糖応答性分子ネックレスを用いたインスリン コントロールドリリースシステムに関する研究

関 智宏

略語一覧			• 1
総論の部 緒言			
лн 🗀			• 3
第1章 =	末端修飾 PEG の調製と評価		
		• •	• 7
第1節	末端修飾 PEG の調製		• 8
第2節	末端修飾 PEG の分子ネックレス形成能の評価		. 0
			• 9
第3節	小括		. 16
			10
第2章 I	PBA 誘導体修飾γ-CyD の合成とその評価		
左 1 左	DD A 悉道是收款,C-D の会已	• • •	17
<b>另</b> I 即	PBA 誘導体修飾γ-CyD の合成		18
第2節	PBA 誘導体修飾γ-CyD の糖結合能の評価		
			_
第3節評価	PBA 誘導体修飾γ-CyD の末端修飾 PEG との分子ネックレス	、形成丽	己の
н і іші			20
第4節	末端修飾 PEG/PBA 誘導体修飾γ-CyD 分子ネックレスの糖応	答の評	平価
			. 23
第5節	小括		23
			33
笛3音 =	末端修飾 PEG-Ins/PBA 誘導体修飾γ-CyD 分子ネックレスの評	吃価	
ガッキ ブ	へ細じ岬ΙEG-IIIS/ΓDA 奶等平じ岬γ-CyD 万丁个ックレクのデ		• 34
第1節	末端修飾 PEG-Ins の調製		

•	•	• 35	
		33	

第2節 末端修飾 PEG-Ins/PBA 誘導体修飾γ-CyD 分子ネック	アレスの糖応答
末端修飾 PEG-Ins 放出の評価	
	• • • 39
第3節 小括	
	• • • 41
結論	
	• • • 43
⇒41.7.÷	
謝辞 ····································	
	• • • 45
	1 1 43
実験の部	
第1章 実験の部	
	• • • 46
第2章 実験の部	
	• • • 49
第3章 実験の部	
	• • • 62
to the state	
参考文献	
	• • • 65

### 略語一覧

本論文中では、以下に示す記号を略語として用いた。

ARS alizarin red S

Bn-PEG 末端ベンゼン修飾ポリエチレングリコール

CHCA 3,5-dimethoxy-4-hydroxycinnamic acid

Con A コンカナバリン A

COSY correlation spectroscopy

CyD シクロデキストリン

dNBn-PEG 末端 *m*-ジニトロベンゼン修飾ポリエチレングリコール

EG エチレングリコール

Fru D-フルクトース

Glc D-グルコース

HEPES 2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]ethanesulfonic acid

HMQC hetero-nuclear multiple quantum coherence

ICD 誘起円偏光二色性

Ins インスリン

Naph-PEG 末端ナフタレン修飾ポリエチレングリコール

Naph-PEG-Ins 片末端ナフタレン修飾ポリエチレングリコール化インスリン

NOESY nuclear Overhauser effect spectroscopy

NPBA-γ-CyD 3-carboxy-5-nitrophenylboronic acid 修飾γ-シクロデキストリン

One-Naph-PEG 片末端ナフタレン修飾ポリエチレングリコール

PBA phenylboronic acid

PBA-γ-CyD 4-carboxyphenylboronic acid 修飾γ-シクロデキストリン

PEG ポリエチレングリコール

PEG-Ins ポリエチレングリコール修飾インスリン

PXRD 粉末 X 線回折

STZ streptozocin

TOCSY totally correlation spectroscopy

# 総論の部

# 緒言

食事の摂取により血糖値は上昇するが、それを引き金に血糖値を下げるインスリン(Ins)が分泌される。2015年時点において、糖尿病患者は世界で4億人に達し、その中でもIns分泌能を欠く糖尿病患者はInsの自己注射による補充が必須となる<sup>1</sup>。Ins自己注射製剤にはInsの基礎分泌を補う持続型や中間型から、食後の追加分泌を補う超速効型まで、多くの製剤が広く用いられている<sup>2</sup>。しかし、血糖値に応じたIns投与は難しく、低血糖のリスクがあり、重篤な場合には死に至る。

この問題を克服するために、血糖値を自ら感知して、Insを必要なときに放出する人工膵臓システムの開発がいくつかのアプローチで行われている<sup>3</sup>。一つのアプローチとして、電気機器であるグルコース(Glc)センサーとInsポンプを組合せたものがある。これとは別に、生体内に投与されるIns製剤自体にGlc 応答放出機能を持たせる試みがある。その一例として、糖鎖結合タンパク質のコンカナバリン(Con A)を利用した高分子ゲルの報告がある<sup>4</sup>。糖鎖結合高分子にCon Aを保持させると高分子中の糖鎖と複数結合し、Con Aが高分子の架橋点の様に働きゲルは収縮する。Glcを添加すると、Con AはフリーのGlcとの結合により置換され、架橋が切れることでゲルが膨張する。ゲル内にInsを分散させておくとGlc濃度が高い場合にゲルが膨潤してIns放出を促進し、Glc濃度が低い場合にはゲルが収縮してIns放出を抑制する。しかし上記の糖応答性のIns放出制御にはタンパク質であるCon Aが利用されており、安定性や免疫原性などの問題を克服する必要がある。

これに対して、タンパク質などを利用しない化学的なアプローチがあり、Glcと結合する特性を持つフェニルボロン酸(PBA)が応用されている(Fig. 1)。PBAは糖類などのcis-ジオールを介して結合する特性があり、糖と結合すると負電荷を持ちやすくなることから、糖化学センサーとして用いられている5-10。PBAが修飾された架橋高分子ゲルでは、Glc濃度の上昇によってPBAとグルコースが結合し、静電的反発が生じることでゲルが膨潤する。その高分子ゲル中にInsを保持させ、血糖値に応じてInsを放出する仕組みとなっている11。

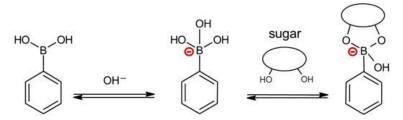


Fig. 1. Equilibria of phenylboronic acid.

上記の様な人工膵臓システムの開発は多数試みられているが、実用化の例はなく、ゲル中の拡散性の変化に基づくシステムでは放出の制御が不十分であると考えられる。糖レスポンスの向上にはより直接的に Ins を放出するシステムが必要である。また、高分子ゲルのシステムは一般的に小型化が難しく、生体適合性に関しても解決しなければならない。しかしながら、PBA 自体は Con A の様なタンパク質の利用を回避でき、糖センサーとして魅力的であることから、本研究の Ins 放出制御システムにおける糖センサー素材として PBA を用いることとした。

そこで新たに著者は、PBA を用いた Glc 応答 Ins 放出制御に、単分子が持つ特性を超えた構造や機能を創りだす超分子集合体を組合せることで、これまでの高分子ゲルとは異なる新規の動作原理を有する Glc 応答性 Ins 放出制御製剤を開発できるのではないかと考えた。生体適合性の高い超分子複合体として、多数のシクロデキストリン(CyD)が、鎖状高分子のポリエチレングリコール(PEG)を包接した分子ネックレス構造(Fig. 2)が挙げられる 12,13。

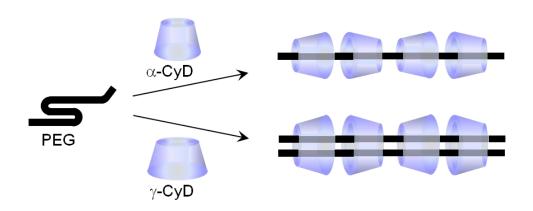


Fig. 2. Molecular necklaces of PEG/α-CyD and PEG/γ-CyD.

CyD は環状のマルトオリゴ糖で、その中でも特に Glc ユニットが 6, 7, 8 個から環が形成される $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ -CyD は、医薬品、食品や化粧品の添加剤として幅広く用いられ、生体適合性が高いことが知られている  $^{14-18}$ 。 CyD は空孔の内部が疎

水性、外部が親水性のホスト分子であり、その空孔のサイズに応じて分子を包接することができる。また、鎖状高分子を包接することも可能であり、 $\alpha$ -CyDは PEGを1本、 $\gamma$ -CyDは PEGを2本包接した状態で難水溶性の分子ネックレス固体を形成することが報告されている(Fig. 2)  $^{12,13}$ 。分子ネックレス中の CyDは溶液中で PEG鎖上をスライドすることが可能であり、CyD空孔の水酸基への官能基導入により環境に応答して CyD が軸分子上を移動する分子マシンなど、発見以来多数の応用研究が報告されている  $^{19-31}$ 。

一方、タンパク質への PEG 修飾により物理的・化学的安定性、溶解性、血中滞留性、免疫原性の改善が得られるため、PEG 化技術はタンパク質性医薬品の上記問題を解決できる有用な方法として注目され、多くのタンパク質医薬品に利用されている <sup>32,33</sup>。この PEG 化技術は Ins にも応用されており (PEG-Ins)、本研究の糖応答分子ネックレスの軸成分として PEG-Ins を用いることが可能である。これらを背景として本研究で企画した Glc 応答性分子ネックレスを用いたインスリン放出制御システムの概念図を Fig. 3 に示す。

糖センサーである PBA 誘導体が化学修飾された CyD (PBA 誘導体修飾 CyD) が PEG-Ins を多数で包接した PEG-Ins/PBA 誘導体修飾 CyD は正常血糖では難水溶性の分子ネックレス構造を維持するので PEG-Ins の放出は遅いと予想される。血糖値が上昇した場合、PBA 誘導体修飾 CyD の PBA 誘導体残基と Glcとの結合を引き金に、分子ネックレス中の PBA 誘導体修飾 CyD が、PEG 鎖を抜けることで分子ネックレスの崩壊が進み、PEG-Ins が放出されると期待される(Fig. 3)。その分子ネックレス崩壊機構としては、Glcと結合した PBA 部分が負電荷を生じ、近接する PBA 誘導体修飾 CyD 間での静電的反発によってPEG 鎖を PBA 誘導体修飾 CyD が抜けてくことが予想される。

分子ネックレス構造を応用した本システムは、糖を感知した際に、CyD が PEG 鎖をスライドして抜けていくという分子レベルで制御された構造変化を 生みだすことが期待でき、ゲル中の拡散性により制御する方法と異なり、より直接的な機構により放出が制御されるこれまでに報告のないユニークなものである。

本システムを実用可能なものとするには、Glc への応答だけでなく、活性を維持した Ins への PEG 化なども課題として挙げられるが、PEG 化タンパク質については多くの研究が報告されており、それらの知見を利用することとした。一方で、修飾 CyD の分子ネックレスは調製すること自体が難しく、さらに刺激応答性を持たせた報告は存在しない新規性の高いものであるため、目指すシステムの基礎となる PEG 鎖と PBA 誘導体修飾 CyD の設計、それらを用いた分子ネックレスの Glc 応答性の改良を中心とした研究を行うこととした。

そこで第1章では、末端修飾PEGの調製と分子ネックレス形成能を評価した。第2章では、PBA 誘導体修飾 CyD の合成とその分子ネックレスの調製、さらにはその糖応答性について評価した。第3章では、応用を目指した検討として末端修飾 PEG 化 Ins (末端修飾 PEG-Ins)の調製、PBA 誘導体修飾 CyD との分子ネックレスの調製、その糖応答性末端修飾 PEG-Ins について評価した。尚、PBA 修飾を行う CyD としては $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ -CyD が挙げられるが、組合せを探索する上で PBA を CyD 空孔の狭い口に修飾した PBA- $\alpha$ -CyD は近接する CyD 空孔に PBA 修飾基が CyD 空孔の広い口より分子間包接され、その構造が連続した Head-to-Tail の超分子ポリマーを、PBA- $\beta$ -CyD は近接するその 2 分子が互いの PBA 修飾基 CyD 空孔の狭い口側から互い違いに包接した Head-to-Head の超分子ダイマーを形成した(Fig. 4)  $^{34,35}$ 。すなわち PBA- $\alpha$ -CyD と PBA- $\beta$ -CyD はそれぞれ 単独で超分子構造を形成し、高分子鎖を包接しないことがわかったため、本研究では PBA 誘導体修飾 $\gamma$ -CyD を用いることとした。

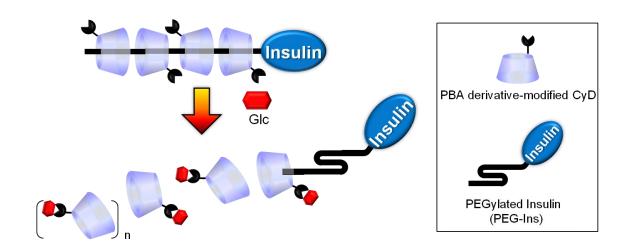


Fig. 3. A schematic illustration of PEG-Ins/PBA-modified CyD molecular necklace and its PEG-Ins release in response to Glc.

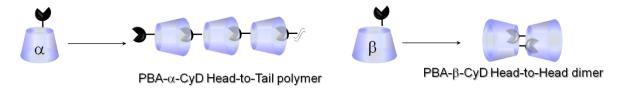


Fig. 4. Supramolecular structures of PBA-α-CyD and PBA-β-CyD.

#### 第1章 末端修飾 PEG の調製と評価

α-CyD 及びγ-CyD は分子量 1,000 ~ 2,000 程度の PEG との水中共存により速やかに分子ネックレス固体を形成するが、CyD の水酸基に化学修飾を施すと、その分子ネックレス形成能が減少するためか、化学修飾 CyD から分子ネックレスを作る報告は非常に少ない。多くの報告では非修飾 CyD から、分子ネックレス形成後、高分子鎖の両末端を CyD が鎖上から抜けていかないような嵩高い分子で塞いだ後に、分子ネックレスに刺激応答機能を付与するための CyD 上への分子修飾が行われる <sup>25</sup>。しかしながら、本研究で目的とする糖応答 Ins 放出制御システムは、糖と PBA 誘導体修飾 CyD が反応した後に PEG 鎖を抜けていくことで Ins が放出される機構であるため、PEG 鎖末端の封鎖を行わずに、CyD に PBA 誘導体を修飾した後に PEG 鎖との分子ネックレスの調製をする必要がある。本研究の予備検討においても、PBA 誘導体修飾γ-CyDと PEG の分子ネックレス固体形成が著しく遅く、固体収率も低いことが観察されているため、修飾 CyD を用いた効率的な分子ネックレス調製において、鎖状高分子の構造についても検討する必要がある。

この課題に対して、CyD 空孔に包接されやすい低分子を PEG 鎖末端に修飾し、PBA 誘導体修飾 CyD が PEG 鎖末端を効率的に認識することで、分子ネックレス形成能の向上が期待できると考えた(Fig. 5)。そこで本章では、PEG 鎖末端への分子修飾を行い、非修飾 CyD 及び PBA 誘導体修飾 CyD との分子ネックレス形成能を評価した。

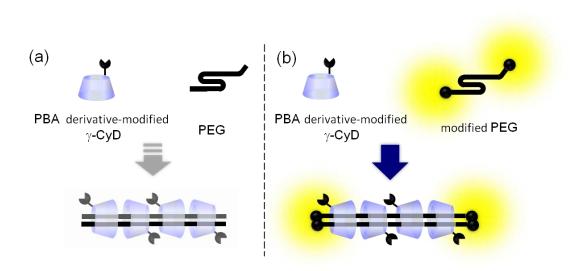


Fig.5. A poor molecular necklace-formation ability of non-modified PEG with modified CyD (a) and an improved molecular necklace-formation ability of modified PEG with modified CyD (b).

#### 第1節 末端修飾 PEG の調製

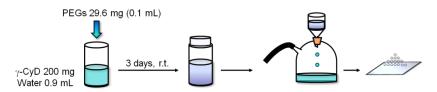
γ-CyD のゲストとして包接される低分子が多数報告されている中で、参考文献を基にベンゼン、ジニトロベンゼン、ナフタレンを PEG 鎖末端への修飾基として選択した <sup>13,36</sup>。すなわち、benzoyl chloride、3,5-dinitrobenzoyl chloride、naphthoyl chloride をそれぞれ、dichloromethane (DCM)中で PEG (MW2,000)の両末端水酸基へ反応させ、benzoyl PEG (Bn-PEG)、3,5-dinitrobenzoyl PEG (dNBn-PEG)、naphthoyl PEG (Naph-PEG)を調製した(Scheme 1)<sup>37</sup>。末端修飾の確認は、マトリックス支援レーザー脱離イオン化法質量分析 (MALDI-TOF MS)、核磁気共鳴 (NMR)スペクトル測定によって行い、どちらの測定からも Bn-PEG、dNBn-PEG、Naph-PEG はそれぞれ両末端がほぼ完全に修飾されたものとして得られたことがわかった。

Scheme 1. Terminal modification of PEG chain.

<sup>&</sup>lt;sup>a</sup> Modification ratios were calculated by NMR peak intensity ratio of modified group and PEG chain in DMSO- $d_6$ .

#### 第2節 末端修飾 PEG の分子ネックレス形成能の評価

末端修飾 PEG の修飾 CyD の分子ネックレス形成能評価の予備的検討として非修飾  $\gamma$ -CyD との分子ネックレスの調製を行った。すなわち Bn-PEG、dNBn-PEG、Naph-PEG、そしてコントロールとして非修飾 PEG それぞれ 29.6 mg を水 1.0 mL 中で $\gamma$ -CyD 200 mg と共存させ、室温で 3 日間静置した。形成した分子ネックレス固体をフィルター濾過( $\phi$ = 0.45  $\mu$ m)により回収した。固体収率は下記の式 1 より算出し、その結果を Table 1 に示す。どの末端修飾 PEGでも本条件では高い収率で分子ネックレスが得られた。



Scheme 2. Preparation of modified-PEG/γ-CyD molecular necklace.

Table 1. Yields of molecular necklaces as a solid state.

Molecular necklace	Yield(%)
PEG/γ-CyD	99.0%
Bn-PEG/γ-CyD	95.3%
dNBn-PEG/γ-CyD	79.5%
Naph-PEG/γ-CyD	75.0%

Yield (%) =   

$$\frac{$$
 固体収量(mg)}{  $(\gamma - \text{CyD}$ 仕込み量(mg) + 修飾PEG仕込み量(mg)  $)$  ・・・(式1)

PEG 末端へ修飾された分子の違いによって、形成される分子ネックレスの構造に違いが生じるかどうかを調べるため、粉末 X 線回折(PXRD)測定および <sup>1</sup>H NMR 測定を行った。過去の報告から、γ-CyD と PEG の分子ネックレスの結晶は、CyD の広い口同士、狭い口同士が向き合いながら PEG 鎖を包接し、その構造が連続した Head-to-Head の正方晶チャネル型構造として知られている <sup>38-43</sup>。本検討で調製した各種修飾 PEG/γ-CyD 分子ネックレスは PEG 鎖末端修飾基の違いに依存せずに同様のパターンを示し、PEG/γ-CyD と同一の構造をとっていることが明らかとなった(Fig. 6)。 Table 2 に、 <sup>1</sup>H NMR スペクトル測定により求めた分子ネックレスを構成する PEG 鎖と CyD の化学量論比を示した。 3.5 ppm 付近に PEG 鎖のエチレングリコール(EG) unit のプロトンのピークが、 4.9 ppm 付近に CyD を構成する Glc 環 1 位のプロトン(H-1)のピーク

が観察された。これらの積分比から EG units: CyD を求めると、PEG/γ-CyD、Bn-PEG/γ-CyD、Naph-PEG/γ-

CyD の分子ネックレスは約 4:1 という比率となった。Harada 等の報告によると、CyD 空孔の深さ(6.7 Å)が EG unit 2 つの長さ(6.6 Å)と等しく、通常 $\gamma$ -CyD は PEG 鎖を 2 本包接して分子ネックレスを形成するため、CyD が完全に PEG 鎖を被覆すると EG unit: CyD は 4:1 となる  $^{12,13,44}$ 。

本検討では、 $dNBn-PEG/\gamma-CyD$  は若干 EG unit の割合が多く、PEG 鎖を包接により被覆する率が若干低かったが、末端修飾 PEG の種類に依存せずに $\gamma-CyD$  に PEG 鎖が 2 本包接されて同様な分子ネックレスを形成したことがわかった。

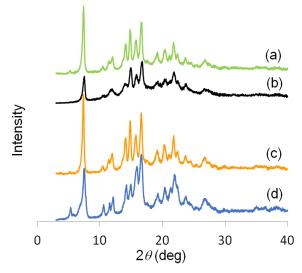
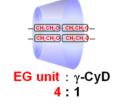


Fig. 6. PXRD patterns of molecular necklaces; (a) Bn-PEG/γ-CyD, (b) Naph-PEG/γ-CyD, (c) dNBn-PEG/γ-CyD and (d) PEG/γ-CyD.

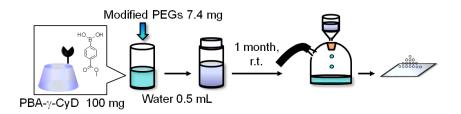
Table 2. Stoichiometries of molecular necklaces determined by  $^{1}H$  NMR and the reported structure with the stoichiometry of EG units:  $\gamma$ -CyD = 4 : 1.

Molecular necklaces	Inte	nsity	- EG unit : CyD	
Wolectiai flecklaces	PEG	CyD	EG unit . CyD	
PEG/γ-CyD	19.5	8.0	4.4:1.0	
Bn-PEG/γ-CyD	18.1	8.0	4.5:1.0	
Naph-PEG/γ-CyD	15.9	8.0	4.0:1.0	
dNBn-PEG/γ-CyD	23.8	8.0	5.9:1.0	



本章の目的である、修飾 CyD の分子ネックレス形成においてより有利に働く PEG 鎖末端への分子修飾効果を調査するため、4-carboxyPBA が $\gamma$ -CyD の 6 位水酸基にエステル結合した PBA 誘導体修飾 $\gamma$ -CyD (PBA- $\gamma$ -CyD)を用いて分子ネックレスの調製を行った(PBA- $\gamma$ -CyD の合成は第 2 章 1 節で詳述する)。水 0.500 mL 中に PBA- $\gamma$ -CyD 100.0 mg と各種修飾 PEG 7.4 mg を共存させ、室温で 1 ヶ月間静置した後に形成した分子ネックレス固体をフィルター濾過( $\phi$ = 0.45  $\mu$ m)により回収した。また、最終収量のみでなく分子ネックレスの形成過程からも PEG への末端修飾の効果を比較するため、固体が形成されるに従って上昇する濁度 ( $\tau$ ) を吸光度計の利用により追跡した。水 1.300 mL に PBA- $\gamma$ -CyD 100.0 mg を溶かした溶液に、各種末端修飾 PEG 7.4 mg を含む 0.2 mL 水溶液を添加した際の $\tau$ 上昇を、撹拌下、25°C でモニターした。

固体収量と24時間目の $\tau$ 値を、Table 3に示した。固体収量、 $\tau$ 値共にNaph-PEGを用いた場合、分子ネックレスの形成が速く、収量も多かった。一方で、dNBn-PEGでは分子ネックレス固体は形成されなかった。非修飾 $\gamma$ -CyD とでは分子ネックレス固体を良く形成するdNBn-PEGは、その末端が比較的嵩高く、PBA導入により空孔の通過性の変化したPBA- $\gamma$ -CyD とは分子ネックレスを形成しなかったと考えられた(Fig. 7)。これらのことから、PBA 誘導体修飾 CyDを用いた効率的な分子ネックレス 調製において本章で検討した中でNaph-PEG が最も良いことがわかり、今後の検討に用いることとした。



Scheme 3. Preparation of modified-PEG/PBA-γ-CyD molecular necklace.

Table 3. Yields of modified PEG/PBA- $\gamma$ -CyD molecular necklaces and  $\tau$  values with respect to a molecular necklace-formation process.

Molecular necklaces	$\tau(24hr)$	Yield (%)
PEG/PBA-γ-CyD	0.12	52.9
Bn-PEG/PBA- $\gamma$ -CyD	0.88	74.7
Naph-PEG/PBA-γ-CyD	1.77	78.9
dNBn-PEG/PBA-γ-CyD	0.16	0

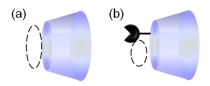


Fig. 7. A narrowed space of primary hydroxyl face due to the modification of PBA group.

PBA-γ-CvD が示した低い分子ネックレス形成能は修飾された PBA 部分の配向 に影響を受けていると考えられたことことから、PBA-γ-CyD のセンサー部分の 配向を知るために、誘起円偏光二色性(ICD)スペクトル法によって検討した。CyD 空孔の不斉場におかれたPBA誘導体修飾基の遷移モーメントとCvD空孔の軸の 成す相対位置・角度の情報が得られる。Harataと Uedaira の報告によれば、ゲス ト分子または修飾された分子の遷移モーメントが CyD 空孔の軸と平行またはそ れに近い場合に正のコットン効果を示し、その成す角が 54.7°を境に正負が逆転 し、遷移モーメントが垂直またはそれに近い場合に負のコットン効果を示す(Fig. 8)<sup>16,45</sup>。Figure 9 には、量子化学計算から求めた PBA 修飾基の遷移モーメントを 示す(Gaussian09, Density functional theory, B3LYP/6-31+G (2d))。測定は PBA 修飾 基が分子形として存在する様に pH3.5 - 4.5 の水を用い、また、PBA-γ-CyD が単 分子として存在するような比較的低濃度の条件として 0.15 mM で行った。ICD スペクトルの測定結果を Fig. 10 に示す。PBA-γ-CyD は 241 nm に負のコットン 効果を示した。量子化学計算からは、PBA 修飾基が 247 nm において遷移モーメ ント(I)を持つことが予測され、この負のコットン効果は PBA 修飾基が CyD 空孔 の軸に対して大きく傾いて配向していることを示す(Fig. 11a, 11b)。この ICD ス ペクトルの解析より、修飾された PBA 部分が空孔を覆うように配向しているこ とで、PEG 鎖が通過できる有効なスペースが減少し、分子ネックレスの形成が されにくくなったと考察した(Fig. 11c)。

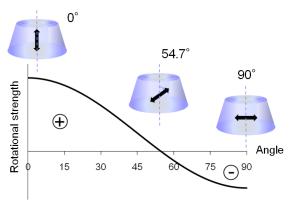


Fig. 8. A schematic illustration of the relation between the angle to the axis of the CyD cavity of dipole moments and the cotton effect.

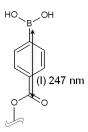


Fig. 9. The transition moment of PBA moiety calculated by Gaussian suite of programs using DFT calculations at the B3LYP/6-31+G (2d) level of theory.

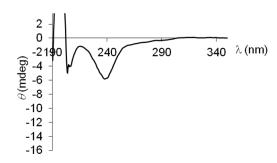


Fig. 10. ICD spectrum of PBA- $\gamma$ -CyD 0.15 mM at 25°C in water.

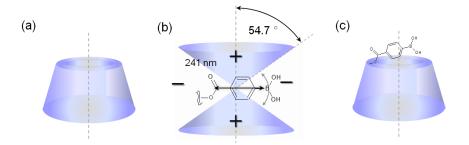


Fig 11. Proposed molecular orientations: (a) the axis of CyD cavity, (b) molecular orientation of PBA to the axis of the CyD cavity amd (c) PBA moiety at the PBA-γ-CyD.

最も高い分子ネックレス形成能を示した Naph-PEG/PBA- $\gamma$ -CyD について PEG 鎖と CyD の化学量論比を求めるため、NMR 測定を行った(Fig. 12)。 Naph-PEG/ $\gamma$ -CyD は EG units : CyD = 4:1 で PEG 鎖 2 本の分子ネックレスであることが確認されたのに対し、Naph-PEG/PBA- $\gamma$ -CyD ではその値が 2:1 となり、1 本鎖の分子ネックレスであることが示唆された(Table 4, Fig. 13)。 Naph-PEG/PBA- $\gamma$ -CyD の調製において、様々な EG/CyD の仕込み比についても検討したが、得られる固体は EG units/CyD 仕込み比に依存せず EG unit : CyD = 2:1 という値を示した(Fig. 14)。このことからも PBA- $\gamma$ -CyD と NPBA- $\gamma$ -CyD は PEG鎖を 1 本のみ包接して分子ネックレスを形成したことが示された。空孔の大きな $\gamma$ -CyD で PEG 鎖 1 本のみを包接して形成された分子ネックレスの報告はこれまでになく、PBA- $\gamma$ -CyD を用いた場合に、1 本鎖の分子ネックレスとして新規性の高い構造が得られたことを明らかにした。

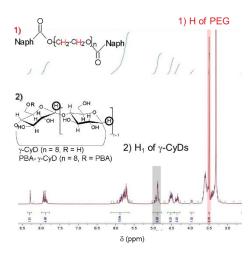


Fig. 12. The <sup>1</sup>H NMR spectrum of Naph-PEG/PBA- $\gamma$ -CyD molecular necklace in DMSO- $d_6$  at 25°C.

Table 4. Stoichiometries of molecular necklaces determined by <sup>1</sup>H NMR.

Molecular necklace	Inte	nsity	- EG unit : CyD
Molecular necklace	PEG	CyD	- EG uiiit : CyD
Naph-PEG/γ-CyD	17.4	8.0	4.4:1.0
Naph-PEG/PBA-γ-CyD	8.1	8.0	2.0:1.0

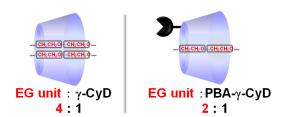


Fig. 13. The double stranded molecular necklace of Naph-PEG/γ-CyD (left) and the single stranded molecular necklace of Naph-PEG/PBA-γ-CyD (right).

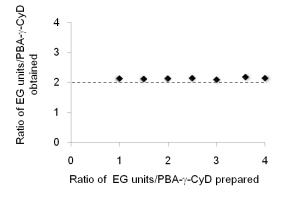


Fig. 14. The stoichiometry of EG units and PBA-γ-CyD in the Naph-PEG/PBA-γ-CyD molecular necklace determined by <sup>1</sup>H NMR with various ratios of EG units and PBA-γ-CyD prepared.

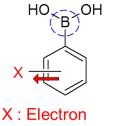
#### 第3節 小括

本章では、PEG 鎖末端修飾分子の異なる Bn-PEG、Naph-PEG、dNBn-PEG を調製した。各種末端修飾 PEG の、γ-CyD との分子ネックレス形成能や固体結晶の構造は PEG 末端の修飾分子の違いによらず、一定であった。一方、分子ネックレス形成が難しい PBA-γ-CyD との組合せでは、Naph-PEG が最も高い分子ネックレス形成能を示した。また、γ-CyD との分子ネックレス形成に有利であると報告のある dNBn-PEG においては、PBA-γ-CyD との分子ネックレス固体が得られず、CyD への PBA 修飾により PEG 鎖末端の CyD 空孔通過性が変化していることが考えられた。ICD スペクトル解析から、PBA 部分が CyD 空孔の軸に対して傾いて配向していることがわかり、PEG 鎖の通過性の低下によって低い分子ネックレス形成性を示したと考察された。本章の検討から、Naph-PEG が修飾 CyD との分子ネックレス形成に最適な末端修飾 PEG であると選択し、その後の検討に用いることとした。この Naph-PEG と PBA-γ-CyD の組合せで得られた Naph-PEG/PBA-γ-CyD の分子ネックレスは、空孔の大きなγ-CyD のものとしてはこれまでに報告のない、PEG 鎖を 1 本のみ包接した構造として形成されたことが明らかとなった。

# 第2章 PBA 誘導体修飾γ-CyD の合成とその評価

本章では、分子ネックレスへの糖応答機能を付与するため、 $\gamma$ -CyD に PBA 誘導体修飾基を導入し、PBA 誘導体修飾 $\gamma$ -CyD と Naph-PEG を用いて分子ネックレスを調製し、その糖応答性を評価した。その際、より高い Glc 応答性を目指し、1章の PBA- $\gamma$ -CyD のほかに、糖結合能のより高い PBA 誘導体の修飾とその分子ネックレスの調製を試みた。すなわち、Fig. 15 に示す3-carboxy-5-nitroPBA (NPBA)を $\gamma$ -CyD へ修飾する誘導体として選択した。Figure 16 に示す様に PBA 環に電子吸引基を有する誘導体は、ホウ素原子の電子密度が低下することで、糖結合能が増加する傾向にあることが知られており  $^{46}$ 、NPBA は電子吸引基としてニトロ基を有するため糖結合能の高い誘導体として分子ネックレスの Glc 応答向上に寄与することが予想される。また、PBA 及び NPBA の異なる PBA 誘導体を有する分子ネックレスの構造解析からも、糖応答の違いについて考察した。

Fig. 15. PBA derivatives selected as a Glc sensor group for attaching to  $\gamma$ -CyD.



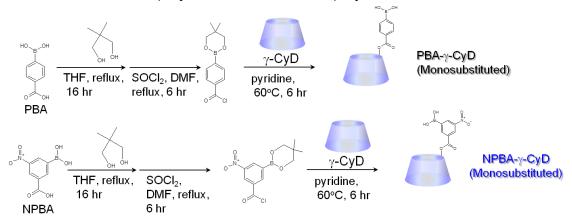
withdrawing group

Fig. 16. A PBA derivative with an electron withdrawing group.

# 第1節 PBA 誘導体修飾γ-CyD の合成

 $\gamma$ -CyD はその空孔の狭い口に Glc 環 6 位の 1 級水酸基を、また空孔の広い口に Glc 環 2 位と 3 位の 2 級水酸基を有するが、そのうち 6 位の水酸基を介して PBA 誘導体を導入することとした  $^{16,37}$ 。 反応と分離操作の条件によっては 1 分子の CyD に 2 分子以上の PBA 誘導体を導入することも可能であるが、修飾 CyD 自 体の溶解性や分子ネックレス形成能が著しく低下する恐れがあるため、本研究では一点修飾体をそれぞれ得ることとした。

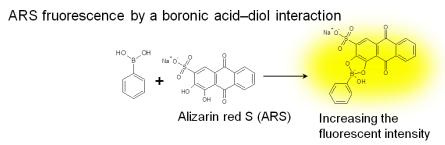
始めに、PBA, NPBA 共に SOCl<sub>2</sub> を用いてカルボン酸部分を酸塩化物に誘導体化し、続いて $\gamma$ -CyD の 1 級水酸基との反応によりエステル結合を介してそれぞれの PBA 誘導体を結合した。 さらにカラム分離により PBA または NPBA が 1 分子のみ修飾された $\gamma$ -CyD をそれぞれ得た(PBA  $\gamma$ -CyD, NPBA- $\gamma$ -CyD)。 それぞれ、FAB Mass スペクトルと  $^{1}$ H NMR スペクトルから 1 点修飾体が得られたことを確認した。収率は PBA  $\gamma$ -CyD が 26.2%、NPBA- $\gamma$ -CyD が 12.6%であった。



Scheme 4. Syntheses of PBA-γ-CyD and NPBA-γ-CyD.

# 第2節 PBA 誘導体修飾y-CyD の糖結合能の評価

合成により得た PBA- $\gamma$ -CyD および NPBA- $\gamma$ -CyD の Glc 結合能を調べた。 Figure 17 に示す様に、alizarin red S (ARS)が PBA と結合することで生じる蛍光を利用し、Glc 濃度の上昇に伴い結合が置換されて減少する ARS 蛍光をモニターすることで結合定数を算出した  $^{47}$ 。 PBA 誘導体と ARS, PBA 誘導体と Glc の結合はそれぞれ 1:1 の結合モデルと仮定した。本実験では Glc と同様に PBA との結合性を示すフルクトース (Fru) の結合定数も調査した。 Table 5 に示す様に NPBA- $\gamma$ -CyD は PBA- $\gamma$ -CyD よりも高い Glc への結合定数を有していた。これは予想した様に、NPBA が電子吸引基としてニトロ基を有することで、ホウ素部分の電子密度が低い状態にあり、それに起因して Glc への結合性がより高かったと考えられる  $^{46}$ 。 Fru に対しては、PBA- $\gamma$ -CyD、NPBA- $\gamma$ -CyD 共に Glc に対する結合定数よりも高い値を示した。この結果は、Fru の方が Glc よりも高い親和性を有するという PBA の一般的性質と一致した。



Three-component competitive system

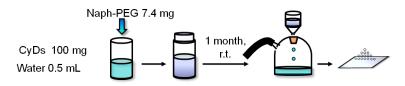
Fig. 17. Schematic illustrations of ARS fluorescence enhanced by binding with PBA derivative and decreased by competitive binding of PBA derivative and Glc.

Table 5. Binding constants of PBA-γ-CyD and NPBA-γ-CyD to sugar.

	PBA-γ-CyD	NPBA-γ-CyD
Gle	8.0 M <sup>-1</sup>	50.1 M <sup>-1</sup>
Fru	$200.9{ m M}^{-1}$	$874.0~{ m M}^{-1}$

# 第 3 節 PBA 誘導体修飾γ-CyD の末端修飾 PEG との分子ネックレス形成能の評価

第1章の検討で分子ネックレス形成に有利とわかった Naph-PEG を軸分子とし て用い、PBA-γ-CvD および NPBA-γ-CvD との分子ネックレスを調製した。調製 方法を Scheme 5 に示す。水 0.5 mL 中に PBA-γ-CvD または NPBA-γ-CvD をそれ ぞれ 100.0 mg 溶解させ、その後 7.4 mg の Naph-PEG を添加した後に室温で静置 した。 $1 \, \text{ヶ月後に形成した固体をフィルター濾過(} \phi = 0.45 \, \mu\text{m})$ により回収すると それぞれ収率78.9%, 62.9%であった(Table 6)。最終収率に大きな差はなかったが、 調製初期において NPBA-γ-CyD を CyD 成分として用いた場合に PBA-γ-CyD より も速やかに Naph-PEG との分子ネックレス形成による白色沈殿が観察された。分 子ネックレスの形成過程を調べるため、吸光度計による*t*測定を第1章2節と同 様な方法で経時的に追跡した。Figure 18 にその結果を示す。比較のために用い た非修飾 $\gamma$ -CyD では Naph-PEG の添加直後から $\tau$ 値上昇を示し、速やかに分子ネ ックレス固体が形成された。一方、 $PBA-\gamma-CyD$ では測定時間内では $\tau$ 値の上昇が 観察されなかった。NPBA-y-CvDは、非修飾y-CvDよりは分子ネックレス形成が 遅いものの、PBA-γ-CyD より明らかに速やかな分子ネックレス形成を示した。 これは CvD に結合した PBA 修飾基の構造や配向の違いによって、CvD 空孔へ のPEG鎖の包接のされやすさが異なるためと考えられた。



Scheme 5. Preparation of PBA modified γ-CyD and Naph-PEG.

Table 6. Yields of Naph-PEG/PBA modified γ-CyD molecular necklaces.

Molecular necklace	Yield (%)
Naph-PEG/PBA-γ-CyD	78.9
Naph-PEG/NPBA-γ-CyD	62.9
Naph-PEG/ $\gamma$ -CyD	75.0

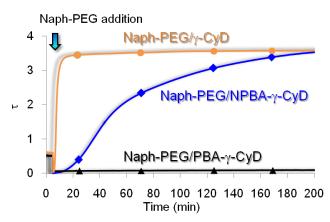


Fig. 18. Evaluation of a molecular necklace-formation ability of CyDs by monitoring formation process (25°C).

NPBA-γ-CyD が示した比較的速やかな分子ネックレスの形成は、修飾された NPBA 部分の配向に影響を受けていると考えられたことことから、 NPBA-γ-CyD のセンサー部分の配向の解析を行った。前章と同様に ICD スペ クトルによって検討した。量子化学計算から求めた NPBA 修飾基の遷移モー メントを Fig. 19 に示す(Gaussian09, Density functional theory, B3LYP/6-31+G (2d))。測定は NPBA 修飾基が分子形として存在する様に pH3.5 – 4.5 の水を用 い、また、NPBA-γ-CyD が単分子として存在するような比較的低濃度の条件と して 0.15 mM で行った。ICD スペクトルの測定結果を Fig. 20 に示す。 NPBA-γ-CyD は 221 nm と 275 nm に負のコットン効果を示し、これらはそれ ぞれ NPBA 修飾基の遷移モーメント(II)と(IV)に帰属される。また、245 nm に 正のコットン効果を示し、これは NPBA の遷移モーメント(III)に帰属される。 遷移モーメント(II)と(IV)は CyD 空孔軸に対して垂直またはそれに近い角を成 し、遷移モーメント(III)は CyD 空孔と平行に近い角度にあることから、CyD 空 孔の軸に対して、Fig. 21b の様に配向していることが考えられた。 この ICD ス ペクトルの解析より、Fig. 21c の様に NPBA 部分が CyD 空孔を塞がずに配向 していることで、PEG 鎖の通過性が良く、分子ネックレス形成が速やかであ ったと考えられた。

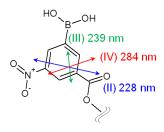


Fig. 19. The transition moment of NPBA moiety calculated by Gaussian suite of programs using DFT calculations at the B3LYP/6-31+G (2d) level of theory.

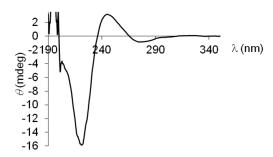


Fig. 20. ICD spectrum of NPBA-γ-CyD at 25°C in water.

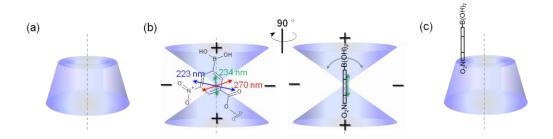


Fig 21. Proposed molecular orientations: (a) the axis of CyD cavity, (b) molecular orientation of NPBA to the axis of the CyD cavity amd (c) NPBA moiety at the

# 第4節 末端修飾 PEG/PBA 誘導体修飾γ-CyD 分子ネックレスの糖応答の評価

得られた Naph-PEG/PBA- $\gamma$ -CyD, Naph-PEG/NPBA- $\gamma$ -CyD のそれぞれの分子ネックレスについて Glc 応答性を調べた。分子ネックレス懸濁液中に Glc 溶液を添加した際のt値の減少を吸光度計での測定により評価した。Figure 22 にその結果を示す。Naph-PEG/PBA- $\gamma$ -CyD および Naph-PEG/NPBA- $\gamma$ -CyD は Glc 濃度の上昇に伴ったt値の減少、すなわち分子ネックレスの崩壊が見られた。それに対し、PBA を有さない Naph-PEG/ $\gamma$ -CyD ではt0値の減少は見られなかった。このことは分子ネックレス中の PBA 誘導体修飾基が Glc センサーとして機能していることを示す。さらに、Naph-PEG/PBA- $\gamma$ -CyD が 50 mM の Glc 濃度でt0が減少し始めたのに対し、Naph-PEG/NPBA-t0の分子ネックレスがより高い Glc 応答性を有していることを示す。

また、Glc 応答性の別の評価方法として、分子ネックレスからの Naph-PEG の 放出を調査した。Figure 23 に結果を示す。Naph-PEG/PBA-γ-CyD および Naph-PEG/NPBA-γ-CyD 分子ネックレス固体からの Naph-PEG 放出は緩衝液中に 比べて Glc 溶液中(100 mM, 200 mM)で大きかった。また、Naph-PEG/NPBA-γ-CyD において Glc 応答はより大きく、NPBA の Glc 結合能が PBA のそれよりも高い ことに起因していると考えられた。さらに、Naph-PEG/NPBA-γ-CyD で Naph-PEG 放出初期において鋭い Glc 応答が見られ、Naph-PEG/PBA-γ-CyD のそれとプロフ ァイル自体が異なった。また、開始15分よりもその後2時間目までにおいて、 累積放出量が一時的に低下する現象が見られた。これらのことは放出メカニズ ム自体が異なる可能性を示唆し、PBA 誘導体修飾基の包接状態や、分子ネック レス構造の違いに起因していると考えられた。すなわち、鋭い Glc 応答を示し た Naph-PEG/NPBA-γ-CyD は、分子ネックレス中で NPBA 修飾基が CyD 空孔に 包接されずに存在し、Glc へのアクセスが良い状態にあることが考えられ、それ に対し、比較的緩やかな Glc 応答を示した Naph-PEG/PBA-γ-CyD は PBA 修飾基 が CyD 空孔に包接されて存在し、Glc へのアクセス性が低いことが考えられた (Fig. 17)。前節の検討で観察された PBA-γ-CyD に比べ NPBA-γ-CyD の速やかな 分子ネックレス形成(Fig. 24)も、NPBA 修飾基が CvD 空孔に包接されないため PEG 鎖の包接を邪魔しなかったと考えられる。本節で見られた Glc 応答性の違 いを考察するため、それぞれの分子ネックレスの構造解析を行った。

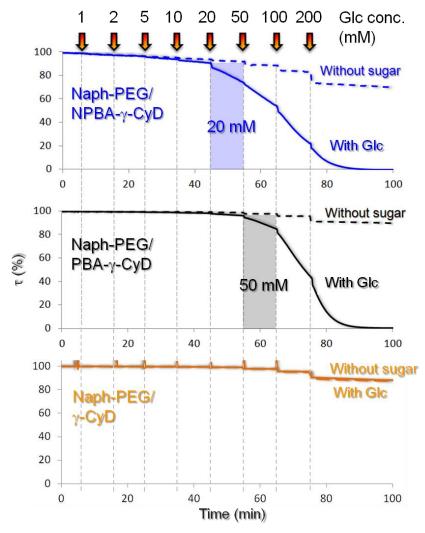


Fig. 22. The turbidity change of the molecular necklaces depending on the sugar concentration (pH 7.4, 37°C).

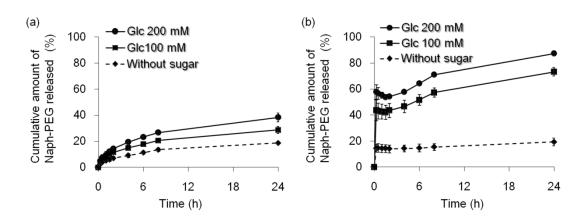


Fig. 23. Release profiles of Naph-PEG from (a) the Naph-PEG/PBA- $\gamma$ -CyD molecular necklace and (b) the Naph-PEG/PBA- $\gamma$ -CyD molecular necklace in the absence and presence of sugars (pH 7.4, 37 °C).

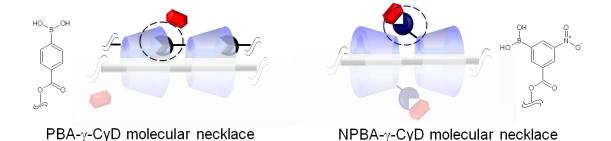


Fig. 24. Anticipated structures of PBA-γ-CyD molecular necklace where PBA moiety is included in the CyD cavity and NPBA-γ-CyD molecular necklace where NPBA moiety is not included.

Naph-PEG 放出実験の結果を踏まえ、観察された Glc 応答性の違いを分子ネ ックレス構造や PBA 誘導体修飾基部分の包接状態の点から考察することとし た。Figure 25 には、それぞれの分子ネックレスの結晶構造の違いを調べるた めに行った PXRD 測定の結果を示す。Naph-PEG/NPBA-γ-CvD は Head-to-Head の正方晶チャネル型構造として知られる Naph-PEG/γ-CyD と同様なパターン を示した。Naph-PEG/NPBA-γ-CyD 結晶が正方晶であることを仮定し、結晶面 (hkl = 200)の回折線 $(2\theta = 7.4^\circ)$ から格子定数 a, b を、結晶面(hkl = 002)の回折線  $(2\theta = 11.9)$ から格子定数 c を、式 2,3 より算出した。これら格子定数を用いて 式 2, 3 から予測された各結晶面の間隔( $d_{cal}$ )と実際に観察された回折ピークの 面間隔( $d_{obs}$ )が良く一致した(Table 7)。特に、Naph-PEG/NPBA- $\gamma$ -CyD の  $2\theta = 5.9^{\circ}$ , 11.9°, 17.9°, 23.9°のピークは、正方晶のc軸(=14.8Å)に垂直な面からの回折 (hkl = 001, 002, 003, 004)に帰属される  $^{48,49}$ 。この c 軸の長さは CyD 2 ユニット 分に相当し(Fig. 26)、 CyD 空孔の狭い口同士、広い口同士が向き合った Head-to-Head の正方晶チャネル型構造であることが確認された。一方で、 Naph-PEG/PBA-γ-CyD 固体は NPBA-γ-CyD や非修飾γ-CyD の分子ネックレスと 全く異なる PXRD パターンを示した。Naph-PEG/PBA-γ-CyD 結晶については、 未知の結晶かつ複雑なパターンであるため、格子定数や面間隔の解析にはい たらなかったが、異なる Glc 応答性を示した Naph-PEG/PBA-γ-CvD と Naph-PEG/NPBA-γ-CyD の 2 つの分子ネックレスは結晶構造が明らかに異なる ことがわかった。Naph-PEG/PBA-γ-CyD において、PBA 修飾基は CyD に包接 されて存在する可能性を考慮すると、近接する CvD 空孔の広い口側からの包 接が予想され(Fig. 24)、すなわち、Head-to-Tail の配列で分子ネックレスの結晶 構造を形成したことが考えられた。

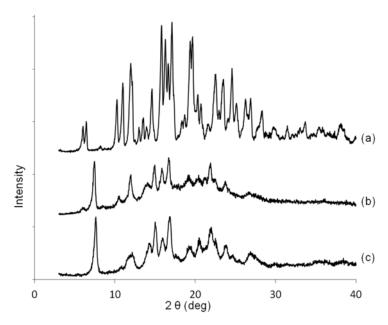


Fig. 25. PXRD patterns: (a) Naph-PEG/PBA- $\gamma$ -CyD molecular necklace,

(b) Naph-PEG/NPBA- $\gamma$ -CyD molecular necklace, and (c) Naph-PEG/ $\gamma$ -CyD molecular necklace.

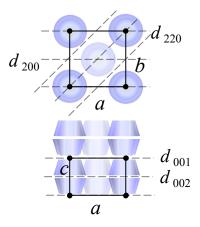


Fig. 26. A schematic illustration of crystal packing structure of Naph-PEG/NPBA- $\gamma$ -CyD molecular necklace.

Table 7. Crystallographic characteristic of Naph-PEG/NPBA-γ-CyD. <sup>a</sup> Calculated assuming a tetragonal unit cell with a = b = 23.76 Å, c = 14.77 Å.

$2~\theta_{\rm obs}({\rm deg})$	(hkl)	$d_{\rm obs}(\rm \AA)$	$d_{\rm cal}({\rm \AA})^{\rm a}$	$2 \theta_{\rm obs}({ m deg})$	(hkl)	$d_{\mathrm{obs}}(\mathrm{\AA})$	$d_{\rm cal}(\rm \AA)^{\rm a}$
5.96	(001)	14.83	14.77	16.66	(420)	5.32	5.31
7.44	(200)	11.88	11.88	16.76	(132)	5.29	5.27
8.26	(210)	10.70	10.63	17.92	(003)	4.95	4.92
10.36	(220)	8.54	8.40	21.08	(521)	4.21	4.23
11.98	(002)	7.39	7.39	21.90	(530)	4.06	4.07
14.02	(202)	6.32	6.27	22.44	(600)	3.96	3.96
14.88	(400)	5.95	5.94	23.74	(004)	3.75	3.69
15.84	(330)	5.59	5.60				

$$2d \sin \theta = \lambda \quad \cdot \quad \cdot \quad (\cancel{\mathbb{Z}} 2)$$

$$d = \frac{1}{\sqrt{\frac{h^2 + k^2}{a^2} + \frac{l^2}{c^2}}} \quad \cdot \quad \cdot \quad (\cancel{\mathbb{Z}} 3)$$

PBA-γ-CyD の分子ネックレスは PEG 鎖 1 本のみを包接していることが 1 章の検討で明らかとなったが、本章で新たに調製した NPBA-γ-CyD の分子ネックレスについてもその化学量論比を、 $^1$ H NMR スペクトル測定により求めた。1 章の方法と同様に 3.5 ppm 付近の PEG 鎖のプロトンピークと、4.9 ppm 付近の CyD H-1 のピークの積分比から EG unit: CyD を求めると、 Naph-PEG/NPBA-γ-CyD の分子ネックレスは Naph-PEG/PBA-γ-CyD のそれと同様に約 2:1 という比率となった(Table 8)。前章で示した様に、非修飾γ-CyD は PEG 鎖を 2 本包接して分子ネックレスを形成するため、CyD が完全に PEG 鎖を被覆すると EG unit: CyD は 4:1 となる  $^{12,13,44}$ 。 Naph-PEG/NPBA-γ-CyD で観察された 2:1 という比率から、PBA-γ-CyD と同様に PEG 鎖を 1 本のみ包接して分子ネックレスを形成したことが考えられた(Fig. 27)。

Table 8. Stoichiometries of molecular necklaces determined by <sup>1</sup>H NMR in DMSO-d<sub>6</sub> at 25°C.

Molecular necklace	Inte	nsity	EC wit CVD	
Molecular necklade	PEG	CyD	- EG unit : CyD	
Naph-PEG/PBA-γ-CyD	8.1	8.0	2.0:1.0	
Naph-PEG/NPBA-γ-CyD	8.5	8.0	2.2:1.0	

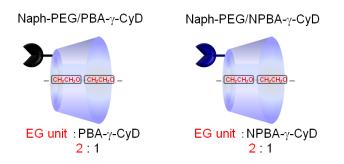


Fig. 27. The single stranded molecular necklace of Naph-PEG/NPBA-γ-CyD determined by <sup>1</sup>H NMR.

PBA- $\gamma$ -CyD および NPBA- $\gamma$ -CyD が PEG 鎖を 1 本のみ包接して分子ネックレスを形成していることを異なる方法からも確認するため、固体蛍光スペクトルの測定から固体中における PEG 鎖の存在状態を調べた。ナフタレンは分子間距離が充分に離れた状態では 360 nm 付近にモノマー発光を示し、ナフタレン同士が2分子で会合した状態では長波長側にエキシマー発光を示す。一方、 $\alpha$ -、 $\beta$ -CyDはナフタレン環を1分子のみ包接するためモノマー発光を示し、 $\gamma$ -CyD は2分子を包接するためエキシマー蛍光を示すことが報告されている  $^{13,50}$ 。

本検討では、比較のために調製した Naph-PEG/ $\alpha$ -CyD はモノマー発光を 360 nm に(Fig. 28a)、Naph-PEG/ $\gamma$ -CyD はエキシマー発光を 400 - 420 nm に示した(Fig. 28b)。Naph-PEG/PBA- $\gamma$ -CyD および Naph-PEG/NPBA- $\gamma$ -CyD はどちらもナフタレンのモノマー発光を示し、1 本鎖分子ネックレスのモデルである Naph-PEG/ $\alpha$ -CyD と同様なピークを有していた(Fig. 28c, 28d)。これらのことから、どちらの分子ネックレスとも PEG 鎖を 1 本のみ包接して固体を形成していることが明らかとなり、PEG 鎖包接数の点からは PBA- $\gamma$ -CyD の分子ネックレス構成と NPBA- $\gamma$ -CyD のそれは同様であった。

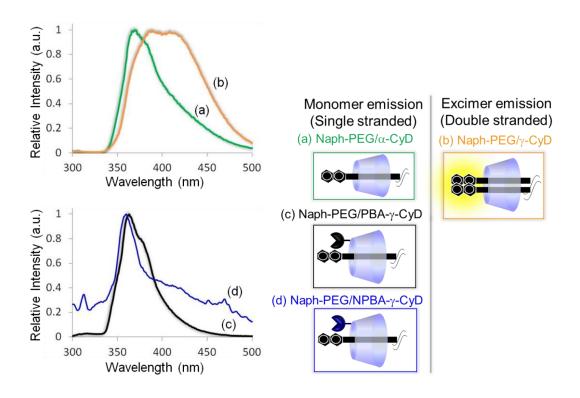


Fig. 28. Solid-state fluorescence spectra of Naph-PEG with (a)  $\alpha$ -CyD, (b)  $\gamma$ -CyD, (c) PBA- $\gamma$ -CyD or (d) NPBA- $\gamma$ -CyD.

Naph-PEG/PBA- $\gamma$ -CyD と Naph-PEG/NPBA- $\gamma$ -CyD で分子ネックレス構造が異なること、またどちらの PBA 誘導体修飾 $\gamma$ -CyD も PEG 鎖 1 本のみを包接して分子ネックレスが形成されることがわかったため、PBA または NPBA 修飾基の包接状態について調べた。

センサー部分の包接状態の解析について、分子間相互作用が生じる状態で 2次元 NMR を用いて行うこととした。それに先立ち、相互作用が生じる濃度条件を知るため、PBA- $\gamma$ -CyD、NPBA- $\gamma$ -CyD 共に 0.5-10.0 mM の濃度範囲において 1 次元の  $^1$ H NMR スペクトルを  $D_2$ O 溶媒中で測定した。検討した濃度範囲においてそれぞれの修飾基や CyD 由来ピークの化学シフト値が連続的に変化したことことから(実験の部 Fig. 42, 43)、分子間相互作用が生じている状態での 2 次元 NMR 測定条件として 5.0 mM を選択した。PBA- $\gamma$ -CyD もしくはNPBA- $\gamma$ -CyD の 2 次元 NMR 測定は  $D_2$ O 中、Naph-PEG を含まない状態で行い、また、 $D_2$ O 中では PBA 修飾基、NPBA 修飾基とも分子形で存在していることを確認している。Figure 29 には、空間的に 5 Å 以内の距離で近接するプロトン同士で相関が得られる 2 次元 NMR の一つ、 $^1$ H- $^1$ H NOESY (nuclear Overhauser effect spectroscopy)スペクトルの測定結果を示した  $^{51-53}$ 。PBA 修飾基のプロト

ンは CvD 空孔内に位置する 3,5 位のプロトン(H-3, H-5)に強い相関が得られ、空 孔の縁の6位のプロトン(H-6)とも相関が得られた(Fig. 29a)。PBA-γ-CyD 分子ネ ックレスは PXRD の解析から Head-to-Head の分子ネックレス構造でないと考え られること、また、ICD スペクトルの解析から PBA 修飾基が CyD 空孔の軸に 対して倒れて存在することが明らかとなっている。そのため、PBA のプロトン (Hx, Hy)は自己の CyD H-5 及び H-6 と、また Head-to-Tail の形で近接する PBA-γ-CyD に広い口から包接され H-3 と近い距離にあると考えられた <sup>34,54,55</sup>。 一 方、NPBA-γ-CyD の NPBA 修飾基はその芳香環プロトンと CyD 空孔の縁に存在 する H-6 に弱いながらクロスピークを認め、包接されずに CyD 1 級側の空孔の 縁に位置していることが示唆された(Fig. 29b)。PXRD 解析で NPBA-γ-CyD の分 子ネックレスは Head-to-Head の構造であり、その配列で並ぶ NPBA-γ-CyD 同士 の間隔が非修飾 CyD 分子ネックレスのそれと同様であることがわかっているた め、NPBA の全てのプロトン  $(H_{x'}, H_{y'}, H_{z'})$ で見られた H-6 との相関は NPBA 修 飾基が倒れた状態で CyD 空孔の縁に存在していることがわかった。また、ICD スペクトルによる配向解析の結果を考慮すると、分子間相互作用のない状態で NPBA 修飾基は CyD 空孔の軸に対して完全には倒れていないのに対し、分子間 相互作用が生じる際にはその配向が変化し、CyD 空孔軸に対して倒れるものと 考えられた。以上の NOESY スペクトルの解析から、PBA-γ-CyD 間に分子間相 互作用が生じる際に PBA 修飾基は包接された状態で、一方、NPBA-γ-CyD 間に 分子間相互作用が生じる際には NPBA 修飾基は包接されない状態にあることが わかった。また、これらの修飾基の包接状態の解析と、前章および本章で示さ れた PBA-γ-CyD または NPBA-γ-CyD による PEG 鎖 1 本のみが包接された分子ネ ックレス形成から、PBA-γ-CyD では包接される PBA 部分と共に PEG 鎖 1 本の みが包接されて1本鎖の分子ネックレスが形成され(Fig. 30a)、一方、NPBA-γ-CyD では空孔の縁に存在する NPBA が空孔の口を狭めることで PEG 鎖が 1 本のみ包 接された分子ネックレスとなった(Fig. 30b)と推察された。

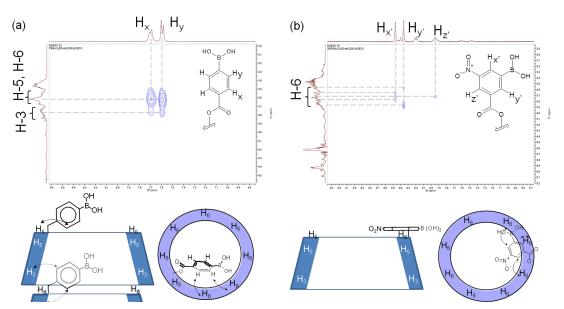


Fig. 29. The  $^1H$ - $^1H$  NOESY spectra of (a) PBA- $\gamma$ -CyD 5.0 mM and (b) NPBA- $\gamma$ -CyD 5.0 mM in D<sub>2</sub>O at 25 $^{\circ}$ C with mixing time of 200 ms and their proposed structures.

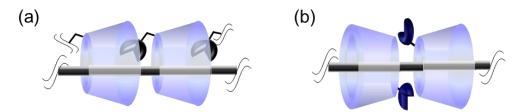


Fig. 30. The proposed structures of molecular necklaces from structural analysis (a) Naph-PEG/PBA- $\gamma$ -CyD and (b) Naph-PEG/NPBA- $\gamma$ -CyD.

これらの構造解析より PBA- $\gamma$ -CyD は、近接する CyD 空孔に PBA 修飾基が包接された状態で分子ネックレスを形成し、一方で、NPBA- $\gamma$ -CyD は NPBA 修飾基が包接されない状態で分子ネックレスが形成されると結論付けた(Fig. 30)。

この包接された PBA と包接されない NPBA の Glc 応答の違いは次の様に説明 できる。Naph-PEG/PBA-γ-CyD は水中において分子ネックレスと CyD, PEG 鎖の それぞれフリー体の平衡状態にある(Fig. 31a)。この系において Glc と結合するの は主にフリー体として存在する PBA-γ-CvD である。Glc 添加時では、Glc 結合型 の PBA-γ-CyD の増加に伴ってフリー体の PBA-γ-CyD が消費される。この、分子 ネックレス-フリー体の平衡状態の移動によって、再びその平衡を保つ様に分子 ネックレスの崩壊が起こる。Glc 分子へのアクセス性の低い PBA-γ-CvD の分子 ネックレスはこの様な間接的な糖応答メカニズムで PEG 鎖を放出したと考えら れる。一方、Naph-PEG/NPBA-γ-CyD 分子ネックレスは、分子ネックレス中で包 接されずに存在する NPBA が Glc と直接結合し、より速やかな崩壊と PEG 鎖放 出を示したしたと考えられる(Fig. 31b)。この Naph-PEG/NPBA-γ-CyD の Glc 応答 メカニズムは次の通りである。分子ネックレス同士が並ぶ空間に低分子薬物が 空孔の外に位置して結晶を形成する報告がされており 42,43、本研究の NPBA 修飾 基も分子ネックレス同士が形成する空間に配置した状態で安定な結晶を形成し たと考えられる。Glc 添加時、NPBA が Glc と結合することで、分子ネックレス 結晶が不安定となり、その崩壊に伴って PEG 鎖が放出されたと考えられる。

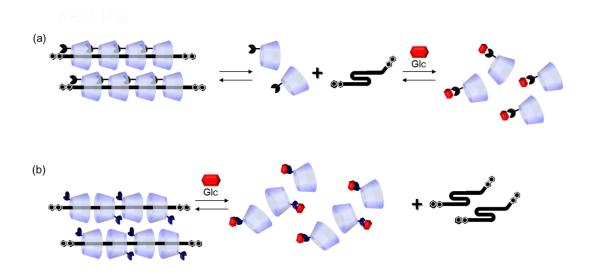


Fig. 31. Glc response mechanisms of molecular necklaces: (a) Naph-PEG/PBA- $\gamma$ -CyD and (b) Naph-PEG/NPBA- $\gamma$ -CyD.

#### 第5節 小括

第 2 章では、PBA 誘導体を $\gamma$ -CyD に修飾することで Glc 応答機能の付与を行った。また 2 種類の PBA と NPBA の異なる構造の誘導体をそれぞれ修飾したことで、Naph-PEG と形成される分子ネックレスの Glc 応答性に大きな違いが見られ、Naph-PEG/NPBA- $\gamma$ -CyD でその応答は高かった。これは NPBA- $\gamma$ -CyD の Glc 結合能が PBA- $\gamma$ -CyD よりも高いことに起因していると考えられた。また、NPBA- $\gamma$ -CyD の分子ネックレスは Glc に応答した Naph-PEG の鋭い放出を示したことから Glc 応答機構自体が PBA- $\gamma$ -CyD の分子ネックレスと異なることが考えられた。構造解析を行うと、Naph-PEG/PBA- $\gamma$ -CyD 分子ネックレスにおいて、PBA 修飾基が近接する CyD 空孔に包接されて存在することがわかった。一方で、Naph-PEG/NPBA- $\gamma$ -CyD 分子ネックレス中で、NPBA 修飾基は CyD 空孔に包接されずに CyD 空孔の縁に存在することがわかった。包接されず、Glc 分子へのアクセス性の良い NPBA を有する Naph-PEG/NPBA- $\gamma$ -CyD 分子ネックレスがより高い Glc 応答 Naph-PEG 鎖放出を示したと考えられた。

分子ネックレス形成能の点でも 2 つの修飾 CyD で差がみられ、包接されにくい NPBA を有する NPBA- $\gamma$ -CyD は PEG 鎖が包接されていくプロセスにおいて、空孔を部分的に塞ぐ PBA 修飾基を有する PBA- $\gamma$ -CyD よりも有利であったと考察した。

# 第3章 末端修飾 PEG-Ins/PBA 誘導体修飾γ-CyD 分子ネックレスの評価

第1章では修飾 CyD の調製に有利な末端修飾 PEG として Naph-PEG を得た。第2章では PBA 誘導体修飾γ-CyD として、2種類の異なる修飾基を持つ PBA-γ-CyD と NPBA-γ-CyD を調製した。これらの修飾 CyD は異なる分子ネックレス構造を形成し、それによって異なる Glc 応答性を示すことを明らかにした。第3章では、第1章、第2章で構築した Glc 応答性分子ネックレスの応用を目指し、PEG-Ins と組合せることで Glc 応答 Ins 放出制御について検討した。すなわち Naph-PEG を修飾した Ins (Naph-PEG-Ins)を調製し(Fig. 32)、PBA-γ-CyD または NPBA-γ-CyD と組合せて分子ネックレスを調製した(Fig. 33)<sup>37</sup>。この Glc 応答性 Naph-PEG-Ins 放出について評価し、臨床的な視点を踏まえた考察から挙げられる課題を解決した先で得られるシステムを提示する。

Fig. 32. The chemical streucture of Naph-PEG-Ins.

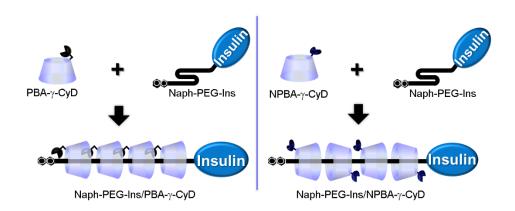


Fig. 33. Naph-PEG-Ins/PBA-γ-CyD molecular necklace and Naph-PEG-Ins/NPBA-γ-CyD molecular necklace.

#### 第1節 末端修飾 PEG-Ins の調製

Ins (human)は単量体分子中に、A 鎖 1 位グリシン(Gly)、B 鎖 1 位フェニルアラニン(Phe)と 29 位リシン(Lys)の 3 点に 1 級アミノ基を有する  $^{56}$ 。本節の検討では、これら 1 級アミノ基を反応点として PEG 鎖を修飾することを試みた(Fig. 34)。また、PEG 鎖の一方の末端に Naph、もう一方に Ins の修飾を行うために、片方の末端にアミノ基、もう一方にカルボキシル基を有する PEG(Sunbright® PA-020HC ( $^{12}$ )3-O-PEG-( $^{12}$ )5-COOH, MW 2,000))を用いることとした。 1 段階目の反応で、PEG 鎖のアミノ基と Naphthoyl chloride を反応させ、精製により片末端 Naph 修飾 PEG(One-Naph-PEG)を収率  $^{12}$  69.3%で得た(Scheme 6)。  $^{12}$   $^{13}$   $^{14}$   $^{15}$ 

続く反応で Ins の 1 級アミノ基と One-Naph-PEG のカルボキシル基を脱水 DMSO 中、1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride (EDC)共存下で縮合し、精製により Naph-PEG-Ins を第 2 工程収率 66.3%で得た(Scheme 6)。

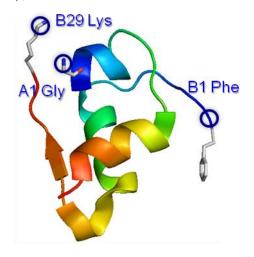
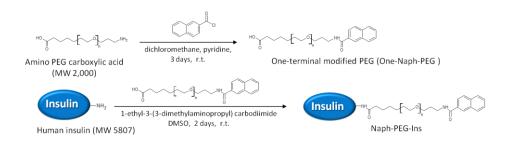


Fig. 34. The structure of human Ins. Amino acid residues that can be a PEGylation site are circled.



Scheme 6. Synthesis of Naph-PEG-Ins.

得られた Naph-PEG-Ins の PEG 鎖修飾率を  $^1$ H NMR スペクトル測定により求めた。Ins を一定濃度とした DMSO- $d_6$ 溶液に末端非修飾 PEG を添加し、様々なモル濃度比 PEG/Ins (0.0, 1.0, 1.5, 3.0, 6.0, 12.0)の溶液を用意して NMR 測定を行った。Figure 35 に示す Ins 由来のプロトンピーク(0.7-0.9 ppm)および PEG 鎖のプロトンピーク(3.5ppm)の積分値の比率(PEG/Ins)を PEG/Ins mol 濃度比に対してプロットした(Fig. 36 青点)。サンプルとして調製により得た Naph-PEG-Ins を同様に DMSO- $d_6$ 中で測定し、Ins 由来のプロトンピークと PEG 鎖のプロトンピークの積分値の比率をとると、5.3 を示し、先に得た濃度と積分値の比率の直線関係に当てはめたところ、PEG/Ins モル濃度比が 2.2 と算出された(Fig. 36 赤点)。すなわち、Naph-PEG-Ins は平均 PEG 鎖修飾率 2.2 であることがわかった。

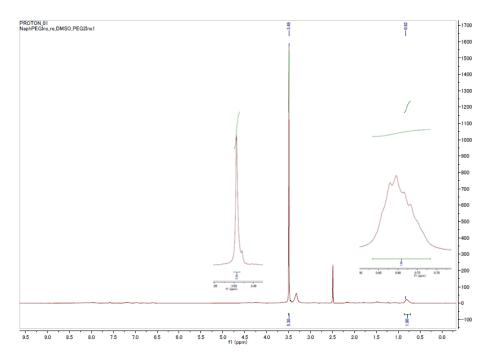


Fig. 35. The  $^{1}$ H NMR spectrum of Naph-PEG-Ins in DMSO- $d_6$  at 25°C, and the enlarged views of signals at 0.7-09 ppm and 3.5 ppm.

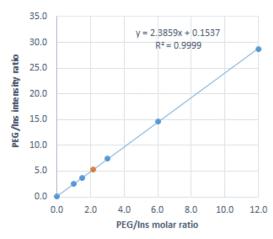


Fig. 36. The liner standard curve for PEG/Ins ratio.

調製した Naph-PEG-Ins がどの程度の血糖降下作用を保持しているのかを確認した。その評価として、Streptozocin 処理で作製した糖尿病モデルラットを用い、Naph-PEG-Ins をラットの頸静脈に投与し、血糖値を経時的に測定した。比較のために修飾をしていない Ins も同様な方法で投与した。投与後の血糖値プロファイルを Fig. 37 に、その結果を基に式 4 を用いて算出した血糖値減少面積(D%)と式 5 を用いて算出した比活性を Table 8 に示した。結果より、Naph-PEG-Ins は、Ins に対して 71.5%の血糖降下活性を保持していることが分かった。モデルとしては充分なものと考えられる。

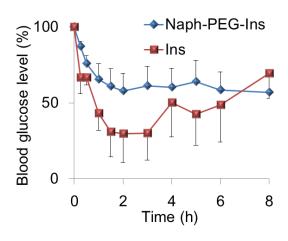


Fig. 37. Blood Glc level after subcutaneous administration of Naph-PEG-Ins and Ins in streptozotocin-induced diabetic rats.

$$D\% = \frac{AUC_c - AUC_{0-8}}{AUC_c} \times 100 \quad \cdot \quad \cdot \quad (\overline{x}\) 4)$$
Relative activity (%) = 
$$\frac{D\%_{Naph-PEG-Ins} / Dose_{Naph-PEG-Ins}}{D\%_{Ins} / Dose_{Ins}} \times 100 \quad \cdot \quad \cdot \quad (\overline{x}\) 5)$$

 $AUC_{0-8}$ : Area under the blood Glc concentration-time curve from o h to 8 h after injection of Naph-PEG-Ins or Ins.

 $AUC_c$ : Area under the blood Glc concentration-time curve assumed that blood Glc concentration does not change keeping its 100 % from 0 to 8 h.

Table 8. Comparison of a pharmacodynamic parameter (D%) of Naph-PEG-Ins and Ins.

	Naph-PEG-Ins	Ins
D(%)	37.7	52.7
Relative activity (%)	71.5	

# 第 2 節 末端修飾 PEG-Ins/PBA 誘導体修飾γ-CyD 分子ネックレスの糖応答末端 修飾 PEG-Ins 放出の評価

前節で調製した Naph-PEG-Ins を用いて、PBA-γ-CyD または NPBA-γ-CyD との組合せによって分子ネックレスを調製し、糖応答性を評価した。

Ins 1 分子当たり平均 2.2 の Naph-PEG 鎖を有する Naph-PEG-Ins と PBA- $\gamma$ -CyD または NPBA- $\gamma$ -CyD を、EG unit : CyD が 2 : 1 となる様な比率で水中共存し、それぞれ分子ネックレス固体をフィルター濾過( $\phi$ = 0.45  $\mu$ m)により得た。収率は Naph-PEG-Ins/ PBA- $\gamma$ -CyD が 17.4%、Naph-PEG-Ins/NPBA- $\gamma$ -CyD が 45.4%であった。

それぞれ得られた分子ネックレス固体の PXRD パターンを Fig. 38 に示した。 Naph-PEG-Ins/PBA-γ-CyD は Naph-PEG/PBA-γ-CyD と、Naph-PEG-Ins/NPBA -γ-CyD は Naph-PEG/NPBA-γ-CyD と同様なパターンとなり、PEG 鎖として Naph-PEG を用いた場合と Naph-PEG-Ins を用いた場合で変化はなく、PEG 鎖末端の Ins は分子ネックレス構造に影響しないことがわかった。

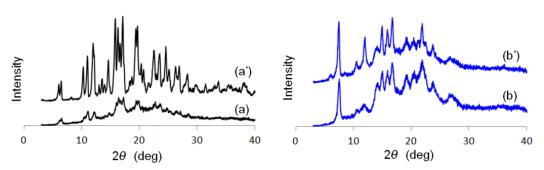


Fig. 38. PXRD patterns: (a) Naph-PEG-Ins/PBA-γ-CyD, (a') Naph-PEG/PBA-γ-CyD, (b) Naph-PEG-Ins/NPBA-γ-CyD and (b') Naph-PEG/NPBA-γ-CyD.

調製により得た Naph-PEG-Ins/PBA- $\gamma$ -CyD と Naph-PEG-Ins/NPBA- $\gamma$ -CyD の分子ネックレスについて、糖応答性 Naph-PEG-Ins 放出を調べた。方法としては、2 章での検討と同様に、Glc 溶液中に分子ネックレス固体を添加してからのNaph-PEG-Ins の放出を経時的に測定した。本章は応用の観点からの考察も行うため、100 mM よりも低濃度の Glc 溶液中での放出についても評価することとした。糖尿病患者の食後血糖値が約  $10 \sim 20$  mM  $(180 \sim 360 \text{ mg/dL})$ 程であるが 57、臨床では血糖値簡易測定キットでは測定上限(Glc 33 mM, 600 mg/dL)を超える重度高血糖の患者もいるため、30 mM (540 mg/dL)を高血糖病態時の Glc 濃度として放出実験を行った。Figure 39 に Naph-PEG-Ins の放出プロファイルを示す。Glc 100 mM 溶液中においてはどちらの分子ネックレスも Naph-PEG-Ins の放出は Glc

を含まない緩衝液中に比べて大きな値を示した。またその応答は Naph-PEG-Ins/NPBA-γ-CyD で大きく、Glc 30 mM 溶液中においても Glc を含ま ない緩衝液中よりも有意に高い放出であった。そのことから Glc 30 mM 程の高 い食後血糖値を示す患者に対しては、Naph-PEG-Ins/NPBA-γ-CyD 分子ネックレ スが応答を示す可能性があることが示された。前章で得られた Naph-PEG/NPBA-y-CyD の分子ネックレスの糖応答 PEG 鎖放出は立ち上がりが 急なプロファイルであったが、本章の Naph-PEG-Ins/NPBA-γ-CyD では急な立ち 上がりは見られなかった。この違いは次のように考えられる。 Naph-PEG/NPBA-γ-CyD では、NPBA が Glc と直接的に結合するため、Glc 応答 PEG 鎖放出の律速段階が PEG 鎖の拡散性に依存していると考えられる。 Naph-PEG-Ins を軸分子として用いた場合には、Naph-PEG-Ins が高分子量であり、 また、Naph-PEG-Ins が PEG 鎖を平均約2本有するため Glc に応答して放出され るには 2 ヶ所の分子ネックレス構造が崩壊する必要がある。この様な軸分子の 拡散性の違いや Glc 分子が分子ネックレス中の NPBA 修飾基へアクセスする際 の複雑なプロセスのため、2章で見られた Naph-PEG の鋭い放出と異なったと推 察した。

Glc 非共存下の緩衝液中においても Naph-PEG-Ins が緩やかに放出され、完全 に ON-OFF 制御されたものとは言えないが、これは基礎分泌を補う持続放出型の製剤として振舞うことが期待される。

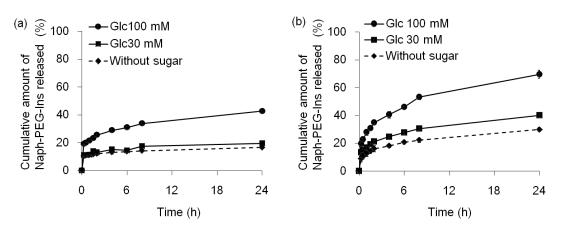


Fig. 39. Release profiles of Naph-PEG-Ins from (a) Naph-PEG-Ins/PBA-γ-CyD and (b) Naph-PEG-Ins/NPBA-γ-CyD in the absence and presence of Glc (pH 7.4, 37 °C).

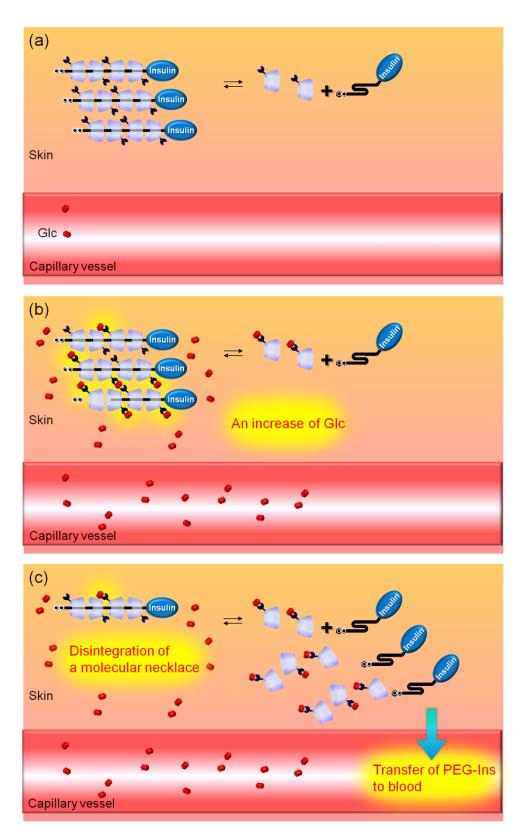
#### 第3節 小括

本章では、糖応答分子ネックレスの応用として Ins との組合せについて検討した。分子ネックレスの軸成分として Naph-PEG-Ins を調製した(平均 Naph-PEG 鎖置換度 2.2)。糖尿モデルラットへの投与により、得られた Naph-PEG-Ins が非修飾 Ins に対して 71.5%の活性を保持していることが明らかとなった。この Naph-PEG-Ins を、2章の検討で得た PBA- $\gamma$ -CyD または NPBA- $\gamma$ -CyD との水中共存により、Naph-PEGIns/PBA- $\gamma$ -CyD、Naph-PEGIns/NPBA- $\gamma$ -CyD の分子ネックレス固体を得た。これらの分子ネックレスは2章で調製した Naph-PEG を軸成分としたものと同様な構造を有していた。Glc 応答を調査すると、Glc 100 mM 溶液中においてはどちらの分子ネックレスも Naph-PEG-Ins の放出は Glc を含まない緩衝液中に比べて大きな値を示した。またその応答は Naph-PEG-Ins/NPBA- $\gamma$ -CyD で大きく、Glc 30 mM 溶液中においても Glc を含まない緩衝液中よりも有意に高い放出であった。そのことから Glc 30 mM 程の高い食後血糖値を示す患者に対しては、Naph-PEG-Ins/NPBA- $\gamma$ -CyD 分子ネックレスが応答を示す可能性があることが示された。

本研究のみで実用可能なシステムの確立を明らかにしたわけではなく、病態時の血糖値で末端修飾 PEG-Ins が放出される Glc 応答性の改良が将来的に必要である。Glc 応答の改善点として、1) CyD に修飾する PBA 自体の Glc 結合能を向上する、2) Glc に対してより直接的に結合可能な場への PBA 修飾基の配向制御を行う、3) Glc 結合後の崩壊に有利な分子ネックレス構造の制御、などが考えられる。

一方で、Glc 非共存下での Naph-PEG-Ins の緩やかな放出は、基礎分泌を補 う持続放出型の製剤として振舞うことや、投与された製剤の過剰蓄積による 低血糖の防止につながることが考えられた。

3章までで得られた結果から、挙げた課題を解決した先に、Scheme 7に示す様な血糖値応答性のインスリン放出制御製剤が将来的には得られると期待する。投与された分子ネックレスは難水溶性の固体として皮下に留まる(Scheme 7a)。食事などで血糖値が上昇すると皮下の Glc 濃度も上昇し、皮下に滞留している分子ネックレスの PBA 誘導体修飾基に Glc が結合する(Scheme 7b)。分子ネックレスが崩壊し、放出された末端修飾 PEG-Ins が皮下から血中へ移行し、血糖降下作用を示す(Scheme 7c)。



Scheme 7. Expected schemes for release of a terminal-modified PEG-Ins from a molecular necklace.

## 結論

Ins 自己注射で問題となる血糖コントロールの困難さや低血糖誘発に対して、血糖値を自ら感知し、Ins を必要なときに放出する人工膵臓システムの開発がいくつかのアプローチで行われている。本研究では、超分子複合体の PEG と CyD の分子ネックレスを利用し、その軸成分として PEG 修飾 Ins を用い、さらに糖と結合する分子化学センサーの PBA 誘導体を分子ネックレスに導入することで、Glc を自ら感知して PEG 修飾 Ins を制御放出する新たな糖応答 Ins 放出制御を考案した。本研究の目的は、システムの基本原理となる、PBA 誘導体修飾末端修飾γ-CyD と末端修飾 PEG の調製、それらを用いた分子ネックレスの調製と Glc 応答性の評価であった。

第1章では、末端修飾 PEG の調製とその分子ネックレス形成能について取り組んだ。分子ネックレス形成能の低い修飾 CyD においても分子ネックレスを効率的に形成する工夫として、PEG 鎖末端に CyD 空孔と相互作用する分子を修飾することとした。探索的検討の中で、速やかに高収率で PBA- $\gamma$ -CyD との分子ネックレス形成を起こす Naph-PEG を見出した。また、1章の検討を進める中で、空孔サイズが大きく、通常 PEG 鎖を 2本包接して分子ネックレスを形成する $\gamma$ -CyD の誘導体を用いたのにも関わらず、Naph-PEG/PBA- $\gamma$ -CyD は PEG 鎖 1本のみを包接した、全く新しい分子ネックレスが得られたことがわかった。

第2章では、PBA 誘導体修飾 $\gamma$ -CyD を合成し、Naph-PEG と組合せて Glc 応答分子ネックレスを調製した。PBA- $\gamma$ -CyD と NPBA- $\gamma$ -CyD の 2 種類の CyD で分子ネックレスを調製し、それぞれ異なる Glc 応答性を示した。 分子ネックレスの構造解析により、この異なる Glc 応答が PBA 誘導体修飾基の包接状態の違いに起因することを解明した。すなわち、Naph-PEG/PBA- $\gamma$ -CyD は、PBA 修飾基が分子ネックレス形成時に近接する CyD 空孔に包接されたことこら、それにより比較的低い Glc 応答性を示し、一方、Naph-PEG/NPBA- $\gamma$ -CyD は、形成した分子ネックレス中で NPBA 修飾基が包接されないため、より直接的に Glc 分子と反応し、速やかに PEG 鎖を放出した。この知見は、本研究のみならず、今後の刺激応答分子ネックレス研究を含めた超分子化学研究の発展に寄与するものと考える。

第3章では、Glc 応答性分子ネックレスを PEG 修飾 Ins と組合せて、Glc 応答性 Ins 放出制御を試みた。Naph-PEG-Ins を調製し、2章で得られた PBA 誘導体修飾γ-CyD と組合せて、Naph-PEG-Ins/PBA-γ-CyD, および Naph-PEG-Ins/NPBA

-γ-CyD 分子ネックレスを得た。構造解析より、軸分子として Naph-PEG-Ins を用いても 2 章で得られた 2 種類の分子ネックレスとそれぞれ同様な構造を形成していることがわかった。これら分子ネックレスは高 Glc 濃度に応答してNaph-PEG-Ins を放出した。一方で、臨床応用の観点からは、糖応答性のさらなる改善の必要性も示された。本研究では、Glc 応答性インスリン放出制御システムにおいてその動作原理となる、Glc 応答性分子ネックレスの調製に成功し、さらには Glc 応答性 Ins 放出を示すことに成功した。

# 謝辞

本研究を終えるにあたり、どんな時も常に支え続けてくれた家族に感謝の意を申し上げます。学会発表などでの活躍を喜んでくれ、研究が足踏みしていても「肩の力を抜いて」と励ましてくれ、同時に、私の健康を常に気遣ってくれた母のお陰で心身ともに充実した研究生活を送ることが出来ました。私の研究に興味深く耳を傾け、時には一緒に喜び、時には一緒に悩んでくれた父のおかげで、研究活動により一層打ち込むことが出来ました。

## 実験の部

#### 第1章

#### 1. 実験材料

γ-Cyclodextrin (γ-CyD) は純正化学株式会社(東京)より購入した。Benzoyl chloride, 3,5-dinitrobenzoyl chloride, polyethylene glycol (PEG, MW 2000), および 3,5-dimethoxy-4-hydroxycinnamic acid(CHCA)は和光純薬工業株式会社(大阪)より購入した。 2-Naphthoyl chloride は東京化成工業株式会社(東京)から購入した。 Pyridine (無水)は Sigma-Aldrich (USA)から購入した。その他すべての試薬は特級で購入し、精製を行わず使用した。

#### 2. 末端修飾 PEG の調製法

#### 2-1. Bn-PEG の調製

無水 pyridine 2.0 mL を含む脱水 dichloromethane (DCM) 100 mL 中に PEG 5.0 g を溶解した。Benzoyl chloride 3.5 g (2.9 mL)を添加し、窒素ガス雰囲気下、室温で3 日間反応を行った。3 日後に溶媒を留去し、残った少量の液体に弱酸性の水を40 mL 加えた。相分離した上層(水相)を回収し、分画分子量(MWCO) 1,000 の透析膜を用いて限外濾過により精製を行った。凍結乾燥により固体を得た。収量 3.12 g.

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ ) δ 8.00-7.89 (m, 4H, benzoyl), δ 7.70–7.60 (m, 2H,benzoyl), δ 7.56–7.45 (m, 4H, benzoyl),δ 3.50–3.48 (m, 180H, H of PEG). MALDI-TOF MS m/z: 2274.85 [M + Na]<sup>+</sup>.

#### 2-2. Naph-PEG の調製

脱水 DCM 300 mL 中に脱水 pyridine 22.5 mL と PEG 10.0 g (5 mmol)を添加した。この溶液に 2-naphthoyl chloride (6.4 g, 34 mmol)を加え、0°C、窒素ガス雰囲気下で反応を開始した。1 時間後に室温へ戻し、3 日間反応を行った。少量の水を添加して反応を停止し、反応溶液の溶媒をエバポレーターによって留去し、固体を得た。加温したエタノールで溶かした後、静置して再結晶を行い精製した。  $^1$ H NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  8.37–8.61 (s, 1H, Naphthoyl H-1), 7.80–7.63 (m, 4H, Naphthoyl H-3, H-4, H-5, H-8), 7.50–7.35 (m, 2H, Naphthoyl H-6, H-7), 4.38–4.23 (m, 2H, Carbonyl  $\alpha$ -H), 3.54–3.45 [m, 85H, -(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>n</sub>-].

MALDI-TOF MS m/z: 2466.70 [M + H]<sup>+</sup>.

#### 2-3. dNBn-PEG の調製

Benzene 125 mL 中に 3,5-dinitrobenzoyl chloride を溶解し、pyridine 50 mL で溶解した PEG 5.0 g に加え、窒素ガス雰囲気下、室温で 3 日間反応させた(多少濁りが生じたが分散性は良好であった)。3 日後、エバポレーターで出来る限り溶媒を留去し、そこへ弱酸性の水を添加した。析出した固体をメンブレンフィルターで除去し、MWCO 1,000 の透析膜を用い限外濾過により精製した。凍結乾燥により固体を得た。

収量 3.48 g.

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ ) δ 9.07–9.02 (t, 2H, 3,5-dinitrobenzoyl), δ 8.93–8.87 (d, 4H, 3,5-dinitrobenzoyl), δ 3.51–3.48 (m, 180H, H of PEG).

MALDI-TOF MS m/z: 2497.88 [M + Na]<sup>+</sup>.

#### 3. 修飾 PEG の質量分析

MALDI-TOF MS スペクトルは AXIMA-CFR plus (島津製作所)により行った。 マトリックスとして、CHCA を用いた。

## 4. 末端修飾 PEG/γ-CyD 分子ネックレスの調製法

水 0.9 mL に $\gamma$ -CyD 200.0 mg を溶解し、非修飾 PEG, 各種末端修飾 PEG (Bn-PEG, Naph-PEG, dNBn-PEG) 29.6 mg をそれぞれ水 0.1 mL に溶解した水溶液全量を $\gamma$ -CyD 水溶液に添加した。室温下、3 日間の静置により調製し、最終的にメンブレンフィルター( $\phi$ = 0.45  $\mu$ m, mixed cellulose ester type)で固体を濾取し、少量の水で洗浄したものを真空乾燥して得た。

## 5. 末端修飾 PEG/PBA-γ-CyD 分子ネックレスの調製法

水 0.5 mL に PBA- $\gamma$ -CyD 100.0 mg を溶解し、非修飾 PEG, 各種末端修飾 PEG (Bn-PEG, Naph-PEG, dNBn-PEG) 7.4 mg をそれぞれ PBA- $\gamma$ -CyD 水溶液に添加した1。室温、1 ヶ月の静置により調製し、最終的にメンブレンフィルター( $\phi$ = 0.45  $\mu$ m, mixed cellulose ester type) で固体を濾取し、少量の水で洗浄したものを真空乾燥して得た。

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup> PBA-γ-CyD の合成については 2 章の実験の部に示す。

## 6. 末端修飾 PEG/PBA-γ-CyD 分子ネックレスの形成過程の調査

PBA- $\gamma$ -CyD 100.0 mg を、1.3 mL の水が入った石英セルに加え、0.2 mL の水に溶解した非修飾 PEG, 各種末端修飾 PEG(Bn-PEG, Naph-PEG, dNBn-PEG) 7.4 mg をそれぞれ PBA- $\gamma$ -CyD 水溶液に添加した。形成される粒子の沈殿を防ぐためにスターラーで撹拌しながら 25°C の条件で 700 nm 吸光度(濁度,  $\tau$ )の経時変化を測定し、0, 1, 4, 24 時間の $\tau$ 値をプロットした。 $\tau$ 測定には、紫外可視吸光度測定装置(V-560 Jasco)を用いた。

#### 7. <sup>1</sup>H NMR 測定

<sup>1</sup>H NMR 測定は Varian 400-MR (Agilent Technologies, California, USA)を用いて行った。

#### 8. 粉末 X 線回折(PXRD)測定

PXRD 測定は Mini FlexII (Rigaku Corporation, 東京)によって、走査速度 4°/min, 測定範囲  $2\theta=3^\circ$ – $40^\circ$ で CuK $\alpha$  線を用いて行った。

#### 9. 誘起円二色性(ICD)スペクトル測定

ICD スペクトルは、J-720WI spectropolarimeter (JASCO)を用いて 190 – 400 nm の波長範囲で測定した。pH3.5 – 4.5 の水を用い、25°C、PBA- $\gamma$ -CyD 0.15 mM の条件で行った。3 回測定したスペクトルの平均としてデータを得た。

#### 第2章

#### 1. 実験材料

4-Carboxyphenylboronic acid は Sigma-Aldrich (USA)から購入した。 3-Carboxy -5-nitrophenylboronic acid は東京化成工業株式会社(東京)より購入した。Thionyl chloride, D-glucose (Glc)および Alizarin Red S は和光純薬工業株式会社(大阪)より購入した。2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]ethanesulfonic acid (HEPES) は株式会社 同仁化学研究所(熊本)より購入した。α-Cyclodextrin (α-CyD)は純正化学株式会社(東京)より購入した。その他の試薬類は1章と同じものを用いた。

#### 2. PBA 誘導体修飾γ-CyD の合成

#### 2-1. PBA-γ-CyD

ボロン酸部分の保護を行うため、tetrahydrofuran (100 mL)中に 4-carboxy phenylboronic acid を 4.02 g (24.2 mmol)溶解し、続いて 2,2-dimethyl-1,3-propanediol を 2.82 g (27.1 mmol)添加した。加熱還流により  $70^{\circ}$ C で反応を行った。24 時間後、反応溶液の溶媒をエバポレーターで留去し、真空乾燥を行った。

得られた固体全量を thionyl chloride (50 mL)に添加し、さらに脱水 dimethylformamide (DMF)を 2, 3 滴滴下化した。反応溶液は 6 時間加熱還流を 行った。 その後、室温にまで反応溶液の温度を戻し、減圧留去を行い、固体 を得た。活性化された PBA 誘導体全量を 50 mL の脱水 pyridine に溶解した。 一方、あらかじめ 100℃ で 3 時間真空乾燥した y-CyD を 12.97 g (10.0 mmol) 脱水 pyridine 1.0 L に溶解した。その γ-CyD 溶液に活性化した PBA 溶液を、撹 拌しながらゆっくり滴下し、90°Cで反応を行った。反応の進行はシリカゲル TLC を用いて行った(展開溶媒, 体積比 n-BtOH: EtOH:  $H_2O = 5:4:3$ , anisaldehyde 染色)。PBA-γ-CyD の 2 点修飾体が現れ始めた時点で少量の水を 反応液に加えることで反応を停止した。その溶液はエバポレーターで約50 mL 程にまで濃縮し、1.0Lアセトン中に撹拌しながら滴下し、白色固体を得た。 固体をガラスフィルターで濾取し、その固体を 1.0 L の水に溶解し、不溶性の 固体をろ紙濾過により除いた。そのろ液をホウ素選択的吸着剤 (Amberlite<sup>®</sup>IRA743, Sigma-Aldrich)のカラムに付した。IRA743 による分離の際、 水を流すことで未反応のγ-CyD を除いた。γ-CyD を除去した後、多点修飾体を 含む PBA-γ-CyD を 5% 酢酸水溶液 3 L で溶離した。 続いて第 2 の分離操作 として、得られた溶離液を多孔性ポリスチレン樹脂 (Diaion®HP-20, 三菱化学 株式会社)に付した。水とメタノールの混合液を溶出液として用いた。メタノ ール/水の体積比が 3/7 の溶離液で流した際に、1 置換体の PBA-γ-CyD が溶出

した。PBA-γ-CyD の溶離液をエバポレーターで 40 mL 程まで濃縮し、アセトン 400 mL に滴下して沈殿を得た。ガラスフィルターで固体を濾取し、アセトンで 3 回洗浄し、真空乾燥により固体を得た。

収量: 3.79 g 収率: 26.2%

 $^{1}$ H NMR (400 MHz, DMSO- $d_{6}$ ) δ 8.25 (s, 2H, BOH), 7.97–7.79 (m, 4H, ArH), 5.99–5.56 (m, 16H, CyD OH-2, OH-3), 4.97–4.80 (m, 8H, CyD H-1), 4.59–4.41 (m, 7H, CyD OH-6), 3.73–3.40 (m, 32H, CyD H-3, H-5, H-6a, b) 3.37–3.25 (m, overlaps with HOD).

MS (FAB, negative mode, matrix: glycerol) *m/z*: 1499.5 [(M + glycerol - 2H<sub>2</sub>O - H)<sup>-</sup> requires 1499.5]. PBA-γ-CyD は PBA-γ-CyD と glycerol のボロン酸エステル体として検出された。

Anal. Calcd for  $C_{55}H_{85}BO_{43} + 6H_2O$ : C, 42.53; H, 6.29; B, 0.70; O, 50.48. Found: C, 42.37; H, 6.06.

#### 2-2. NPBA-γ-CyD

ボロン酸部分の保護を行うため、tetrahydrofuran (100 mL) 中に 3-carboxy-5-nitrophenylboronic acid を 5.10 g (24.2 mmol)溶解し、続いて 2,2-dimethyl-1,3-propanediolを 2.82 g (27.1 mmol)添加した。加熱還流により  $70^{\circ}$ C で反応を行った。24 時間後、反応溶液の溶媒をエバポレーターで留去し、真空乾燥を行った。

得られた固体全量を thionyl chloride (50 mL)に添加し、さらに脱水 DMF を 2,3 滴滴下した。反応溶液は 6 時間加熱還流を行った。 その後、室温にまで反応溶液の温度を戻し、減圧留去を行い、固体を得た。活性化された NPBA 誘導体 3.95 g (12.1 mmol) を 50 mL の脱水 pyridine に溶解した。一方、あらかじめ 100°C で 3 時間真空乾燥した  $\gamma$ -CyD を 12.97 g (10.0 mmol)脱水 pyridine 1.0 L に溶解した。その  $\gamma$ -CyD 溶液に活性化した NPBA 溶液を、撹拌しながらゆっくり滴下し 50°C で反応を行った。反応の進行はシリカゲル TLC を用いて行った(操作は PBA- $\gamma$ -CyD と同様)。NPBA- $\gamma$ -CyD の 2 点修飾体が現れ始めた時点で少量の水を反応液に加えることで反応を停止した。その溶液はエバポレーターで約 50 mL程にまで濃縮し、1.0 L アセトン中に撹拌しながら滴下し、白色固体を得た。固体をガラスフィルターで濾取し、その固体を 1.0 L の水に溶解し、不溶性の固体をろ紙濾過により除いた。そのろ液を Amberlite®IRA743 吸着剤を充填したカラムに付した。IRA743 による分離の際、水を流すことで未反応の $\gamma$ -CyD を除いた。 $\gamma$ -CyD を除去した後、多点修飾体を含む NPBA- $\gamma$ -CyD を 5% 酢酸水溶液 3 L で溶離した。 続いて第 2 の分離として、溶離液を Diaion®HP-20 の吸着剤を充填し

たカラムに付した。水とメタノールの混合液を溶出液として用いた。メタノール/水が 3/7 で流した際に、1 置換体の NPBA-γ-CyD が溶出した。NPBA-γ-CyD の溶離液をエバポレーターで 20 mL 程まで濃縮し、アセトン 300 mL に滴下して沈殿を得た。ガラスフィルターで固体を濾取し、アセトンで 3 回洗浄し、真空乾燥により固体を得た。

収量 1.87 g 収率: 12.6%

 $^{1}$ H-NMR (400 MHz, DMSO- $d_{6}$ ) δ 9.71-9.52 (s, 1H, BOH), 8.99-8.80 (m, 1H, ArH<sub>x</sub>), 8.77-8.72 (m, 1H, ArH<sub>y</sub>), 8.70-8.63 (m, 1H, ArH<sub>z</sub>), 6.21-5.66 (m, 16H, CyD OH-2, OH-3), 5.05-4.73 (m, 8H, CyD H-1), 4.67-4.36 (m, 7H, CyD OH-6), 3.86-3.46 (m, 32H, CyD H-3, H-5, H-6a, b), 3.45-3.02 (m, CyD H-2, H-4, overlaps with HOD).

MS (FAB, negative mode, matrix: glycerol) *m/z*: 1544.5 [(M-H + glycerol - 2H<sub>2</sub>O)<sup>-</sup> requires 1544.5]. NPBA-γ-CyD は NPBA-γ-CyD と glycerol のボロン酸エステル体として検出された。

Anal. Calcd for  $C_{55}H_{84}BNO_{45} + 8H_2O$ : C, 40.42; H, 6.17; B, 0.66; N, 0.86 O, 51.89. Found: C, 40.33; H, 6.04; N, 0.98.

## 3. PBA 誘導体修飾γ-CyD の Glc 結合能の調査

HEPES 緩衝液(20 mM, pH7.4)中に一定濃度の ARS (0.10 mM)と 、様々な濃度 PBA 誘導体修飾 $\gamma$ -CyD を含む溶液を調製し、ARS 蛍光の測定を行った。蛍光測定は RF-5300PC spectrofluorophotometer (島津製作所)により行い、励起波長( $\lambda_{Ex}$ ) 468 nm で得られた蛍光スペクトルから蛍光波長( $\lambda_{Em}$ ) 556 nm の強度を PBA 誘導体修飾 CyD 濃度に対してプロットした。1:1 の結合と仮定し、式 6 を用いて KaleidaGraph によりカーブフィッテングを行い、回帰曲線より ARS に対する結合定数( $K_{ARS}$ )を算出した(Fig. 40)。PBA- $\gamma$ -CyD は 440.4  $M^{-1}$ 、NPBA- $\gamma$ -CyD は 1035.8  $M^{-1}$  であった。次に ARS 濃度を 0.10 mM, PBA 誘導体修飾 CyD 濃度を 1.0 mM に固定し、様々な濃度の Glc (0.0 – 1000.0 mM)を含む溶液を調製し、同様に測定した。556 nm の蛍光強度を Glc 濃度に対してプロットし(Fig. 41)、 $K_{ARS}$ を用いて式 7 より PBA 誘導体修飾 CyD の Glc に対する結合定数( $K_{Glc}$ )を算出した。PBA- $\gamma$ -CyD は 8.0  $M^{-1}$ 、NPBA- $\gamma$ -CyD は 50.1  $M^{-1}$ であった。同様にしてフルクトース(Fru)に対する結合定数( $K_{Fru}$ )を算出した。PBA- $\gamma$ -CyD は 200.9  $M^{-1}$ 、NPBA- $\gamma$ -CyD は 874.0  $M^{-1}$  であった。

K<sub>ARS</sub>: ARS-PBA 誘導体修飾 CyD の結合定数 (M<sup>-1</sup>)

 $\Delta I_{\mathrm{f}}$ : 蛍光強度の変化量

[ARS<sub>0</sub>]:ARS 総濃度

L: PBA 誘導体修飾 CyD (リガンド)

[Glc<sub>0</sub>]: Glc 総濃度

[LARS]: ARS-PBA 誘導体修飾 CyD 複合体の濃度

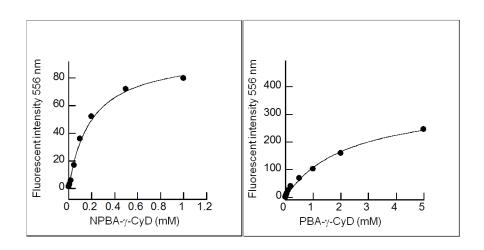


Fig. 40. Fluorescent intensity increases of ARS (0.10 mM) in the presence of NPBA-γ-CyD or PBA- $\gamma$ -CyD in the HEPES buffer solution (20 mM, pH 7.4) at 25°C ( $\lambda_{Ex}$  = 468 nm,  $\lambda_{Em}$  = 556 nm).

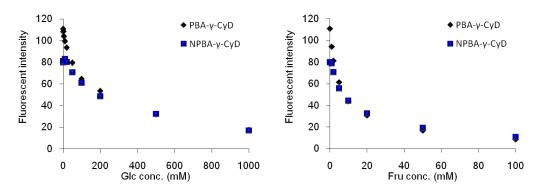


Fig. 41. Fluorescent intensity decreases of ARS (0.10 mM) in the Glc solutions (left) or Fru solutions (right) with the fixed concentration (1.0 mM) of PBA-γ-CyD or NPBA-γ-CyD in the HEPES buffer solution (20 mM, pH 7.4) at 25°C ( $\lambda_{Ex}$  = 468 nm,  $\lambda_{Em}$  = 556 nm).

- 4. Naph-PEG/PBA 誘導体修飾 CyD 分子ネックレスの調製
- 4-1. Naph-PEG/PBA-γ-CyD の調製

第1章で行った調製と同様に行った。また、本章では EG units: CyD の仕込み比率を様々な条件で行った。すなわち、水  $0.5\,$  mL に PBA- $\gamma$ -CyD  $100.0\,$  mg を溶解し、Table 9 に示す各量の Naph-PEG を PBA- $\gamma$ -CyD 水溶液に添加した。室温で $1\,$   $\tau$ 月静置し、調製を行い、最終的にメンブレンフィルター( $\phi$ = $0.45\,$   $\mu$ m, mixed cellulose ester type) で固体を濾取し、少量の水で洗浄したものを真空乾燥して得た。

Table 9. Various mole ratios between EG units and PBA-γ-CyD for the preparation of Naph-PEG/PBA-γ-CyD molecular necklace.

EG units/PBA-γ-CyD	PBA-γ-CyD	Naph-PEG	Yield
mole ratio	(mg)	(mg)	(mg)
0.0	100.0	0	0
1.0	100.0	3.6	38.5
1.5	100.0	5.3	62.1
2.0	100.0	7.4	79.5
2.5	100.0	8.9	83.9
3.0	100.0	10.7	82.6
3.6	100.0	12.3	84.7
4.0	100.0	14.2	91.8

#### 4-2. Naph-PEG/NPBA-γ-CyD の調製

水 0.5 mL に NPBA- $\gamma$ -CyD 100.0 mg を溶解し、Naph-PEG 7.4 mg を NPBA- $\gamma$ -CyD 水溶液に添加した。室温で 1  $\gamma$ 月静置し、調製を行い、最終的にメンブレンフィルター( $\phi$ = 0.45  $\mu$ m, mixed cellulose ester type) で固体を濾取し、少量の水で洗浄したものを真空乾燥して得た。

#### 4-3. Naph-PEG/γ-CyD の調製

第1章で行った調製と同様に行った。

#### 4-4. Naph-PEG/α-CyD の調製

水 0.9 mL に  $\alpha$ -CyD 602.0 mg を溶解し、Naph-PEG 63.5 mg をそれぞれ水 0.1 mL に溶解した水溶液全量を $\alpha$ -CyD 水溶液に添加した。室温で 3 日間静置し、調製を行った。メンブレンフィルター( $\phi$ =  $0.45 \mu$ m, mixed cellulose ester type) で固体を濾取し、少量の水で洗浄したものを真空乾燥して得た。

収量: 300.9 mg.

#### 5. Naph-PEG/PBA 誘導体修飾γ-CyD 分子ネックレスの形成過程の調査

PBA- $\gamma$ -CyD、NPBA- $\gamma$ -CyD または $\gamma$ -CyD それぞれ 100.0 mg を 1.3 mL の水が入った石英セルに加え、0.2 mL の水に溶解した Naph-PEG 7.4 mg をそれらの水溶液の入ったセルに添加した。形成される粒子の沈殿を防ぐためにスターラーで撹拌しながら 25°C の条件で $\tau$ の経時変化(0 – 3 時間)を測定した。 $\tau$ 測定には、紫外可視吸光度測定装置(V-560 Jasco)を用いた。

#### 6. 誘起円二色性(ICD)スペクトル測定

ICD スペクトルは、J-720WI spectropolarimeter (JASCO)を用いて 190 – 400 nm の波長範囲で測定した。pH3.5 – 4.5 の水を用い、25°C、NPBA-γ-CyD 0.15 mM の条件で行った。3 回測定したスペクトルの平均としてデータを得た。

# 7. Naph-PEG/PBA 誘導体修飾γ-CyD 分子ネックレスの Glc 応答性の評価 7-1. Glc 添加による τ減少測定

HEPES 緩衝液 (pH7.4、20 mM) 2.0 mL の入ったセルに、Naph-PEG/NPBA- $\gamma$ -CyD もしくはNaph-PEG/PBA- $\gamma$ -CyD の分子ネックレス固体を6.0 mg 添加し、37°C、スターラーで撹拌しながら、 $\tau$ が一定になるまで平衡化した。その後測定を開始し、セル内の Glc 濃度が1,2,5,10,20,50,100,200 mM となる様に1 M Glc 溶液を10 分間隔で添加した。PBA を有さない分子ネックレスのコントロールとしてNaph-PEG/ $\gamma$ -CyD の分子ネックレスも測定を行ったが、この分子ネックレス固体は溶解性が高いため20.0 mg の固体添加量で測定を行った。

#### 7-2. Glc 溶液中での分子ネックレスからの Naph-PEG 放出実験

pH7.4 20 mM HEPES 緩衝液または、それに Glc を 100, 200 mM 含む溶液 1.0 mL 中に、Naph-PEG/PBA- $\gamma$ -CyD もしくは Naph-PEG/NPBA- $\gamma$ -CyD 分子ネックレス固体 3.0 mg を添加した。経時的に遠心分離したサンプルの上清 40  $\mu$ m をサンプリングした。測定は、上清 40  $\mu$ L を 10 倍希釈し、マイクロプレートリーダー (Spectra Max M5e multiplate reader (Molecular Devices))によって Naph-PEG の蛍光強度を測定した( $\lambda_{Ex}$  = 280 nm,  $\lambda_{Em}$  = 420 nm)。

#### 8. PXRD 測定

第1章と同じ装置、条件によって行った。

#### 9. <sup>1</sup>H NMR 測定

<sup>1</sup>H NMR 測定は第 1 章で用いた装置と同じものを用いて行った。分子ネックレス中での PEG 鎖と修飾 CyD の化学量論比については DMSO- $d_6$ 溶媒中で 1 次元の <sup>1</sup>H NMR 測定を行った。PBA- $\gamma$ -CyD または NPBA- $\gamma$ -CyD の分子間相互作用の検出を目的としたものとして、 $D_2$ O 溶媒中、修飾 CyD 濃度が 0.5-10.0 mM の条件で 1 次元の <sup>1</sup>H NMR 測定を行った(Fig. 42, 43)。

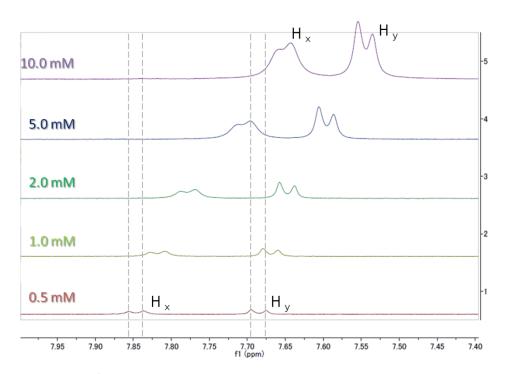


Fig. 42. The  $^1H$  NMR spectral changes of PBA moiety depending on the concentration of PBA- $\gamma$ -CyD (0.5, 1.0, 2.0, 5.0 and 10.0 mM) in D<sub>2</sub>O at 25°C.

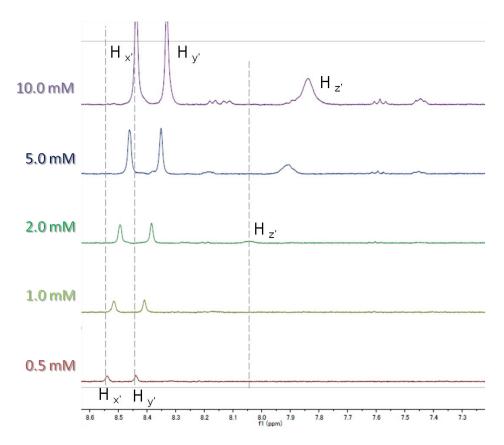


Fig. 43. The <sup>1</sup>H NMR spectral changes of NPBA moiety depending on the concentration of NPBA-γ-CyD (0.5, 1.0, 2.0, 5.0 and 10.0 mM) in D<sub>2</sub>O at 25°C.

<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H NOESY 測定は、25°C、D<sub>2</sub>O 溶媒中で PBA- $\gamma$ -CyD、NPBA- $\gamma$ -CyD 共に 5.0 mM の条件で行った(総論の部 Fig. 29)。予備解析として、D<sub>2</sub>O 中における PBA- $\gamma$ -CyD、NPBA- $\gamma$ -CyD のプロトンの帰属を、H-H COSY (correlation spectroscopy)、H-H TOCSY (totally correlation spectroscopy)、HMQC (hetero-nuclear multiple quantum coherence)などの方法により行った。以下に PBA- $\gamma$ -CyD のプロトンの帰属について示す。スピン結合するビシナルプロトン間で相関が得られる COSY スペクトルの解析を行い、CyD H-1 (4.85 – 5.15 ppm)とクロスピークを示した 3.40 – 3.55 ppm のピークを CyD H-2 のものと帰属した(Fig. 44)。同スペクトルにおいて、H-2 と帰属されたピークは 3.70 – 3.90 ppm のピークともクロスピークを示した。このことから 3.70 – 3.90 ppm のピークは H-2 と隣り合う H-3 のものであると帰属された。H-4、H-5、H-6 のピークの帰属は、直接結合するプロトンとカーボンとの間で相関が得られる HMQC によって行った。CyD C-1 からC-6 の化学シフトはすでに報告されている値を参考にした  $^{53}$ 。C-4 由来の約 80 ppm のピークと相関が見られた 3.45 – 3.53 ppm のピークは H-4 のものと帰属され、また、C-6 由来の約 60 ppm のピークと相関が見られた 3.53 – 3.75 ppm のピ

ークは H-6 のものと帰属された(Fig. 45)。過去の報告から、C-2, 3, 5 の化学シフト値が 70 ppm 付近に集中することが知られており、本測定においても 70 – 74 ppm の狭い範囲に H-2, 3, 5 のものと思われるピークが得られ、それらはプロトン側の 3.43-3.90 ppm に渡るピークと相関を示した。先ほどの COSY の解析から、H-2 のピークが 3.40-3.55 ppm に、また、H-3 のピークが 3.70-3.90 ppm に帰属されたことから、H-5 は 3.55-3.70 ppm にピークを持つと結論付けられた。

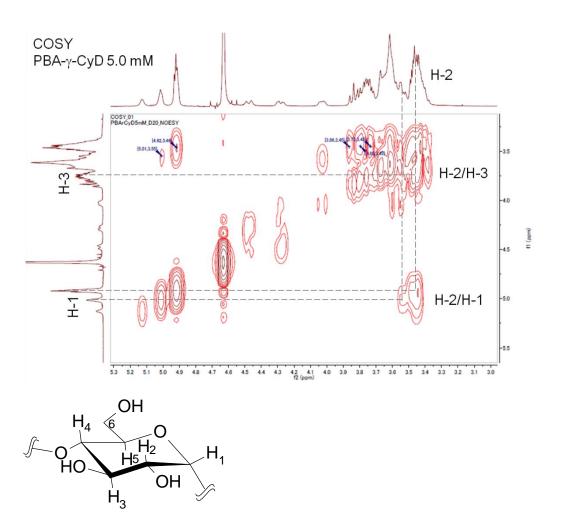


Fig. 44. The COSY spectrum of PBA- $\gamma$ -CyD 10.0 mM in D<sub>2</sub>O at 25°C and Glc ring of CyD with its numberd protons.

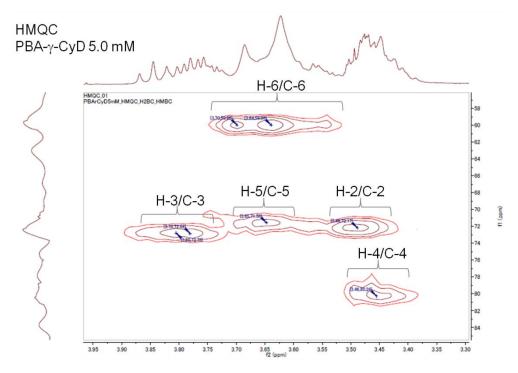


Fig. 45. The HMQC spectrum of PBA-γ-CyD 10.0 mM in D<sub>2</sub>O at 25°C.

NPBA-γ-CvD の帰属につては次の様に行った。H-2 の帰属は PBA-γ-CvD と同様 に COSY スペクトルにより解析し、4.85 - 5.12 ppm の H-1 と相関を示した 3.30 -3.60 ppm のピークが H-2 のものであると帰属した。H-3 の帰属は、同一スピン系 のプロトン同士のロングレンジカップリングを検出可能な TOCSY によって行 った。CvD 分子中の Glc ユニット同士を繋ぐ酸素原子でスピン系が途切れるた め、同一Glc ユニット中でのH-1からH-6までの相関を検出可能である。また、 測定パラメーターの一つである混合時間(zm)を調節することによって磁化移動 の距離をある程度制御でき、短いから段階的に長くして測定していくことで、 よりロングレンジのカップリングも検出する様になる。Glc ユニット中の H-1 に 着目した場合、それと近い結合順で相関が現れ、H-2から H-6までを順番に帰属 していくことが可能である。本測定において、Tmを10-30 msとした測定では、 H-1のピークはCOSYからも確認されているH-2/H-1のクロスピークのみを示し たが、 $\tau_{\rm m}$ を 40 ms として測定を行うと、H-1 のピークは 3.70 – 3.85 ppm のピーク と新たなクロスピークを示した。このことより、3.70 – 3.85 ppm のピークは H-3 のものであると結論付けられた。測定原理的にはさらに長い元で測定すること で H-4 から H-6 までのピークも帰属可能であるが、本検討ではそれ以降の結果 が複雑な重なり合ったものであったことから、H-4.5.6 については HMOC での 帰属を試みた。カーボンの化学シフト値は過去の報告を基にし53、C-4 由来の約

80 ppm のピークと相関が見られた 3.37 - 3.55 ppm のピークは H-4 のものと帰属され、また、C-6 由来の約 60 ppm のピークと相関が見られた 3.20 ppm 付近及び 3.38 - 3.95 ppm のピークは H-6 のものと帰属された。本測定においても 71 - 74 ppm の狭い範囲に C-2, 3, 5 のものと思われるピークが得られ、それらはプロトン側の 3.43 - 3.90 ppm に渡るピークと相関を示した。COSY の解析から、H-2 のピークが 3.30 - 3.60 ppm に、また、H-3 のピークが 3.70 - 3.85 ppm に帰属されたことから、H-5 は 3.60 - 3.70 ppm にピークを持つものと考えられた。

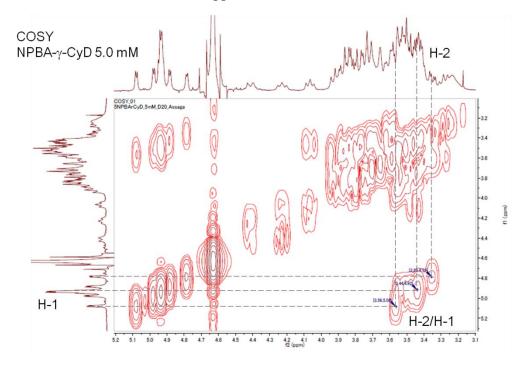


Fig. 46. The COSY spectrum of NPBA-γ-CyD 5.0 mM in D<sub>2</sub>O at 25°C.

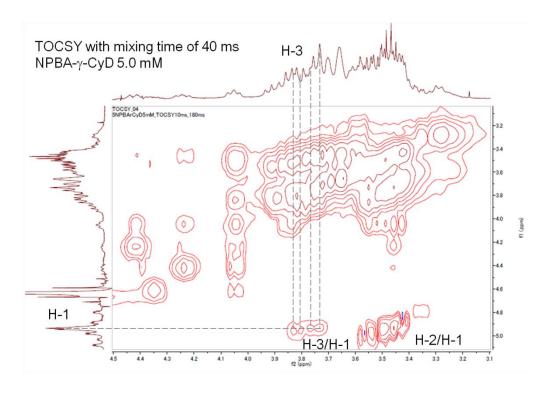


Fig. 47. The TOCSY spectrum of NPBA- $\gamma$ -CyD 5.0 mM in D<sub>2</sub>O at 25°C with mixing time of 40 ms.

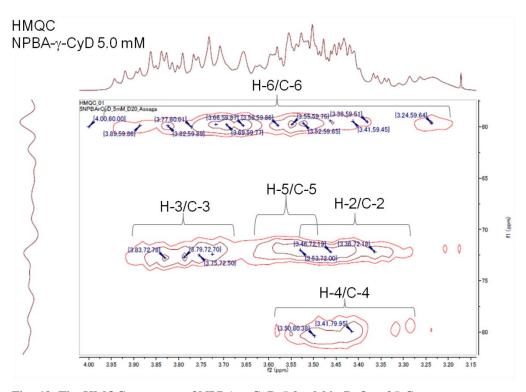


Fig. 48. The HMQC spectrum of NPBA- $\gamma$ -CyD 5.0 mM in D<sub>2</sub>O at 25°C.

# 10. 固体蛍光スペクトル測定

固体蛍光測定は RF-5300PC spectrofluorophotometer (島津製作所、京都)により行い、固体サンプル専用のアタッチメントを装着して行った ( $\lambda_{ex}=280$  nm,  $\lambda_{em}=280-600$  nm)。

## 第3章

#### 1. 実験材料

Amino-PEG-carboxylic acid (Sunbright® PA-020HC, MW 2,000)は日油株式会社 (東京)から購入した。1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride) (EDC)は東京化成工業株式会社(東京)より購入した。Insulin (Ins) (human, recombinant)は和光純正工業株式会社(東京)より購入した。Streptozocin (STZ)は Sigma-Aldrich (USA)から購入した。

#### 2. One-Naph-PEG の合成

脱水 DCM 10 mL 中に脱水 Pyridine 0.7 mL と amino-PEG-carboxylic acid (MW 2,000)を 300 mg(0.138 mmol)添加した。この溶液に 2-naphthoyl chloride 286 mg (1.5 mmol)を加え、 $0^{\circ}$ C、窒素ガス雰囲気下で反応を開始した。1 時間後に室温へ戻し、4 日間反応を行った。反応溶液をエバポレーターで溶媒を留去し、固体を得た。蒸留水 40 mL に添加し、不溶性部分を 3G5 ガラスフィルターで除き、ろ液を MWCO 1,000 の透析膜で透析を行い、精製した。この溶液を凍結乾燥して、one-Naph-PEG を固体として得た。

収量, 229 mg 収率, 69.3 %

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  8.22–8.16 (s, 1H, Naph1 位 H),  $\delta$  7.93–7.81 (m, 3H, Naph3,4,5 位 H),  $\delta$  7.69–7.64 (d, 1H, Naph8 位 H),  $\delta$  7.55–7.45 (m, 2H Naph6,7 位 H),  $\delta$  3.72–3.66 (m, 2H, アミド N の隣の-CH2-),  $\delta$  3.53–3.51 (m, 187H, エチレングリコールユニットの H),  $\delta$  2.03–1.97 (t, 2H, amino-PEG-carboxylic acid のカルボン酸末端カルボニルの隣の-CH<sub>2</sub>-),  $\delta$  1.82–1.74 (m, 2H, amino-PEG-carboxylic acid のアルキル鎖 H),  $\delta$  1.65–1.56 (m, 2H, amino-PEG-carboxylic acid のアルキル鎖 H),  $\delta$  1.47–1.34 (m, 8H, amino-PEG-carboxylic acid のアルキル鎖 H).

MALDI-TOF MS, m/z (M+H)<sup>+</sup> =2394.46

## 3. Naph-PEG-Ins の合成

脱水 dimethyl sulfoxide (DMSO) 28.0 mL 中に Ins (human) 280 mg (48.2 μmol)と one-Naph-PEG 208 mg (96.3 μmol)を溶解させた。EDC 18.0 mg (96.3 μmol)を添加し、反応を開始した。反応開始から 42 時間で蒸留水 80 mL を加えて反応を停止した。これを MWCO 3,500 の透析膜を用いて水で透析を行い、凍結乾燥により Naph-PEG-Ins を得た。

収量: 348.0 mg 収率: 66.3 %

#### 4. Naph-PEG-Ins の PEG 鎖修飾率の決定

 $^{1}$ H NMR スペクトルから Naph-PEG-Ins の PEG 化率を算出した。DMSO- $d_6$ 溶媒 を用いて、Ins 10 mg/mL (1.7 mM)に対して PEG(MW 2,000)を添加し、PEG/Ins mol 濃度比が 0, 1, 1.5, 3, 6, 12 になる様な溶液を調製した。測定は第 1 章で用いた装置と同じものを用いて行った。

## 5. STZ 誘発糖尿病モデルラットにおける Naph-PEG-Ins の血糖降下作用

#### 5-1. STZ 誘発糖尿病モデルラットの作製

雄性 Wistar ラット(8 週齢)を用いてモデル作製を行った。STZ (50 mg/kg)を尾静脈投与した後、定期的採血による血糖値を確認し、18 時間絶食時血糖値が 200 mg/dL 以上の個体を実験に採用した。また、本研究における実験動物は、城西大学動物実験規定に沿って計画し、全学動物実験管理委員会の承認を得て実施した。

## 5-2. STZ 誘発糖尿病モデルラットへの Naph-PEG-Ins の血糖降下作用

糖尿病モデルラット(18 時間絶食)に Naph-PEG-Ins または Ins を頸静脈投与 (0.050 mg protein/kg, 1.0 mL/kg)した。経時的に採血し、簡易測定キット (グルテストエース  $\mathbf{R}$ )により血糖値を測定した。麻酔は 0.65 %ペントバルビタール (初回投与: 6 mL/kg, 追加投与: 初期投与量の 1/3 倍量)を腹腔内投与により行った。 Ins, Naph-PEG-Ins はそれぞれリン酸緩衝生理食塩水(PBS)を用いて 0.05 mg/mL の濃度に調製して投与した。

#### 6. Naph-PEG-Ins/PBA 誘導体修飾 CyD 分子ネックレスの調製

#### 6-1. Naph-PEG-Ins/PBA-γ-CyD の分子ネックレスの調製

水 1.0 mL に Naph-PEG-Ins 50.0 mg を溶解し、その後 PBA- $\gamma$ -CyD 200.0 mg 添加し、溶解した。室温で 1  $\gamma$ 月静置し、分子ネックレスの沈殿を得た。メンブレンフィルター( $\phi$ = 0.45  $\mu$ m, mixed cellulose ester type)で固体を濾取し、少量の水で洗浄したものを真空乾燥して得た。

収量: 43.4 mg

## 6-2. Naph-PEG-Ins/NPBA-γ-CyD の分子ネックレスの調製

水 0.5 mL に Naph-PEG-Ins 25.0 mg を溶解し、その後 NPBA- $\gamma$ -CyD 100.0 mg 添加し、溶解した。室温で 1 ヶ月静置し、分子ネックレスの沈殿を得た。メンブレンフィルター( $\phi$ =0.45 $\mu$ m, mixed cellulose ester type)で固体を濾取し、少量の水で洗浄したものを真空乾燥して得た。

収量: 56.7 mg

#### 7. PXRD 測定

第1章と同じ装置、条件によって行った。

## 8. Glc 溶液中での分子ネックレスからの Naph-PEG-Ins 放出実験

HEPES 緩衝液(pH7.4, 20 mM)または、それに Glc を 30, 100 mM 含む溶液 1.0 mL 中に、Naph-PEG-Ins/PBA- $\gamma$ -CyD もしくは Naph-PEG-Ins/NPBA- $\gamma$ -CyD 分子ネックレス固体 3.0 mg を添加した。経時的に遠心分離したサンプルの上清 40  $\mu$ m をサンプリングした。測定は、上清 40  $\mu$ L を 10 倍希釈し、マイクロプレートリーダー(Spectra Max M5e multiplate reader (Molecular Devices))によって Naph-PEG の蛍光強度を測定した( $\lambda$ Ex = 280 nm,  $\lambda$ Em = 420 nm)。

## 参考文献

- (1) International Diabetes Federation. *Diabetes Atlas*, Seventh Ed.; 2015.
- (2) 内潟安子. 臨床と研究 2012, 89 (1), 24-28.
- (3) Qiu, Y.; Park, K. Adv. Drug Deliv. Rev. 2001, 53 (3), 321–339.
- (4) Lee, S. J.; Park, K. J. Mol. Recognit. **1996**, 9 (5-6), 549–557.
- (5) Ozawa, R.; Hayashita, T.; Matsui, T.; Nakayama, C.; Yamauchi, A.; Suzuki, I. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **2008**, *60* (3-4), 253–261.
- (6) Mizuno, T.; Takeuchi, M.; Hamachi, I.; Nakashima, K.; Shinkai, S. Chem. Commun. 1997, 2, 1793–1794.
- (7) Egawa, Y.; Miki, R.; Seki, T. *Materials* **2014**, 7 (2), 1201–1220.
- (8) Egawa, Y.; Seki, T.; Takahashi, S.; Anzai, J. *Mater. Sci. Eng. C* **2011**, *31* (7), 1257–1264.
- (9) Yamauchi, A.; Sakashita, Y.; Hirose, K.; Hayashita, T.; Suzuki, I. *Chem. Commun.* **2006**, *1* (41), 4312.
- (10) James, T. In Creative Chemical Sensor Systems; 2007; Vol. 277, pp 107–152.
- (11) Ravaine, V.; Ancla, C.; Catargi, B. J. Control. Release 2008, 132 (1), 2–11.
- (12) Harada, A.; Li, J.; Kamachi, M. *Nature* **1992**, *356* (6367), 325–327.
- (13) Harada, A.; Li, J.; Kamachi, M. *Nature* **1994**, *370* (6485), 126–128.
- (14) Uekama, K. J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem. **2003**, 44 (1), 3–7.
- (15) Higashi, T.; Motoyama, K.; Arima, H. *Japan, Chem. Soc.* **2012**, *60* (1), 14–17.
- (16) 上野昭彦. シクロデキストリン 基礎と応用-; 産業図書(東京), 1995.
- (17) シクロデキストリン学会. ナノマテリアル・シクロデキストリン; 米田出版(千葉), 2005.
- (18) Bom, A.; Bradley, M.; Cameron, K.; Clark, J. K.; Egmond, J. Van; Feilden, H.; MacLean, E. J.; Muir, A. W.; Palin, R.; Rees, D. C.; Zhang, M. *Angew. Chemie Int. Ed.* 2002, 41 (2), 265–270.
- (19) Higashi, T.; Hirayama, F.; Misumi, S.; Arima, H.; Uekama, K. *Biomaterials* **2008**, 29, 3866–3871.

- (20) Higashi, T.; Hirayama, F.; Misumi, S.; Motoyama, K.; Arima, H.; Uekama, K. *Chem. Pharm. Bull.* **2009**, *57* (5), 541–544.
- (21) Higashi, T.; Hirayama, F.; Arima, H.; Uekama, K. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17* (7), 1871–1874.
- (22) Yuen, F.; Tam, K. C. Soft Matter **2010**, 6 (19), 4613.
- (23) Araki, J.; Ito, K. Soft Matter 2007, 3 (12), 1456.
- (24) Harada, A.; Hashidzume, A.; Yamaguchi, H.; Takashima, Y. *Chem. Rev.* **2009**, *109* (11), 5974–6023.
- (25) Ooya, T.; Utsunomiya, H.; Eguchi, M.; Yui, N. *Bioconjug. Chem.* **2005**, *16* (1), 62–69.
- (26) Ooya, T.; Choi, H. S.; Yamashita, A.; Yui, N.; Sugaya, Y.; Kano, A.; Maruyama, A.; Akita, H.; Ito, R.; Kogure, K.; Harashima, H. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 3852–3853.
- (27) Park, C.; Oh, K.; Lee, S. C.; Kim, C. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2007**, *46*, 1455–1457.
- (28) Meng, F.; Zhong, Z.; Feijen, J. Biomacromolecules **2009**, 10 (2), 197–209.
- (29) Liu, P.; Cai, W.; Chipot, C.; Shao, X. J. Phys. Chem. Lett. **2010**, 1 (12), 1776–1780.
- (30) Seo, J. H.; Kakinoki, S.; Inoue, Y.; Yamaoka, T.; Ishihara, K.; Yui, N. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135* (15), 5513–5516.
- (31) Seki, T.; Namiki, M.; Egawa, Y.; Miki, R.; Juni, K.; Seki, T. *Materials* **2015**, 8 (3), 1341–1349.
- (32) Veronese, F. M.; Pasut, G. *Drug Discov. Today* **2005**, *10* (21), 1451–1458.
- (33) Pfister, D.; Morbidelli, M. J. Control. Release 2014, 180, 134–149.
- (34) Nakamura, K.; Seki, T.; Egawa, Y.; Miki, R.; Oda, Y.; Yamanoi, T.; Seki, T. *Chem. Pharm. Bull.* **2013**, *61* (11), 1188–1191.
- (35) Egawa, Y.; Seki, T. Yakugaku Zasshi **2013**, 133 (12), 1287–1295.
- (36) Rekharsky, M. V.; Inoue, Y. Chem. Rev. **1998**, 98 (5), 1875–1918.
- (37) Seki, T.; Abe, K.; Egawa, Y.; Miki, R.; Juni, K.; Seki, T. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **2015**, 82, 417–424.

- (38) Toropainen, T.; Heikkilä, T.; Leppänen, J.; Matilainen, L.; Velaga, S.; Jarho, P.; Carlfors, J.; Lehto, V.-P.; Järvinen, T.; Järvinen, K. *Pharm. Res.* **2007**, 24 (6), 1058–1066.
- (39) Takeo, K.; Kuge, T. Agric. Biol. Chem. 1970, 34 (4), 568–574.
- (40) Takeo, K.; Kuge, T. Agric. Biol. Chem. 1969, 33 (8), 1174–1180.
- (41) Harata, K.; Takenaka, Y.; Yoshida, N. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* 2 **2001**, 1667–1673.
- (42) Higashi, K.; Ideura, S.; Waraya, H.; Moribe, K.; Yamamoto, K. *Cryst. Growth Des.* **2009**, *9* (10), 4243–4246.
- (43) Higashi, K.; Ideura, S.; Waraya, H.; Moribe, K.; Yamamoto, K. *J. Pharm. Sci.* **2011**, *100* (1), 325–333.
- (44) Harada, A.; Li, J.; Kamachi, M. *Macromolecules* **1993**, 26 (21), 5698–5703.
- (45) Harata, K.; Uedaira, H. Bull. Chem. Soc. Jpn. 1975, 48, 375–378.
- (46) Yan, J.; Springsteen, G.; Deeter, S.; Wang, B. *Tetrahedron* **2004**, *60* (49), 11205–11209.
- (47) Springsteen, G.; Wang, B. Tetrahedron 2002, 58 (26), 5291–5300.
- (48) He, Y.; Shen, X.; Chen, Q.; Gao, H. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2011**, *13* (2), 447–452.
- (49) Xue, Q.; Le, X.; Dang, Z.; Du, F. Y. Bull. Chem. Soc. Jpn. **2009**, 1213 (9), 1209–1213.
- (50) Yuichi Tozuka, Etsuo Yonemochi, Toshio Oguchi, K. Y. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2000**, *73*, 1567–1572.
- (51) Stanier, C. A.; Alderman, S. J.; Claridge, T. D. W.; Anderson, H. L. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2002**, *41* (10), 1769–1772.
- (52) Oda, Y.; Matsuda, S.; Yamanoi, T.; Murota, A.; Katsuraya, K. *Supramol. Chem.* **2009**, *21* (7), 638–642.
- (53) Schneider, H.-J.; Hacket, F.; Rüdiger, V.; Ikeda, H. *Chem. Rev.* **1998**, 98 (5), 1755–1786.
- (54) Harada, A.; Miyauchi, M.; Hoshino, T. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **2001**, *41*, 115–121.

- (55) Zhang, Y. M.; Yang, Z. X.; Chen, Y.; Ding, F.; Liu, Y. *Cryst. Growth Des.* **2012**, *12* (3), 1370–1377.
- (56) Brange, J.; Kang, S. Diabetes Care 1990, 13 (9), 923–954.
- (57) American Diabetes Association. *Diabetes Care* **2014**, *37* (Supplement 1), S14–S80.