

ポリボロン酸と水溶性高分子間の相互作用を評価する  
実験系とそれを用いたボロン酸修飾インスリンの  
放出制御の評価に関する基礎的研究

武井 千弥

## 目次

### 略号と記号

### 総論の部

緒言 . . . . . 1

## 第1章 静的・動的粘弾性測定を用いたポリボロン酸誘導体/水溶性

高分子間における相互作用の評価 . . . . . 4

第1節 ピリジニウムボロン酸誘導体の合成 . . . . . 4

第2節 ピリジニウムボロン酸誘導体/水溶性高分子ゲルの調製と静的・動的粘弾性測定を用いた力学的特性の評価 . . . . . 8

第3節 小括 . . . . . 18

## 第2章 水晶振動子マイクロバランス法を用いたポリボロン酸誘導

体/水溶性高分子間における相互作用の評価 . . . . . 20

第1節 水晶振動子マイクロバランス法を用いたピリジニウムボロン酸誘導体とポリビニルアルコール間における相互作用の評価 . . . . . 21

第2節 ポリフェニルボロン酸の合成 . . . . . 24

第3節 水晶振動子マイクロバランス法を用いたポリフェニルボロン酸とポリアリルアミン間における相互作用の評価 . . . . . 25

第4節 小括 . . . . . 29

### 第3章 フロースルーセル型溶出試験器を用いた

ポリボロン酸誘導体/水溶性高分子ゲルにおける

糖応答性崩壊の評価 . . . . . 31

第1節 フロースルーセル型溶出試験器による

ジピリジニウムボロン酸/ポリビニルアルコールゲルにおける

糖応答性崩壊挙動の評価 . . . . . 31

第2節 フロースルーセル型溶出試験器によるポリフェニルボロン酸/ポリアリルアミンゲルにおける糖応答性崩壊挙動の評価 . . . . . 36

第3節 小括 . . . . . 38

### 第4章 水晶振動子マイクロバランス法とフロースルーセル型溶出

試験器を用いたボロン酸修飾インスリン/ポリビニルアル

コールゲルにおける糖応答性インスリン放出制御の

評価 . . . . . 39

第1節 フェニルボロン酸修飾インスリンの合成 . . . . . 40

第2節 水晶振動子マイクロバランス法を用いたフェニルボロン酸修飾インスリンとポリビニルアルコール間における相互作用の評価 . . . . . 42

第 3 節	フロースルーセル型溶出試験器によるフェニルボロン酸修飾インスリン/ポリビニルアルコールゲルにおける糖応答性薬物放出の評価	・ ・ ・ ・ ・ 45
第 4 節	小括	・ ・ ・ ・ ・ 49
結論		・ ・ ・ ・ ・ 50
謝辞		・ ・ ・ ・ ・ 53
実験の部		・ ・ ・ ・ ・ 54
参考文献		・ ・ ・ ・ ・ 65

## 略号と記号

本論文では、以下に示す記号を略語として用いた。

3-AAmPBA	3-Acrylamidophenylboronic acid
AIBN	2, 2'-Azobis(isobutyronitrile)
DDS	Drug Delivery System
DE	Diethylene glycol
DPrBA	Dipyridiniumboronic acid
DPrBA/PVA gel	A gel composed of dipyridiniumboronic acid and poly(vinyl alcohol)
FPBA-Ins	Fluorophenylboronic acid-modified insulin
Fru	Fructose
GOx	Glucose oxidase
Glc	Glucose
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]ethanesulfonic acid
HPrBA	Hexapyridiniumboronic acid
HPrBA/PVA gel	A gel composed of hexapyridiniumboronic acid and poly(vinyl alcohol)
Ins	Insulin
PAA	Poly(allylamine)
PBA	Phenylboronic acid
PBA-Ins	Phenylboronic acid-modified insulin
PVA	Poly(vinyl alcohol)
PolyPBA	Poly(3-acrylamidopheylboronic acid)
PolyPBA/PAA gel	A gel composed of poly(3-acrylamidopheylboronic acid) and poly(allylamine)
QCM	Quartz crystal microbalance
RAFT	Reversible addition-fragmentation chain transfer
TNBS	2,4,6-Trinitrobenzenesulfonic acid
TPrBA	Tripyridiniumboronic acid
TPrBA/PVA gel	A gel composed of tripyridiniumboronic acid and poly(vinyl alcohol)

## 総論の部

### 緒言

Drug Delivery System (DDS) は、医薬品に何らかの機能を付与させることで薬物の体内動態を精密に制御し、必要な時に・必要な量を・必要な場所へ作用させる技術である。この特性を利用することで、服薬回数の減少や急激な血中薬物濃度の変動、副作用の発現リスクを軽減することが可能となる。その結果、より効果的な薬物治療が実施され、患者のアドヒアランスおよび Quality of Life の向上が期待できる (Figure 1)。コントロールドリリースは、DDS において求められる重要な機能のうちの 1 つであり、その機能を付与した製剤は、大きく徐放性製剤と放出制御製剤に分類される。長時間に渡って有効な血中濃度を維持することで投与回数を減少させることができる徐放性製剤は、これまでに多くの医薬品が開発され、すでに臨床で実用化されている<sup>1)</sup>。一方で、放出制御製剤は、意図する速度で薬物を放出し、必要によっては外部の刺激 (pH, 温度, 光, 物質の濃度変化) に応じて薬物の放出量を制御することも求められる。しかしながら、高度な制御機能を付与した製剤の実用化は十分ではなく、時間的かつ空間的な制御機能を有するインテリジェントマテリアルを利用する研究が試みられている<sup>2-13)</sup>。このインテリジェントマテリアルを含むシステムを実現させるためには、そのインテリジェントマテリアル自体とそれを組み込んだ薬物放出制御システムを、より効率的かつ的確に設計することが重要である。

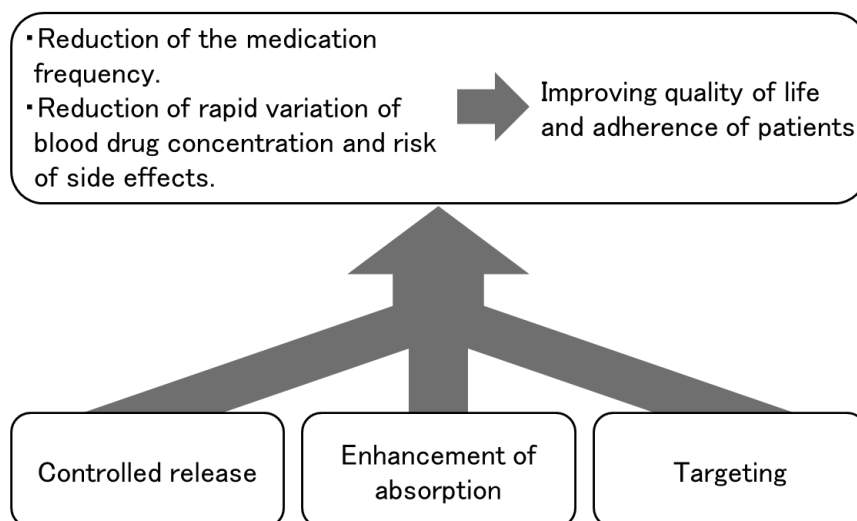


Figure 1. Capabilities and effects of Drug Delivery System.

著者は、放出制御製剤のデザイン基盤として糖応答性マテリアル<sup>14-16)</sup>に着目した (Figure 2)。これは、厳密な血中濃度コントロールが要求される糖尿病の治療、特に 1 型糖尿病のインスリン (Ins) 補充療法において非常に有用であると考えられる<sup>17-20)</sup>。

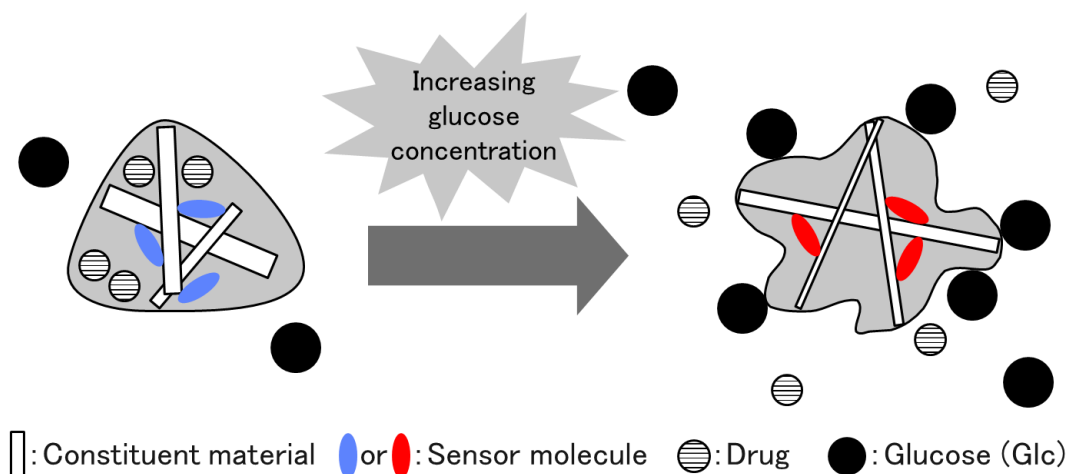
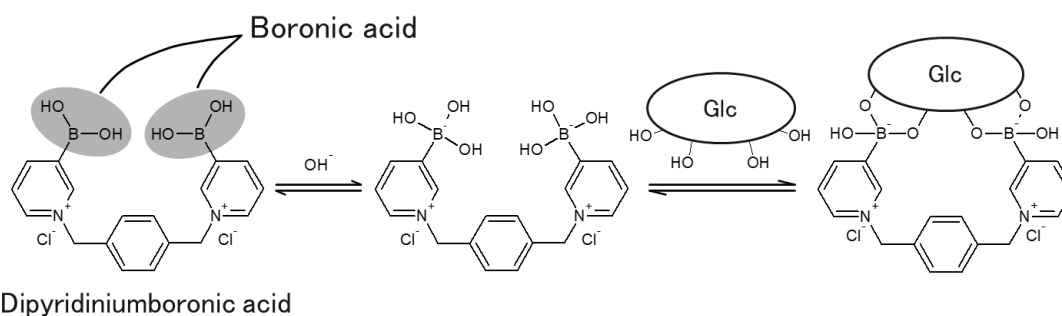


Figure 2. A material whose functional characteristics vary with glucose concentration change.

糖センサーとして知られているボロン酸は、アルカリ性条件下でホウ素にヒドロキシ基が配位し、ジオール構造をもつ化合物と可逆的に結合する (Scheme 1)。よって、本研究では、ジオール化合物への結合能や負の電荷を持つといったボロン酸の特性を糖応答性マテリアルの調製に利用した。ボロン酸構造を複数有する化合物は、ポリビニルアルコール (PVA) のような分子内にヒドロキシ基を多数含む水溶性高分子を架橋することができる<sup>21-23)</sup>。そのため、ポリボロン酸は PVA と共存することで複合材料を形成し、得られたその複合材料は、ジオール構造を有する糖を添加することで、結合定数の違いによる結合の置換が生じ、



Scheme 1. Equilibrium of diboronic acid and Glc.

崩壊すると期待される (Figure 3)。また、静電的な相互作用を利用した複合材料の形成が報告されていることから<sup>24-26</sup>、ヒドロキシ基が配位することで負電荷を帯びたポリボロン酸は、ポリカチオンと静電的相互作用による複合材料の形成も期待できる<sup>27</sup>。

そこで、第1章では粘弾性測定を、第2章では quartz crystal microbalance (QCM) 法を用いてポリボロン酸誘導体と水溶性高分子間の相互作用を評価した。第3章では、その相互作用が糖の添加によって消失する過程を、新規に作製したフロースルーセル型の溶出試験器を用いて評価した。そして、最終章では、第3章までに用いた種々の実験系を組み合わせ、糖応答性 **Ins** 放出材料のデザインを試みた。

よって、本研究では、物理化学的な性質を評価する実験系を利用して、ポリボロン酸がポリオールもしくはポリカチオン性の水溶性高分子との間で生じる相互作用と、糖の存在という刺激に応じた相互作用の変化、および相互作用の発生や消失に起因する複合材料の特性を調査することにより、種々実験系における刺激応答性材料の設計に向けた情報を得るための手法としての有用性を評価すること、そしてそれらを応用して **Ins** の放出制御機能を有する材料を調製することを目的とした。

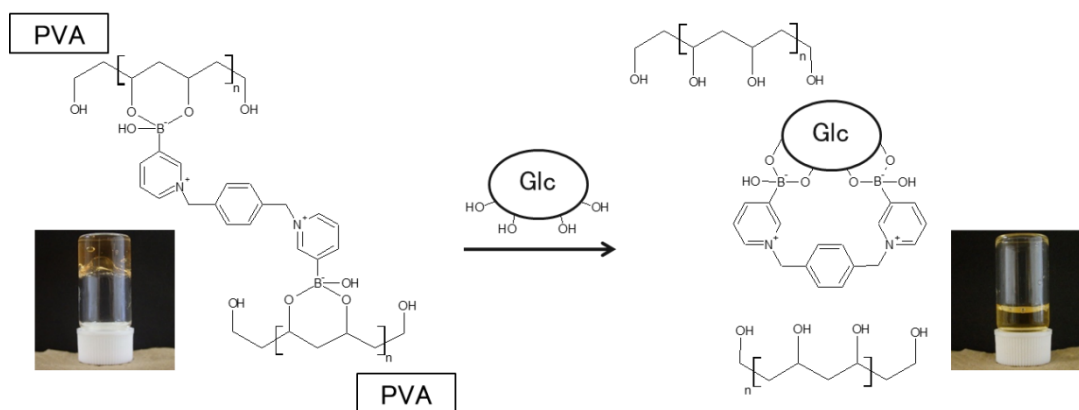


Figure 3. Formation of a composite material due to cross-linking PVA chain by diboronic acid and disintegration of the composite material due to cross-linking cleavage by addition of Glc.



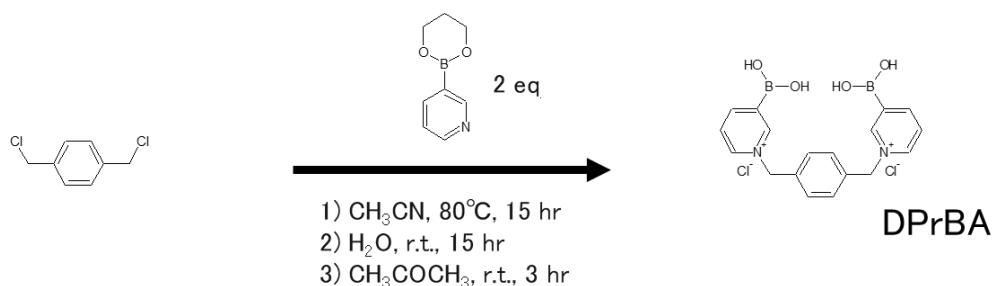
## 第1章 静的・動的粘弾性測定を用いたポリボロン酸誘導体/水溶性

### 高分子間における相互作用の評価

本章では、糖応答性の機能を付与したマテリアルを構築するうえで、ピリジニウムボロン酸構造を複数有する化合物を用いた。このピリジニウムボロン酸誘導体は親水性が高く、ヒドロゲルの調製が容易になると期待した。そして、それらを PVA と組み合わせることでゲル (複合材料) が調製可能か検討した後、粘弾性測定を実施した。そもそも、粘弾性測定にはひずみまたは応力を一方向に加える静的粘弾性測定と、正弦波的にひずみを加えて測定を行う動的粘弾性測定がある<sup>28, 29)</sup>。静的粘弾性測定は、粘性と弾性の両方を反映したサンプルの力学的特性を評価する。一方で、動的粘弾性測定はそれら 2 つの性質を別々に評価することが可能で、サンプルを構成する高分子の分子構造や分子運動に関する情報を得ることができる。本研究では、静的粘弾性測定として応力緩和測定を、動的粘弾性測定として強制振動測定を実施した。そして、これらの測定により、ゲルの力学的特性を調査して、内部の 3 次元ネットワーク構造とそれに関連したボロン酸/PVA 間の相互作用について考察した。

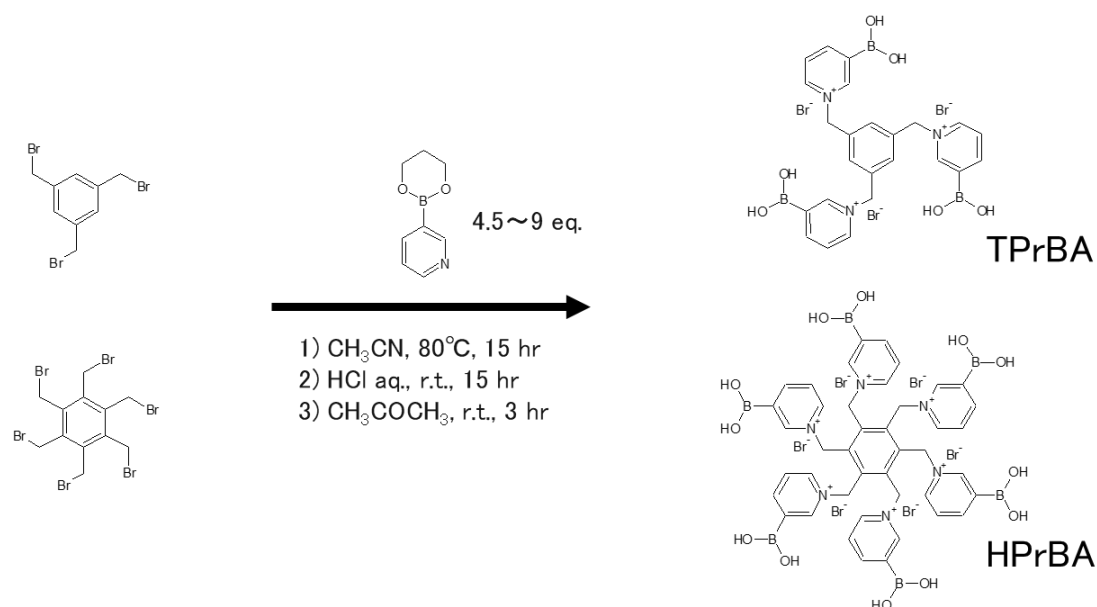
### 第1節 ピリジニウムボロン酸誘導体の合成

Scheme 2 および 3 に示す方法により、dipyridiniumboronic acid (DPrBA)、tripyridiniumboronic acid (TPrBA)、hexapyridiniumboronic acid (HPrBA) を合成した。すなわち、1, 4-bis(chloromethyl)benzene、1, 3, 5-tris(bromomethyl)benzene、hexakis(bromomethyl)benzene を、それぞれ 3-pyridineboronic acid 1, 3-propanediol ester と反応させた後、水中でボロン酸部位の脱保護を行い、その溶液をアセト



Scheme 2. Synthesis of DPrBA.

ン中に滴下して固体を析出させることで目的物質を得た<sup>30)</sup>。得られた各ピリジニウムボロン酸誘導体は、核磁気共鳴 (NMR) や質量分析 (MS) の測定により構造決定を行った (Figure 4, 5)。<sup>1</sup>H-NMR スペクトルにおいて、全てのピリジニウムボロン酸誘導体で 6 ppm 付近にメチレン基のプロトンに由来するシグナル、8 ppm よりも低磁場側にピリジニウム環のプロトンに由来するシグナルが観察された。また、DPrBA と TPrBA においては 7.6 ppm 付近にベンゼン環のプロトンに由来するシグナルも観察された。各シグナルの積分値の合計は、DPrBA、TPrBA、HPrBA でそれぞれ 15.97、21.09、35.92 であった。これは推測される積分値の合計値 (DPrBA 16, TPrBA 21, HPrBA 36) とほぼ一致した。MS スペクトルにおいて、DPrBA あるいは TPrBA のグリセリン複合体としての分子量に由来する  $m/z$  461 と 652 にピークが確認された。これらの結果から目的の化合物が合成できていることが確認できた。



Scheme 3. Syntheses of TPrBA and HPrBA.

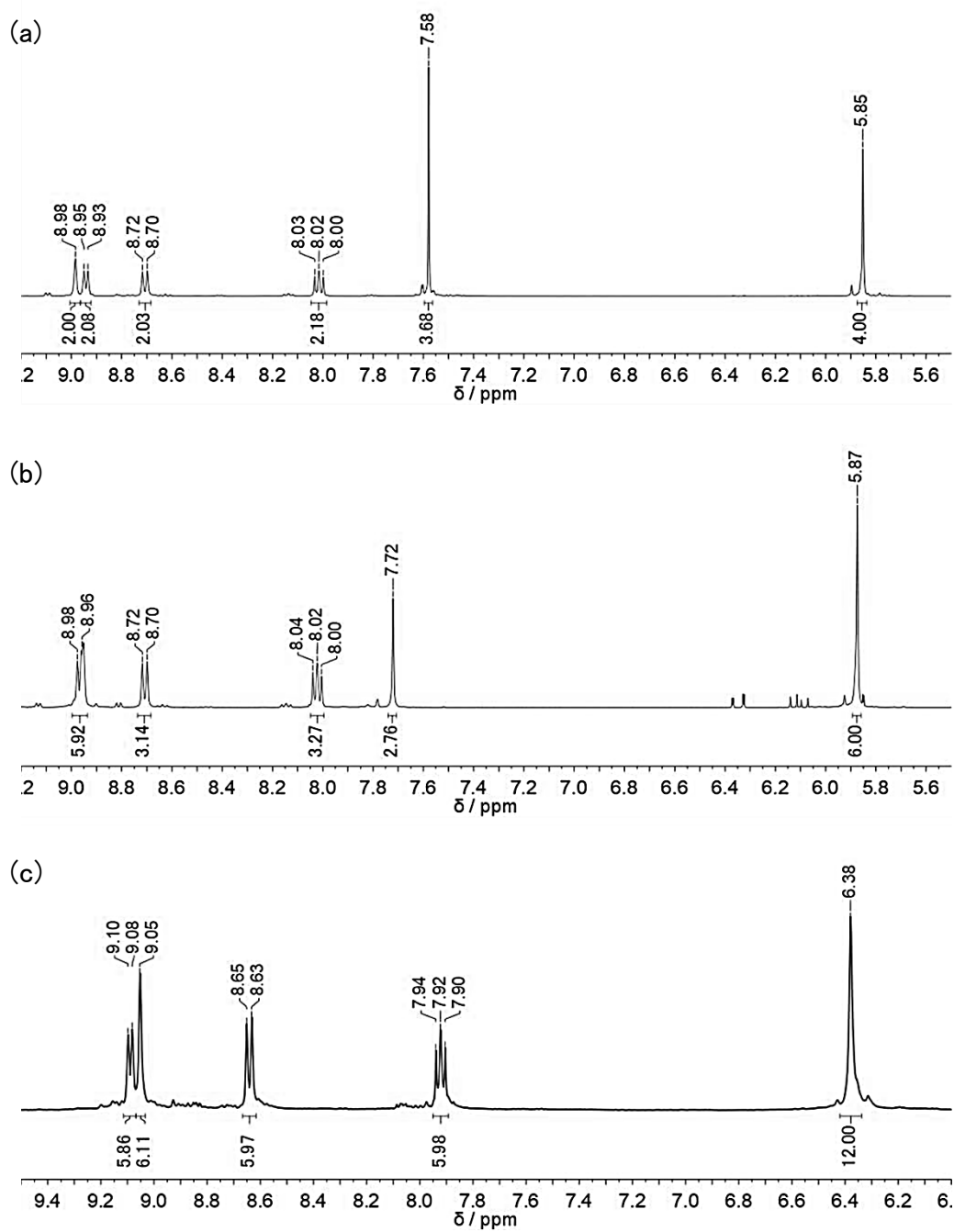


Figure 4.  $^1\text{H-NMR}$  spectra of pyridiniumboronic acid derivatives. (a) DPrBA (b) TPrBA (c) HPrBA (methanol- $d_4$ ).

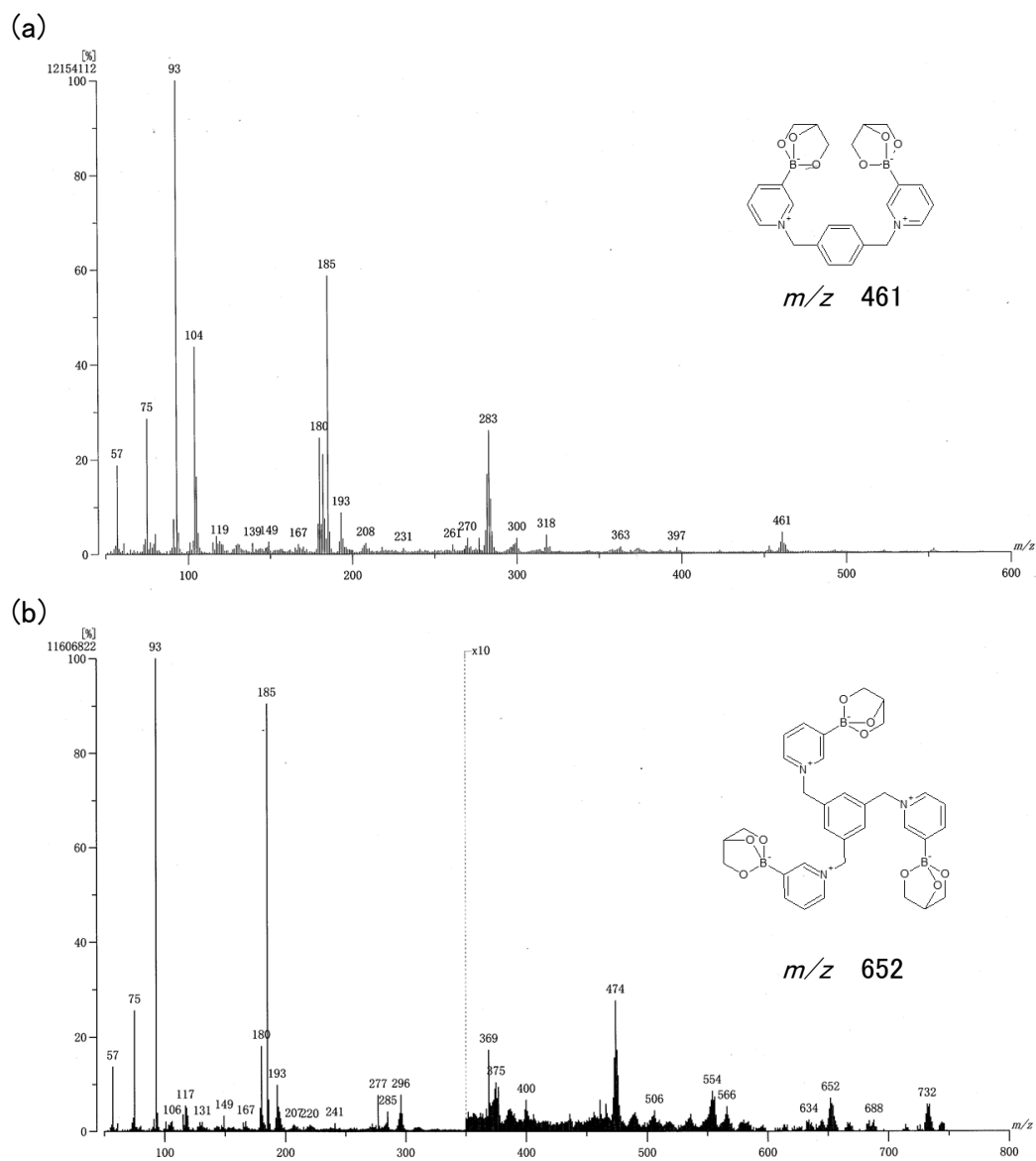


Figure 5. FAB-MS (positive mode) and structures of pyridiniumboronic acid derivatives glycerin complex. (a) DPrBA, (b) TPrBA

## 第2節 ピリジニウムボロン酸誘導体/水溶性高分子ゲルの調製と静的・動的粘弾性測定を用いた力学的特性の評価

### 静的・動的粘弾性測定を用いた力学的特性の評価

合成したピリジニウムボロン酸誘導体と PVA 間で相互作用が生じることで、ゲルが形成されるか検討した。DPrBA 水溶液あるいは TPrBA 水溶液、HPrBA 水溶液、必要に応じて蒸留水を加え、次いで NaOH 水溶液を加えて混合した。次いで、PVA 水溶液を加えて激しく振とう混和した後、18 時間室温下で静置した (Figure 6)。なお、この操作で調製されるゲルにおいて推測されるボロン酸と PVA のヒドロキシ基の割合は、ボロン酸部位 1 つに対してヒドロキシ基の繰り返しが約 20 組存在している。

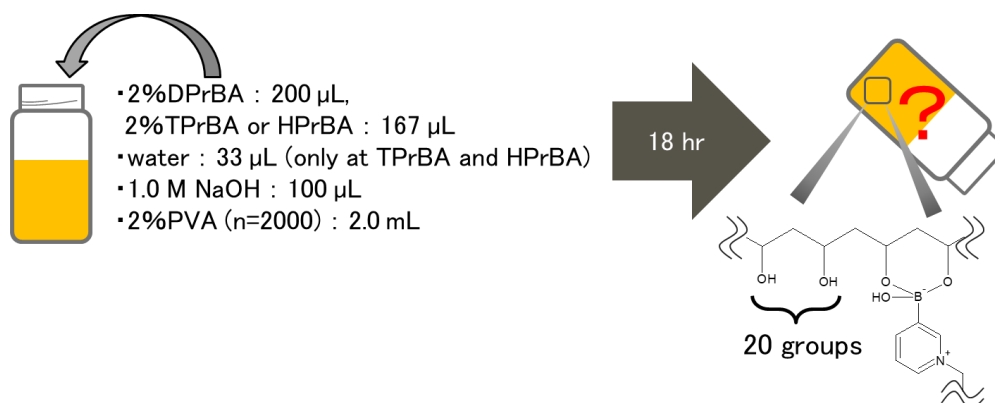


Figure 6. Preparation of pyridiniumboronic acid derivative/PVA gels.

Figure 7 に上記操作により得られたゲルの観察結果を示す。全てのピリジニウムボロン酸誘導体において、PVA と共存することによるヒドロゲルの形成が観察された。よって、ゲル内では 3 次元ネットワークが形成されていることが示

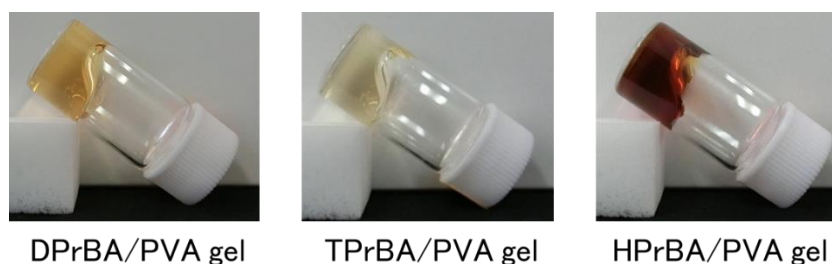


Figure 7. Pictures of pyridiniumboronic acid derivative/PVA gels.

唆され、これはボロン酸とポリオール間における相互作用 (エステル結合) に起因していると考えられる。

形成された各ゲルの静的・動的粘弾性評価に先立ち、内部のネットワーク構造とそれに起因する力学的性質について推測した。Figure 6 で示すように、形成された 3 種類のゲルは PVA のヒドロキシ基に対してボロン酸が同じ割合で存在するように調製している。よって、分子内のボロン酸部位が多いほど架橋剤としてのピリジニウムボロン酸誘導体の分子数は少なくなることを考慮した (Figure 8)。まず、架橋点周辺における PVA の凝集度について、DPrBA はボロン酸部位が 2 つのみであるため、3 種類のゲルの中で架橋点の PVA の凝集度は最も低くなると推測した。一方で、分子内に 6 つのボロン酸部位がある HPrBA は、PVA が最も凝集すると考えられる。よって、ゲル全体としてのネットワークの網目の大きさは、架橋剤が多く分散した状態の DPrBA/PVA gel で最も小さく、架橋剤が少ない HPrBA/PVA gel で最も大きくなると推測した。ピリジニウムボロン酸誘導体におけるボロン酸部位の可動性については、DPrBA/PVA gel で動きやすく、HPrBA/PVA gel で動きにくいと考えられる。TPrBA/PVA gel においては、DPrBA/PVA gel と HPrBA/PVA gel の中間の性質を示すと推測した。これらのこ

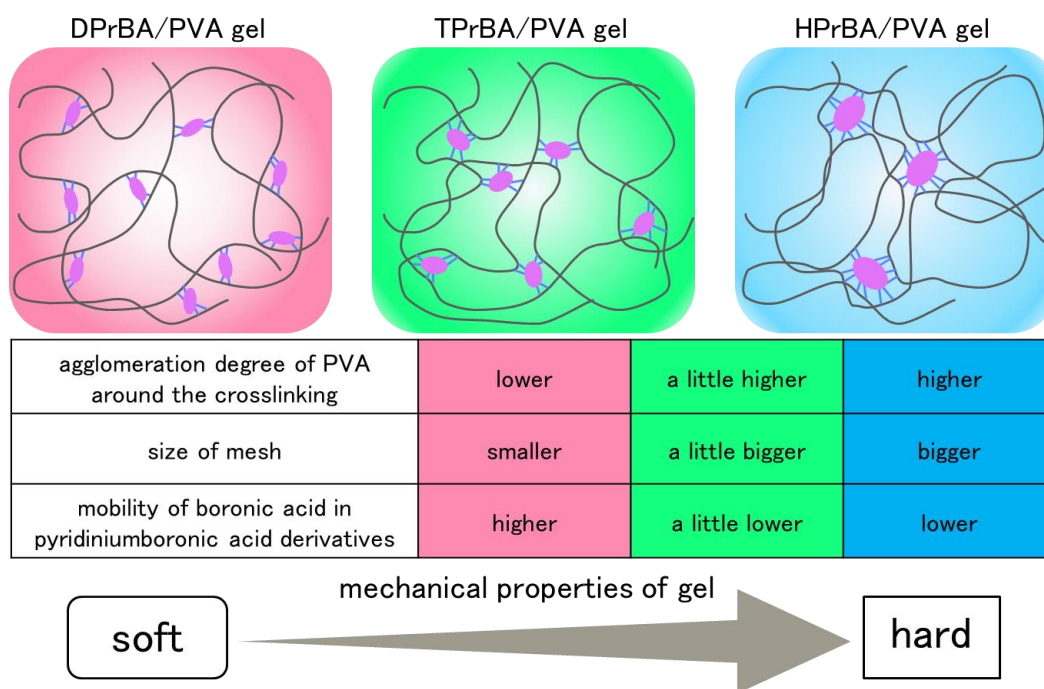


Figure 8. Prediction of internal structures and mechanical properties of pyridiniumboronic acid derivative/PVA gels.

とから、ゲルとしてのマクロな性質は、分子内のボロン酸部位数が多くなるほど硬いゲルが形成されると推測した。すなわち、応力緩和測定で得られる緩和時間等の値の大きさは DPrBA/PVA gel < TPrBA/PVA gel < HPrBA/PVA gel になると考えられる。また、動的粘弾性測定の結果で得られる弾性を表す貯蔵弾性率 ( $G'$ ) は DPrBA/PVA gel < TPrBA/PVA gel < HPrBA/PVA gel、粘性を表す損失弾性率 ( $G''$ ) は HPrBA/PVA gel < TPrBA/PVA gel < DPrBA/PVA gel になると考えられる。

粘弾性測定のうち、まずは応力緩和測定を実施した (Figure 9)。3種類のピリジニウムボロン酸誘導体/PVA gel を 5.0 mL ずつ調製し、18 時間室温下で静置した。そのゲルに円柱状の治具を使って約 30%のひずみを加え続け、その際の応力の減衰を経時的に測定した。得られたプロファイルは以下に示すような弾性項を有する Maxwell の並列モデルに組み込むことで成分 A~D の値を求め、それぞれのゲルについての特徴づけおよびゲル間での比較を行った。なお、ここでの  $S$  は応力、 $S_0$  は最大応力、 $t$  は  $S_0$  からの経過時間、 $\tau_A \sim \tau_C$  は成分 A~C の緩

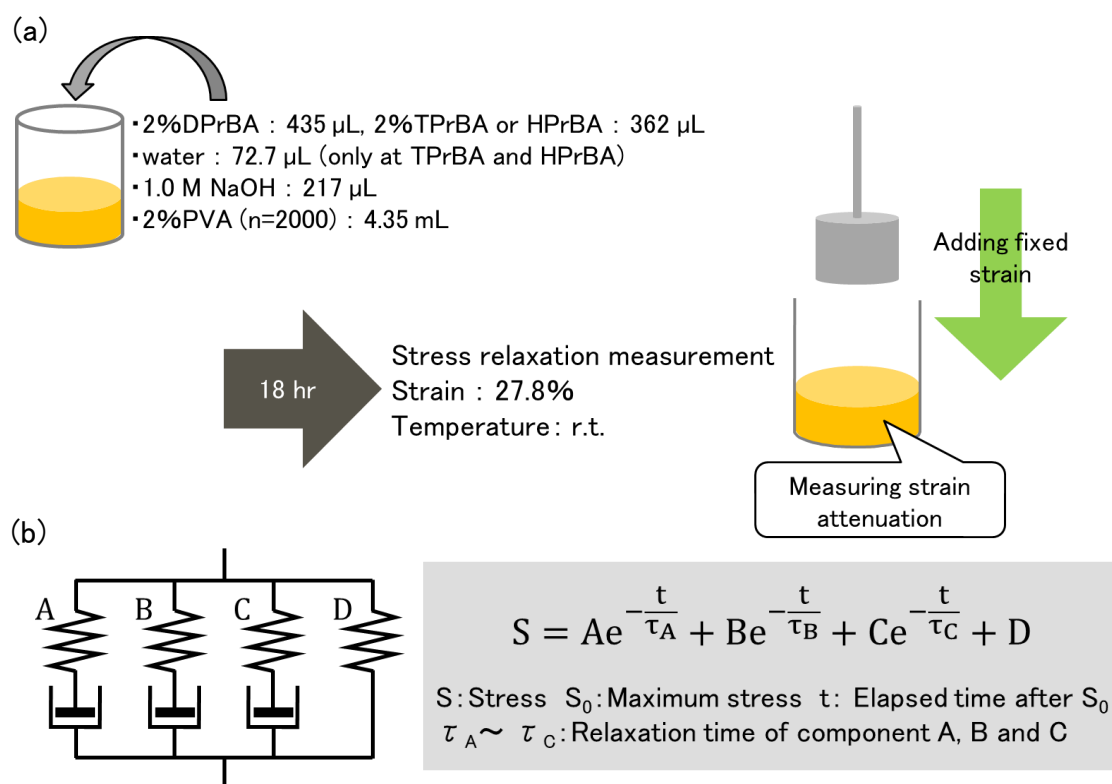


Figure 9. (a) Preparation of pyridiniumboronic acid derivative/PVA gels and stress relaxation measurement. (b) A maxwell model with parallel elements and an elastic term for the analysis.

和時間を示す。

Figure 10 に応力の継時的な変化を示す。全てのゲルで経時的な応力減衰、すなわち応力緩和が観察された。またその緩和は、特に HPrBA/PVA gel で速いことが示された。さらに、DPrBA/PVA gel と HPrBA/PVA gel はそれぞれ約 20 および 15 Pa の応力が残存したが、TPrBA/PVA gel は観測時間内において応力は減少し続けた。

プロファイルをモデルに組み込んだところ、DPrBA/PVA gel と HPrBA/PVA gel においては成分 A~D が観察され、TPrBA/PVA gel においては成分 A~C が観察された。全てのゲルにおいて最も高い割合を占める要素は成分 C であり、その割合は 50% 以上であった (Table 1)。そこで、成分 C におけるパラメータに関して比較した。緩和時間  $\tau_c$  の値は、HPrBA/PVA gel < DPrBA/PVA gel < TPrBA/PVA gel であり、ここでも HPrBA/PVA gel でより速い応力緩和が生じていることが示された。また、 $S_0$  の値を比較すると、 $\tau_c$  と同様の大小関係であった。

これらの結果から、HPrBA/PVA gel が最も柔軟な 3 次元ネットワークを形成し、TPrBA/PVA gel が最も堅硬な 3 次元ネットワークを形成していることが示唆され、測定実施前の推測とは異なる結果となった。

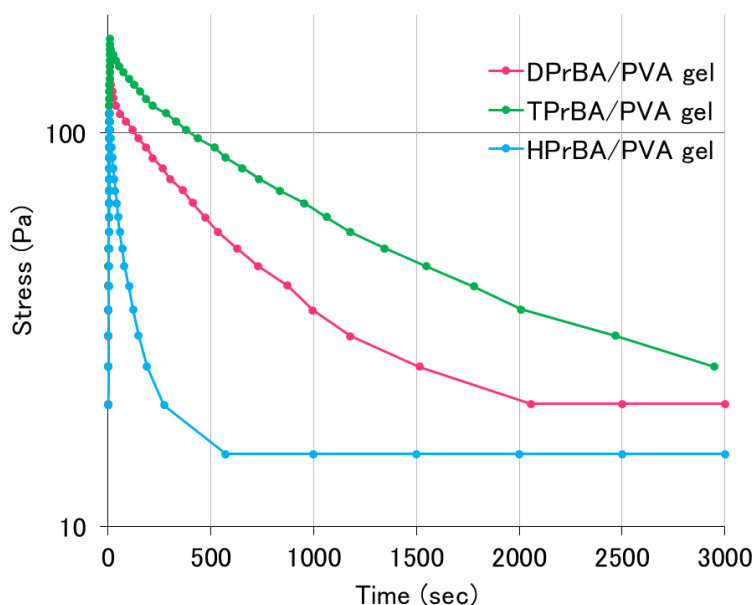


Figure 10. The change in stress over time of pyridiniumboronic acid derivative/PVA gels (strain 27.8%).



Table 1. Viscoelastic characteristics of pyridiniumboronic acid derivative/PVA gels.

	A				B			C			D					
	$S_0$ (Pa)	A (Pa)	A/ $S_0 \times$ 100 (%)	$\tau_A$ (sec)	Spring constant (N/mm)	B (Pa)	B/ $S_0 \times$ 100 (%)	$\tau_B$ (sec)	Spring constant (N/mm)	C (Pa)	C/ $S_0 \times$ 100 (%)	$\tau_C$ (sec)	Spring constant (N/mm)	D (Pa)	D/ $S_0 \times$ 100 (%)	Spring constant (N/mm)
DPrBA/PVA gel	144	4.26	3.0	1.2	0.003	17.4	12	42	0.014	101	71	510	0.080	20.5	14	0.016
TPrBA/PVA gel	167	14.4	8.6	31	0.011	57.9	35	386	0.045	94.7	57	2174	0.074	—	—	—
HPrBA/PVA gel	109	3.96	3.6	2.1	0.003	30.6	28	24	0.024	58.9	54	106	0.046	15.3	14	0.012

次に、動的粘弾性測定を実施した。これは、正弦的なひずみを加えたときに発生する応力と位相差 ( $\delta$ ) から、サンプルの粘弾性挙動を評価する方法で、粘性を反映した $G'$ や弾性を反映した $G''$ 、それらの比から求められる  $\tan\delta (= G''/G')$  などの値が得られる。この  $\tan\delta$ は、サンプルの力学的特性に対する粘性の寄与を弾性の寄与で割った値であり、0に近いほど弾性体、大きいほど粘性体に近い性質を示す。

まずは、周波数を一定にして、加えるひずみの大きさを徐々に変化させていくひずみ分散測定を実施した。すなわち、プラスチック製のシャーレにゲルを調製して、0.16~400%の範囲でひずみを連続的に大きくしていき、 $G'$ と $G''$ の値を測定した (Figure 11)。

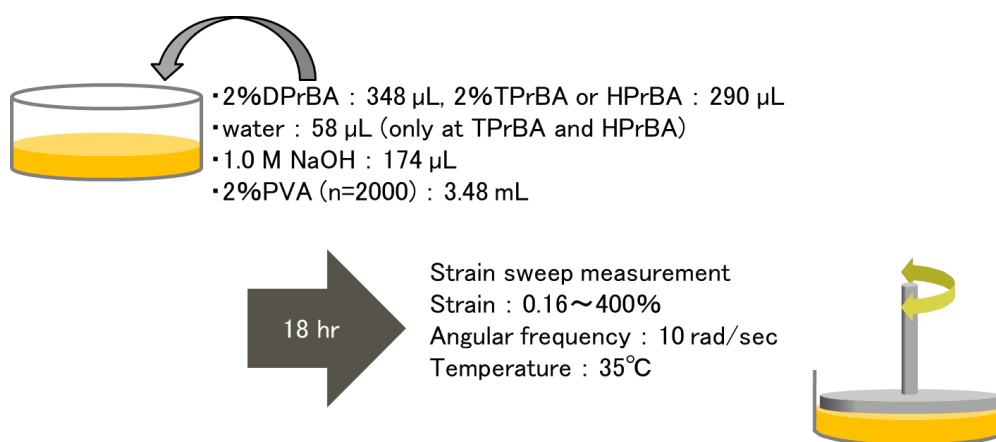


Figure 11. Preparation of pyridiniumboronic acid derivative/PVA gels and the strain sweep measurement.

Figure 12 に各ゲルにおけるひずみに対する $G'$ と $G''$ 値の変化を示す。全てのゲルにおいて、広い範囲で $G'$ と $G''$ が線形領域を有していた。これは、線形領域内のひずみに対してはゲルの内部構造が変化しないことを意味する。つまり、ピリジニウムボロン酸誘導体/PVA gel は安定な 3 次元ネットワークを構築していると考えられる。線形領域における $G'$ の結果に着目すると、DPrBA/PVA gel と TPrBA/PVA gel ではわずかな減少傾向が観察されたのに対して、HPrBA/PVA gel では一定の値を示していた。また、高ひずみ領域では $G'$ と $G''$ の増大が観察され、大きなひずみを加えることで弾性の性質が強くなること示された<sup>31)</sup>。特に、 $G''$ が増大し始めたひずみの大きさに着目すると、その傾向が最初に観察されたひずみはそれぞれ、DPrBA/PVA gel で 100%、TPrBA/PVA gel で 95%、HPrBA/PVA gel で 158%であった。よって、ひずみ分散測定では、最も線形領域が広い HPrBA/PVA gel が最も安定なゲルを形成していることが示された。

ここで、得られた結果からゲルの内部構造とひずみを加えることによる構造の変化を推測する。まず、長い線形範囲を有していたということは、架橋の切断とともに結合も同時に起きていると考えられる。ボロン酸と PVA 間の結合は可逆的であるため、 $G'$ と $G''$ が広い範囲で一定値を示す現象については概ね推測可能な結果であると言える。ところが、大きなひずみを加えることで弾性が強くな

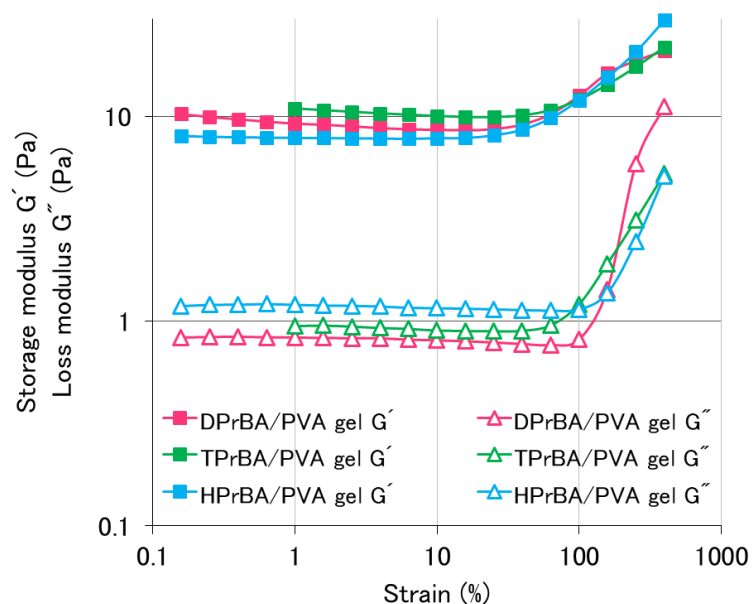


Figure 12. Strain sweeps of pyridiniumboronic acid derivative/PVA gels (angular frequency 10 rad/s).

り、ゲルが硬化する特性を示すという現象を考慮すると、測定前の推測を修正する必要が生じる。そもそもこの硬化現象は、大きなひずみを加えたときに架橋点が見かけ上増大して起きていると考える。つまり、ひずみを加えていない状態のゲル内には、PVA と相互作用していないボロン酸があり、大きな変形が生じるとそれらの位置関係が変化し、それまで相互作用していなかったボロン酸も PVA と相互作用が可能な距離に近づき、架橋点が増大すると考えられる。また、PVA は水素結合により物理ゲルを形成することが知られている<sup>32-34)</sup>。よって、ひずみが大きいときは PVA 同士でも相互作用が生じ、さらに架橋点が増大していると認められる状態が観察されると考えられる。よって、この測定でピリジニウムボロン酸誘導体/PVA gel では、架橋に関与していないボロン酸が存在することが示唆された (Figure 13)。

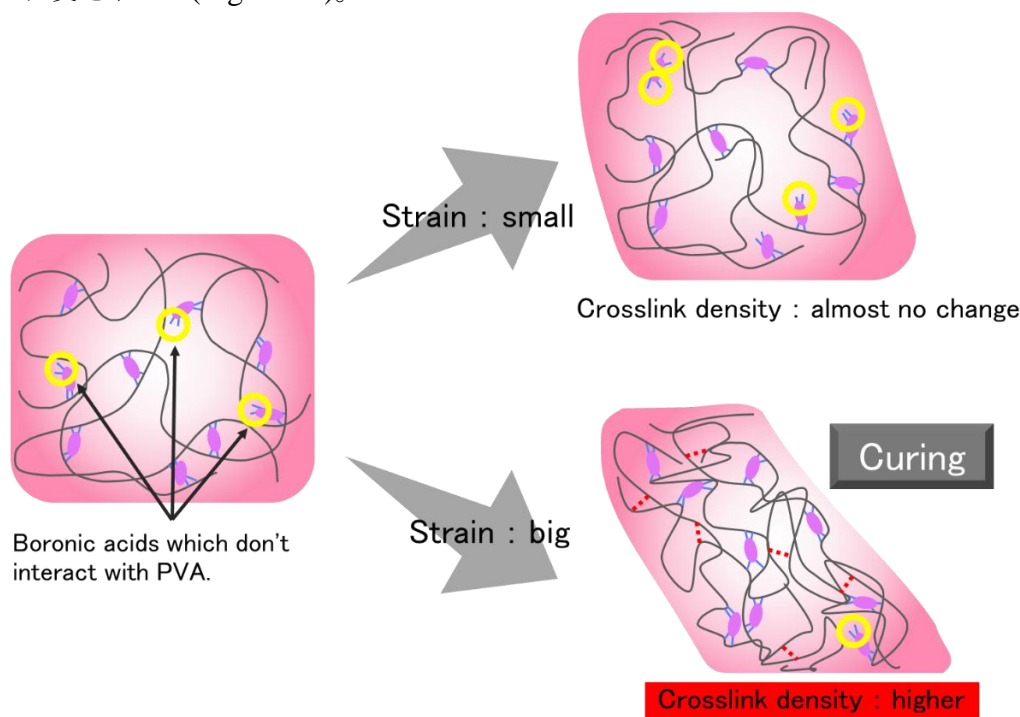


Figure 13. Internal structure and change expected of pyridiniumboronic acid derivative/PVA gels based on the measurement results.

次に、周波数分散測定を実施した。これは、ひずみの大きさを一定にして、ひずみを加える周期を徐々に変化させる測定方法である。ひずみは1%で、周波数を10~0.01 rad/s の範囲で連続的に小さくしていき、 $G'$ と $G''$ の値を測定した。その他ゲルの調製などに関してはひずみ分散測定の場合と同様の操作を行った (Figure 14)。

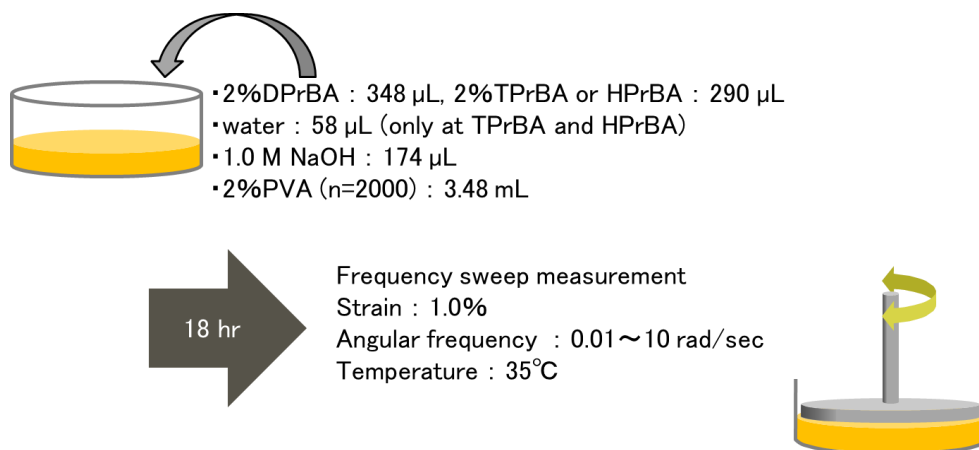


Figure 14. Preparation of pyridiniumboronic acid derivative/PVA gels and the frequency sweep measurement.

それぞれの周波数において測定された $G'$ と $G''$ の値を Figure 15 (a) に、 $\tan\delta$ の値を Figure 15 (b) に示す。測定の結果、全てのゲルにおいて、角周波数の低下に伴う $G'$ の減少と $G''$ の上昇 ( $\tan\delta$ の上昇) が観察された。つまり、ピリジニウムボロン酸誘導体/PVA gel は速くひずみを加えるときは $G' > G''$ であるため固体の性質が強く、遅くひずみを加えるときは $G' < G''$ であるため液体の性質が強く現れると示された。中でも、青い実線で示した HPrBA/PVA gel はより高い角周波数領域において $G'$ の減少と $G''$ の上昇 ( $\tan\delta$ の上昇) 挙動が観察され、0.30 rad/s 付近で $G' = G''$  ( $\tan\delta = 1.0$ ) になり、それより低い角周波数では $G' < G''$ となった。全てのゲルが固体の性質を強く示す 1.0 rad/s における $G'$ と $G''$ の値を比較すると、 $G'$ の値は HPrBA/PVA gel < DPrBA/PVA gel < TPrBA/PVA gel、 $G''$ の値は TPrBA/PVA gel < DPrBA/PVA gel < HPrBA/PVA gel という大小関係であった。よって、静的粘弾性測定の結果と同様に、HPrBA/PVA gel が柔軟なゲルを、TPrBA/PVA gel が堅硬なゲルを形成していることが示され、予測とは異なる結果となった。

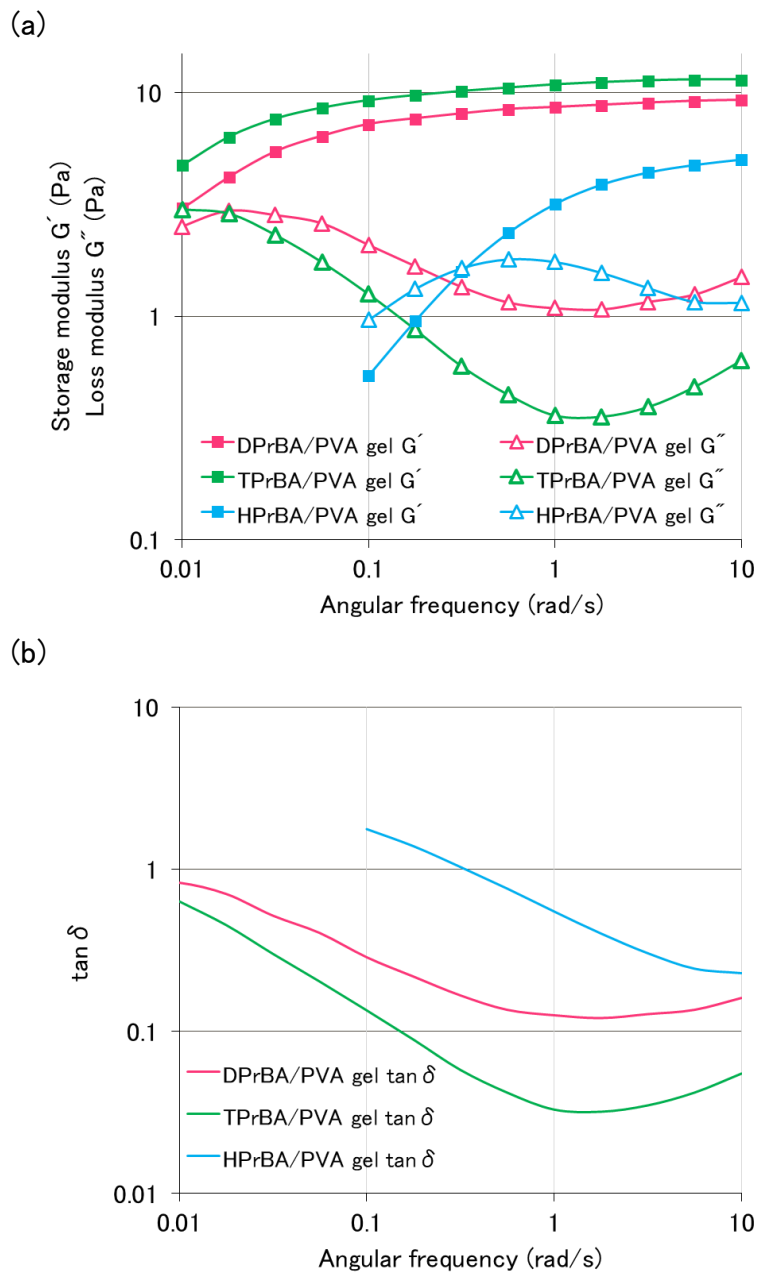


Figure 15. Frequency sweeps of pyridiniumboronic acid derivative/PVA gels (strain 1.0%). (a) Storage and loss moduli. (b)  $\tan \delta$ .

### 第3節 小括

本章では、まず水溶性の高いポリボロン酸としてピリジニウムボロン酸誘導体である DPrBA、TPrBA、HPrBA をそれぞれ合成し、PVA と共存させてヒドロゲルを調製することに成功した。そして、それらのゲル内で 3 次元ネットワークを構築しているボロン酸と PVA 間の相互作用に関して調査するために、あらかじめ結果の予測を立てたうえで静的および動的粘弾性測定を行った。

静的粘弾性測定においては応力緩和測定を行い、弾性項が組み込まれた Maxwell の並列モデルを用いて応力を各要素に分けた。最も重みのある成分において、緩和時間や初期応力の比較をしたところ 3 次元ネットワークの硬さは HPrBA/PVA gel < DPrBA/PVA gel < TPrBA/PVA gel であることが示された。また、DPrBA/PVA gel と HPrBA/PVA gel で弾性成分が観測されたことから、この 2 種類のゲル内には、ボロン酸と PVA 間の強固な結合が部分的に存在すると考えられる。

動的粘弾性測定においては、ひずみ分散測定と周波数分散測定を行った。ひずみ分散測定では、ピリジニウムボロン酸誘導体/PVA gel の 3 次元ネットワークが安定であること、ゲルは大きなひずみをかけることで硬化する性質を持つことが示された。この測定により、PVA との相互作用に寄与しないボロン酸がゲル内に存在すると考察した。周波数分散測定では、ピリジニウムボロン酸誘導体/PVA gel が、速いひずみに対しては固体の性質を、遅いひずみに対しては液体の性質を強く示すことが観測され、特に HPrBA/PVA gel で顕著に現れていた。さらに、 $\tan\delta$  の値に関しても比較することで、ゲルの硬さが静的粘弾性と同様な大小関係になると示された。

これらの結果から考察したピリジニウムボロン酸誘導体/PVA gel の内部構造と、それに起因したゲルの性質を Figure 16 に示す。DPrBA/PVA gel と TPrBA/PVA gel に関しては、PVA と相互作用しているボロン酸の割合が推測よりも少なかったものの、分子内のボロン酸部位が増えることによるゲルの特性変化に関しては概ね推測通りとなった。一方で、HPrBA/PVA gel においては、PVA との相互作用に寄与しないボロン酸の割合が DPrBA/PVA gel や TPrBA/PVA gel よりも多いと考えられる。その結果、PVA の凝集度が低く、網目構造が大きい柔軟なヒド

ロゲルが形成されたと考えられる。

以上のことから、複数の実験系を用いてポリボロン酸と水溶性高分子からなる複合材料のマクロな特性を評価することで、ポリボロン酸と水溶性高分子間の相互作用に関する情報を得ることができ、複合材料におけるミクロな構造の予測を行うことができたと考える。

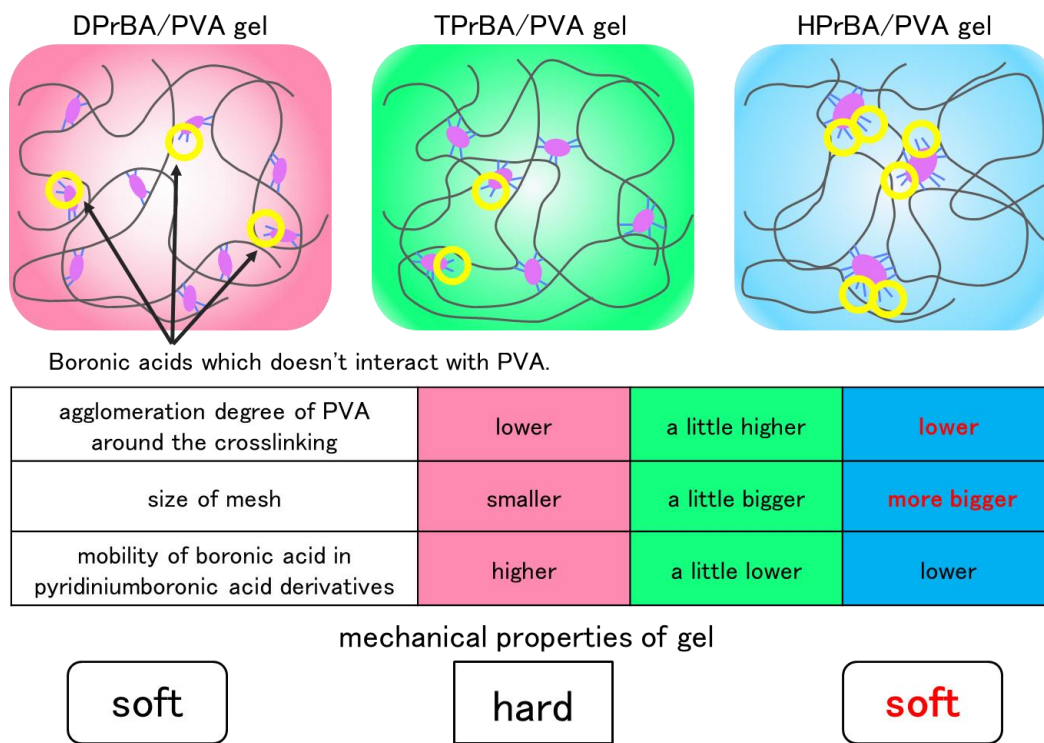


Figure 16. Internal structures and mechanical properties of pyridiniumboronic acid derivative/PVA gels expected based on the measurement results.



## 第 2 章 水晶振動子マイクロバランス法を用いたポリボロン酸誘導体/水溶性高分子間における相互作用の評価

第 2 章では、QCM 法を利用して、第 1 章で粘弾性を評価したピリジニウムボロン酸誘導体/PVA 間の化学結合による相互作用に加え、ポリフェニルボロン酸/ポリアリルアミン (PAA) 間の静電的な相互作用の評価を試みた。QCM 法は、電極上のミクロな質量の変化を振動数の変化として観測するため、交互累積膜などの材料調製に関する検討で利用されている<sup>35)</sup>。この方法において、物質間で相互作用が生じて電極上に物質が留まると質量は重くなり、振動数は低下する。一方、相互作用が消失して電極上の物質が剥がれると質量は軽くなるため振動数は上昇する。よって、この方法を利用することで、ポリボロン酸と水溶性高分子間における相互作用の発生および糖の添加による相互作用の消失をリアルタイムで観測できると考えた。そして、その振動数変化の傾向を比較することで、相互作用の差別化が可能になると期待した。また、本章で得られた結果を第 1 章の結果と組み合わせることによって、複合材料の特徴づけと、その特性に関する要因の考察がよりの確に行うことができ、マテリアル設計手法としての有用性が高まると考えた。

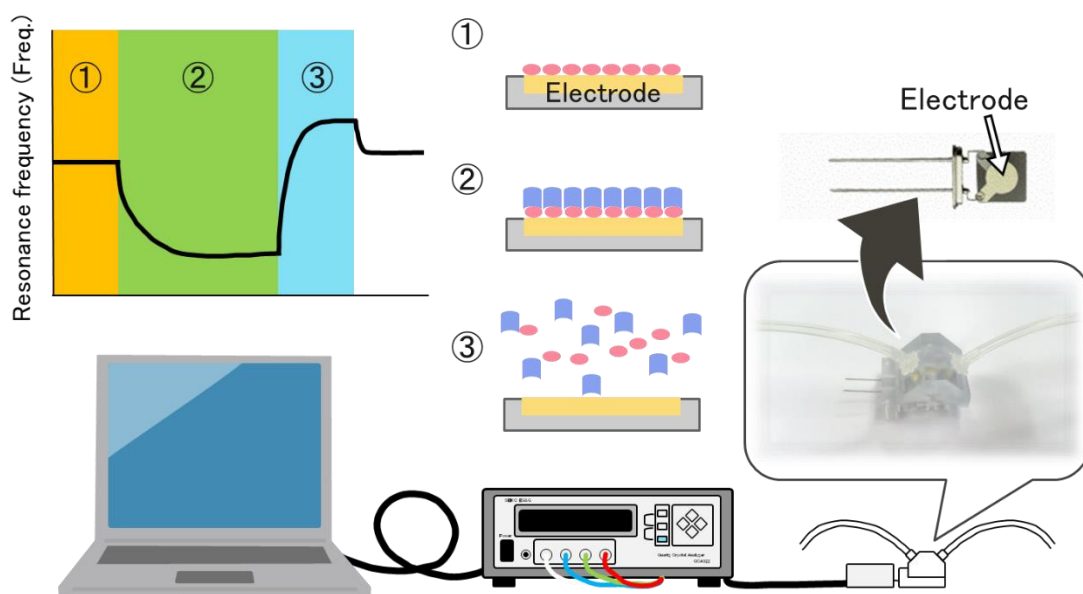


Figure 17. Outline of the QCM system with a flow through-cell and the mechanism of measurement.

## 第 1 節 水晶振動子マイクロバランス法を用いたピリジニウムボロン

### 酸誘導体とポリビニルアルコール間における相互作用の評価

まずは、ボロン酸とジオール間のエステル結合形成という化学的な相互作用について、ピリジニウムボロン酸誘導体と PVA を用いて検討した。すなわち、フロースルーセル型の装置内に電極を設置し、そこへ 150 mM NaCl を含有した 2-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl]ethanesulfonic acid (HEPES) 緩衝液 (10 mM, pH 7.4) で調製した材料溶液を繰り返し流して振動数変化を測定した。なお、振動数の低下は電極上の質量の増加を、振動数の上昇は質量の減少を意味する。よって、電極上に材料が積層する場合、材料溶液の流入に応じて振動数の低下プロファイルが得られると予想される (Figure 18)<sup>36</sup>。

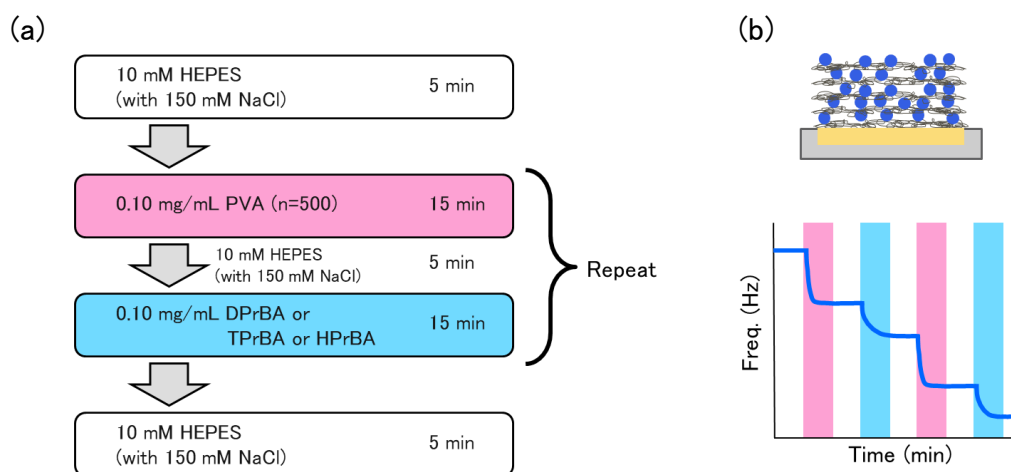


Figure 18. (a) Repetition procedure of the measurement. (b) Expected change of resonance frequency caused by the repetition procedure.

Figure 19 に得られた振動数プロファイルを示す。このように、PVA の流入では徐々に振動数が低下し、ピリジニウムボロン酸誘導体の流入では速やかな振動数の上昇が観察された。よって、全てのピリジニウムボロン酸誘導体は PVA と相互作用を生じていると考えられる。また、材料の溶液を流入させた後の振動数変化量に着目すると、その変化量の大きさは  $DPrBA < TPrBA < HPrBA$  であった。よって、ピリジニウムボロン酸誘導体と PVA 間における相互作用の違いを

比較できていると考えられる。しかし、振動数変化の傾向は予測とは異なるものだった。つまり、PVA およびピリジニウムボロン酸誘導体溶液を流入させた場合、どちらの流入でも振動数の低下が起きると予測していたが、実際はピリジニウムボロン酸誘導体の流入で振動数の上昇が観察された。この要因の 1 つとして、ピリジニウムボロン酸の水溶性が高いために、PVA と結合して電極上に積層した際、PVA の水溶性が増大したことが挙げられる。すなわち、初めに流入させた PVA が電極上に留まっているときは、凝集が起これ溶解性が低下して固体になるため、見かけ上質量が増大すると考えられる。そして、PVA に親水性の高いピリジニウムボロン酸誘導体が結合した場合は、PVA の凝縮が抑制され、質量が見かけ上軽くなったのではないかと考えられる。また、流入の際にピリジニウムボロン酸誘導体によって積層した PVA がはがされているということなども要因として挙げられる。

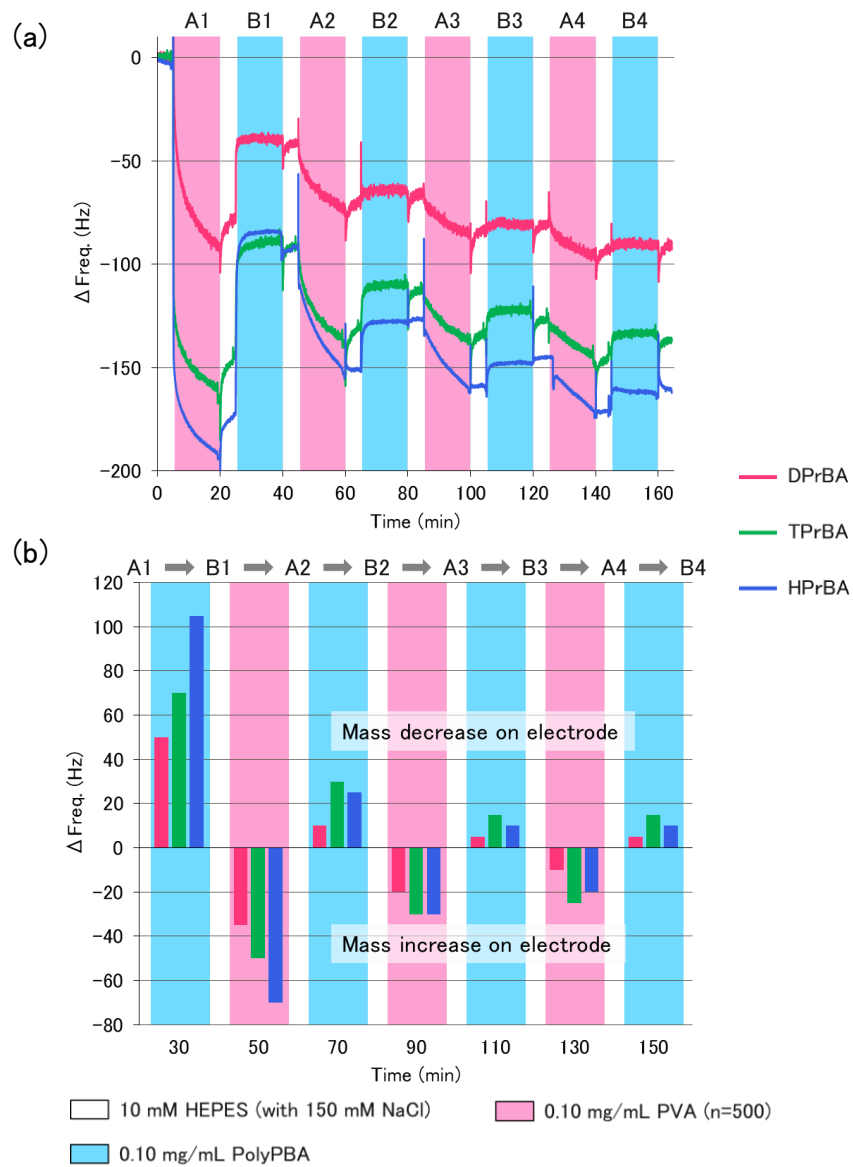
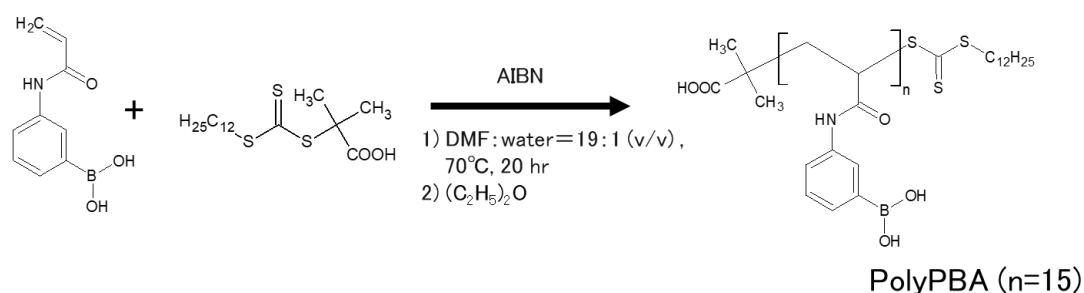


Figure 19. (a) Changes in the resonance frequency of the QCM measurement in a pH 7.4. (b) Comparison of resonance frequency changes in each step.

## 第2節 ポリフェニルボロン酸の合成

第2節では、負電荷を帯びたボロン酸とカチオン性の水溶性高分子間で生じる静電的な相互作用に関する検討に向けて、ポリアクリルアミドフェニルボロン酸 (PolyPBA) を合成した。

まずは、3-acrylamidophenylboronic acid を合成した<sup>37)</sup>。次に、Reversible addition-fragmentation chain transfer polymerization (RAFT) 重合を利用して PolyPBA を合成した (Scheme 4)<sup>38)</sup>。NMR 測定において、ポリマーに特徴的なブロードのピーク (1.8, 2.5, 7.5 ppm) の積分値から重合度を算出したところ、重合度が約 15 の PolyPBA が合成された (Figure 20)。



Scheme 4. Synthesis of PolyPBA by RAFT polymerization.

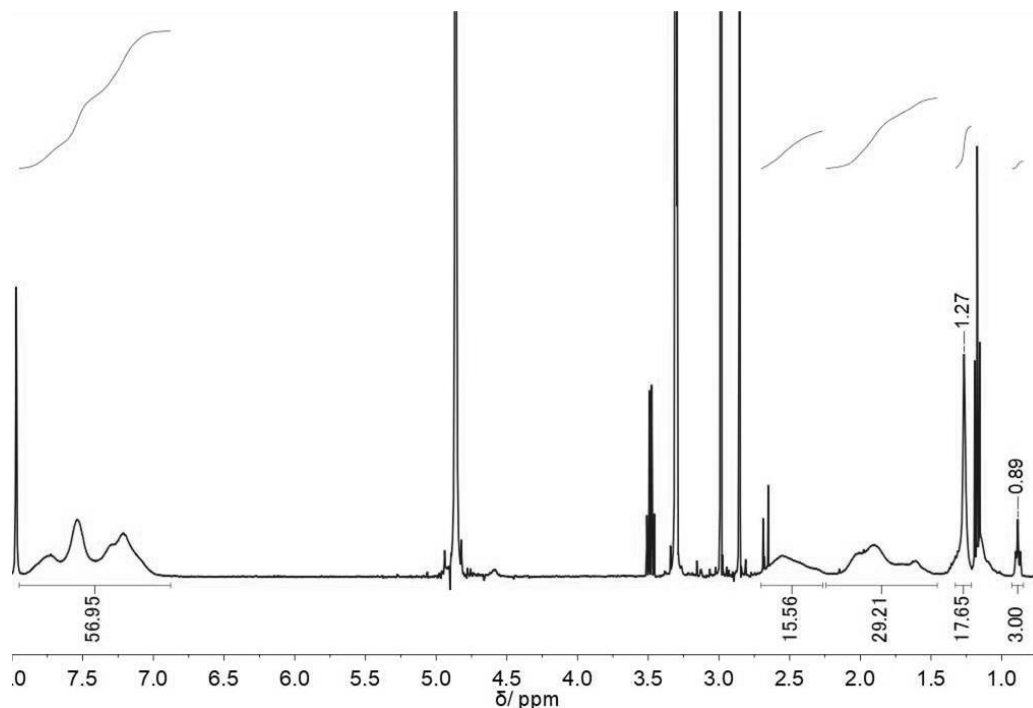


Figure 20. <sup>1</sup>H-NMR spectrum of PolyPBA (methanol-*d*<sub>4</sub>).

### 第 3 節 水晶振動子マイクロバランス法を用いたポリフェニルボロン酸とポリアリルアミン間における相互作用の評価

PolyPBA と PAA の静電的な相互作用による複合材料の形成を、QCM 法により調査した (Figure 21)。なお、本検討においてはグルコースオキシダーゼ (GOx, 等電点 4.2)<sup>39, 40)</sup> を共存させた。この理由については、後の第 3 章で行った糖応答性の評価において記載するが、中性条件下では GOx は負に帯電しているため、カチオン性の分子と組み合わせることで複合材料を調製可能であると期待した。操作方法は前節と同様で、負電荷を帯びている PolyPBA と GOx、正電荷を帯びている PAA を交互に繰り返し流入させた。よって、この評価においても、電極上に各材料が積層する場合、溶液の流入に応じて振動数の低下プロファイルが得られると予想される (Figure 22)。

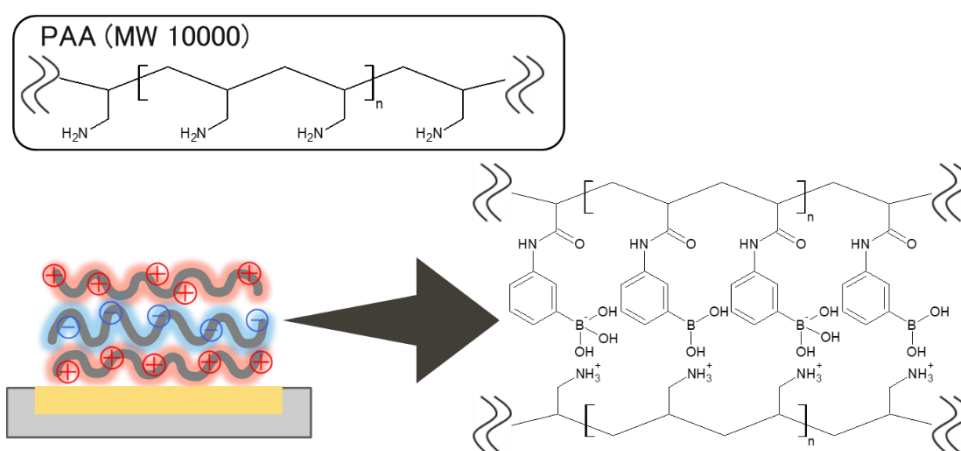


Figure 21. Schematic representation and chemical structure of polyPBA/PAA composite material.

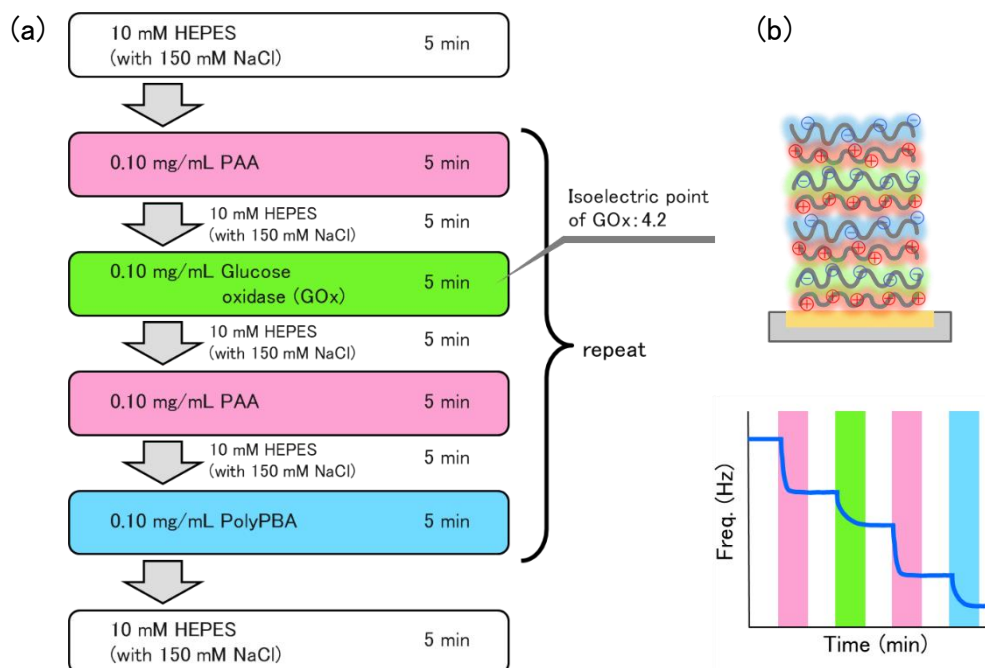


Figure 22. (a) Repetition procedure of the measurement. (b) Expected change of resonance frequency caused by the repetition procedure.

Figure 23 に得られた実際のプロファイルと材料の流入後における振動数の変化量を示す。振動数の変化傾向としては、各材料を流入させることによる速やかな振動数の低下が概ね観察された。よって、PolyPBA/PAA 間での相互作用により電極上に複合材料が積層したことが示唆された。また、その際の振動数変化量には大きな変動が観察されなかった。これは、ピリジニウムボロン酸誘導体の検討で繰り返し流入させると変化量が小さくなったという結果と異なるものであった。さらに、HPrBA/PVA の結果を例に挙げて水溶性高分子を流入させた際の振動数変化に着目してみると、ピリジニウムボロン酸誘導体/PVA の場合、PVA の流入では 15 分かけて徐々に振動数が低下した。それに対して PolyPBA/PAA の場合は、PAA の流入後 10 秒ほどで急激に振動数が低下した (Figure 24)。これらの違いは、化学結合による相互作用と静電的な相互作用の特性の違いから生じていると考えられる。

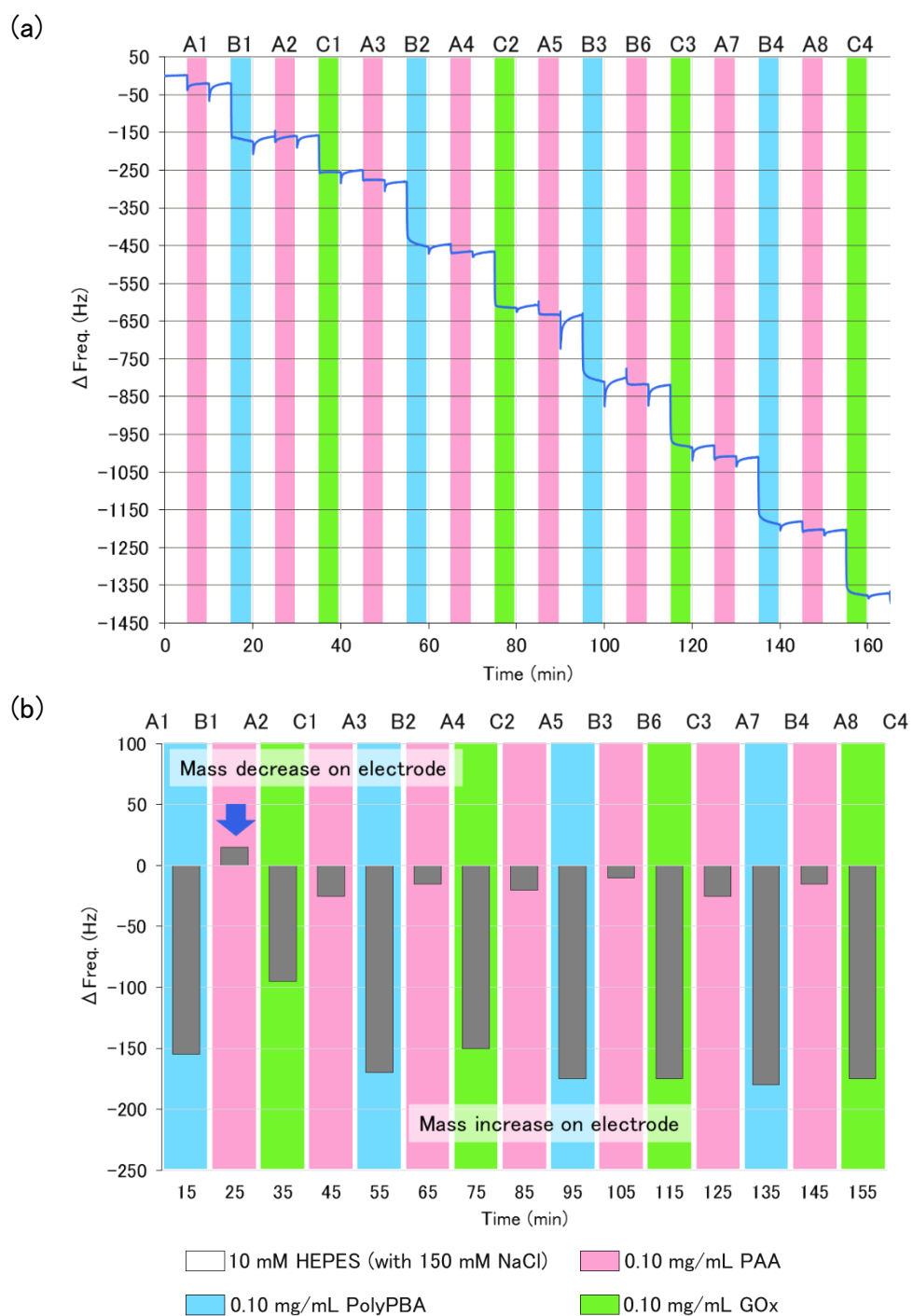


Figure 23. (a) Resonance frequency change for the formation of polyPBA/PAA composite at pH 7.4. (b) Change in resonance frequency caused by the repetition procedure.



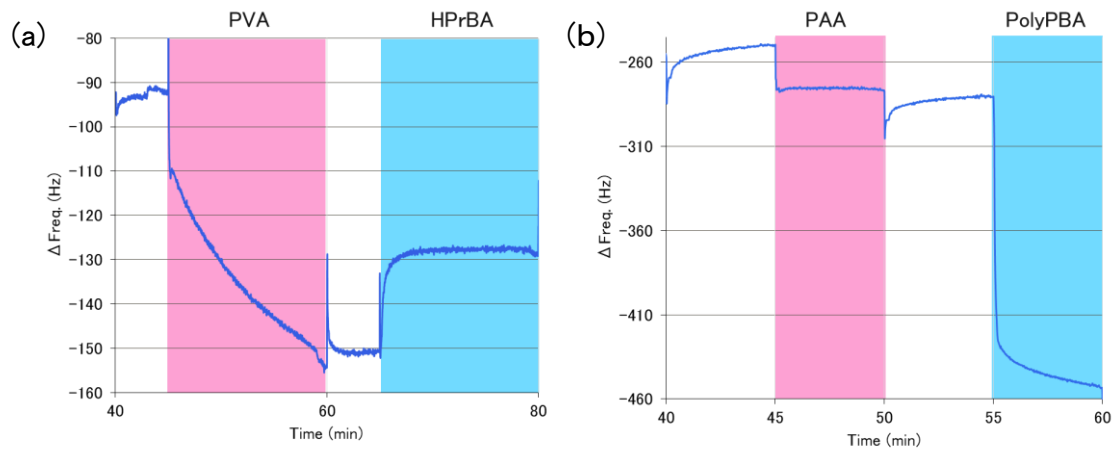


Figure 24. Comparison of resonance frequency changes for water-soluble polymer solution. (a) HPrBA/PVA and (b) PolyPBA/PAA.

## 第4節 小括

本章では、マイクロな質量変化を計測することが可能な QCM 法を用いることで、ポリボロン酸と水溶性高分子間の相互作用の検出およびボロン酸誘導体間における特性の違いの評価を試みた。

ピリジニウムボロン酸誘導体と PVA 間で生じている相互作用の評価においては、両者の流入後に振動数が変化したことから、化学結合による相互作用の発生とその程度を検出できていると考えられる。そして、その変化の大きさから、3種類あるピリジニウムボロン酸誘導体間で相互作用の強さを比較することができ、特に HPrBA が PVA と強く相互作用することが示唆された。これは、第1章の粘弾性測定において、HPrBA/PVA gel は PVA と結合しているボロン酸部位の割合が低いにも関わらず最も安定なゲルを形成した経緯と関係すると考えられる。

PolyPBA と PAA 間の相互作用の評価においても、同じく両者の流入後に振動数が低下したことから、静電的な相互作用に関しても検出できていると考えられる。さらに、GOx を材料の1つとして組み込んだ場合でもその変化が観察されたことから、PolyPBA/PAA/GOx からなる複合材料の調製に応用が可能であると示唆された。

ピリジニウムボロン酸誘導体/PVA の結果と、PolyPBA/PAA/GOx の結果を比較すると、振動数の変化傾向においては、ピリジニウムボロン酸誘導体の流入で振動数の増大が観察されたのに対し、PolyPBA では振動数の低下が観察された。これは、化学結合は静電的なものよりも強く水溶性高分子と相互作用することや、ピリジニウムボロン酸誘導体は水溶性が高いのに対して PolyPBA は低いために相互作用によって生じる水溶性高分子の溶解性の変化傾向が異なることなどが要因として考えられる。振動数の変化量においては、材料の流入を繰り返すと変化量が小さくなったピリジニウムボロン酸誘導体/PVA に対して、PolyPBA/PAA/GOx ではそのような現象は観察されなかった。また、振動数の変化速度に関しては、特に水溶性高分子の流入において大きな違いがみられ、PolyPBA と PAA を用いた方が振動数の低下が速やかに生じた。これらの結果の違いも、化学結合によるピリジニウムボロン酸誘導体/PVA 間の相互作用と、静

電的な PolyPBA/PAA/GOx 間の相互作用における反応速度や用いた水溶性高分子の分子量などの特性の違いを反映していると考えられる。

以上のことから、QCM 法を利用することで、ポリボロン酸と水溶性高分子間における相互作用を検出することができた。さらに、同じ機構で相互作用を生じるピリジニウムボロン酸誘導体間での特性の違いや、PolyPBA のような機構が異なる相互作用と比較することで反応の強さやプロセスの違いを調査することが可能であった。よって、QCM 法は刺激応答性材料の構築に必要な構成材料間での相互作用の評価や最適化を行う実験系として有用な手法であると考えられる。さらに、粘弾性測定の結果と組み合わせることで、相互作用が生じて形成された複合材料のより詳細な物理化学的性質を予測することができると考えられる。

### 第 3 章 フロースルーセル型溶出試験器を用いたポリボロン酸誘導体/水溶性高分子ゲルにおける糖応答性崩壊の評価

本章では、第 2 章までに扱った 2 つの異なる相互作用で形成された複合材料に関して、刺激応答性マテリアルとしての薬物放出特性を評価する手法を検討した。一般的に、薬物放出特性の試験方法として日本薬局方に記載されている溶出試験法が利用されているが<sup>41)</sup>、回転バスケット法とパドル法は製剤の外部環境を変化させる場合に同一サンプルを用いて実施することが困難である。一方で、環境を変化させることができる方法としてフロースルーセル法があるが、現在汎用されている装置では使用する試料や溶液のスケールが大きく、貴重なサンプルを用いて繰り返し実施する試験方法としては、経済性、簡便性などの面で好ましくない場合がある。そこで、フロースルーセル型のマイクロデバイスの利用が有用であると考えた。これは、試料の微量化や装置の小型化、実験効率の向上による迅速化といった様々な利点を有しているため、先に述べたような溶出試験の難点を解決できると期待した。よって、小さいスケールで刺激応答性薬物放出を評価するためのフロースルーセル型溶出試験器を作成し、放出試験を実施した。これにより、刺激応答性薬物放出の評価に適したシステムの構築を試みるとともに、得られた結果から糖応答性放出制御に適したマテリアル設計に関して考察した。

#### 第 1 節 フロースルーセル型溶出試験器によるジピリジニウムボロン酸/ポリビニルアルコールゲルにおける糖応答性崩壊挙動の評価

Scheme 1 (p. 2) に示したように、Glc とボロン酸は 1 : 2 で結合する。そのため、本研究で合成したピリジニウムボロン酸誘導体のうち Glc の添加によって架橋構造が消失しやすいのは、ボロン酸部位が 2 つである DPrBA だと考えた。そこで、DPrBA/PVA gel を用いて、糖応答性を評価することとした。まず、DPrBA/PVA gel が Glc の添加により崩壊し、ボロン酸と結合を生じない他のジオール構造を持つ化合物では崩壊しないことを視覚的に評価した。すなわち、調製

した DPrBA/PVA gel へ最終濃度が 100 mM になるように Glc およびボロン酸と相互作用を生じないと予想されるジエチレングリコール (DE) を加えて、経時的に外観の観察を行った (Figure 25)。

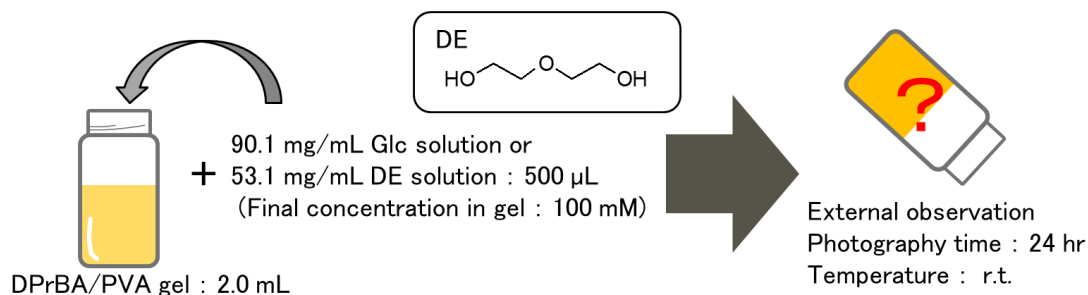


Figure 25. Evaluation of the behavior of DPrBA/PVA gel to Glc and DE.

Glc の添加により、DPrBA/PVA gel はゲルとしての性質が変化して溶液状態となった。それに対して、DE の添加で性質の変化はほとんど観察されなかった (Figure 26)。よって、DPrBA/PVA gel の糖応答性が視覚的に確認されたため、以降の放出試験に用いた。

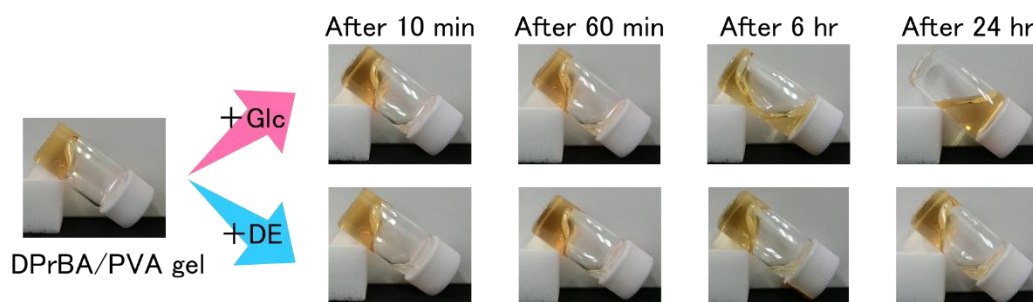


Figure 26. Result of the external observation and the Glc responsive behavior of DPrBA/PVA gel.

放出試験を実施するにあたり、Figure 27 に示すような刺激応答性材料の薬物放出特性を評価するシステムを構築した。フロースルーセル型溶出試験器は、厚さが異なる 3 枚の亚克力板を加工して作成した。この試験器には 2 つの流入路と 1 つの流出路があり、流入路にはそれぞれ別々のシリンジポンプを接続させている。よって、これらのシリンジポンプの ON/OFF を切り替えるだけで、試験器内の環境を段階的かつ速やかに変化させることができる。

本試験では、装置の空洞内に DPrBA/PVA gel を調製し、そこへ片方のシリンジポンプから HEPES 緩衝液 (10 mM, pH 7.4) を流して溶出液のサンプリングを行った。その後、もう一方のシリンジポンプから HEPES 緩衝液や HEPES 緩衝液で調製した Glc あるいは DE 溶液 (100 mM) を流して同様にサンプリングを行い、遊離する DPrBA 量を測定した。試験終了後は、溶出試験器内に残存しているゲルを回収し、そのゲルと各サンプル中の DPrBA 含量を吸光度の測定により定量した。また、溶出試験器は透明で内部観察が可能であるため、放出試験開始時、HEPES 緩衝液の流入終了時、放出試験終了時に試験器内にあるゲルの外観を観察した。

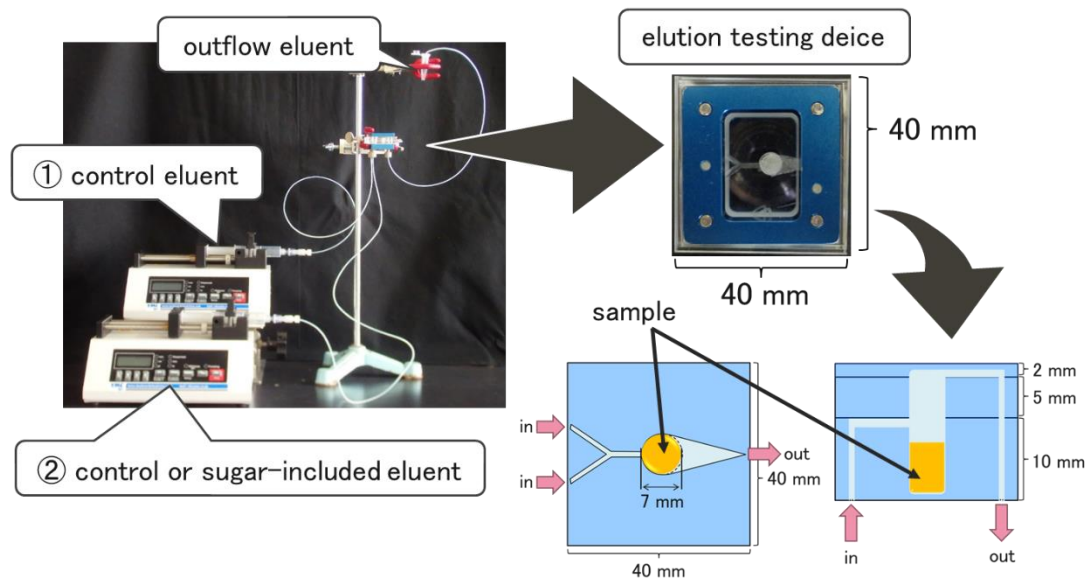


Figure 27. Photographs of the elution testing system with a flow-through cell and schematic representation of the flow-through cell.

どちらのポンプでも HEPES 緩衝液を流入させた場合と、②のポンプで DE 溶液を流入させた場合は、ゲルの外観に変化は無かった。一方で、Glc 溶液を流入させた場合は、Glc 溶液の流入終了時にゲルの量が減少しており、溶出試験器内でも Glc による DPrBA/PVA gel の崩壊が観察された (Figure 28)。

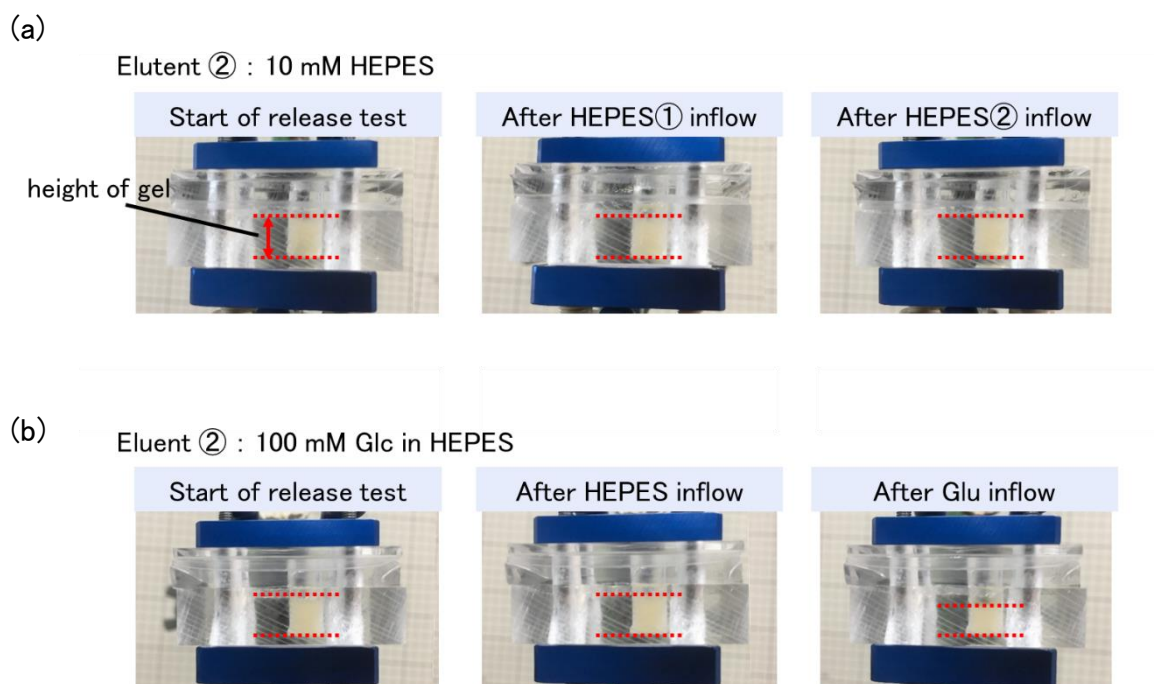


Figure 28. Photographs of the flow-through cell side view at the start, before changing eluent and after the release test. (a) Eluent ② is 10 mM HEPES. (b) Eluent ② is 100 mM Glc in HEPES.

DPrBA の累積放出率および放出速度プロファイルを Figure 29 に示した。120 分時の累積放出率は、②のポンプでも HEPES 緩衝液を流した場合は 4.1%、②のポンプで DE 溶液を流した場合は 5.3%、②のポンプで Glc 溶液を流した場合は 10.4%であった。また、放出速度も Glc 溶液の流入により大きな増大し、Glc の添加により DPrBA の放出増加が示された。よって、放出の増大を生じるゲルの崩壊は、DPrBA と PVA の結合が Glc により置換され、架橋の消失に伴って生じていると考えられる。

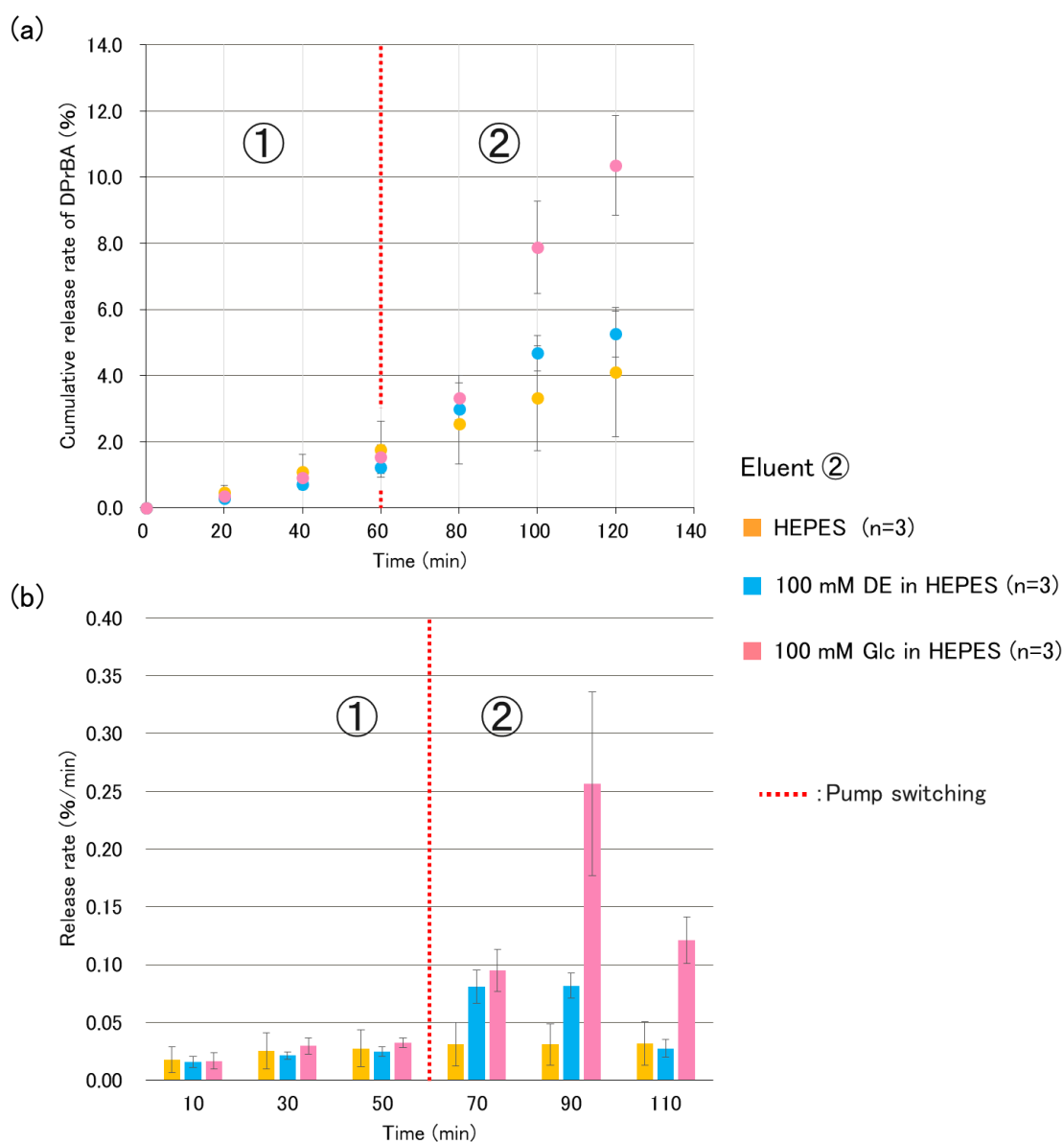


Figure 29. (a) Cumulative release of DPrBA from DPrBA/PVA gel. (b) DPrBA release rate from DPrBA/PVA gel.



## 第 2 節 フロースルーセル型溶出試験器によるポリフェニルボロン

### 酸/ポリアリルアミンゲルにおける糖応答性崩壊挙動の評価

PolyPBA/PAA gel に関してもフロースルーセル型溶出試験器を用いて糖応答性崩壊挙動を調査した。すなわち、装置の空洞内にゲルを調製し、前節と同様に放出試験を行った。なお、ボロン酸は Glc と結合したとしても電荷に変化はなく、顕著なゲルの崩壊が生じないと予想されたため、間接的な糖応答性を利用することを試みた。すなわち、第 2 章で GOx も静電的な相互作用を生じることが示されたため、GOx を共存させたゲルを調製した。過酸化水素は、フェニルボロン酸 (PBA) のボロン酸部分をヒドロキシ基に変換する性質がある<sup>36, 42-44)</sup> (Figure 30)。よって、Glc が GOx で酸化されて発生する過酸化水素で PolyPBA/PAA

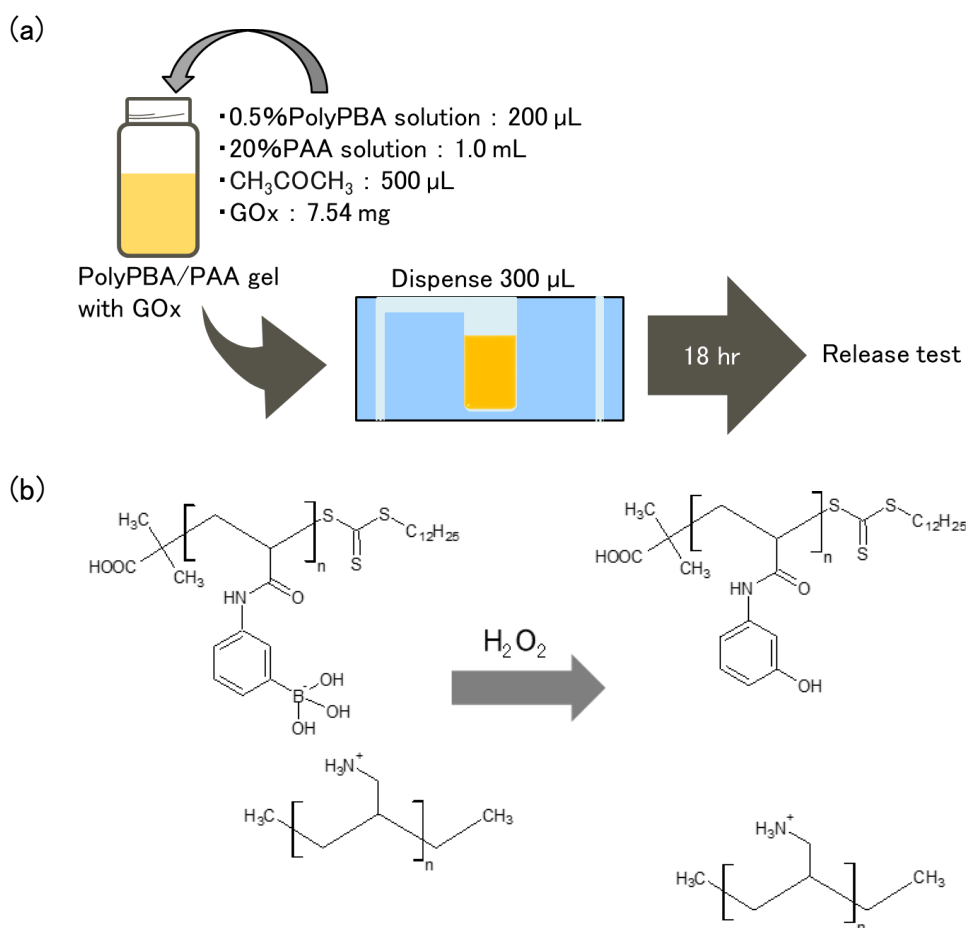


Figure 30. (a) Preparation of PolyPBA/PAA gel. (b) Disintegration of PolyPBA/PVA gel due to cross-linking cleavage by  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

間の静電的相互作用を消失させることにより、ゲルの糖応答性崩壊を生じさせることができるかと期待した。

外観および遊離された PolyPBA の定量による評価では、Glc に応じたゲルの崩壊および PolyPBA の放出が観測されなかった (Figure 31)。これは、PolyPBA にはボロン酸部位が多数存在することから、一部がヒドロキシ基に変換されても PAA との架橋点が残存したためだと考えられる。

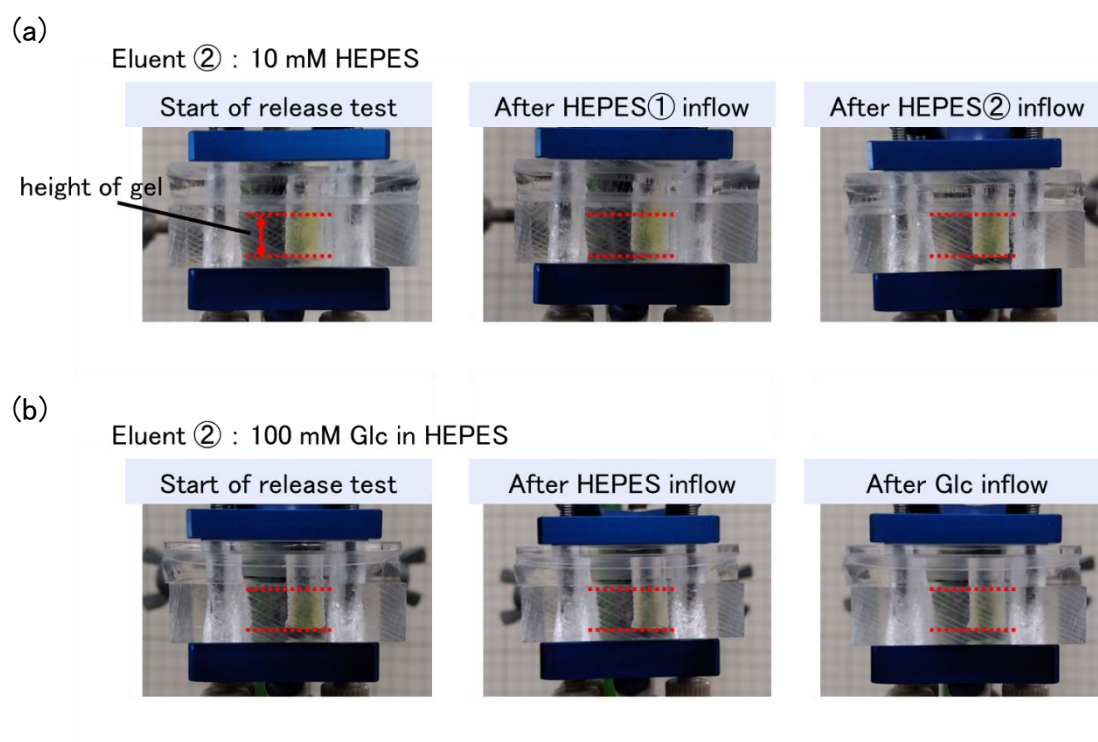


Figure 31. Photographs of the flow-through cell side view at the start, before changing eluent and after the release test. (a) Eluent ② is 10 mM HEPES. (b) Eluent ② is 100 mM Glc in HEPES.

### 第3節 小括

本章では、第2章で相互作用の存在が確認された DPrBA/PVA と PolyPBA/PAA のゲルを調製し、それらの糖応答性崩壊挙動を評価した。この評価に際して、刺激応答性挙動を調査するためのシステム構築を試み、それぞれのゲルに関して検討した。

システムの主要部である溶出試験器は、透明で内部観察が可能なアクリル板を加工し、小スケールで放出試験が実施できるようなサイズで作成した。また、流入路を2か所設けて別々のシリンジポンプを繋げることにより、試験器内に流入させる溶液の速やかな切り替えを可能にした。

DPrBA/PVA gel の検討では、Glc の添加によるゲルの崩壊が確認された。そのゲルを試験器内に調製して放出試験を実施した結果、Glc の流入に起因したゲルの崩壊と DPrBA の放出が観測された。この DPrBA/PVA gel の崩壊は、DPrBA と PVA 間の架橋が Glc により置換されたために生じたと考えられ、フロースルーセル型の溶出試験器を使用することで化学結合に由来する DPrBA/PVA gel の糖応答性材料としての有用性を評価することができた。

PolyPBA/PAA gel の検討では、過酸化水素による間接的な糖応答性崩壊を試みたものの、ゲルの崩壊とそれに伴った PolyPBA の放出は観察されなかった。これは、ボロン酸部位が多く存在するために、PAA との架橋点つまり相互作用が残存したためだと考えられ、静電的な相互作用を利用した PolyPBA/PAA gel の糖応答性崩壊を生じさせるメカニズムを再度検討する必要があると考えられた。

以上の結果から、結合の置換をメカニズムとした Glc 応答性においては、ボロン酸は PVA と相互作用させ、かつ分子内のボロン酸部位は少ない方が有利であると考えられる。

このように、内部観察が可能なフロースルーセル型の溶出試験器を利用することで、外部の Glc 濃度の変化に応じたゲルの特性変化を同一のサンプルを用いて視覚的かつ段階的に評価し、材料における糖応答性崩壊メカニズムの改良に関する情報を得ることができた。

## 第 4 章 水晶振動子マイクロバランス法とフロースルーセル型溶出試験器を用いたボロン酸修飾インスリン/ポリビニルアルコールゲルにおける糖応答性インスリン放出制御の評価

これまでに扱ってきた刺激応答性マテリアルの評価に向けた実験系の応用として、糖応答性の Ins 放出制御を試みた。Ins に様々な修飾を施すことで、Ins に新たな機能を付与させる試みがなされている<sup>45-47)</sup>。

第 3 章までの結果から、合成したポリボロン酸誘導体が水溶性高分子と相互作用を生じ、ゲルを形成すること、そのゲルは Glc を添加すると崩壊することが確認された。

そこで、これまでの検討の応用として、薬物にボロン酸を複数修飾することによるゲルの調製と、そのゲルからの糖濃度に依存した薬物放出が可能になると考えた。また、前章までの検討から、ボロン酸と水溶性高分子間における相互作用をボロン酸と糖の相互作用に置換するというメカニズムを利用してゲルを崩壊させるためには、分子内に存在するボロン酸の数が少なく、PVA と相互作用させることがより良いアプローチであると予想された。よって、本章では PBA 誘導体を複数修飾し、それ自体が架橋剤としての機能を有する Ins を合成した (Figure 32)。これは、低分子化合物による最低限の修飾により、Ins の薬理作用が大幅に低下することを防ぐ<sup>48)</sup> 一方、水溶性高分子に対する架橋機能を付与して、新規糖応答性 Ins 放出制御が可能になると期待したものである。また検討に際して、修飾するフェニルボロン酸誘導体を変更することで、より良いマテリアルの

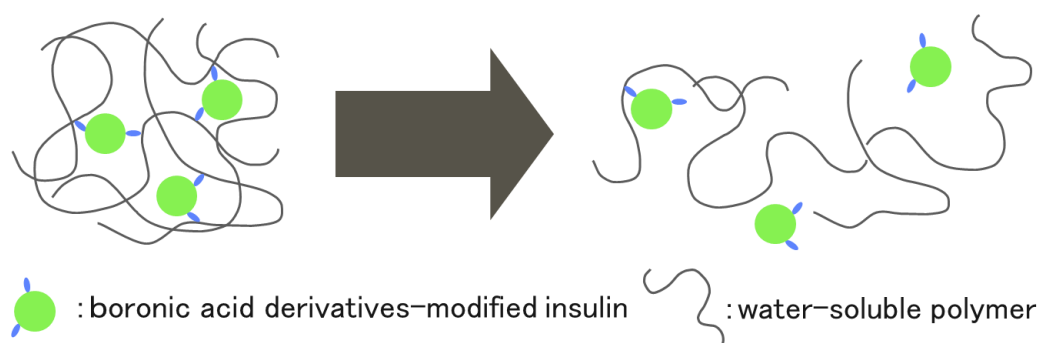


Figure 32. The drug release from systems incorporating composite materials.

設計に向けた情報の収集を試みた。さらに、糖応答性薬物放出のメカニズムとして、前章までに試みた Glc による直接的なアプローチと、GOx を用いた間接的なアプローチの両方を検討した。PVA とボロン酸修飾 Ins 間の相互作用の発生と Glc による直接的な相互作用の消失に関しては QCM 法を、形成された複合材料の糖応答性 Ins 放出に関してはフロースルーセル型溶出試験器を用いて評価した。

## 第1節 フェニルボロン酸修飾インスリンの合成

4-Carboxyphenylboronic acid と isobutyl chloroformate を反応させた。次いで、それを Ins の 1 級アミノ基と反応させることで、phenylboronic acid-modified insulin (PBA-Ins) を合成した<sup>49)</sup>。また、4-carboxy-3-fluorophenylboronic acid と isobutyl chloroformate を反応させた。次いで、それを Ins の 1 級アミノ基と反応させることで、fluorophenylboronic acid-modified insulin (FPBA-Ins) を合成した。この2つのフェニルボロン酸誘導体は、ボロン酸の  $pK_a$  がそれぞれ異なっている (Figure

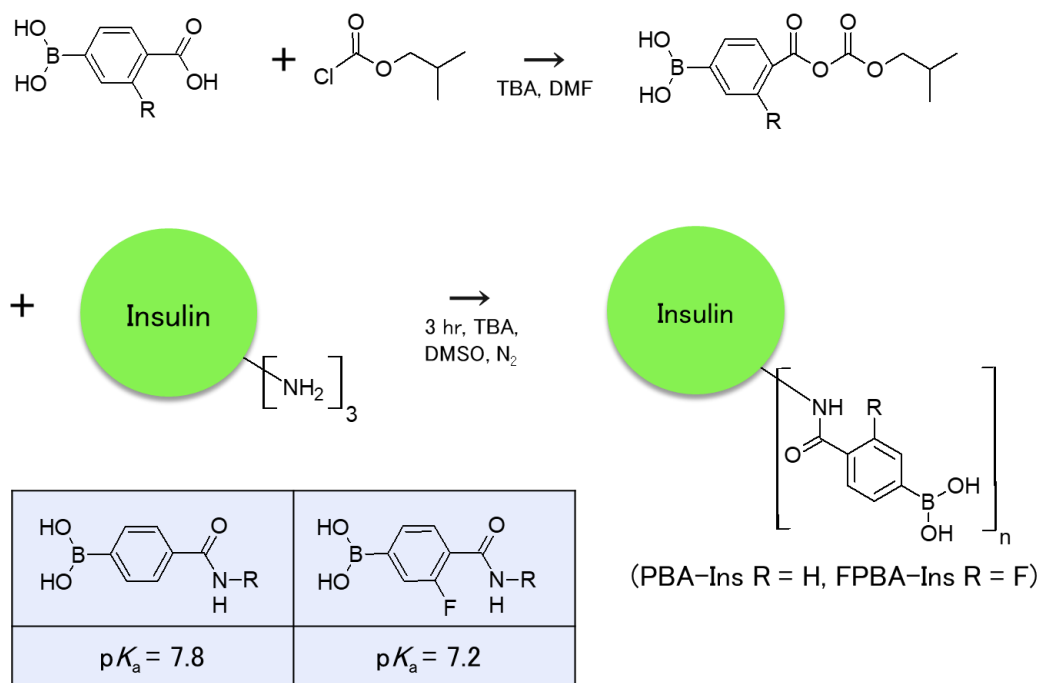


Figure 33. Syntheses of PBA-Ins and FPBA-Ins, and  $pK_a$  values of the phenylboronic acid derivatives.

33)<sup>50,51</sup>。よって、これらの誘導体から合成されたボロン酸修飾 Ins は PVA との相互作用の強さが異なると予想した。

合成したボロン酸修飾 Ins において、Ins に対するフェニルボロン酸誘導体の修飾数を評価した。すなわち、1 級アミノ基に結合する 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS) を Ins、PBA-Ins、FPBA-Ins と反応させた後、吸収スペクトルを測定した<sup>52</sup>。そして、得られた吸収極大波長における吸光度を以下の式に適用して、フェニルボロン酸誘導体の修飾数を求めた。

$$n = \left( 1 - \frac{\text{Abs}_{\text{Boronic acid-modified Ins}} - \text{Abs}_{\text{TNBS}}}{\text{Abs}_{\text{Ins}} - \text{Abs}_{\text{TNBS}}} \right) \times 3$$

PBA-Ins と FPBA-Ins のフェニルボロン酸誘導体修飾数は、それぞれ 2.16 と 2.17 であった (Figure 34)。よって、どちらのボロン酸修飾 Ins も PVA を架橋することが可能なジボロン酸構造を有していることが示された。

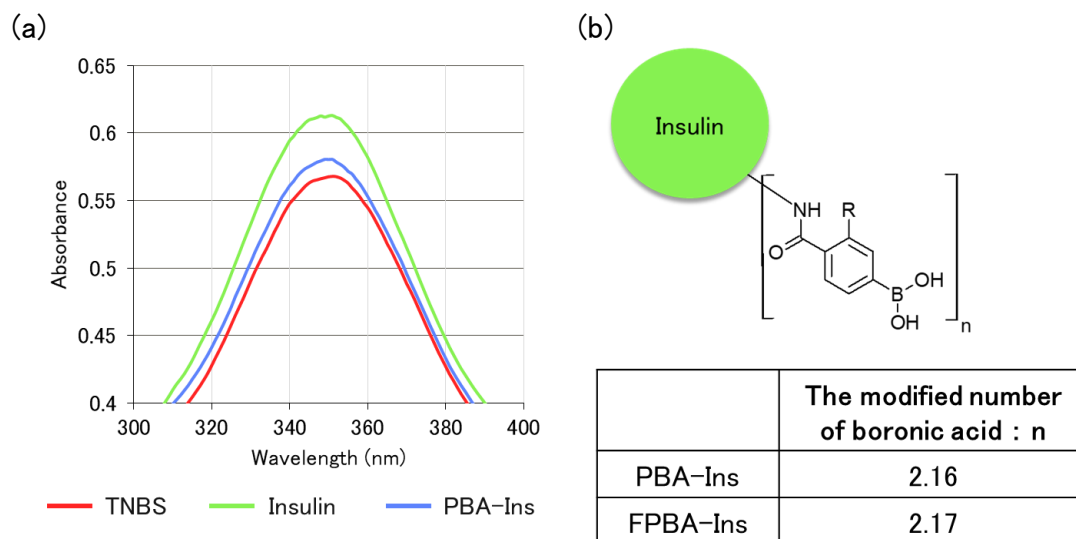


Figure 34. (a) Absorption spectra of TNBS, native insulin and PBA-Ins. (b) The calculated boronic acid modification numbers of PBA-Ins and FPBA-Ins.

## 第 2 節 水晶振動子マイクロバランス法を用いたフェニルボロン酸修飾インスリンとポリビニルアルコール間における相互作用の評価

QCM 法を用いて、ボロン酸修飾 Ins と PVA 間で生じる相互作用に起因した複合材料の形成と、糖の添加による崩壊を第 2 章と同様の方法で評価した。電極上への複合材料の積層と、糖による崩壊で下記のようなプロファイルが得られると予想して実施した (Figure 35)。

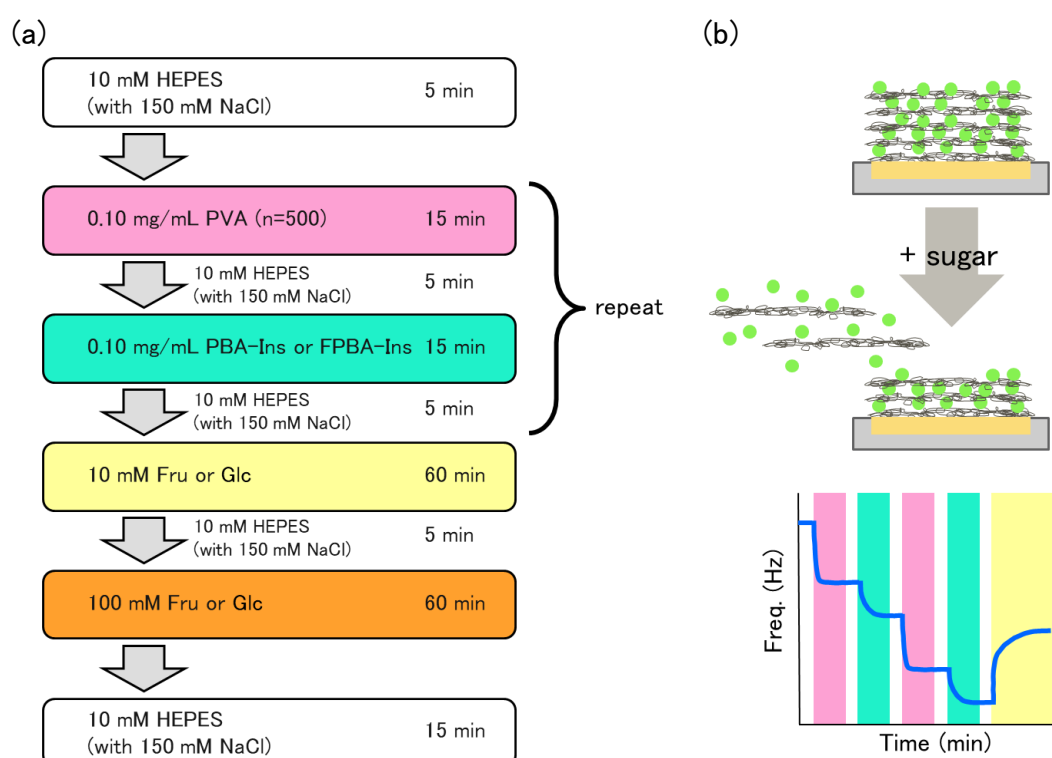


Figure 35. (a) Repetition procedure of measurement. (b) Expected change in resonance frequency caused by the repetition procedure.

Figure 36 に各材料を流入させることにより得られた振動数のプロファイルを示す。どちらのボロン酸修飾 Ins においても、材料溶液を繰り返し流入させることで振動数の低下が観察された。よって、PBA-Ins と FPBA-Ins は共に PVA と相互作用を生じさせ、複合材料が電極上に形成していると考えられる。また、最終的な振動数の低下量や PVA の流入時の変化量を比較すると、FPBA-Ins の方が大きかった。これは、PBA-Ins と FPBA-Ins の PVA に対する相互作用の強さの違いに起因していると考えられる。

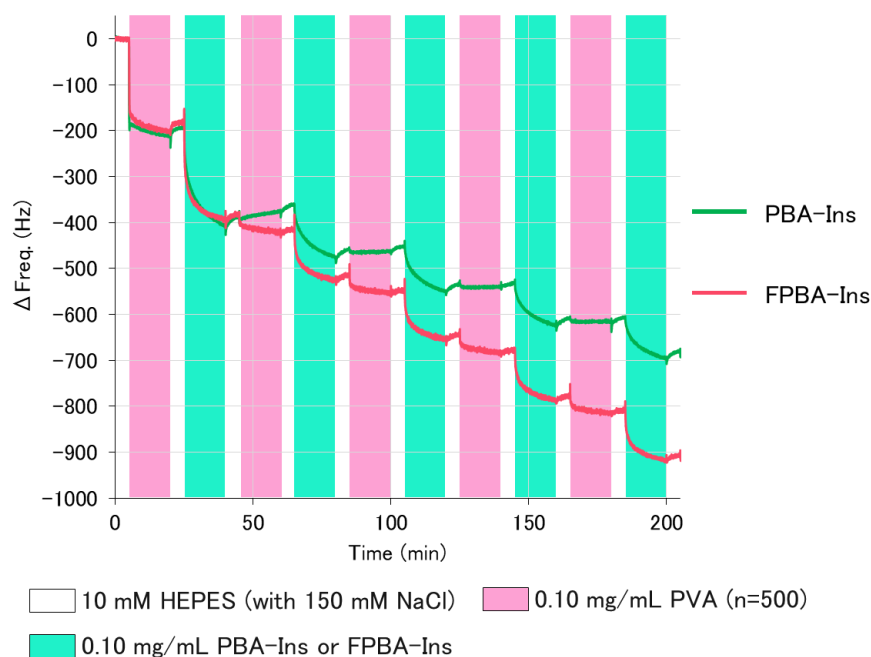


Figure 36. Resonance frequency changes for the formation of PBA-Ins/PVA and FPBA-Ins/PVA composite material in pH 7.4 solutions.

次に、この複合材料が積層している電極へ 10 mM の Glc あるいはフルクトース (Fru) 溶液を流入させて振動数の変化を測定した。その結果、どちらのボロン酸修飾 Ins においても糖溶液の流入による振動数の増大が観測された (Figure 37)。このことから、PBA-Ins および FPBA-Ins と PVA との相互作用が糖と置換したと考えられる。また、その増大は特に Fru で大きく、これは PBA の糖に対する結合定数が Glc ( $4.6 \text{ M}^{-1}$ ) に比べて Fru ( $210 \text{ M}^{-1}$ )<sup>53)</sup> で大きいという特性が反映した結果であると考えられる。Ins の放出速度に対応する振動数変化の傾きに着目したとき、PBA-Ins ではどちらの糖でも濃度依存的な振動数の増大が観察されたのに対して、FPBA-Ins では Fru でのみその傾向が観察された (Figure 38)。

QCM 法を利用したこれらの検討結果から、それぞれのボロン酸修飾 Ins に関して特徴づけると、複合材料の形成能では FPBA-Ins が、糖応答性崩壊能では PBA-Ins がそれぞれ優れていると考えられる (Table 2)。よって、次節の糖応答性薬物放出に関する検討では、PBA-Ins を採用することとした。しかし、Glc の流入による振動数の上昇度は Fru のものよりも著しく低いため、置換をメカニズ



ムとしたとき、ボロン酸修飾 Ins/PVA の複合材料は Glc への応答性が低く、改善する必要があると示された。

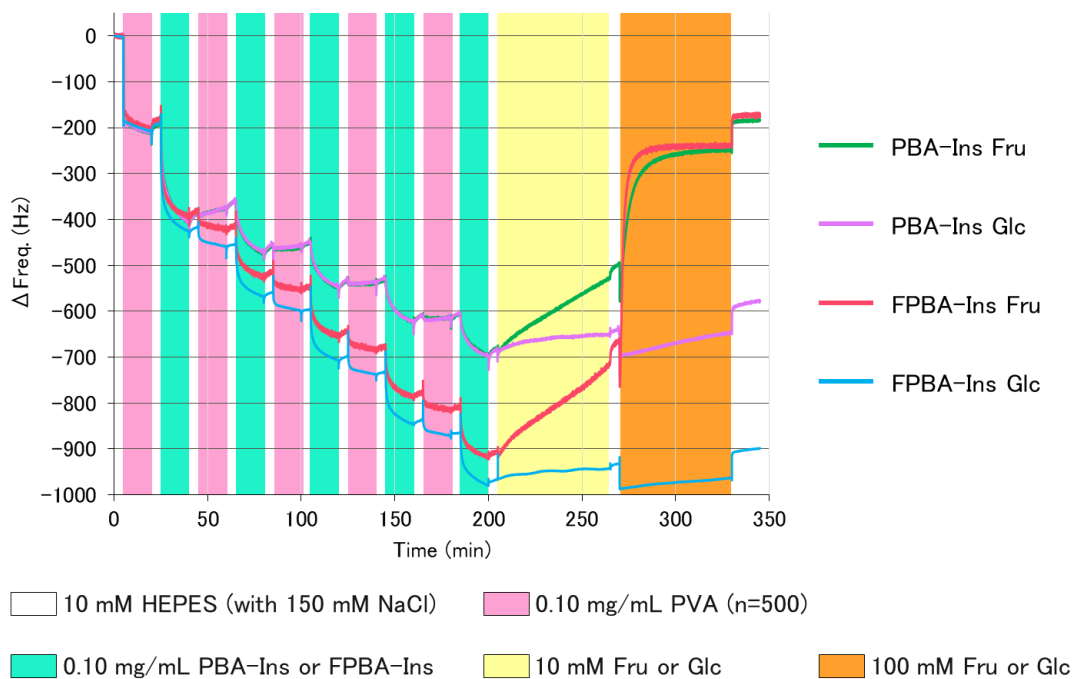


Figure 37. Resonance frequency changes during the sugar response of PBA-Ins/PVA and FPBA-Ins/PVA composite at pH 7.4.

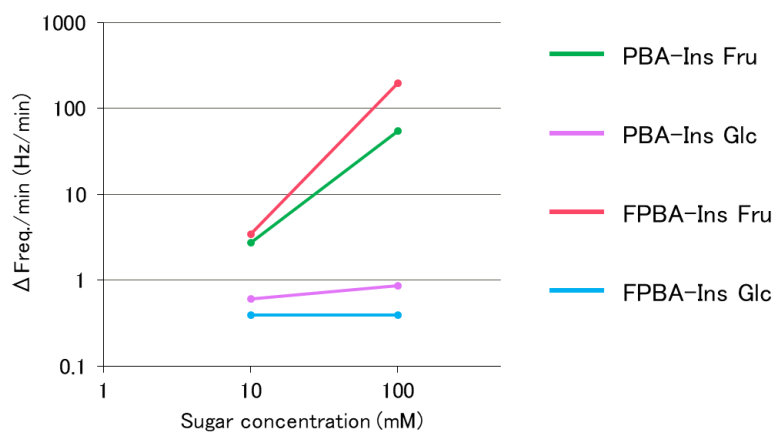


Figure 38. Relationship between the sugar concentration and the resonance frequency change.

Table 2. Properties of boronic acid-modified insulin.

Composite material forming ability	PBA-Ins < FPBA-Ins
Sugar responsive disintegrating ability	PBA-Ins > FPBA-Ins

### 第 3 節 フロースルーセル型溶出試験器によるフェニルボロン酸修飾インスリン/ポリビニルアルコールゲルにおける糖応答性薬物放出の評価

凍結融解法を利用して PBA-Ins/PVA gel を調製し、その糖応答性 Ins 放出をフロースルーセル型溶出試験器により評価した。調製に際して、Glc 応答性の向上のためには架橋点が少ない方が望ましいが、その場合、ゲル全体の強度が低下するため、凍結-融解のプロセスを導入して、PVA 間の水素結合もゲル形成の架橋として働くようにした<sup>32-34)</sup>。また、前節の検討で PBA-Ins/PVA からなる複合材料は Glc 応答性を向上させる必要があると予測されたため、GOx を共存させたゲル (PBA-Ins/PVA gel with GOx) も調製して同様に評価した (Figure 39)。

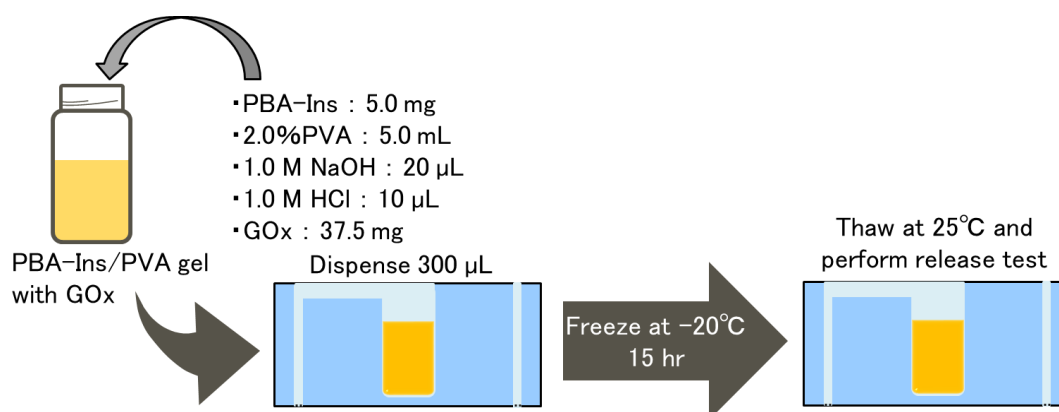


Figure 39. Preparation of PBA-Ins/PVA gel and PBA-Ins/PBA gel with GOx.

GOx を含有させたゲルは、GOx により呈する黄色に基づいて視覚的観察が容易だったため、PBA-Ins/PVA gel with GOx の観察結果のみを示す (Figure 40)。どちらのポンプでも HEPES 緩衝液を流した場合は、ゲルの外観に変化は無かった。一方で、Glc 溶液を流入させた場合、試験終了時にはゲルの色が薄くなり、半透明のゲルが残存している様子が観察された。この黄色は GOx に由来しているため、少なくとも Glc の添加により GOx が放出されていると考えられる。

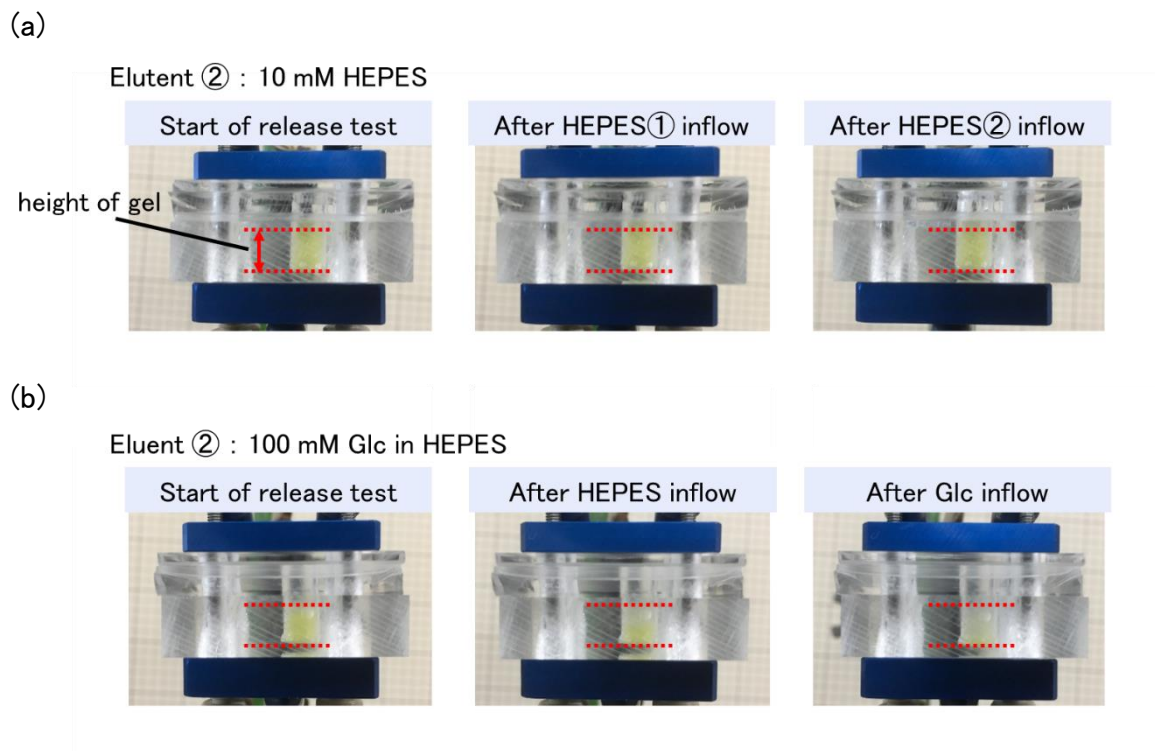


Figure 40. Photographs of the flow-through cell side view at the start, before changing eluent and after the release test. (a) Eluent ② is 10 mM HEPES. (b) Eluent ② is 100 mM Glc in HEPES.

次に、PBA-Ins の放出プロファイルを示す (Figure 41)。120 分時の累積放出率は、②のポンプでも HEPES 緩衝液を流した場合、PBA-Ins/PVA gel では 2.0%、PBA-Ins/PVA gel with GOx では 0.35%であった。②のポンプで Glc 溶液を流した場合、PBA-Ins/PVA gel では 4.6%、PBA-Ins/PVA gel with GOx では 34%であった。よって、どちらのゲルも Glc の添加によるボロン酸修飾 Ins の放出が観察された。また、GOx を共存させた場合に累積放出率と放出速度の両方で Glc 応答性のボロン酸修飾 Ins 放出能が大きく向上したことから、間接的にゲルの崩壊を生じさせるアプローチが有効であることが示された。

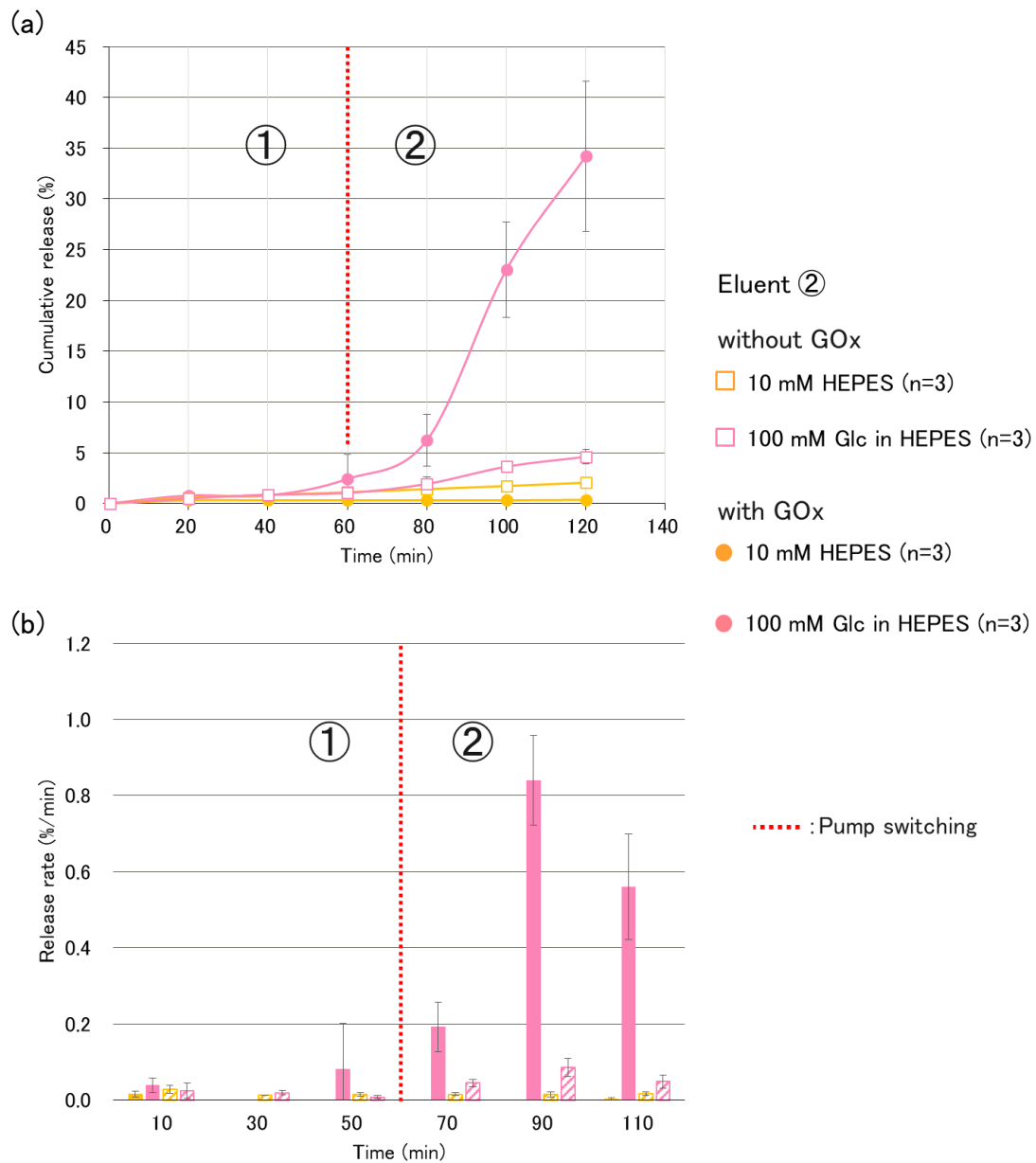


Figure 41. (a) Cumulative release of PBA-Ins from PBA-Ins/PVA gel or PBA-Ins/PVA gel with GOx. (b) PBA-Ins release rate variation over time from PBA-Ins/PVA gel or PBA-Ins/PVA gel with GOx.

これらの結果から、効率よく Ins を放出した PBA-Ins/PVA gel with GOx において、調製と放出試験の過程で生じる内部構造の変化を推測した (Figure 42)。溶出試験器内に分注したときは、それぞれの材料はランダムな配置で存在していると考えられる。それを凍結させると、冷却により結晶化する性質を持つ PVA が

部分的に凝集して物理的な架橋構造を形成し、PBA-Ins や GOx の濃度にも偏りが生じる。このとき、PBA-Ins と PVA が相互作用して化学的な架橋構造を形成する。そこに Glc が流入すると、GOx の触媒反応により過酸化水素が生じ、ボロン酸を変換して化学架橋が切断されて網目構造が広がり、PBA-Ins の放出が生じたと考えられる。また、GOx は多くが PBA-Ins/PVA の相互作用からなるネットワークに封入されているが、Glc 溶液の流入により GOx も放出され、半透明のゲルが残存したと考えられる。

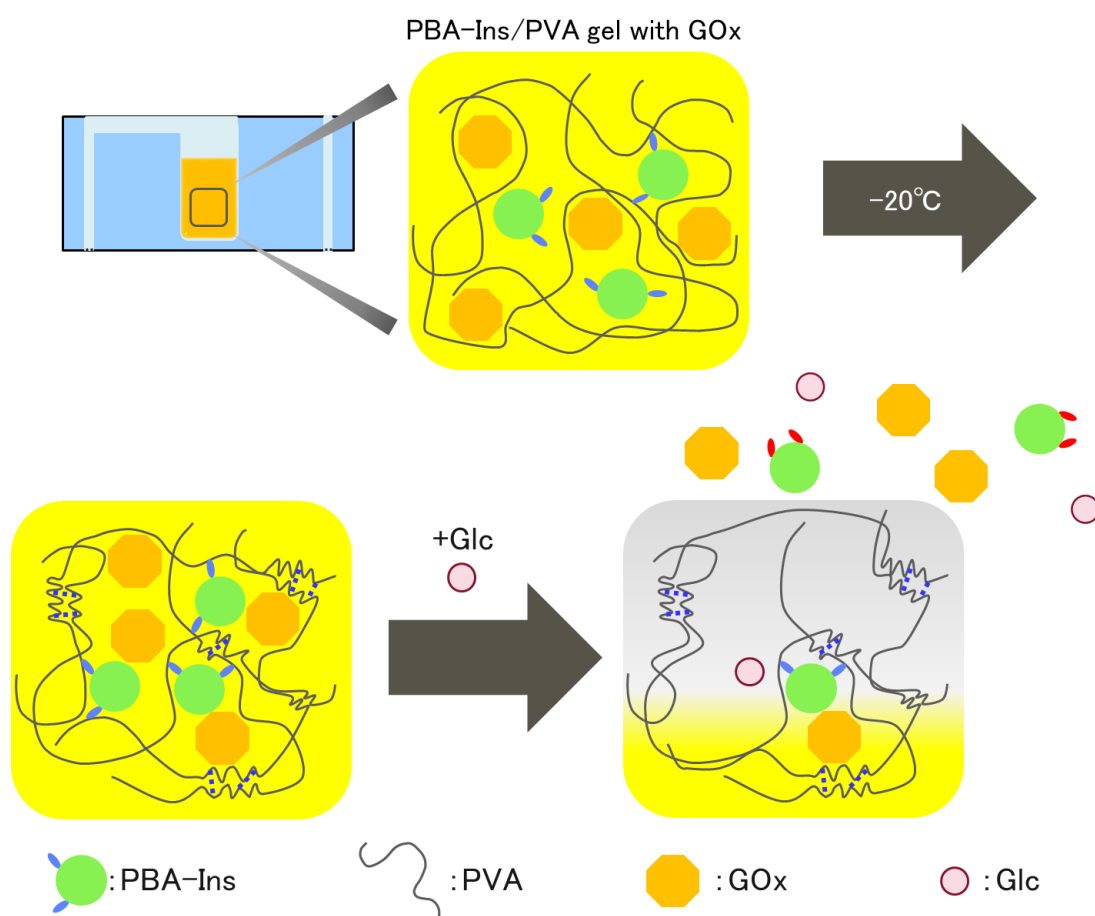


Figure 42. Speculated internal structure change of PBA-Ins/PVA gel with GOx by Glc addition expected based on the measurement results.

## 第4節 小括

本章では、これまでに糖応答性マテリアルの設計に向けた手法として検討した QCM 法とフロースルーセル型溶出試験器による放出試験法を応用し、Ins の新規糖応答性放出制が可能な複合材料の調製を試みた。まずは、PVA と相互作用する機能を付与するべく、2 種類のフェニルボロン酸誘導体を Ins に修飾し、それらが複合材料を形成できるジボロン酸構造であることを明らかにした。

次に、QCM 法を利用して、それぞれのボロン酸修飾 Ins における PVA に対する相互作用の強さと、糖の添加による相互作用の消失に関して特徴づけを行った。結果、ボロン酸修飾 Ins と PVA 間の相互作用による複合材料の形成と糖応答性の崩壊が観測できたと共に、複合材料形成能および糖応答性崩壊能という観点における性質の違いを評価することができた。さらに、この検討で Glc 応答性を改善する必要性があることが示された。

フロースルーセル型溶出試験器を用いた放出試験では、QCM 法の結果をもとに新しく GOx を共存させた PBA-Ins/PVA gel を調製して、その糖応答性 Ins 放出を評価した。結果、Glc の流入により PBA-Ins が放出され、さらに GOx を共存させたゲルでは Glc 応答性を大きく向上させることに成功した。

以上のことから、QCM 法やフロースルーセル型溶出試験器を利用した実験系は、PBA-Ins/PVA gel のような外部環境に応答して薬物放出することが可能な機能性マテリアルの評価に応用可能である。また、本章で検討したような GOx を内封した複合マテリアルは、高感度に糖応答性を示すマテリアルとして利用できることが示唆され、糖尿病治療のための DDS 製剤開発に対して、さらなる研究が期待される。

## 結論

外部の刺激によって特性を変化させて薬物のコントロールドリリースを可能にする材料は、インテリジェントマテリアルの応用の1つとして注目され、日々盛んに研究・開発が行われている。このインテリジェントマテリアルを組み込んだシステムを実現するためには、そのマテリアル自体とそれを組み込んだ薬物放出制御の仕組みをより効率的かつ的確に設計することが重要である。そこで、本研究では、糖の存在により結合状態が変化することが知られているボロン酸を分子内に複数有するポリボロン酸誘導体を合成し、糖応答性の新規複合材料を調製するとともに、刺激応答に基づく薬物放出制御に直接関係するマテリアル中での物質間における相互作用を評価するための評価系の有用性についても明らかにした。以下にその要約を示す。

第1章では、ボロン酸の導入数が異なる3種類のピリジニウムボロン酸誘導体とPVAからなるゲルを調製し、そのゲルの静的・動的粘弾性測定を行うことで、ポリボロン酸とPVA間の相互作用の評価を試みた。まず、応力緩和測定においては、DPrBA/PVA gelとHPrBA/PVA gelで弾性項に相当する応力が観測されたため、一部にボロン酸とPVA間の強固な結合が存在すると推察した。ひずみ分散測定においては、ピリジニウムボロン酸誘導体/PVAゲルが広い範囲で線形領域を有していることが示され、ボロン酸とPVAの結合により安定な3次元ネットワークが形成されていると考えられた。さらに、応力緩和測定とひずみ分散測定、および周波数分散測定の結果から、TPrBA/PVA gelは架橋密度が高く、硬い3次元ネットワークを形成するのに対して、HPrBA/PVA gelはPVAとの相互作用に寄与しないボロン酸の存在があることで架橋密度が低く、軟らかい3次元ネットワークを形成すると考えた。このように、粘弾性測定を実施することで、相互作用に起因したマクロな性質の評価と、その情報をもとにした複合材料のミクロな内部構造を推測することができると考えられた。

第2章では、QCM法を用いてポリボロン酸と水溶性高分子間の相互作用の評価を試みた。結果、振動数の変化からピリジニウムボロン酸誘導体とPVA間で生じている相互作用を検出することができた。特に、HPrBAは振動数の変化量が大きく、PVAと強く相互作用することが示された。これは、粘弾性測定にお

いて HPrBA/PVA gel は PVA と結合しているボロン酸部位の割合が低いにも関わらず最も安定なゲルを形成した結果と関係すると考えられる。また、PolyPBA と PAA 間、さらに GOx と PAA 間でも静電的な相互作用が生じ、複合材料が形成されることが示された。水溶性高分子を流入させた際の振動数の減少速度の違いから、ピリジニウムボロン酸誘導体/PVA 間と PolyPBA/PAA 間の速度的な相互作用の違いを検出することができた。よって、QCM 法を用いてマイクロ単位での質量変化を検出することで、ピリジニウムボロン酸誘導体/PVA 間で生じる化学結合と PolyPBA/PAA 間で生じる静電的な相互作用というメカニズムの違いや、相互作用の強さの違いを評価できると考えられた。

第 3 章では、ゲルの糖応答性崩壊挙動を調査するためにフロースルーセル型溶出試験器を作成し、刺激応答性マテリアルの評価に向けた実験系の構築を試みた。その結果、DPrBA/PVA gel は Glc 含有溶液を流すことにより崩壊し、DPrBA の放出が観測された。一方で、PolyPBA/PAA gel は、Glc の添加によるゲルの崩壊とそれに伴った PolyPBA の放出は観察されなかった。これは、PolyPBA/PAA gel にボロン酸部位が多く存在し、PAA との架橋点が多いため、Glc によって部分的にそれらが切断しても多くの架橋点が残存したためだと考えられる。つまり、水溶性高分子と相互作用させる際、分子内のボロン酸を必要最低限に少なくすることが Glc に応答しやすい複合材料を調製する上で重要であることが示唆された。このように、段階的に溶出液の条件を変化させることができ、かつ視覚的に刺激応答性マテリアルの薬物放出を評価できる実験系を利用することで、応答性の最適化を行うための情報が得られると考えられる。

第 4 章では、これまでの評価系を利用した糖応答性マテリアルデザインの応用として、ボロン酸修飾 Ins と PVA からなるゲルによる放出制御に関して検討した。QCM 法の結果から、ボロン酸修飾 Ins と PVA の相互作用による複合材料の形成と糖応答性の崩壊が観測できた。また、修飾するボロン酸誘導体の違いによる特性の変化も評価することができた。フロースルーセル型溶出試験器を用いた放出試験から、GOx と組み合わせた系で Glc の流入に対して高感度に応答した PBA-Ins の放出が観察された。つまり、Glc 応答性を改善する上で GOx が有効であることが示された。そして、Glc 刺激時に PBA-Ins の放出率の上昇に合わせて GOx も放出されたことから、Glc による刺激応答性放出がゲルの網目構



造の変化に起因することも併せて明らかとなった。よって、これまでの実験系を組み合わせることで、多様な情報が得られ、新規糖応答性 Ins 放出マテリアルの設計が可能になるものと考ええる。

以上のことから、ポリボロン酸と水溶性高分子からなるゲルが持つ様々な特性の中から、粘弾性、分子間相互作用、薬物放出などの着目する特性を的確に調査するための、物理化学的な評価手法を選択および構築することができた。また、それらの実験系を組み合わせることで、期待する薬物放出特性を持つ糖応答性マテリアルを設計するための有用な情報を得ることができた。このことは、環境の変化に応答する他のマテリアルへの応用も可能であり、これらの手法により得た多様な情報を収集・蓄積することによって、より優れたマテリアルデザインにつながるものと考えられる。そして、この評価手法とマテリアルデザインの両方の改善を繰り返していくことにより、理想的な放出制御機能を有する製剤の開発につながると思われる。

## 謝辞

本研究に際して、終始御懇篤なる御指導と御鞭撻を賜りました城西大学大学院薬学研究科薬品物理化学講座教授 關俊暢 先生に深甚なる謝意を表します。

本研究に関して、ご指導並びにご助言を賜りました城西大学大学院薬学研究科製剤学講座教授 夏目秀視 先生に深謝の意を表します。

本研究に関して、ご指導並びにご助言を賜りました城西大学大学院薬学研究科食品機能学講座教授 真野博 先生に深謝の意を表します。

本研究に際して、終始御指導と御助言を賜りました城西大学大学院薬学研究科薬品物理化学講座准教授 江川祐哉 先生に深謝の意を表します。

本研究に際して、終始御指導と御助言を賜りました城西大学薬学部薬品物理化学研究室助手 三木涼太郎 先生に深謝の意を表します。

学位論文審査にあたり、御教示と御閲覧を頂きました城西大学大学院薬学研究科病院薬剤学講座教授 上田秀雄 先生、城西大学大学院薬学研究科医薬品化学講座教授 坂本武史 先生、城西大学大学院薬学研究科薬品作用学講座教授 岡崎真理 先生に心より感謝の意を表します。

本研究の遂行にあたり、御協力を頂きました城西大学大学院薬学研究科、城西国際大学大学院薬学研究科を修了された先輩諸氏、城西大学大学院薬学研究科薬品物理化学講座諸氏、城西大学薬学部薬品物理化学研究室諸氏に心より感謝いたします。

最後に、日々私を支えてくれた両親に感謝いたします。

## 実験の部

### 第 1 章

#### 1. 実験材料

1, 4-Bis(chloromethyl)benzene、poly(vinyl alcohol) (n=2000, PVA)、acetonitrile、methanol、acetone、NaOH solution (1.0 M) は、和光純薬工業株式会社 (大阪) から購入した。1, 3, 5-tris(bromomethyl)benzene、hexakis(bromomethyl)benzene は、東京化成株式会社 (東京) から購入した。3-pyridineboronic acid 1, 3-propanediol ester は、Sigma-Aldrich Japan (東京) から購入した。

その他の試薬も含めて特級で購入し、精製せずに使用した。

#### 2. 測定機器

<sup>1</sup>H-NMR 測定は、Varian 400-MR (Agilent Technologies, CA, USA) を用いて実施した。MS 測定は、JMS-700 (日本電子株式会社, 東京) を用いて実施した。静的粘弾性測定は、SUN RHEO METER CR-100 (サン科学株式会社, 東京) を用いて実施した。動的粘弾性測定は、レオメータ MCR 302 (アントンパール・ジャパン, 東京) を用いて実施した。

#### 3. Dipyridiniumboronic acid (DPrBA) の合成

1, 4-Bis(chloromethyl)benzene (875 mg, 5.0 mmol) の acetonitrile (80 mL) 溶液に 3-pyridineboronic acid 1, 3-propanediol ester (1630 mg, 10 mmol) を加え、15 時間加熱還流を行った。反応終了後、溶媒を減圧留去し、残渣に methanol (35 mL) を加えてろ過した。次いで、溶媒を減圧留去し、残渣に蒸留水 (30 mL) を加えて 15 時間攪拌した。その溶液を acetone (600 mL) に滴下して析出した固体をろ取り、減圧乾燥させることで DPrBA (961 mg, 46%) を得た。

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, methanol-*d*<sub>4</sub>) δ5.85 (s, 4H, -CH<sub>2</sub>-), 7.58 (s, 4H, XyH), 8.02 (t, 2H, PyH), 8.71 (d, 2H, PyH), 8.94 (d, 2H, PyH), 8.98 (s, 2H, PyH).

FAB-MS, positive mode, matrix: glycerol m/z: 461

#### 4. Tripyridiniumboronic acid (TPrBA) の合成

1, 3, 5-Tris(bromomethyl)benzene (714 mg, 2.0 mmol) の acetonitrile (90 mL) 溶液に 3-pyridineboronic acid 1, 3-propanediol ester (1467 mg, 9.0 mmol) を加え、15 時間加熱還流を行った。反応終了後、溶媒を減圧留去し、残渣に methanol (32 mL) を加えてろ過した。次いで、溶媒を減圧留去し、残渣に蒸留水 (27 mL) を加え、さらに HCl 水溶液 (1.0 M) を加えて pH を約 2 にした状態で 15 時間攪拌した。その溶液を acetone (900 mL) に滴下して析出した固体をろ取り、減圧乾燥させることで TPrBA (1266 mg, 87%) を得た。

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz, methanol- $d_4$ )  $\delta$ 5.87 (s, 6H,  $-\text{CH}_2-$ ), 7.72 (s, 3H, XyH), 8.02 (t, 3H, PyH), 8.71 (d, 3H, PyH), 8.97 (s and d, 6H, PyH).

FAB-MS, positive mode, matrix: glycerol  $m/z$ : 652

#### 5. Hexapyridiniumboronic acid (HPrBA) の合成

Hexakis(bromomethyl)benzene (636 mg, 1.0 mmol) の acetonitrile (72 mL) 溶液に 3-pyridineboronic acid 1, 3-propanediol ester (1467 mg, 9.0 mmol) を加え、15 時間加熱還流を行った。反応終了後、溶媒を減圧留去し、残渣に methanol (32 mL) を加えてろ過した。次いで、溶媒を減圧留去し、残渣に蒸留水 (27 mL) を加え、さらに HCl 水溶液 (1.0 M) を加えて pH を約 2 にした状態で 15 時間攪拌した。その溶液を acetone (900 mL) に滴下して析出した固体をろ取り、減圧乾燥させることで HPrBA (1052 mg, 77%) を得た。

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz, methanol- $d_4$ )  $\delta$ 6.38 (s, 12H,  $-\text{CH}_2-$ ), 7.92 (t, 6H, PyH), 8.64 (d, 6H, PyH), 9.05 (s, 6H, PyH), 9.09 (d, 6H, PyH).

## 6. ピリジニウムボロン酸誘導体/PVA gel の調製

DPrBA 水溶液 (20 mg/mL, 500  $\mu$ L) に NaOH 水溶液 (1.0 M, 250  $\mu$ L)、PVA 水溶液 (20 mg/mL, 5.0 mL) を加え、激しく 5 回振って混和した。静的粘弾性測定の場合、そのうち 5.0 mL をガラス製のスナップカップ (直径 30 mm) に入れて 18 時間室温下で静置させた。動的粘弾性測定の場合、そのうち 4.0 mL をプラスチックシャーレ (直径 60 mm) に入れて一晩静置させた。

TPrBA 水溶液あるいは HPrBA 水溶液 (20 mg/mL, 417  $\mu$ L) と NaOH 水溶液 (1.0 M, 250  $\mu$ L)、蒸留水 (83  $\mu$ L)、PVA 水溶液 (20 mg/mL, 5.0 mL) を混ぜ、激しく 5 回振った。各粘弾性測定用のサンプルは、DPrBA と同様に分注して調製した。

## 7. 静的粘弾性測定

調製した 3 種類のゲルに円柱状の治具 (直径 20 mm, 高さ 10 mm) を使って 27.8% のひずみをかけ続け (ステージの移動速度 20 mm/min)、その際の応力を 50 分間、室温下で測定した。

## 8. 動的粘弾性測定

ひずみ分散測定は、角周波数を 10 rad/s に設定し、ひずみを 0.16~400% の範囲で連続的に大きくしていったときの  $G'$  と  $G''$  の値を測定した。周波数分散測定では、ひずみを 1.0% に設定し、角周波数を 10~0.01 rad/s の範囲で連続的に小さくしていったときの  $G'$  と  $G''$  の値を測定した。なお、測定において、使用した治具は共にガラス製の平行プレート (D-PP38GL)、温度は 35°C で実施した。

## 第2章

### 1. 実験材料

*N,N*-Dimethylformamide、diethyl ether、PVA (n=500) は、和光純薬工業株式会社 (大阪) から購入した。3-Aminophenylboronic acid monohydrate、acryloyl chloride、2,2'-azobis (isobutyronitrile) (AIBN) は、東京化成株式会社 (東京) から購入した。2-(Dodecylthiocarbonothioylthio)-2-methylpropionic acid、4-(2-hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid (HEPES)、glucose oxidase from *aspergillus niger* (GOx) は、Sigma-Aldrich Japan (東京) から購入した。Poly(allylamine) (PAA, 分子量 10000, 20%水溶液) は、日東紡績株式会社 (東京) から購入した。

その他の試薬も含めて特級で購入し、精製せずに使用した。

### 2. 測定機器

<sup>1</sup>H-NMR 測定は、第1章と同様の機器を使用した。Quartz crystal microbalance (QCM) 法における振動数の測定は、QCA922 (SEIKO EG&G, 東京) で行った。

### 3. QCM 法によるピリジニウムボロン酸誘導体/PVA 間における相互作用の評価

PVA 溶液 (0.10 mg/mL)、DPrBA 溶液 (0.12 mg/mL)、TPrBA 溶液 (0.10 mg/mL)、HPrBA 溶液 (0.10 mg/mL) を HEPES 緩衝液 (10 mM, pH 7.4, 150 mM NaCl 含有) で調製した。

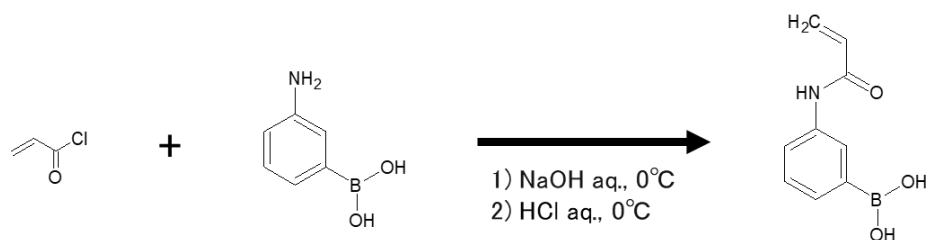
フロースルーセル型の装置内に Pt 電極 (QA-A9M PT, SEIKO EG&G, 東京) を設置して、HEPES 緩衝液を流入させて浸した (5 min)。次に、PVA 溶液に浸した (15 min) 後、HEPES 緩衝液でリンスした (5 min)。次に、各種ピリジニウムボロン酸誘導体溶液に浸して (15 min)、同様にリンスした。この操作を繰り返し行って、振動数の変化を評価した。

#### 4. 3-Acrylamidophenylboronic acid の合成

氷冷下、NaOH 水溶液 (2.0 M, 73 mL) に 3-aminophenylboronic acid monohydrate (5.0 g, 37 mmol) を加え、次いで acryloyl chloride (5.9 mL, 73 mmol) を滴下し、1 時間攪拌した。反応終了後、HCl 水溶液 (1.0 M) を加えて pH を約 1.0 にした。析出した固体をろ取り、冷却水で洗浄した後、減圧乾燥した。その固体を再結晶 (蒸留水) し、3-acrylamidophenylboronic acid を得た (3.9 g, 55%, Scheme 5)。合成の確認は、 $^1\text{H-NMR}$  と FAB-MS の測定により行った (Figure 43, 44)。

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz, dimethyl sulfoxide- $d_6$ )  $\delta$  5.72 (dd, 1H,  $-\text{C}=\text{CH}_2$ ), 6.23 (dd, 1H,  $-\text{C}=\text{CH}_2$ ), 6.43 (dd, 1H,  $=\text{CHC}=\text{O}$ ), 7.27 (t, 1H, ArH), 7.48 (d, 1H, ArH), 7.80 (d, 1H, ArH), 7.86 (s, 1H, ArH), 8.01 (s, 2H,  $-\text{BOH}$ ), 10.06 (s, 1H,  $-\text{NHC}=\text{O}$ )。

FAB-MS, negative mode, matrix: glycerol  $\text{M-H}^+$ : 246



Scheme 5. Synthesis of 3-acrylamidophenylboronic acid.

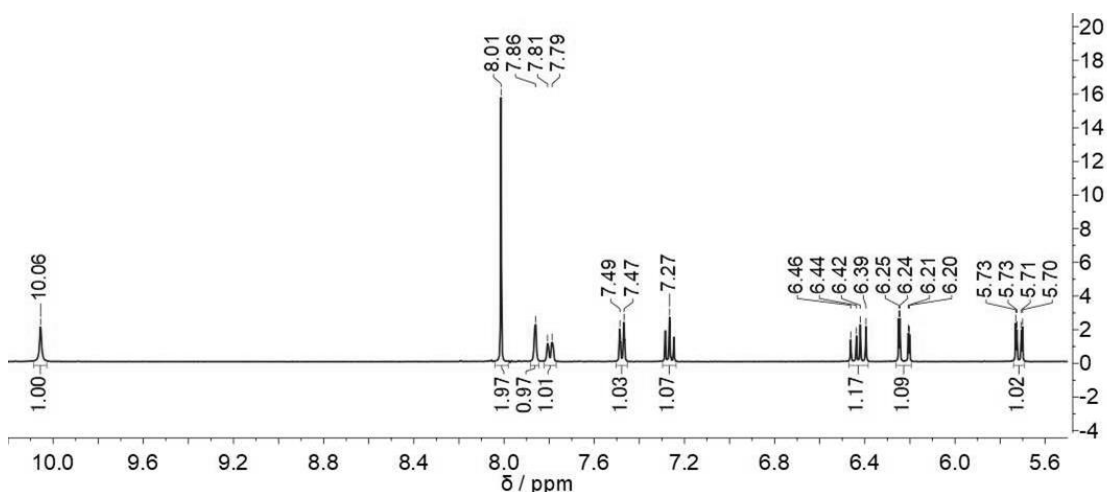


Figure 43.  $^1\text{H-NMR}$  spectrum of 3-acrylamidophenylboronic acid (dimethyl sulfoxide- $d_6$ ).

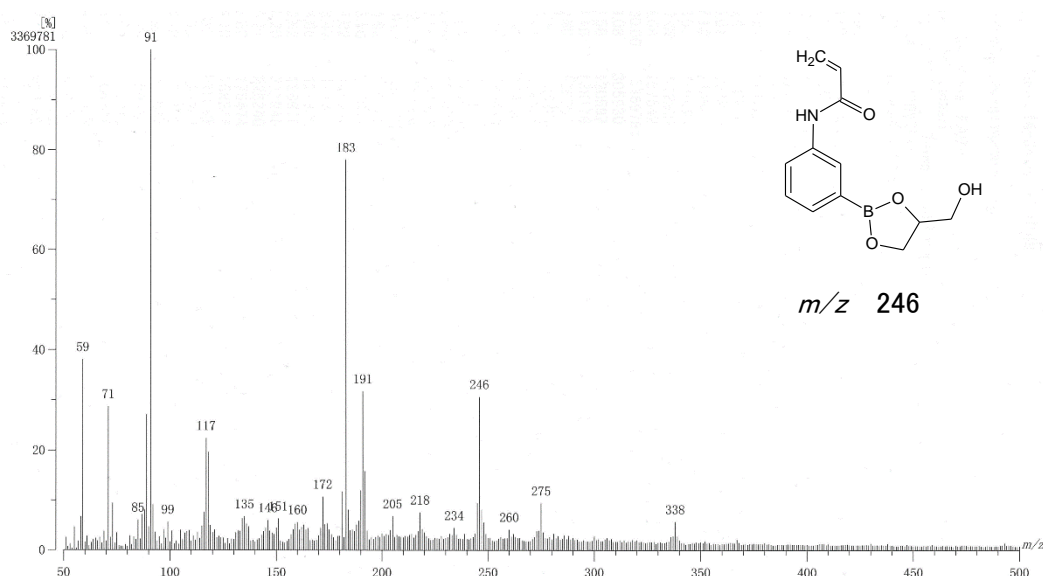


Figure 44. FAB-MS (negative mode) and structures of 3-acrylamidophenylboronic acid glycerin complex.

## 5. Poly(3-acrylamidophenyl boronic acid) (PolyPBA) の合成

*N,N*-Dimethylformamide と蒸留水の 19 : 1 (v/v) 溶液 (8.0 mL) に 3-acrylamidophenylboronic acid (2.3 g, 12 mmol)、2-(dodecylthiocarbonothioylthio)-2-methylpropionic acid (438 mg, 1.2 mmol)、AIBN (49 mg, 0.30 mmol) を加え、30 分間  $N_2$  バブリングを行った後、70°C で 20 時間攪拌した。次いで、反応溶液を diethyl ether (500 mL) に滴下し、析出した固体をろ取して PolyPBA (2.3 g, 84%) を得た。 $^1H$ -NMR (400 MHz, methanol- $d_4$ )  $\delta$ 0.89 (t, 3H, -CH<sub>3</sub>), 1.27 (s, 18H, -CH<sub>2</sub>-), 1.80 (m, 29H, -CH<sub>2</sub>-), 2.50 (m, 16H, -CHC=O-), 7.40 (m, 57H, ArH).

## 6. QCM 法による PolyPBA/PAA 間における相互作用の評価

PAA 溶液 (0.10 mg/mL)、PolyPBA 溶液 (0.10 mg/mL)、GOx 溶液 (0.10 mg/mL) を HEPES 緩衝液 (10 mM, pH 7.4, 150 mM NaCl 含有) で調製した。

フロースルーセル型の装置内に Pt 電極を設置して、HEPES 緩衝液を流入させた (5 min)。次に、PAA 溶液に浸した (5 min) 後、HEPES 緩衝液でリンスした (5 min)。さらに、PolyPBA 溶液に浸して同様にリンスした (5 min) 後、再度 PAA 溶液を流入させてリンスした。その後 GOx 溶液を流入させ、この操作を繰り返して行って、振動数の変化を評価した。



## 第3章

### 1. 実験材料

D-(+)-glucose (Glc)、diethylene glycol (DE) は、和光純薬工業株式会社 (大阪) から購入した。PVA (n=2000)、PAA、GOx、HEPES、NaOH solution などは、第2章までと同じものを用いた。

その他の試薬も含めて特級で購入し、精製せずに使用した。

### 2. 測定機器

吸光度の測定は、SpectraMax M5<sup>e</sup> (Molecular Devices, CA, USA) で行った。

### 3. DPrBA/ PVA gel の Glc 添加による外観変化の評価

DPrBA 水溶液 (20 mg/mL, 174  $\mu$ L) と NaOH 水溶液 (1.0 M, 86  $\mu$ L)、PVA 水溶液 (20 mg/mL, 1.74 mL) を激しく振とう混和して一晩静置させた。そこへ、最終濃度が 100 mM になるように、Glc 水溶液 (90.1 mg/mL, 500  $\mu$ L) あるいは DE 水溶液 (53.1 mg/mL, 500  $\mu$ L) を加え、経時的に外観の様子を撮影した。

### 4. フロースルーセル型溶出試験器の作成

アクリル板 (厚さ 2.0, 5.0, 10 mm, 1 辺の長さ 40 mm) をルーターで加工した (Figure 45)。それぞれのアクリル板の間には高真空用グリースを塗り、それらを重ね合わせてミキサハウジング (YMC-P-0030-01, YMC, 京都) で固定することにより試験器を作製した。

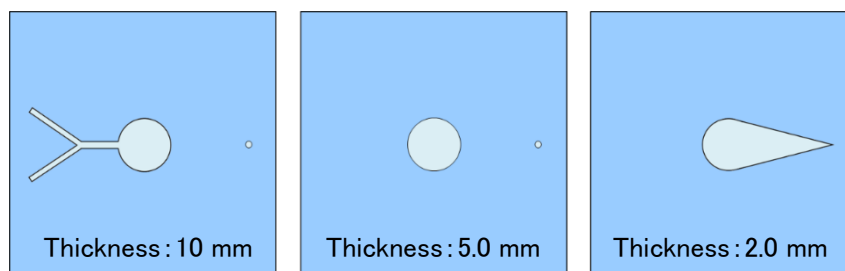


Figure 45. Schematic representation of an acrylic plate constituting a flow-through cell.

#### 4. フロースルーセル型溶出試験器を用いた放出試験による DPrBA/PVA gel および PolyPBA/PAA gel の Glc 応答性崩壊挙動の評価

スクリー管で DPrBA 水溶液 (20 mg/mL, 174  $\mu$ L) と NaOH 水溶液 (1.0 M, 86  $\mu$ L)、PVA 水溶液 (20 mg/mL, 1.74 mL) を混合し、すぐにアクリル板 (厚さ 10 mm) に空いている円柱状の空洞へ分注した (300  $\mu$ L)。それを 25°C で一晩静置させた後、3 枚のアクリル板に高真空用グリースを塗り、ミキサハウジングで固定した。試験器には 2 つのシリンジポンプ (YSP-101, YMC, 東京) を接続して、まずは片方の流入路から HEPES 緩衝液 (10 mM, pH 7.4) を流し (15  $\mu$ L/min)、20 分間隔で 1 時間サンプリングを行った。次に、ポンプの ON/OFF を切り替え、もう一方のポンプで HEPES 緩衝液、あるいは HEPES 緩衝液で調製した Glc 溶液 (100 mM) を流し (15  $\mu$ L/min)、20 分間隔で 1 時間サンプリングを行った。試験終了後、試験器内に Glc 溶液 (100 mM) を流し入れて溶液を回収した。また、厚さ 2.0 mm のアクリル板を外し、パストゥールピペットで試験器内に Glc 溶液を少量入れてその溶液を回収する作業を繰り返し行うことで、試験器内に残っているゲルを回収した。各サンプルおよび回収したゲルの吸光度をマイクロプレートリーダーで測定して ( $\lambda$ : 262 nm)、それぞれの DPrBA 含有量を求めた。

PolyPBA/PAA gel においては、スクリー管で PolyPBA 水溶液 (5.0 mg/mL, 200  $\mu$ L) と PAA 水溶液 (200 mg/mL, 1.0 mL)、GOx (7.54 mg)、acetone (500  $\mu$ L) を混合し、すぐにアクリル板 (厚さ 10 mm) に空いている円柱状の空洞へ分注した (300  $\mu$ L)。放出試験は、DPrBA/PVA gel と同様の操作で行い、PolyPBA の放出プロファイルを得た ( $\lambda$ : 250 nm)。

## 第4章

### 1. 実験材料

Insulin (Ins, Human, recombinant)、sodium dodecyl sulfate (SDS)、acetic acid、D-(-)-fructose (Fru)、dimethyl sulfoxide (super dehydrated)、*N,N*-dimethylformamide (super dehydrated) は、和光純薬工業株式会社 (大阪) から購入した。tributylamine (TBA)、isobutyl chloroformate は、東京化成株式会社 (東京) から購入した。4-carboxyphenylboronic acid、2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS, 5%水溶液) は、Sigma-Aldrich Japan (東京) から購入した。4-carboxy-3-fluorophenylboronic acid は、Oakwood Products Inc.から購入した。PVA (n=500, 2000)、GOx、HEPES、NaOH solution などは、第3章までと同じものを用いた。

その他の試薬も含めて特級で購入し、精製せずに使用した。

### 2. 測定機器

ボロン酸修飾数を評価する際の吸光度の測定は、JASCO V-560, ETC-505T (日本分光, 東京)で行った。放出試験における吸光度の測定は、第2章と同様の装置で行った。

### 3. Phenylboronic acid-modified insulin (PBA-Ins) と fluorophenylboronic acid-modified insulin (FPBA-Ins) の合成

Ins (300 mg, 51.7  $\mu$ mol) を TBA (300  $\mu$ L) および dimethyl sulfoxide (60 mL) の混合溶液に溶解させ、insulin 溶液を調製した。別容器で、4-carboxyphenylboronic acid (43 mg, 259  $\mu$ mol) を TBA (61.2  $\mu$ L) と *N,N*-dimethylformamide (12 mL) の混合溶液に溶解し、その溶液に isobutyl chloroformate (33  $\mu$ L, 252.6  $\mu$ mol) を加えた。次いで、insulin 溶液に加え、窒素置換した後、室温下で3時間攪拌した。反応終了後、蒸留水 (10 mL) を加え、その溶液を透析した (MWCO 3500)。それを凍結乾燥して PBA-Ins を得た。FPBA-Ins は、4-carboxy-3-fluorophenylboronic acid を用いた同様の操作により合成した。

#### 4. PBA-Ins および FPBA-Ins におけるボロン酸修飾数の評価

リン酸緩衝液 (0.01 M, pH 9.0) で SDS 溶液 (0.15%) を調製した。その溶液で ins、PBA-Ins、FPBA-Ins 溶液 (1.0 mg/mL) と TNBS 溶液 (0.03%) を調製した。SDS 溶液 (2.0 mL)、各サンプル溶液 (2.0 mL)、TNBS 溶液 (1.0 mL) をバイアルに入れ、50°C で振とう混和させた (1 hr)。その後、HCl 溶液 (0.20 M, 3.8 mL) をバイアルに加え、室温で静置した (30 min)。それぞれの反応溶液において、吸収スペクトルを測定して、吸収極大波長における吸光度を求めた。

#### 5. QCM 法による PBA-Ins/PVA および FPBA-Ins/PVA 間における相互作用の評価

PVA 溶液 (n=500, 0.10 mg/mL)、PBA-Ins 溶液 (0.10 mg/mL) を HEPES 緩衝液 (10 mM, pH 7.4, 150 mM NaCl 含有) で調製した。

フロースルーセル型の装置内に Pt 電極を設置して、HEPES 緩衝液を流入させて浸した (5 min)。次に、PVA 溶液に浸した (15 min) 後、HEPES 緩衝液でリンスした (5 min)。次に、PBA-Ins 溶液に浸して (15 min)、同様にリンスした。この操作を繰り返し行って、振動数の変化を評価した。

FPBA-Ins も同様の操作で評価した。

#### 6. QCM 法による PBA-Ins/PVA および FPBA-Ins/PVA 複合材料の糖応答性崩壊挙動の評価

前述した PBA-Ins/PVA あるいは FPBA-Ins/PVA の流入サイクルを 5 回繰り返して Pt 電極上に複合材料を積層させた。そこに、HEPES 緩衝液 (10 mM, pH 7.4, 150 mM NaCl 含有) で調製した Fru 溶液 (10 mM) を流入させた (1 hr)。HEPES 緩衝液でリンスした (5 min) 後、Fru 溶液 (100 mM) に浸した (1 hr)。最後に HEPES 緩衝液でリンスして (15 min)、振動数の変化を評価した。

Glc においても同様の操作を行った。

## 7. フロースルーセル型溶出試験器を用いた放出試験による PBA-Ins/

### PVA gel および FPBA-Ins/PVA gel の Glc 応答性 Ins 放出の評価

スクリー管で PBA-Ins (1.0 mg)、NaOH 水溶液 (1.0 M, 20  $\mu$ L)、HCl 水溶液 (1.0 M, 10  $\mu$ L)、PVA 水溶液 (n=2000, 20 mg/mL, 1.74 mL)、必要に応じて GOx (37.5 mg)を混合し、アクリル板 (厚さ 10 mm) に空いている円柱状の空洞へ分注した (300  $\mu$ L)。それを  $-20^{\circ}\text{C}$  で 15 時間凍結させた後、 $25^{\circ}\text{C}$  で解凍した。放出試験は、DPrBA/ PVA gel と同様の操作で行い、PBA-Ins の放出プロファイルを得た ( $\lambda$ : 250 nm)。

## 参考文献

1. 森本雍憲・関俊暢・関川彬・福島昭二・岸本修一・宮崎正三・伊藤邦彦・夏目秀視・山下伸二・曾根知道・西田孝洋・藤田卓也・杉林堅次・長谷川高明・灘井雅行・加藤美紀 (2012). *みてわかる薬学 図解薬剤学 改訂5版* 南山堂, 東京.
2. E. R. Gillies and J. M. Frechet, pH-responsive copolymer assemblies for controlled release of doxorubicin, *Bioconjugate Chem.*, 16, 361-368 (2005).
3. K. S. Soppimath, D. C.-W. Tan and Y.-Y. Yang, pH-triggered thermally responsive polymercore-shell nanoparticles for drug delivery, *Adv. Mater.*, 17, 318-323 (2005).
4. J.-Z. Du, T.-M. Sun, W.-J. Song, J. Wu and J. Wang, A tumor-acidity-activated charge-conversional nanogel as an intelligent vehicle for promoted tumoral-cell uptake and drug delivery, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 49, 3621-3626 (2010).
5. W. Wu, J. Shen, P. Banejee and S. Zhou, Chitosan-based responsive hybrid nanogels for integration of optical pH-sensing, tumor cell imaging and controlled drug delivery, *Biomaterials*, 31, 8371-8381 (2010).
6. M. Morishita, A. M. Lowman, K. Takayama, T. Nagai and N. A. Peppas, Elucidation of the mechanism of incorporation of insulin controlled release systems based on complexation polymers, *J. Control. Release*, 81, 25-32 (2002).
7. A. Car, P. Baumann, J. T. Duskey, M. Chami, N. Bruns and W. Meier, pH-responsive PDMS-*b*-PDMAEMA micelles for intracellular anticancer drug delivery, *Biomacromolecules*, 15, 3235-3245 (2014).
8. J. Shi, N. Alves and J. F. Mano, Drug release of pH/temperature-responsive calcium alginate/poly(*N*-isopropylacrylamide) semi-IPN beads, *Macromol. Biosci.*, 6, 358-363 (2006).
9. B.-L. Guo and Q.-Y. Gao, Preparation and properties of a pH/temperature-responsive carboxymethyl chitosan/poly(*N*-isopropylacrylamide)semi-IPN hydrogel for oral delivery of drugs, *Carbohydr. Res.*, 342, 2416-2422 (2007).
10. K. Peng, I. Tomatsu and A. Kros, Light controlled protein release from a supramolecular hydrogel, *Chem. Commun.*, 46, 4094-4096 (2010).

11. D. Wang, M. Wangner, H.-J. Butt and S. Wu, Supramolecular hydrogels constructed by red-light-responsive host-guest interactions for photo-controlled protein release in deep tissue, *Soft Matter*, 11, 7656-7662 (2015).
12. L. Han, Y. Zhang, X. Lu, K. wang, Z. Wang and H. Zhang, Polydopamine nanoparticles modulating stimuli-responsive PNIPAM hydrogels with cell/tissue adhesiveness, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 8, 29088-29100 (2016).
13. V. Yesilyurt, M. J. Webber, E. A. Appel, C. Godwin, R. Lomger and D. G. Anderson, Injectable self-healing glucose-responsive hydrogels with pH-regulated mechanical properties, *Adv. Mater.*, 28, 86-91 (2016).
14. A. Matsumoto, K. Yamamoto, R. Yoshida, K. Kataoka, T. Aoyagi and Y. Miyahara, A totally synthetic glucose responsive gel operating in physiological aqueous conditions, *Chem. Commun.*, 46, 2203-2205 (2010).
15. A. Matsumoto, R. Yoshida and K. Kataoka, Glucose-responsive polymer gel bearing phenylborate derivative as a glucose-sensing moiety operating at the physiological pH, *Biomacromolecules*, 5, 1038-1045 (2004).
16. M.-J. Zhang, W. Wang, R. Xie, X.-J. Ju, L. Liu, Y.-Y. Gu and L.-Y. Chu, Microfluidic fabrication of monodisperse microcapsules for glucose-response at physiological temperature, *Soft Matter*, 9, 4150-4159 (2013).
17. W. Wu, N. Mitra, E. Y. Yan and S. Zhou, Multifunctional hybrid nanogel for integration of optical glucose sensing and self-regulated insulin release at physiological pH, *ACS Nano*, 4, 4831-4839 (2010).
18. H. Kim, .Y J. Kang, S. Kang and K. T. Kim, Monosaccharide-responsive release of insulin from polymersomes of polyboroxole block copolymers at neutral pH, *J. Am. Chem. Soc.*, 134, 4030-4033 (2012).
19. T. Traitel, Y. Cohen and J. Kost, Characterization of glucose-sensitive insulin release systems in simulated in vivo conditions, *Biomaterials*, 21, 1679-1687 (2000).
20. D. Shiino, Y. Murata, A. Kubo, Y. J. Kim, K. Kataoka, Y. Koyama, A. Kikuchi, M. Yokoyama, Y. Sakurai and T. Okano, Amine containing phenylboronic acid gel for glucose-responsive insulin release under physiological pH, *J. Control. Release*, 37, 269-276 (1995).

21. A. E. Ivanov, H. Larsson, I. Y. Galaev and B. Mattiasson, Synthesis of boronate-containing copolymers of *N,N*-dimethylacrylamide, their interaction with poly(vinyl alcohol) and rheological behavior of the gels, *Polymer*, 45,2495-2505 (2004).
22. Y.-F. Huang, P.-F. Wu, M.-Q. Zhang, W.-H. Ruan and E. P. Giannelis, Boron cross-linked graphene oxide/Poly(vinyl alcohol) nanocomposite gel electrolyte for flexible solid-state electric double layer capacitor with high performance, *Electrochimica Acta*, 132, 103-111 (2014).
23. T. Konno and K. Ishihara, Temporal and spatially controllable cell encapsulation using a water-soluble phospholipid polymer with phenylboronic acid moiety, *Biomaterials*, 28, 1770-1777 (2007).
24. K. Yoshida, R. Hashide, T. Ishii, S. Takahashi, K. Sato and J. Anzai, Layer-by-layer films composed of poly(allylamine) and insulin for pH-triggered release of insulin, *Colloids Surf. B*, 91, 274-279 (2012).
25. Y. Lvov, G. Decher and H. Möhwald, Assembly, structural characterization, and thermal behavior of layer-by-layer deposited ultrathin films of poly(vinyl sulfate) and poly(allylamine), *Langmuir*, 9, 481-486 (1993).
26. O. I. Inogradova, O. V. Lebedeva, K. Vasilev, H. Gong, J. Garcia-Turiel and B.-S. Kim, Multilayer DNA/poly(allylamine hydrochloride) microcapsules: Assembly and mechanical properties, *Biomacromolecules*, 6, 1495-1502 (2005).
27. B. G. D. Geest, A. M. Jonas, J. Demeester and S. C. D. Smedt, Glucose-responsive polyelectrolyte capsules, *Langmuir*, 22, 5070-5074 (2006).
28. 上田隆宣 (2012). 測定から読み解くレオロジーの基礎知識 日刊工業新聞社, 東京.
29. 上田隆宣 (2015). 図解でわかるレオロジー測定の実務とデータの活かし方 日刊工業新聞社, 東京.
30. H. Eggert, J. Frederiksen, C. Morin and J. C. Norrild, A new glucose-selective fluorescent bisboronic acid. First report of strong  $\alpha$ -Furanose complexation in aqueous solution at physiological pH, *J. Org. Chem.*, 64, 33846-3852 (1999).



31. G. Huang, H. Zhang, Y. Liu, H. Chang, H. Zhang, H. Song, D. Xu and T. Shi, Strain Hardening Behavior of Poly(vinyl alcohol)/Borate Hydrogels, *Macromolecules*, 50, 2124–2135 (2017).
32. A. S. Hickey and N. A. Peppas, Mesh size and diffusive characteristics of semicrystalline poly(vinyl alcohol) membranes prepared by freezing/thawing techniques, *J. Membr. Sci.*, 107, 229-237 (1995).
33. P. J. Willcox, D. W. Howie jr., K. Schmidt-Rohr, D. A. Hoagland, S. P. Gido, S. Pudjijanto, L. W. Kleiner and S. Venkatraman, Microstructure of poly(vinyl alcohol) hydrogels produces by freeze/thaw cycling, *J. Polym. Sci., Part B: Polym. Phys.*, 37, 3438-3454 (1999).
34. H. Zhang, H. Xia and Y. Zhao, Poly(vinyl alcohol) hydrogel can autonomously self-heal, *ACS Macro Lett.*, 1, 1233-1236 (2012).
35. J. J. Richardson, M. Björnmalm and F. Caruso, Technology-driven layer-by-layer assembly of nanofilms, *Science*, 348, aaa2491 (2015).
36. K. Sato, M. Takahashi, M. Ito, E. Abe and J. Anzai, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced decomposition of layer-by-layer films consisting of phenylboronic acid-bearing poly(allylamine) and poly(vinyl alcohol), *Langmuir*, 30, 9247-9250 (2014).
37. S. Li, E. N. Davis, J. Anderson, Q. Lin and Q. Wang, Development of boronic acid grafted random copolymer sensing fluid for continuous glucose monitoring, *Biomacromolecules*, 10, 113-118 (2009).
38. Y. Wang, X. Zhang, J. Mu and C. Li, Synthesis and pH/sugar/salt-sensitivity study of boronate crosslinked glycopolymer nanoparticles, *New J. Chem.*, 37, 796-803 (2013).
39. X. Chen, W. Wu, Z. Guo, J. Xin and J. Li, Controlled insulin release from glucose-sensitive self-assembled multilayer films based on 21-arm star polymer, *Biomaterials*, 32, 1759-1766 (2011).
40. X. Chen, W. Wu, Z. Guo, J. Xin and J. Li, The influence of arrangement sequence on the glucose-responsive controlled release profiles of insulin-incorporated LbL films, *Acta Biomaterialia*, 8, 4380-4388 (2012).

41. 日本薬局方解説書編集委員会編集, 第十七改正日本薬局方, 廣川書店, 東京, (2016).
42. J. Simon, S. Salzbrunn, G. K. S. Prakash, N. A. Petasis and G. A. Olah, Regioselective conversion of arylboronic acids to phenols and subsequent coupling to symmetrical diaryl ethers, *J. Org. Chem.*, 66, 633-634 (2001).
43. C. de G. Lux, S. Joshi-Barr, T. Nguyen, E. Mahmoud, E. Schopf, N. Fomina and A. Almutairi, Biocompatible polymeric nanoparticles degrade and release cargo in response to biologically relevant levels of hydrogen peroxide, *J. Am. Chem. Soc.*, 134, 15758-15764 (2012).
44. K. Sato, M. Takahashi, M. Ito, E. Abe and J. Anzai, Glucose-induced decomposition of layer-by-layer films composed of phenylboronic acid-bearing poly(allylamine) and poly(vinyl alcohol) under physiological conditions, *J. Mater. Chem. B*, 3, 7796-7802 (2015).
45. D. H.-C. Chou, M.J. Webber, B.C. Tang, A.B. Lin, L.S. Thapa, D. Deng, J.V. Truong, A.B. Cortinas, R. Langer and D. G. Anderson, Glucose-responsive insulin activity by covalent modification with aliphatic phenylboronic acid conjugates, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 112, 2401-2406 (2015)
46. T. Hirotsu, T. Higashi, I. I. A. Hashim, S. Misumi, K. Wada, K. Motoyama and H. Arima, Self-assembly PEGylation retaining activity (SPRA) technology via a host-guest interaction surpassing conventional PEGylation methods of proteins, *Mol. Pharmaceutics*, 14, 368-376 (2017)
47. E. Lee, J. Lee and S. Jon, A novel approach to oral delivery of insulin by conjugating with low molecular weight chitosan, *Bioconjugate Chem.*, 21, 1720-1723 (2010)
48. H. Asada, T. Douen, M. Waki, S. Adachi, T. Fujita, A. Yamamoto and S. Muranishi, Absorption characteristics of chemically modified-insulin derivatives with various fatty acids in the small and large intestine, *J. Pharm. Sci.*, 84, 682-687 (1995).
49. M. Baudys, T. Uchida, D. Mix, D. Wilson and S. W. Kim, Physical stabilization of insulin by glycosylation, *J. Pharm. Sci.*, 84, 28-33 (1995).

50. A. Matsumoto, T. Ishii, J. Nishida, H. Matsumoto, K. Kataoka and Y. Miyahara, A synthetic approach toward a self-regulated insulin delivery system, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 51, 2124-2128 (2012).
51. A. Matsumoto, S. Ikeda, A. Harada and K. Kataoka, Glucose-responsive polymer bearing a novel phenylborate derivative as a glucose-sensing moiety operating at physiological pH conditions, *Biomacromolecules*, 4, 1410-1416 (2003).
52. S. M. Jo, Y. Xia, H. Y. Lee, Y. C. Kim and J.-C. Kim, Liposomes incorporating hydrophobically modified glucose oxidase, *Korean J. Chem. Eng.*, 25, 1221-1225 (2008).
53. J. Yan, G. Springsteen, S. Deeter and B. Wang, The relationship among  $pK_a$ , pH, and binding constants in the interactions between boronic acids and diols-it is not as simple as it appears, *Tetrahedron*, 60, 11205-11209 (2004).