

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5113036号
(P5113036)

(45) 発行日 平成25年1月9日(2013.1.9)

(24) 登録日 平成24年10月19日(2012.10.19)

(51) Int.Cl.

F I

C O 1 B 31/02 (2006.01)

C O 1 B 31/02 I O 1 F

C O 7 K 1/04 (2006.01)

C O 7 K 1/04

請求項の数 3 (全 25 頁)

(21) 出願番号 特願2008-501758 (P2008-501758)
 (86) (22) 出願日 平成19年2月16日(2007.2.16)
 (86) 国際出願番号 PCT/JP2007/053335
 (87) 国際公開番号 W02007/097406
 (87) 国際公開日 平成19年8月30日(2007.8.30)
 審査請求日 平成21年8月13日(2009.8.13)
 (31) 優先権主張番号 特願2006-42872 (P2006-42872)
 (32) 優先日 平成18年2月20日(2006.2.20)
 (33) 優先権主張国 日本国(JP)

(73) 特許権者 503360115
 独立行政法人科学技術振興機構
 埼玉県川口市本町四丁目1番8号
 (74) 代理人 100091096
 弁理士 平木 祐輔
 (74) 代理人 100096183
 弁理士 石井 貞次
 (74) 代理人 100118773
 弁理士 藤田 節
 (74) 代理人 100125508
 弁理士 藤井 愛
 (72) 発明者 磯部 寛之
 東京都荒川区東日暮里6-40-9-704

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 親水性炭素クラスター

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

チューブ状炭素クラスターに金属アミドを反応させることを含む、チューブ状炭素クラスターの炭素原子に置換または無置換アミノ基が結合した構造を有する親水性チューブ状炭素クラスターの製造方法。

【請求項2】

金属アミドがアルカリ金属アミドである、請求の範囲第1項記載の方法。

【請求項3】

チューブ状炭素クラスターの炭素原子に結合したアミノ基を化学修飾することをさらに含む、請求の範囲第1項または第2項記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、親水性炭素クラスター、炭素クラスター分散物、親水性炭素クラスターの製造方法、および親水性炭素クラスターを用いた固相合成方法に関する。

【背景技術】

【0002】

カーボンナノチューブ、カーボンナノホーンおよびフラーレン等のナノメートルスケールの微細構造を有する炭素クラスターは、新しい電子材料、触媒、光材料、ナノテクノロジー等への応用が期待されているナノ構造黒鉛(グラファイト)物質である(S. I i j

ima, et al., Nature, 1991, 354, 56、S. Iijima et al., Nature, 1993, 363, 603、S. Iijima et al., 1999, Chem. Phys. Lett., 1999, 309, 165)。例えば、カーボンナノチューブは、その構造によって金属にも半導体にもなることができ、ナノメートルサイズのデバイスを作るための研究が行われている。

しかしながら、医療用途などへの応用を図るためには、炭素クラスターの水に対する分散性の乏しさが問題となる。そこで、水性溶媒への分散化の方法が検討されている。最近では、界面活性剤や水溶性高分子などの溶解補助剤を用いて非共有結合により錯形成させ、水分散溶液を調製する方法などが開発されている(O'Connell, M. J. et al., Science 2002, 297, 593、Zheng, M. et al., Nature Mat. 2003, 2, 338)。しかしこれらの溶解補助剤は水溶液中で炭素クラスターから解離しやすく、また生体に対する毒性を有するものも多い。また、特開2005-104762号公報には、カーボンナノチューブを多糖類の β -1,3-グルカンと複合体化することによって、安定的に水性溶媒中へ可溶化させる方法が開示され、特開2005-28560号公報には、DNAおよびオリゴヌクレオチドを用いてカーボンナノチューブを可溶化する方法が開示されている。しかし、これらの手法では多量の溶解補助剤を必要とすることから、炭素クラスターの特性を大きく改変してしまうと考えられる。さらに、特開2003-095624号公報には、カルボニル基などの酸素官能基を導入し、さらにその化学修飾を行うことで、親水性カーボンナノホーンを調製する方法が開示されている。しかし、この方法は、カーボンナノホーンを酸化処理するものであり、当該方法ではアミノ基を導入することはできない。

固相合成法は、固体表面に有機化合物を導入し、その上で化学修飾を行う方法である。固相担体の別操作により反応試剤・溶媒を分離し、続く担体からの切り出しにより目的化合物の単離を可能とする手法である。化合物を簡単に精製・単離できることから、さまざまな有機化合物の合成に利用されている。現在では、ポリスチレン樹脂やガラス粒子を固相担体として、ペプチドやDNAの合成、また近年では多種の化合物を合成するコンビナトリアル化学で利用されている。

固相合成において汎用される固相担体は、通常マイクロメートルサイズの樹脂粒子(ビーズ)であり、反応は穏やかに振盪することで実施される。固体表面上での反応であることに加え、物理的に弱く、激しい攪拌操作ができないことから、反応効率が低い場合がある。また、固相合成法で得られた反応生成物を解析するためには、担体からの切り出しを行う必要があり、各反応段階での反応の成否の確認が煩雑である。このため最近では、固相担体上での化合物の直接解析法の開発が注目されている。

【発明の開示】

【0003】

本発明の課題は、炭素クラスターの特性を大きく改変することなく、炭素クラスターを親水性炭素クラスターに変換する方法を提供することである。

本発明者らは、上記課題を解決すべく鋭意検討を行った結果、炭素クラスターに金属アミドを作用させることにより水性溶媒に分散可能な親水性炭素クラスターを製造できることを見出し、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は以下の発明を包含する。

(1) 炭素クラスターの炭素原子に置換または無置換アミノ基が結合した構造を有する、親水性炭素クラスター。

(2) アミノ基が無置換アミノ基である、(1)記載の親水性炭素クラスター。

(3) 炭素クラスターがチューブ状炭素クラスターである、(1)または(2)記載の親水性炭素クラスター。

(4) 炭素クラスターがカーボンナノホーンであり、置換または無置換アミノ基が少なくとも円錐の末端キャップの炭素原子に結合している、(3)記載の親水性炭素クラスター。

(5) (1)～(4)のいずれかに記載の親水性炭素クラスターが水性溶媒に分散してい

る、炭素クラスター分散物。

(6) 炭素クラスターに金属アミドを反応させることを含む、炭素クラスターの炭素原子に置換または無置換アミノ基が結合した構造を有する親水性炭素クラスターの製造方法。

(7) 炭素クラスターがチューブ状炭素クラスターである、(6)記載の方法。

(8) 金属アミドがアルカリ金属アミドである、(6)または(7)記載の方法。

(9) 炭素クラスターの炭素原子に結合したアミノ基を化学修飾することをさらに含む、(6)～(8)のいずれかに記載の方法。

(10) (1)～(4)のいずれかに記載の親水性炭素クラスターからなる有機化合物の固相合成に使用するための担体。

(11) 有機化合物の固相合成に使用するための担体であって、

(1)～(4)のいずれかに記載の親水性炭素クラスターのアミノ基に固相合成用のリンカー分子が共有結合した構造を有する、前記担体。

(12) (10)または(11)に記載の担体を用いて有機化合物を固相合成する方法。

(13) 有機化合物がポリペプチドまたはポリヌクレオチドである、(12)記載の方法。

。本発明により、炭素クラスターの特性を大きく改変することなく、炭素クラスターを親水性炭素クラスターに変換することができる。また、得られた親水性炭素クラスターを固相合成に用いることにより、溶液反応と同様の条件で合成反応および生成物の分析を実施することができる。

本明細書は、本願の優先権の基礎である特願2006-042872号の請求の範囲、明細書および図面に記載された内容を包含する。

【図面の簡単な説明】

【0004】

図1は、カーボンナノホーン凝集物(NHA)から、円錐の末端キャップにアミノ基を有するアミノ化NHA2を製造する工程、アミノ化NHA2のアミノ基を1-フルオロ-2,4-ジニトロベンゼンによりジニトロフェニルアミノ基に変換してアミノ化NHA3を製造する工程、およびアミノ化NHA2から蛍光標識されたアミノ化NHA4を製造する工程の概略を示す。

図2は、未処理NHA(上)およびアミノ化NHA2(下)のIRスペクトルを示す。3200 cm⁻¹付近の幅広いシグナルはアミノ化NHA2中のアミノ基の存在を示す。

図3の(A)は、アミノ化NHA2のTEM画像を示す。カーボンナノホーンの円錐形の形状が保持されていることがわかる。スケールバーは2 nmを表す。(B)は、1.0 mg/mLおよび0.20 mg/mLの濃度のアミノ化NHA2の水溶液、ならびに未処理NHAの写真を示す(左から右へ)。(C)はアミノ化NHA2の水溶液(0.20 mg/mL)のDLSデータを示す。(D)は、マイカ上に析出したアミノ化NHA2のAFM画像を示す。スケールバーは500 nmを表す。

図4は、AFMによるアミノ化NHA2のサイズ分析の結果を示す。

図5の(A)は、濃度0.02 mg/mLのアミノ化NHA2のUV-visスペクトルを示す。260 nmの吸収はNHAの黒鉛構造のプラズモン吸収に相当する。(B)は濃度0.02 mg/mLのアミノ化NHA3のUV-visスペクトルを示す。挿入図は、アミノ化NHA3およびアミノ化NHA2の差スペクトルを示す。350 nmの吸収はジニトロフェニルアミノ基に相当し、NHA上のアミノ基の存在を立証するものである。(C)は、濃度0.02 mg/mLのアミノ化NHA4のUV-visスペクトルを示す。挿入図は、アミノ化NHA4およびアミノ化NHA2の差スペクトルを示す。500 nmの吸収はオレゴングリーン488に相当する。

図6の(A)は、セファクリル500HR(樹脂体積:17 mL、検出:260 nm)により溶離されたアミノ化NHA2(0.2 mg/mL、0.5 mL)のクロマトグラムを示す。分画の位置は、左から順に、分画22:赤、23:橙、24:緑および27:青の色で表される。(B)は、分画のDLS分析の代表的データを示す。分画を表す色はAと同じであり、上から順に、分画22:赤、23:橙、24:緑および27:青の色で表

10

20

30

40

50

される。

図7は、アミノ化NH₂A₂を溶離した後のカラムの写真を示す。(A)は、セファクリル100HRを用いた場合、(B)はセファクリル500HRを用いた場合、(C)はセファクリル1000SFを用いた場合のカラムの写真を示す。アミノ化NH₂A₂は、セファクリル500HRのカラムから溶離したが、他のカラムからは溶離しなかった。

図8は、蛍光染料の存在を示すアミノ化NH₂A₄の励起(赤)および発光(青)スペクトルを示す。

図9は、(A)は3T3細胞とHeLa細胞を粒子とともに培養したときの生存率を示す。この生存率はBradford法をもちいて算出した。(B)は3T3細胞を培養した時の写真を示す。左の写真はアミノ化NH₂A₂が入っておらず、中央と右の写真はそれぞれ0.1mg/mL、1mg/mLの濃度でアミノ化NH₂A₂が添加されたものである。

図10は、実施例11で合成したN-Fmoc-Gly-HMP-ANの¹H NMRスペクトルを示す。

図11は、実施例12で合成したN-Fmoc-Ala-HMP-ANの¹H NMRスペクトルを示す。

【発明を実施するための最良の形態】

【0005】

本発明において炭素クラスターとは、炭素-炭素間結合の種類を問わず、通常は数個から数百個の炭素原子が結合または凝集して形成されている集合体をさす。ただし、必ずしも100%炭素のみで構成されているものに限られず、他原子が混在しているものも包含する。このような場合も含めて、炭素原子が多数を占める集合体を炭素クラスターと称する。炭素クラスターには、球殻状炭素クラスター、例えば、フラーレン、およびチューブ状炭素クラスター、例えば、カーボンナノチューブ、カーボンナノホーンおよびカーボンファイバー、ならびにこれらを化学的に修飾した誘導体およびこれらの凝集物が含まれる。

チューブ状炭素クラスターの1つであるカーボンナノチューブは、2~数十層のグラファイト状の炭素が積み重なってできた多重のチューブであり、各層の両端がフラーレンのように閉じた構造を有する。カーボンナノチューブとしては、単層のチューブからなる単層カーボンナノチューブ(SWCNT)、および2つ以上の層が同心円的に重なっている多層カーボンナノチューブ(MWCNT)が知られているが、本発明においてはいずれも使用できる。カーボンナノチューブおよびその誘導体は、公知の製造方法で得ることができ、例えば、アーク放電法(Acc. Chem. Res. vol. 16, no. 12, 2002, p. 1035-1044)、熱分解法(J. Phys. Chem. B vol. 105, no. 35, 2001, p. 8297-8301)、レーザ蒸発法(Carbon vol. 33, no. 7, 1995, p. 903-914)、気相合成法(Science vol. 306, no. 5700, 2004, p. 1362-1364)などにより得ることができる。カーボンナノチューブの平均繊維長(電子顕微鏡写真の画像解析から求めた長軸長の数平均から求めることができる)は、10~100μmであることが好ましく、直径は0.8~20nmであることが好ましい。

カーボンナノホーンは、カーボンナノチューブのようにチューブ径が一定ではなく、チューブ径が連続的に増加する中空円錐状の、つまり、角(ホーン)状の構造を有する(特開2001-64004号公報)。カーボンナノホーンは、カーボンナノチューブと同様の方法により製造できる。例えば、上記特許公報にも開示されているように、固体状炭素単体物質に対して、不活性ガス雰囲気中で、レーザ光を照射して炭素レーザ蒸発させることにより、球状粒子が集合した構造体として得ることができる。この球状粒子は、単層のカーボンナノチューブの先端が円錐状に閉じたものの集合体であって、ダリヤの花に似た形状を持つものや、つぼみ、たね状のものも存在する。

一実施形態として、カーボンナノホーンの好ましい製造方法について以下に説明する。固体状炭素単体物質に対して、不活性ガス雰囲気中で、レーザ光を照射して炭素レーザ蒸

10

20

30

40

50

発させ、すす状物質として、球状物質が集合した粉体を得る。炭素レーザ蒸発は、Ar（アルゴン）、He（ヘリウム）等の希ガスをはじめとする反応不活性なガス雰囲気中において、高出力CO₂ガスレーザ光等のレーザ光を固体炭素単体物質の表面に対して適当な角度で照射して行う。固体物質としての炭素単体物質としては、例えば丸棒状焼結炭素や圧縮成形炭素等を用いることができる。すす状物質は、適当な基板上に堆積して回収することや、ダストバッグによる微粒子回収の方法によって回収することができる。不活性ガスを反応容器内で流通させて、不活性ガスの流れによりこのすす状物質を回収することができる。得られたすす状物質は、カーボンナノホーン構造体が集合して球状粒子を形成し、この球状粒子が多数集合している粒子である。これを単一または複数個が集合した状態の球状粒子とすることができる。この場合には、溶媒として例えばエタノールに懸濁し、超音波攪拌とデカンテーション等を行うこと、また必要により繰り返すことにより、単一の、または複数個の集合状態の上記球状粒子が回収できる。

10

カーボンナノチューブおよびカーボンナノホーンなどのチューブ状炭素クラスターは、市販のものを使用してもよく、例えば、本荘ケミカル（株）、（株）東京プログレスシステム、（株）サイエンスラボラトリーズ、（株）カーボン・ナノテク・リサーチ・インスティテュート（CNRI）、米・Hyperion社などの混合品、精製品が挙げられる。

フラーレンは、炭素原子のネットワークに、グラファイトに見られる6員環のほかに5員環を含む球殻状炭素分子である。例えば、C₃₆、C₆₀、C₇₀、C₇₆、C₇₈、C₈₀、C₈₂、C₈₄、C₈₆、C₈₈、C₉₀、C₉₂、C₉₄、C₉₆、および一分子中の炭素数が96を超え且つ最大凝集塊径が30nm以下の高次フラーレン、ならびにこれらの2種以上の混合物が挙げられる。中でもC₆₀、C₇₀、C₇₆、C₈₂が好ましく用いられる。これらのフラーレンは、公知の方法によって合成することができる。

20

例えば、C₃₆の製造方法はNew Diamond, vol. 16, no. 2, 2000, p. 30-31に記載されている。C₆₀、C₇₀、C₇₆、C₇₈、C₈₂、C₈₄、C₉₀およびC₉₆の製造方法としては、J. Phys. Chem., 94, 8634 (1990) にアーク放電法による製造方法が記載され、また、Z. Phys. D, 40, 414 (1997) にオープン・レーザ法による製造方法がそれぞれ記載されている。また、一分子中の炭素数が96を超え且つ最大凝集塊径が30nm以下の高次フラーレンは、上記したアーク放電法の副成物として得ることができる。

30

フラーレンの市販品としては、C₆₀、C₇₀ではフロンティアカーボン（株）製、MATERIALS TECHNOLOGIES RESEARCH MTR LIMITED社製のものなどが挙げられ、C₇₆、C₇₈、C₈₄ではMATERIALS TECHNOLOGIES RESEARCH MTR LIMITED社製のものなどが挙げられる。本発明では、炭素数の異なるフラーレンの混合物を用いてもよく、その市販品としては、フロンティアカーボン（株）、（株）サイエンスラボラトリーズ、（株）東京プログレスシステム、MATERIALS TECHNOLOGIES RESEARCH MTR LIMITED社製のC₆₀/C₇₀の混合物が挙げられる。

炭素クラスターの誘導体には、炭素クラスターを官能基で化学的に修飾したものが含まれる。炭素クラスターを化学的に修飾する官能基としては、例えば、C₁₋₆アルキル、C₂₋₆アルケニル、C₂₋₆アルキニル、カルボキシル、ヒドロキシル、エポキシ、オキシエンタンなどが挙げられる。炭素クラスターの誘導体には、炭素クラスターを金属元素で化学的に修飾したものも含まれる。炭素クラスターを化学的に修飾する金属元素としては、公知のものを用いることができ、例えば、Li、NaおよびKなどのアルカリ金属、Be、MgおよびCaなどのアルカリ土類金属、Ti、V、Cr、Mn、Fe、Co、Ni、Cu、Znなどの遷移金属が挙げられる。

40

本発明の親水性炭素クラスターは、上記炭素クラスターを構成する炭素原子に置換または無置換のアミノ基が結合した構造を有する。以下、本発明の親水性炭素クラスターを、アミノ化炭素クラスターと称する場合がある。置換または無置換のアミノ基は-NR¹R

50

² で表され、ここで、 R^1 および R^2 は、それぞれ独立して、水素原子、ハロゲン、ヒドロキシル、 C_{1-6} アルキル、 C_{2-6} アルケニル、 C_{2-6} アルキニル、 C_{1-6} アルコキシ、 C_{1-6} アシル、アリール、ヘテロアリール、シクロアルキルから選択される。上記 C_{1-6} アルキル、 C_{2-6} アルケニル、 C_{2-6} アルキニル、 C_{1-6} アルコキシ、 C_{1-6} アシル、アリール、ヘテロアリールおよびシクロアルキルは置換されていてもよい。

本明細書において、 C_{1-6} アルキル、 C_{2-6} アルケニル、 C_{2-6} アルキニル、 C_{1-6} アルコキシおよび C_{1-6} アシルは、それぞれ記載の数の炭素原子を含んでいるアルキル基、アルケニル基、アルキニル基、アルコキシ基およびアシル基を意味し、直鎖状でも分岐状でもよい。

10

本明細書においてアリールは、5 ~ 20 個の炭素原子、好ましくは 6 ~ 14 個の炭素原子、さらに好ましくは 6 ~ 10 個の炭素原子を含んでいる芳香族の単環式または多環式炭化水素環基を意味する。アリールの例としては、特に制限されないが、フェニル、ナフチル、インデニル、アズレニル、フルオレニル、アントラセニル、フェナントレニル、テトラヒドロナフチル、インダニルおよびフェナントリジニルなどを挙げることができる。

本明細書においてヘテロアリールは、芳香族の単環式環基または多環式環基を意味し、ここで、該芳香族の単環式環基または多環式環基は、5 ~ 20 個の炭素原子、好ましくは 5 ~ 10 個の炭素原子を含み、その際、1 個以上の環炭素、好ましくは、1 ~ 4 個の環炭素が、それぞれ、酸素原子、窒素原子または硫黄原子などのヘテロ原子で置き換えられている。好ましいヘテロアリールには、5 ~ 6 員の単環式ヘテロアリールおよび 8 ~ 10 員の二環式ヘテロアリールが包含される。ヘテロアリールの例としては、特に制限されないが、イミダゾリル、キノリル、イソキノリル、インドリル、インダゾリル、ピリダジル、ピリジル、ピロリル、ピラゾリル、ピラジニル、キノキサリル、ピリミジニル、ピリダジニル、フリル、チエニル、トリアゾリル、チアゾリル、カルバゾリル、カルボリニル、テトラゾリル、ベンゾフラニル、オキサゾリル、ベンゾオキサゾリル、イソオキサゾリル、イソチアゾリル、チアジアゾリル、フラザニル、オキサジアゾリル、ベンゾイミダゾリル、ベンゾチエニル、キノリニル、ベンゾトリアゾリル、ベンゾチアゾリル、イソキノリニル、イソインドリル、アクリジニルおよびベンゾイソオキサゾリルなどを挙げることができる。

20

本明細書においてシクロアルキルは、3 ~ 20 個の炭素原子、好ましくは 3 ~ 12 個の炭素原子、さらに好ましくは 3 ~ 10 個の炭素原子を有する、単環式または多環式の非芳香族炭化水素環基を意味する。

30

R^1 および R^2 に関し、上記 C_{1-6} アルキル、 C_{2-6} アルケニル、 C_{2-6} アルキニル、 C_{1-6} アルコキシ、 C_{1-6} アシル、アリール、ヘテロアリールおよびシクロアルキルにおける置換基としては、ハロゲン、ヒドロキシル、ニトロ、アミノ、メルカプト、シアノ、イソシアナート、カルボキシル、 C_{1-6} アルキル、 C_{2-6} アルケニル、 C_{1-6} アルコキシ、シクロアルキル、シクロアルキルアルキル、アリール、ヘテロアリール、 C_{1-6} アルキルアミノ、 C_{1-6} アルキルチオ等が挙げられる。

本発明のアミノ化炭素クラスターにおいては、好ましくは R^1 および R^2 のいずれかが水素原子であり、より好ましくは双方が水素原子である。

40

炭素クラスターの炭素原子に置換または無置換アミノ基が結合した構造とは、炭素クラスターを構成する炭素原子に置換または無置換アミノ基が共有結合していることを意味する。

置換または無置換アミノ基は、炭素クラスターにおける反応性の高い部位に優先的に結合していると考えられる。5 員環や 7 員環等の、グラファイト中の 6 員環とは異質の局所的な結合構造が存在すると、有限の曲率が生まれるために、物質の幾何学的形状が変わるのみならず、新しい電子構造が生じ、反応性や反応速度が大きくなると考えられる。

カーボンナノチューブ表面は通常、6 員環のグラファイト構造で覆われているが、この 6 員環の中に 5 員環や 7 員環が混じるとチューブの径が狭くなったり、あるいは広がったりすることが知られている。円錐状のカーボンナノホーンは、ホーンの径が連続的に変化

50

するため、カーボンナノチューブに比べて表面のグラファイト構造が不規則となりやすく、アミノ基を付加しやすい。カーボンナノホーンの円錐の末端キャップ部分も反応性が高いことから、炭素クラスターがカーボンナノホーンである場合、置換または無置換アミノ基は、少なくともカーボンナノホーンの円錐の末端キャップに存在する炭素原子に結合していると考えられる。

本発明の親水性炭素クラスターに含まれる置換または無置換アミノ基の量は、Sangerの方法(Paquette, L. A. Eds. Wiley, Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis Vol. 4, pp 2556 - 2557, 1995)で測定した場合、通常 $0.1 \sim 0.3 \mu\text{mol/mg}$ 、好ましくは $0.21 \sim 0.27 \mu\text{mol/mg}$ である。これは、炭素クラスターの表面積で通常 $100 \sim 500 \text{ nm}^2$ 、好ましくは $200 \sim 400 \text{ nm}^2$ にアミノ基1個の密度に相当する。

10

本発明者らはまた、親水性炭素クラスターに含まれる置換または無置換アミノ基がニンヒドリンと反応することを見いだした。従って、親水性炭素クラスターに含まれる置換または無置換アミノ基は、ニンヒドリン呈色反応(Madeleine, M. J.; Tracy, R. T.; Norman, H. N. Tetrahedron. 1991, 47, 8791 - 8830)を用いて簡便に定量できる。通常のアミノ酸との反応と同様に、反応の初段階でアミノ基とニンヒドリンとの反応からイミンが生成する。アミノ化炭素クラスターの炭素骨格上にはアミノ基のほかに水素原子またはそこから平衡で生じる負電荷が存在すると考えられている。このためイミン部位をもつ炭素クラスターからは、炭素骨格上の負電荷からの反応によりイミン部位の脱離が進行することが可能となる。この反応により生じた2-イミノ-1,3-インダジオンがもう一分子のニンヒドリンと反応することでruhemann紫が生成する。

20

具体的には、アミノ化炭素クラスターをエタノール/ピペリジン混合溶媒中、ニンヒドリン水和物、フェノールおよびシアン化カリウムと混合し、反応後、炭素クラスター由来の化合物をメンブランろ紙(細孔径 $0.2 \mu\text{m}$)により除去すると、紫色の溶液が得られる。この溶液の紫外可視スペクトルにおける 570 nm の吸収の値からアミノ基を定量することができる。

本発明において親水性とは、本発明のアミノ化炭素クラスターが、水性溶媒に分散または溶解可能であることを意味する。本発明の親水性炭素クラスターは、 1 mg/mL 以上の濃度で水に分散させることができる。

30

本発明の親水性炭素クラスターは、親水性であるという性質を除き、置換または無置換アミノ基を導入する前の炭素クラスターの性質、例えば、三次元構造、凝集構造、機能等を維持している。

本発明の親水性炭素クラスターを水性溶媒に分散させることにより、炭素クラスター分散物が得られる。超音波処理を行うことにより、より効率的に分散させることができる。炭素クラスター分散物は、水性溶媒中に炭素クラスターが均一に分散しているものであればよく、炭素クラスターの水性溶液も包含される。本発明の炭素クラスター分散物は、通常 $0.001 \sim 2 \text{ mg/mL}$ の濃度、好ましくは $0.001 \sim 1 \text{ mg/mL}$ の濃度で炭素クラスターを含有する。水性溶媒は水を主成分とする溶媒であれば制限されず、水を通常 $50 \text{ 重量}\%$ 以上、好ましくは $70 \text{ 重量}\%$ 以上含有する。水性溶媒は、水に加えて、アルコール、ジメチルスルホキシド(DMSO)、テトラヒドロフラン(THF)、ジメチルホルムアミド(DMF)等を含んでいてもよい。

40

本発明の炭素クラスター分散物は、動的光散乱(DLS)で測定した場合、通常、平均粒径 $10 \sim 5000 \text{ nm}$ 、好ましくは $100 \sim 300 \text{ nm}$ 、より好ましくは $120 \sim 250 \text{ nm}$ の粒子を含有する。また、粒子は好ましくは球状の形を有する。本発明の炭素クラスター分散物は、粒子のサイズ分布が小さいという点で有利である。従って、標準粒子として好適に使用できる。粒径分布の範囲は、通常 $50 \sim 500 \text{ nm}$ 、好ましくは $90 \sim 160 \text{ nm}$ である。

本発明はまた、親水性炭素クラスターの製造方法に関する。本発明者らは、炭素クラス

50

ターに金属アミドを反応させることにより、炭素原子に置換または無置換アミノ基が結合してなる親水性炭素クラスターを製造できることを見出した。炭素クラスターと金属アミドは、通常、溶媒中で混合して反応させる。

金属アミドは、 NH -イオンの塩と考えることができ、好ましくはアルカリ金属アミドおよびアルカリ土類金属アミドを用いる。金属アミドは、 MNR^1R^2 または $\text{M}(\text{NR}^1\text{R}^2)_2$ で表される。ここで、 R^1 および R^2 は上記のとおりであり、好ましくは水素原子である。Mは、金属、好ましくはアルカリ金属（例えば、Li、NaまたはK）またはアルカリ土類金属（例えば、Be、MgまたはCa）を表す。アルカリ金属アミドとしては、好ましくは、ナトリウムアミド（ NaNH_2 ）、カリウムアミド（ KNH_2 ）、リチウムアミド（ LiNH_2 ）およびリチウムジエチルアミド（ $(\text{C}_2\text{H}_5)_2\text{NLi}$ ）などが挙げられる。アルカリ土類金属アミドとしては、好ましくは、マグネシウムアミド（ $\text{Mg}(\text{NH}_2)_2$ ）およびカルシウムアミド（ $\text{Ca}(\text{NH}_2)_2$ ）などが挙げられる。好ましくは、ナトリウムアミドを用いる。

反応溶媒は、炭素クラスターを分散可能なものであれば特に制限されないが、例えば、液体アンモニア、クロロベンゼン、ジメチルホルムアミドおよびジメチルスルホキシドなどが使用できる。沸点が低く反応後容易に除去できることから、液体アンモニアを溶媒として用いるのが好ましい。反応温度は、溶媒の沸点以下の温度であれば特に制限されないが、通常 -78 ~ 180 である。反応時間は、通常 1 ~ 6 時間、好ましくは 3 ~ 4 時間である。大量合成の場合は、通常 3 ~ 9 時間、より好ましくは 5 ~ 7 時間である。炭素クラスターと金属アミドとの混合比は、特に制限されないが、炭素クラスター 1 g に対し、金属アミドを、通常 1 ~ 5 g、より好ましくは 1 ~ 3 g 加える。大量合成する場合は、炭素クラスター 1 g に対し、金属アミドを、通常 2 ~ 6 g、より好ましくは 2 ~ 5 g 加える。得られた粗生成物は、当技術分野で通常用いられる方法により精製できる。

上記方法により得られたアミノ化炭素クラスターは、結合したアミノ基をさらに化学修飾することができる。そのようなアミノ基の化学修飾としては、アミド化、アルキル化、アリール化、アジ化、ジアゾ化などが挙げられる。

本発明のアミノ化炭素クラスターは、有機化合物の固相合成における固相担体に利用することができる。本発明の固相合成用担体は、好ましくは本発明のアミノ化炭素クラスターのアミノ基に固相合成用のリンカー分子が共有結合した構造を有する。本発明の固相合成用担体は、ポリペプチドおよびポリヌクレオチドなどの合成において行われるように、例えば、合成する有機化合物の構造単位を連続的に添加する固相合成において出発点として用いることが可能である。

本発明の固相合成用担体は、有機化合物として、ポリペプチドおよびポリヌクレオチドを固相合成するために好適に用いられる。また、コンビナトリアルケミストリーにおいて好適に用いられる。固相合成においては、合成する有機化合物、例えば、ポリペプチドおよびポリヌクレオチドの構造単位、例えばアミノ酸、ヌクレオシドおよびこれらの誘導体が連続的に結合される。

本明細書においてポリペプチドは、アミノ酸がペプチド結合を形成してできる化合物をさし、オリゴペプチドも包含される。ここでアミノ酸は、アミノ基とカルボキシル基の両方をもつ有機化合物であれば特に制限されないが、好ましくは α -アミノ酸である。ポリヌクレオチドにはオリゴヌクレオチドも包含され、核酸（DNAおよびRNA）およびその誘導体が包含される。核酸誘導体には、当技術分野で公知のものが包含され、リン酸部位の酸素原子を硫黄原子で置換したホスホロチオエート型、ホスホロジチオエート型、ホスホロジアミデート型、メチルホスホネート型、メチルホスホノチオエート型、フラノース環上の置換基修飾型、糖環骨格が1炭素増炭したピラノース型、多環式糖骨格型、ピリミジンC-5位修飾塩基型、プリンC-7位修飾塩基型および環拡張修飾塩基型の核酸、PNA、PRNAなど（ゲノムケミストリー、関根光雄・齋藤烈編、講談社サイエンティフィク、2003年；*Peptidenucleic acids*, 2nd ed. P. E. Nielsen 著, Horizon Bioscience, 2004年；WO 92/20702；WO 01/96355；WO 01/96356 など）が挙げられる

10

20

30

40

50

。

リンカー分子は、リンカーを形成するために共有結合を介して炭素クラスターに結合される分子を意味する。リンカー分子は炭素クラスターに結合される前の化学種をさし、リンカーは炭素クラスターに結合された後の化学種をさす。リンカー分子は、炭素クラスター上のアミノ基と共有結合を形成しうる反応性基またはその保護形態および有機分子を結合することが可能な反応性基またはその保護形態を含む。リンカー分子は、通常、炭素クラスター上のアミノ基と共有結合を形成しうる反応性基と有機分子を結合することが可能な反応性基とが二価の有機基で接続された構造を有する。

炭素クラスターのアミノ基と共有結合を形成しうる反応性基としては、例えば、ハロゲン（フッ素、塩素、臭素およびヨウ素）、カルボキシル基、ヒドロキシル基、活性エステル基、エポキシ基、アルデヒド基、カルボジイミド基、イミダゾール基、イソチオシアネート基、イソシアネート基などが挙げられる。

合成する有機化合物の構造単位を結合することが可能な反応性基は、結合する有機分子の種類により適宜決定される。有機化合物としてポリペプチドを合成する場合であって、その構造単位であるアミノ酸またはその保護形態（例えば、カルボキシル基またはアミノ基を保護したもの）をリンカーに結合する場合は、アミノ酸のカルボキシル基またはアミノ基と共有結合を形成しうる反応性基が好ましい。アミノ酸のカルボキシル基と共有結合を形成しうる反応性基としては、例えば、アミノ基、ヒドロキシル基、カルボキシル基、ハロゲン（フッ素、塩素、臭素およびヨウ素）などが挙げられる。アミノ酸のアミノ基と共有結合を形成しうる反応性基としては、カルボキシル基、活性エステル基、エポキシ基、アルデヒド基、カルボジイミド基、イミダゾール基、イソチオシアネート基、イソシアネート基などが挙げられる。有機化合物としてポリヌクレオチドを合成する場合であって、その構造単位であるヌクレオシドまたはその保護形態（例えば、塩基のアミノ基を保護したもの）をリンカーに結合する場合は、ヌクレオシドの3' - ヒドロキシル基と共有結合を形成する反応性基が好ましい。ヒドロキシル基と共有結合を形成しうる反応性基としては、例えば、カルボキシル基、アミノ基、ハロゲン（フッ素、塩素、臭素およびヨウ素）、エポキシ基、アルデヒド基、カルボジイミド基などが挙げられる。

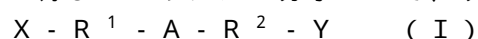
当業者であれば適当な保護基を選択することにより反応性基を保護形態とすることができる。各反応性基の保護基については、例えば、例えば、ハリソン・アンド・ハリソン（Harrison and Harrison）著、「有機合成法概論」（Compendium of Organic Synthetic Methods），124 - 131，John Wiley and Sons出版，1971を参照されたい。こうした保護基はリンカー上での反応中に除去される。

リンカー分子の2つの反応性基またはその保護形態を結合する二価の有機基は、目的の固相合成反応を妨げないものであれば特に制限されない。有機基は、例えば、二価の脂肪族基、二価の環式基、または脂肪族基と環式基の組み合わせである二価の炭化水素基（酸素、窒素、硫黄および珪素などを含んでもよい）である。脂肪族基には、アルキレン基、アルケニレン基およびアルキニレン基が包含される。環式基には、脂環式基、芳香族基およびヘテロ環式基が包含される。ここで脂環式基は、脂肪族基の特性に似た特性を有する環式炭化水素基をさし、芳香族基は、一核芳香族炭化水素基または多核芳香族炭化水素基をさし、ヘテロ環式基は、環中の原子の一個以上が炭素以外の元素（酸素、窒素、硫黄および珪素など）で置換された環式炭化水素基を意味する。

リンカー分子における二価の有機基は、好ましくは芳香環を含むものである。芳香環を含むことにより、固相合成後の有機化合物の担体から切り離しが容易になる。芳香環としては、ベンゼン環、フェナントレン環、フルオレン環、ナフタレン環、アントラセン環またはピレン環などが挙げられる。

リンカー分子は、炭素クラスターに結合されると、合成する有機化合物の構造単位を結合することが可能な反応性基またはその保護形態を有するリンカーとなる。

好ましいリンカー分子として、以下の式 I：



10

20

30

40

50

[式中、

Xは、炭素クラスターのアミノ基と共有結合を形成しうる反応性基またはその保護形態であり、好ましくはハロゲン、より好ましくはフッ素である。

R^1 は、直接結合または置換もしくは無置換の二価の脂肪族基、好ましくは置換もしくは無置換の C_{1-6} アルキレンまたは C_{2-6} アルケニレンであり、

Aは、置換または無置換の芳香環、好ましくは置換または無置換のフェニレン基であり、好ましくは1,4-フェニレン基であり、

R^2 は、直接結合または置換もしくは無置換の二価の脂肪族基、好ましくは置換もしくは無置換の C_{1-6} アルキレンまたは C_{2-6} アルケニレンであり、

Yは、合成する有機化合物の構造単位を結合することが可能な反応性基であり、ポリペプチドを合成する場合は、好ましくはヒドロキシル基またはその保護形態であり、ポリヌクレオチドを合成する場合は、好ましくはカルボキシル基またはその保護形態である] で表される分子が挙げられる。ヒドロキシル基の保護基としては、アセチル基、ベンジル基、シリル基、テトラヒドロピレニル基、メチル基、モノメトキシメチル基などが挙げられる。カルボキシル基の保護基としては、エステル、酸ハロゲン化物、酸無水物などのカルボン酸誘導体を形成し得る基が挙げられる。エステルを形成し得る基としては、アルコキシ基、アラルキルオキシ基、アリールオキシ基などが挙げられる。具体的には、ベンジルオキシ基、t-ブトキシ基などが挙げられる。

R^1 、Aおよび R^2 における置換基としては、例えば、フッ素、塩素、臭素およびヨウ素から選ばれるハロゲン、ヒドロキシル基、置換または無置換のアミノ基、ニトロ基、シアノ基、置換または無置換の C_{1-10} アルキル基、置換または無置換の C_{2-10} アルケニル基、置換または無置換の C_{5-10} シクロアルキル基、置換または無置換の C_{1-10} アルコキシ基、置換または無置換のアルコキシカルボニル基またはカルボキシル基等を挙げることができる。

Aで表される芳香環、好ましくはフェニレン基は、電子吸引性の置換基を有することが好ましい。電子吸引性の置換基としては、例えば、ニトロ基、ニトロソ基、カルボニル基、カルボキシル基、シアノ基、トリアルキルアンモニウム基、トリフルオロメチル基などが挙げられる。

また、リンカー分子として、固相合成において一般に用いられるベンジルアルコール官能基を与えるものを用いてもよい(例えば、Wangら, J. Amer. Chem. Soc., 95, 1328 (1973) および Rinkら, Tetrahedron Letters, 28, 3787 (1987))。

リンカー分子の具体例としては、さらに、2-(4-フルオロ-2-ニトロベンジルオキシ)テトラヒドロピラン、ポリエチレンオキシドをもつフルオロニトロベンゼン、コハク酸無水物などが挙げられる。

式(I)のリンカー分子が、アミノ化炭素クラスターのアミノ基と共有結合を形成すると、以下の式(II)



[式中、-NH-は炭素クラスターの炭素に結合し、 R^1 、A、 R^2 およびYは、式Iについて定義したとおりである]

で表されるリンカーが結合してなる固相合成用担体が得られる。固相合成を実施する前は、反応性基Yは通常保護された形態である。

固相合成における副反応を防ぐため、本発明のアミノ化炭素クラスターにリンカー分子を反応させた後、炭素クラスター上に残存する遊離のアミノ基は保護(カップリング)することが好ましい。アミノ基の保護基としては、特に制限されないが、例えば、アシル基、カルバメート基、トリアルキルシリル基、フタリル基、カルボキシアルキルカルボニル基、トシル基、トリフルオロアセチル基、トリチル基、ベンジルオキシカルボニル基、Fmoc(9-フルオレニルメトキシカルボニル)基、Boc(t-ブトキシカルボニル)基、ベンジルオキシカルボニル基、Npy(3-ニトロ-2-ピリジルスルフェニル)基およびp-メトキシベンジルオキシカルボニル基およびモノまたはジ置換トリチル基が

挙げられる。

本発明の有機化合物の固相合成法は、本発明の固相合成用担体を出発点として、合成する有機化合物の構造単位を順次反応させて結合させることを含む。

有機化合物としてポリペプチドを固相合成する場合の一実施形態を以下に説明する。まず、リンカーの反応性基（例えばヒドロキシル基またはアミノ基）が保護されている場合はそれを脱保護し、第一アミノ酸のカルボキシル基と共有結合させる。通常、アミノ酸のアミノ基は、Fmoc基などの保護基で保護されている。第一アミノ酸を結合した後、所望のポリペプチドを体系的に合成する。この合成は、脱保護と結合を繰り返し行うことにより実施する。最後に結合されたアミノ酸上の保護基は、N末端アミノ基を遊離させるために、適当な処理によって、例えば、Boc基の場合にはトリフルオロ酢酸を用いるような酸加水分解によって、またはFmoc基の場合にはピペリジンを用いるような塩基処理によって、定量的に除去する。最後に結合されたアミノ酸のN末端と次に結合するアミノ酸のC末端との結合は、いくつかの方法で行うことができる。例えば、例えば、ジシクロヘキシルカルボジイミド（Sheehanら, J. Am. Chem. Soc., 1955, 77, 1067）またはその誘導体、HATU、TBTU、HBTUなどの縮合試薬によって実施できる。

10

本発明の固相合成用担体に結合しているポリペプチドとアミノ酸との縮合反応は、カイザーテストによって確認できる。カイザーテストは、a) 5% ニンヒドリンのエタノール溶液、b) 80% フェノールのエタノール溶液、c) 0.2 mM シアン化カリのピリジン溶液を各々5滴ずつ加え、沸騰水中で5分間加熱することによって実施する。この操作で溶液が青色の場合は縮合反応を続行し、溶液が黄色になればアミノ基を脱保護して次のアミノ酸との縮合反応を行う。このサイクルを必要な回数繰り返すことにより、目的とする配列を有し、かつ所望の長さのポリペプチドを得ることができる。

20

ポリペプチドの最後の脱保護および担体からの切り離しは、無水HF（Sakakibaraら, Bull. Chem. Soc. Jpn., 1965, 38, 4921）などの強酸、トリフルオロ酢酸、トリス（トリフルオロ酢酸）ホウ素（Plessら, Helv. Chim. Acta, 1973, 46, 1609）、トリフルオロメタンスルホン酸およびメタンスルホン酸などのスルホン酸（Yajimaら, J. Chem. Soc., Chem. Comm., 1974, 107）、ならびに前記化合物とクレゾールの混合溶液を使用して行うことができる。

30

ポリヌクレオチドを固相合成する方法は当技術分野で周知であり、例えば、ホスホロアミダイト法、H-ホスホネート法、トリエステル法などの手法を利用することができる。固相合成の出発点として、アミノ化炭素クラスターにリンカー分子が共有結合してなる担体を用いることを除き、公知の手法に従って固相合成を実施すればよい。

ポリヌクレオチドを固相合成する場合の一実施形態としてホスホロアミダイト法による合成方法について以下に説明する。まず、種々の官能基を保護したヌクレオシド3'-ホスホロアミダイトと、リンカーを介して炭素クラスターに結合されたヌクレオシドを縮合させて、ヌクレオシドホスファイトトリエステル体を得る。次に未反応の5'-水酸基を保護した後、酸化してヌクレオシドホスフェートトリエステル体を得る。次いで、鎖伸長生成物の5'-水酸基の保護基を除去し、5'-水酸基保護体とする。以下、同様にして目的とする長さのヌクレオチド鎖を伸長した後、すべての保護基の除去および生成したポリヌクレオチドの担体からの切り離しを行う。核酸塩基部の保護基としてはベンゾイル基やイソブチリル基のようなアシル基を使用でき、インターヌクレオチド部の保護基としては2-シアノエチル基を使用できる。

40

アミノ化炭素クラスターは、汎用の固相担体と異なり物理的に強く、激しい攪拌操作が可能であることから、高い反応効率で固相合成反応を実施できる。さらに本発明者らは、溶媒への分散性の良いアミノ化炭素クラスターを固相合成用担体に利用することで、既存の樹脂製担体では実現不可能な分析が可能であることを見いだした。通常の樹脂製固相担体は、数百マイクロメートルの大きさであることから溶媒中に分散して自由運動することはない。このため、担体上の有機化合物を直接検出することは困難である。これまでに、

50

担体上のリンカー部位に柔軟なPEO鎖を導入することで担持された部位の運動性を確保し、NMRで検出する手法などが開発されているが、固体NMRを利用するものであり、その感度・分解能は溶液スペクトルとは比較にならない。本発明のアミノ化炭素クラスターは、溶液中に単粒子分散し巨大な分子として振る舞うことから、小分子の自由運動に近い運動性をもつことが推測される。本発明者らは、溶液¹H NMRスペクトルにより本発明の固相合成用担体上のアミノ酸部位が検出・同定できることを見いだした。これまで固相合成法で得られた反応生成物を解析するためには担体からの切り出しを行う必要があり、各反応段階での反応の成否の確認が煩雑であったが、本発明のアミノ化炭素クラスターを用いることにより反応生成物の切り出しを行うことなく各反応段階での反応の成否の確認を担体上で実施することが可能になる。

10

【実施例】

【0006】

実施例1 親水性アミノ化NH₂の合成

カーボンナノホーン凝集物(NHA)(200mg)およびナトリウムアミド(200mg)の液体アンモニア(320mL)中の混合物を、ドライアイス冷却器を付けたフラスコ中で3時間還流した(-33)。アンモニアを除去すると黒色の固体が得られた。粗物質をさらに飽和NH₄Cl水溶液(100mL)により洗浄し、濾過し、25、0.2mmHgで12時間乾燥して、アミノ化NH₂(205mg)の黒色の固体を得た(図1)。NHAは吸収性が高いので、アミノ化NH₂の正確な重量を算出するのは困難であった。反応は、1.00gのNHAの量まで容易にスケールアップすることができ、1.03gのアミノ化NH₂が得られた。

20

減衰全反射(ATR)装置を付けたASIR Applied Systems REACT IR1000により、未処理NHAおよびアミノ化NH₂のIRスペクトルを得た(図2)。IRスペクトルは、3220cm⁻¹に幅広い吸収を有し、これはNHA上にアミノ基が存在することを示している。

また、透過型電子顕微鏡(TEM; JEM2100F, JEOL)を用いてアミノ化NH₂の構造を分析した(図3A)。TEMによる分析により、カーボンナノホーンの円錐形の構造ならびにその凝集した構造が反応の前後で同じように存在していることが示された。

実施例2 アミノ化NH₂の分散液の調製および解析

30

アミノ化NH₂(1.00mg)を水(5.00mL)中で2分間音波処理(3.8kHz; US-3, As One Co.)すると灰色の透明な溶液が得られた(図3B中)。溶液中に視認できる粒子は存在せず、濾過しても膜(孔径0.2μm, Advantec)上に物質は付着しなかった。アミノ化NH₂の濃度はさらに1.0mg/mL以上まで上げることが可能であるが、溶液の色が濃くなりすぎて、視認できる粒子の存在を判定することができなくなった(図3B左)。反応により得られたすべての粗物質が水に溶解した。これは反応によりNHAが定量的に親水性の形に変換したことを示している。

溶液中の粒子のサイズを動的光散乱(DLS)(Zetasizer Nano ZS, Malvern)により分析した(図3C)。DLSの研究により、アミノ化NH₂の水溶液は平均サイズ134±5nmの粒子を含有することが示された。サイズの範囲は70nm~500nmであって、先のTEMの結果と一致した。

40

溶液をマイカ上に析出させ、粒子をさらにAFM(JSPM-4200, JEOL)により分析した(図3D)。AFMによる分析により、粒子は球状の形を有することが示され、よく単離された粒子の観察により、NHAが溶液中で単一の粒子として存在することが確認された。AFMによる固体粒子の高さ分析は、95nmのより小さい平均サイズを示した(図4)。これはAFMの条件下では水和層が除去されるためであると考えられる。

実施例3 Sangerの方法によるアミノ化NH₂上のアミノ基の定量

アミノ化NH₂におけるアミノ基の量を、Sangerの方法を用いて証明および定

50

量した (Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis Vol. 4, pp 2556 - 2557, Paquette, L. A. Eds. Wiley, 1995, Chichester)。すなわち、アミノ化NHA2のアミノ基を1-フルオロ-2,4-ジニトロベンゼンによりジニトロフェニルアミノ基に変換し、その量をUV-vis差スペクトルにより定量した。

アミノ化NHA2 (5.00 mg) を、 NaHCO_3 (0.10 M、100 μL) の塩基性水溶液およびエタノール (50 μL) 中で、60 で20分間、1-フルオロ-2,4-ジニトロベンゼン (1.00 mg) と混合した。反応混合物を濾過すると黒色の固体が得られた。上記黒色の固体をさらに水 (1.0 mL) およびエタノール (1.0 mL) により洗浄し、減圧乾燥してジニトロフェニルアミノ化NHA3 (5.28 mg) を得た (図1)。

10

ジニトロフェニルアミノ化NHA3 (1.00 mg) の水溶液の吸収スペクトルは、355 nmにジニトロフェニル基に相当するピークを有していた (図5B)。出発物質はいずれも355 nmに吸収を有しないことから、ナトリウムアミドとの反応によりNHAにアミノ基が導入されたことが立証された。また、報告されているジニトロフェニルアミノ基のモル吸収係数の値 ($16000 \sim 18000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) から、アミノ基の量は約0.22 $\mu\text{mol} / \text{mg}$ と算出された。NHAの表面積はあらかじめ308 m^2 / g であると算出されているので (Murata, K.; Kaneko, K.; Kokai, F.; Takahashi, K.; Yudasaka, M.; Iijima, S. Chem. Phys. Lett. 2000, 331, 14 - 20)、これは300 nm^2 の面積に1個のアミノ基が存在することを示している。

20

実施例4 カラムクロマトグラフィーによるアミノ化NHA2の分画

炭素粒子を標準化するために最も困難な問題の一つは、均一なサイズの粒子を得ることである。本発明者らは、分離のためのゲル浸透クロマトグラフィーを研究した結果、ポリアクリルアミドを基礎とするゲル (セファクリル (Sephacryl) 500 HR) が媒体として適していることが見出された。そこで、セファクリル500 HRのカラムによりアミノ化NHA2の水溶液を溶離した。

アミノ化NHA2 (0.20 mg/mL、0.50 mL) の水溶液をセファクリル500 HRのカラム (樹脂体積: 17 mL、カラム直径: 1 cm、カラム高さ: 22 cm) に流し、0.5 mL/分の流速で水により溶離した。UV検出器 (260 nmで検出、UV-2075、JASCO) を用いてクロマトグラムを得て (図6A)、溶離液を0.25 mLの分画として集めた。それぞれの分画の粒子のサイズをDLSにより分析した (図6B)。フラクションの260 nmのUV吸収により、流した粒子の92%がカラムから溶離したことが示された。

30

また、図6Bの典型的なデータに示されるように、粒子はサイズにより分画された。分画22、23、24および27における粒子の平均サイズは、それぞれ 198 ± 17 、 148 ± 1 、 134 ± 6 および $127 \pm 7 \text{ nm}$ であった。

異なる孔径を有するゲル (セファクリル100 HRまたは1000 SF) を用いた場合には、溶離した粒子の量が0%および1%に減少した (図7)。

実施例5 蛍光標識されたアミノ化NHA4の合成

40

アミノ化NHA2 (0.40 mg/mL、20 mL) の水溶液に、2-(2,7-ジフルオロ-6-ヒドロキシ-3-オキソ-3H-キサンテン-9-イル)-N-[5-(2,5-ジオキソピロリジン-1-イルオキシカルボニル)-ベンチル]-テレフタルアミド酸 (2.8 mg、オレゴングリーン488-X, Invitrogen) のメタノール (20 mL) 溶液を加え、混合物を室温で16時間攪拌した。反応混合物を濾過すると黒色の固体が得られた。上記黒色の固体を水 (20 mL) およびメタノール (20 mL) によりさらに洗浄し、減圧乾燥して蛍光標識されたアミノ化NHA4 (8.23 mg) を得た (図1)。アミノ化NHA4をUV-vis差スペクトルにより分析した (図5C)。発色団の吸収係数 ($84000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) から、オレゴングリーン488の量は0.017 $\mu\text{mol} / \text{mg}$ であると算出された。

50

同じ反応条件でアミノ化NH₂A₂をオレゴングリーン488のメチルエステルにより処理した場合には、得られたNH₂Aは蛍光染料の吸収および励起を示さなかった(図8)。この結果により、アミノ化NH₂A₄の蛍光は物理吸着された染料によるものではなく、共有結合した染料によるものであることが確認された。

実施例6 細胞毒性試験

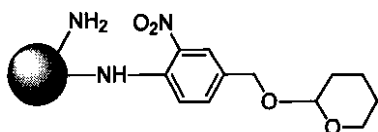
およそ 2×10^4 個の細胞を96穴のプレートを用いて10%の牛胎児血清と1%のペニシリンとストレプトマイシンを含む培地(Dulbecco's modified Eagle's medium)中、37℃、加湿条件下24時間培養した。0.05 mg/mLの割合でアミノ化NH₂A₂を含む新しい培地に交換した後48時間培養した。細胞を溶かした後遠心分離し、タンパク質分解酵素阻害剤とクマシーブリーアントブルーG-250を加え、595 nmの吸収からタンパク質を定量し(Bradford法)コントロール実験と比較することで毒性を算出した。

上記と同様の実験を石英粒子と二酸化チタン粒子とでおこなったところ、アミノ化NH₂A₂は石英粒子の10分の1程度の毒性を示したが、一般的に無毒とされる二酸化チタン粒子に比べると毒性を示した(図9)。本実施例により、構造特性が完全に明確となったナノチューブ粒子と既存粒子との毒性の比較が行われた。この実施例により本発明で調製される親水化炭素クラスターがナノチューブ粒子の標準物質として利用できることが示された。

実施例7 アミノ化カーボンナノホーン凝集物の大量合成

カーボンナノホーン凝集物(1.50 g)を液体アンモニア(2.4 L)へ分散させた後、ナトリウムアミド(3.00 g)を加えた。ドライアイスコンデンサーを取り付けたフラスコで-33℃、反応混合物を還流撹拌した。6時間撹拌した後、30℃の湯浴で穏やかに加熱することで1時間かけてアンモニアを留去し、黒色固体を得た。この粗生成物を飽和塩化アンモニウム水溶液(300 mL)に分散させ、親水性メンブレンフィルター(孔径0.2 μm)でろ別した後、ろ紙上に残った目的生成物を超純水(300 mL)で洗浄した。減圧下(0.2 mmHg)12時間室温で乾燥させ、アミノナノホーン凝集物を黒色固体として得た(1.52 g)。

実施例8 アミノナノホーン凝集物へのベンジルアルコール連結(リンカー)部の導入



(黒丸はカーボンナノホーンを示す)

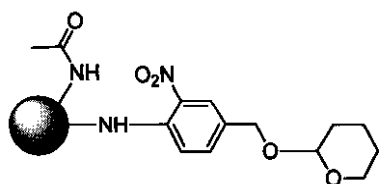
4-フルオロ-3-ニトロベンジルアルコール(1.00 g, 5.84 mmol)、3,4-ジヒドロ-2H-ピラン(0.690 mL, 7.60 mmol)、塩化アルミニウム六水和物(14.1 mg, 58.4 μmol)を60℃で撹拌し、4時間後室温下に戻した。反応混合物をそのままシリカゲルクロマトグラフィー(溶離液: 塩化メチレン)により精製した。減圧下(0.2 mmHg)12時間室温で乾燥させ、2-(4-フルオロ-3-ニトロベンジロキシ)テトラヒドロピランの薄い黄色い液体を得た(1.45 g, 97%)。IR(neat) 3070(w), 2944(m), 2871(m), 1622(m), 1593(m), 1538(s), 1349(s), 1254(m), 1201(m), 1123(s), 1079(m), 1036(m), 975(m), 906(m), 833(m), 818(m); ¹H NMR(500 MHz, CDCl₃) δ 1.56-1.68(m, 4H), 1.75-1.80(m, 2H), 1.85-1.89(m, 1H), 3.36-3.58(m, 1H), 3.85-3.89(m, 1H), 4.52-4.54(d, J = 13 Hz, 1H), 4.71-4.73(t, J = 3.4 Hz, 1H), 4.79-4.82(d, J = 13 Hz, 1H), 7.60-7.63(m, 1H), 8.1(dd, J = 2, 4 Hz, 1H); ¹³C NMR(125 MHz, CDCl₃) δ 19.2(CH₂), 25.3(CH₂), 30.4(CH₂), 62.3

(CH₂), 67.0 (CH₂), 98.3 (CH), 118.2 (CH), 124.8 (C), 134.3 (CH), 135.7 (CH), 153.7 (C-C1), 155.8 (C-NO₂); Anal Calcd for C₁₂H₁₄NO₄F: C, 25.07; H, 5.53; N, 5.49. Found: C, 56.27; H, 5.68; N, 5.31.

2 - (4 - フルオロ - 3 - ニトロベンジルオキシ) テトラヒドロピラン (13 mg, 5.5 mmol)、炭酸カリウム (750 mg, 5.5 mmol)、アミノナノホーン凝集物 (504 mg; アミノ基の量: 0.11 mmol) を DMF (25 mL) 中混合し、60 で 20 時間加熱攪拌した。反応混合物を親水性メンブレンフィルター (孔径 0.2 μm) でろ過した後、水 (10 mL × 3)、メタノール (10 mL × 3)、トルエン (10 mL × 3) で洗浄した。減圧下 (0.2 mmHg · 10 時間 · 室温)、さらに乾燥し、目的生成物を黒色固体として得た (510 mg)。

10

実施例 9 ベンジルアルコール連結 (リンカー) 部の導入後の残存アミノ基の保護

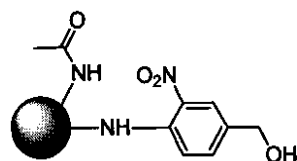


実施例 8 で合成したリンカー導入後のカーボンナノホーン (450 mg; アミノ基の量: 12 μmol) とジメチルアミノピリジン (2.0 mg, 17 μmol) を DMF (23 mL) 中混合し、この溶液へ無水酢酸 (57 μL, 0.61 mmol)、ジイソプロピルアミン (27 μL, 0.15 mmol)、HOBt (1 - ヒドロキシベンゾトリアゾール, 2.5 mg, 18 μmol) を加え、室温下 2 時間攪拌した。反応混合物を親水性メンブレンフィルター (孔径 0.2 μm) でろ過した後、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 (10 mL × 3)、DMF (10 mL × 3)、塩化メチレン (10 mL × 3)、メタノール (10 mL × 3) で洗浄した。減圧 (0.2 mmHg · 13 時間 · 室温) 下、さらに乾燥し、残存アミノ基をアセチル化したカーボンナノホーンを黒色固体として得た (451 mg)。

20

実施例 10 ベンジルアルコール連結 (リンカー) 部の T H P 保護基の除去

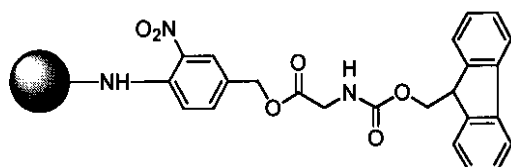
30



実施例 9 で合成したリンカー付きカーボンナノホーン (410 mg, THP の量: 76 μmol) と p - トルエンスルホン酸一水和物 (10 mg, 58 μmol) をメタノール (15 mL) 中混合し、40 で 4 時間加熱攪拌した。反応混合物を親水性メンブレンフィルター (孔径 0.2 μm) でろ過した後、DMF (10 mL × 3)、塩化メチレン (10 mL × 3)、メタノール (10 mL × 3) で洗浄した。減圧 (0.2 mmHg · 12 時間 · 室温) 下溶媒を留去し、目的生成物であるベンジルアルコール部位をもつカーボンナノホーンを黒色固体として得た (410 mg)。

40

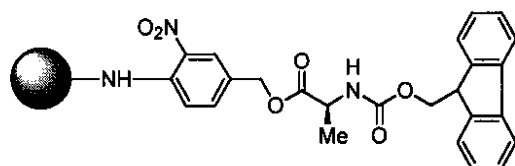
実施例 11 ベンジルアルコール部への Fmoc 保護グリシンの導入 (N - Fmoc - Gly - HMP - AN の合成)



この反応ではDMFはニンヒドリン存在下で蒸留したものを、溶媒中に残存するアミンを完全に除去した。N-Fmocグリシン(110mg, 0.36mmol)を塩化メチレン(3.0mL)、DMF(0.5mL)の混合溶媒中溶解し、DIC(N,N'-ジイソプロピルカルボジイミド, 28μL, 0.18mmol)を0℃で加え同じ温度で20分間攪拌した。溶媒を減圧留去した後得られた白色固体にDMF(2.5mL)を加え、再度溶解し、この溶液とベンジルアルコール部をもつカーボンナノホーン(52mg, ヒドロキシル基の量: 95μmol)を混合し、室温下3時間攪拌した。反応混合物を親水性メンブレンフィルター(孔径0.2μm)でろ過した後、DMF(10mL×3)、塩化メチレン(10mL×3)、メタノール(10mL×3)で洗浄した。減圧(0.2mmHg・12時間・室温)下、さらに乾燥し、Fmoc保護グリシンと結合したカーボンナノホーンを黒色固体として得た(50mg)。合成したFmoc保護グリシン・カーボンナノホーン複合体1.0mgを重DMF(0.5mL)中に分散し、¹H NMRを測定することでFmocグリシン部およびベンジルアルコールリンカー部の信号を検出、同定した(図10)。

¹H NMR(400MHz, DMF-d₇) δ 3.69(s, 1H), 3.89(m, 2H), 3.94(m, 1H), 7.10(d, J = 7.6Hz, 1H), 7.30-7.38(br m, 2H), 7.42-7.45(br m, 2H), 7.64(d, J = 7.6Hz, 1H), 7.70-7.75(br m, 1H), 7.78-7.93(br m, 1H)。

実施例12 ベンジルアルコール部へのFmoc保護アラニンの導入(N-Fmoc-Ala-HMP-ANの合成)

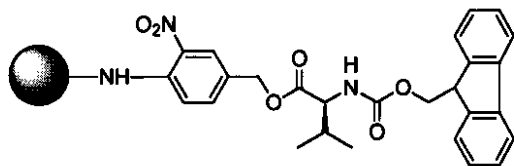


この反応ではDMFはニンヒドリン存在下で蒸留したものを、溶媒中に残存するアミンを完全に除去した。N-Fmoc-L-アラニン(110mg, 0.36mmol)を塩化メチレン(3.0mL)、DMF(0.5mL)の混合溶媒中溶解し、DIC(N,N'-ジイソプロピルカルボジイミド, 28μL, 0.18mmol)を0℃で加え同じ温度で20分間攪拌した。溶媒を減圧留去した後得られた白色固体にDMF(2.5mL)を加え、再度溶解し、この溶液とベンジルアルコール部をもつカーボンナノホーン(51mg, ヒドロキシル基の量: 95μmol)を混合し、室温下3時間攪拌した。反応混合物を親水性メンブレンフィルター(孔径0.2μm)でろ過した後、DMF(10mL×3)、塩化メチレン(10mL×3)、メタノール(10mL×3)で洗浄した。減圧(0.2mmHg・12時間・室温)下、さらに乾燥し、Fmoc保護グリシンと結合したカーボンナノホーンを黒色固体として得た(53mg)。合成したFmoc保護アラニン・カーボンナノホーン複合体1.0mgを重DMF(0.5mL)中に分散し、¹H NMRを測定することでFmocアラニン部およびベンジルアルコールリンカー部の信号を検出、同定した(図11)。

¹H NMR(400MHz, DMF-d₇) δ 1.05(d, J = 6.9Hz, 3H), 3.68(s, 1H), 4.11-4.12(m, 2H), 4.27(m, 1H), 7

. 10 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 7.34 - 7.38 (br m, 2H), 7.42 - 7.45 (br m, 2H), 7.64 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 7.76 (br m, 1H), 7.78 - 7.98 (br m, 1H).

実施例 13 ベンジルアルコール部への Fmoc 保護バリンの導入 (N-Fmoc-Val-HMP-AN の合成)



10

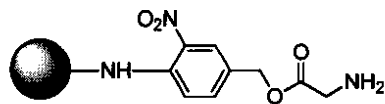
この反応では DMF はニンヒドリン存在下で蒸留したものを、溶媒中に残存するアミンを完全に除去した。N-Fmoc-L-バリン (120 mg, 0.36 mmol) を塩化メチレン (3.0 mL)、DMF (0.5 mL) の混合溶媒中溶解し、DIC (N,N'-ジイソプロピルカルボジイミド, 28 μ L, 0.18 mmol) を 0 で加え同じ温度で 20 分間攪拌した。溶媒を減圧留去した後得られた白色固体に DMF (2.5 mL) を加え、再度溶解し、この溶液とベンジルアルコール部をもつカーボンナノホーン (51 mg, ヒドロキシル基の量: 95 μ mol) を混合し、室温下 3 時間攪拌した。反応混合物を親水性メンブレンフィルター (孔径 0.2 μ m) でろ過した後、DMF (10 mL $\times$ 3)、塩化メチレン (10 mL $\times$ 3)、メタノール (10 mL $\times$ 3) で洗浄した。減圧 (0.2 mmHg $\cdot$ 12 時間 $\cdot$ 室温) 下、さらに乾燥し、Fmoc 保護グリシンと結合したカーボンナノホーンを黒色固体として得た (50 mg)。合成した Fmoc 保護バリン・カーボンナノホーン複合体 1.0 mg を重 DMF (0.5 mL) 中に分散し、 ^1H NMR を測定することで Fmoc バリン部およびベンジルアルコールリンカー部の信号を検出、同定した。

20

^1H NMR (400 MHz, DMF- d_7) δ 1.00 (d, J = 6.4 Hz, 6H), 2.25 (br m, 1H), 4.11 - 4.12 (m, 2H), 4.29 (m, 1H), 7.10 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 7.30 - 7.38 (br m, 2H), 7.42 - 7.45 (br m, 2H), 7.64 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 7.76 - 7.77 (br m, 1H), 7.78 - 7.98 (br m, 1H).

30

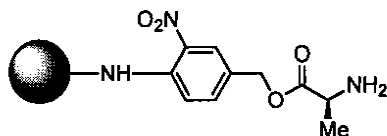
実施例 14 カーボンナノホーン上の Fmoc 保護グリシンからの保護基の除去



Fmoc 保護グリシンを連結したカーボンナノホーン (30 mg) を 50% ピペリジン / DMF (1.5 mL) へ分散させ室温下 1 時間攪拌した。この反応液を親水性メンブレンフィルター (孔径 0.2 μ m) でろ過した後、DMF (10 mL $\times$ 3)、塩化メチレン (10 mL $\times$ 3)、メタノール (10 mL $\times$ 3) で洗浄した。減圧 (0.2 mmHg $\cdot$ 室温 $\cdot$ 12 時間) 下、さらに乾燥し、Fmoc 保護基を除去したグリシン・カーボンナノホーン複合体を黒色固体として得た (30 mg)。ろ液中に得られた N-(9-フルオレニルメチル) ピペリジンは、濃縮後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (溶離液: 1:1 酢酸エチル / クロロホルム) により精製し白色固体として得た (1.5 mg, 5.7 mg)。

40

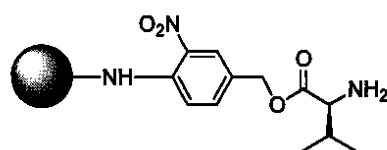
実施例 15 カーボンナノホーン上の Fmoc 保護アラニンからの保護基の除去



Fmoc 保護アラニンを連結したカーボンナノホーン (30 mg) を 50 % ピペリジン / DMF (1.5 mL) へ分散させ室温下 1 時間攪拌した。この反応液を親水性メンブレンフィルター (孔径 0.2 μm) でろ過した後、DMF (10 mL × 3)、塩化メチレン (10 mL × 3)、メタノール (10 mL × 3) で洗浄した。減圧 (0.2 mmHg・室温・12 時間) 下、さらに乾燥し、Fmoc 保護基を除去したアラニン・カーボンナノホーン複合体を黒色固体として得た (29 mg)。ろ液中に得られた N-(9-フルオレニルメチル) ピペリジンは、濃縮後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (溶離液: 1:1 酢酸エチル/クロロホルム) により精製し白色固体として得た (1.5 mg, 5.7 mg)。

10

実施例 16 カーボンナノホーン上の Fmoc 保護バリンからの保護基の除去



20

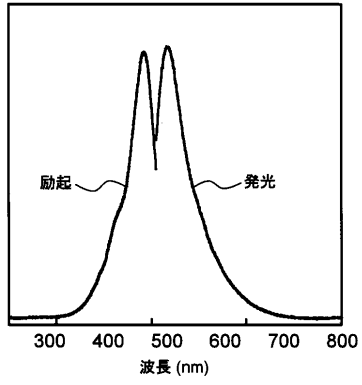
Fmoc 保護バリンを連結したカーボンナノホーン (30 mg) を 50 % ピペリジン / DMF (1.5 mL) へ分散させ室温下 1 時間攪拌した。この反応液を親水性メンブレンフィルター (孔径 0.2 μm) でろ過した後、DMF (10 mL × 3)、塩化メチレン (10 mL × 3)、メタノール (10 mL × 3) で洗浄した。減圧 (0.2 mmHg・室温・12 時間) 下、さらに乾燥し、Fmoc 保護基を除去したバリン・カーボンナノホーン複合体を黒色固体として得た (29 mg)。ろ液中に得られた N-(9-フルオレニルメチル) ピペリジンは、濃縮後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (溶離液: 1:1 酢酸エチル/クロロホルム) により精製し白色固体として得た (1.3 mg, 4.9 mg)。

30

本明細書中で引用した全ての刊行物、特許及び特許出願をそのまま参考として本明細書中にとり入れるものとする。

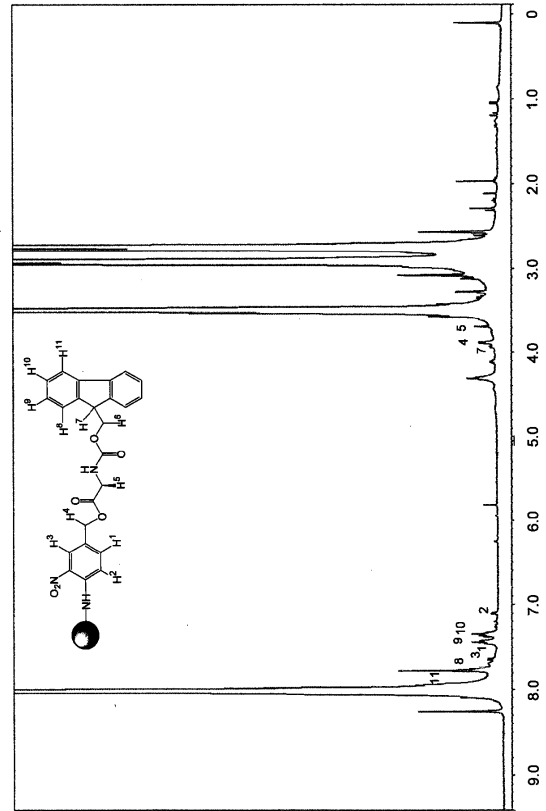
【図 8】

図 8



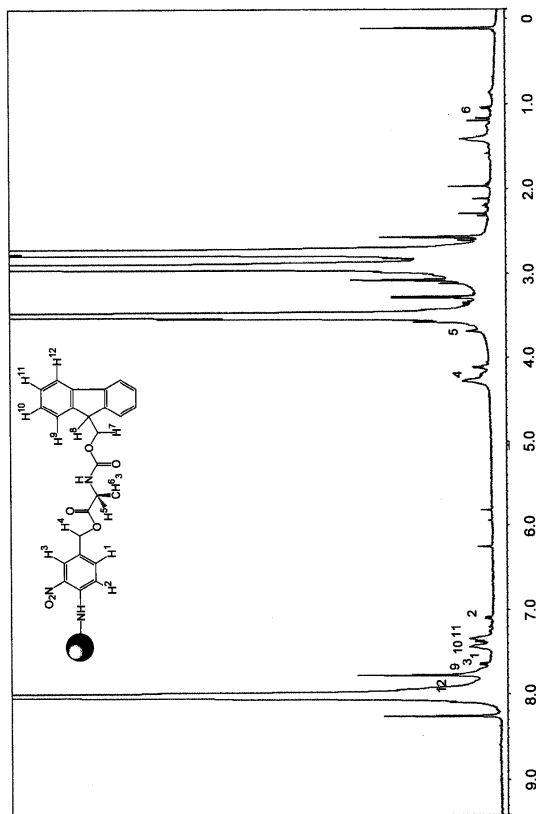
【図 10】

図 10



【図 11】

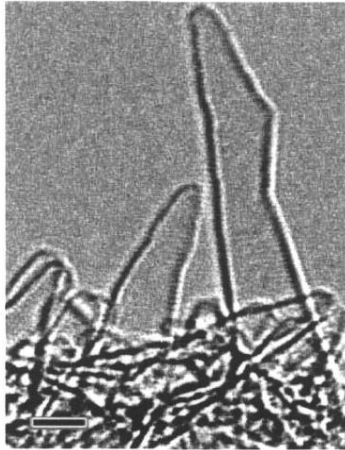
図 11



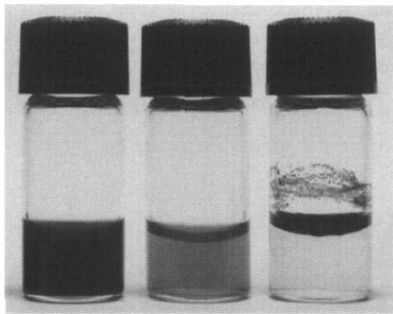
【図 3】

図 3

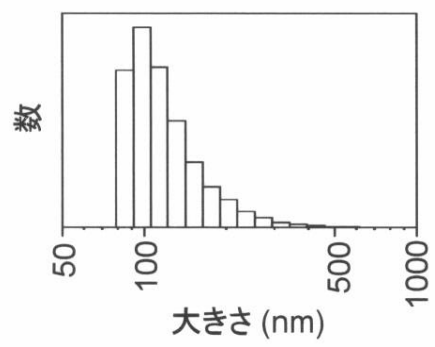
A



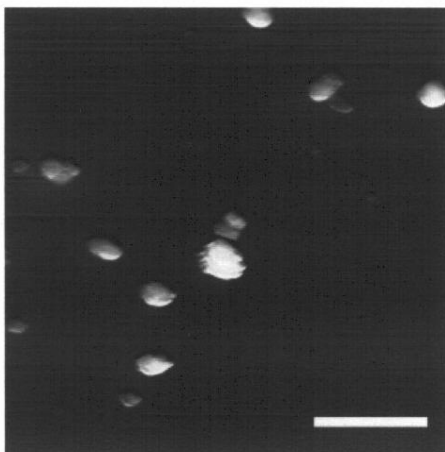
B



C

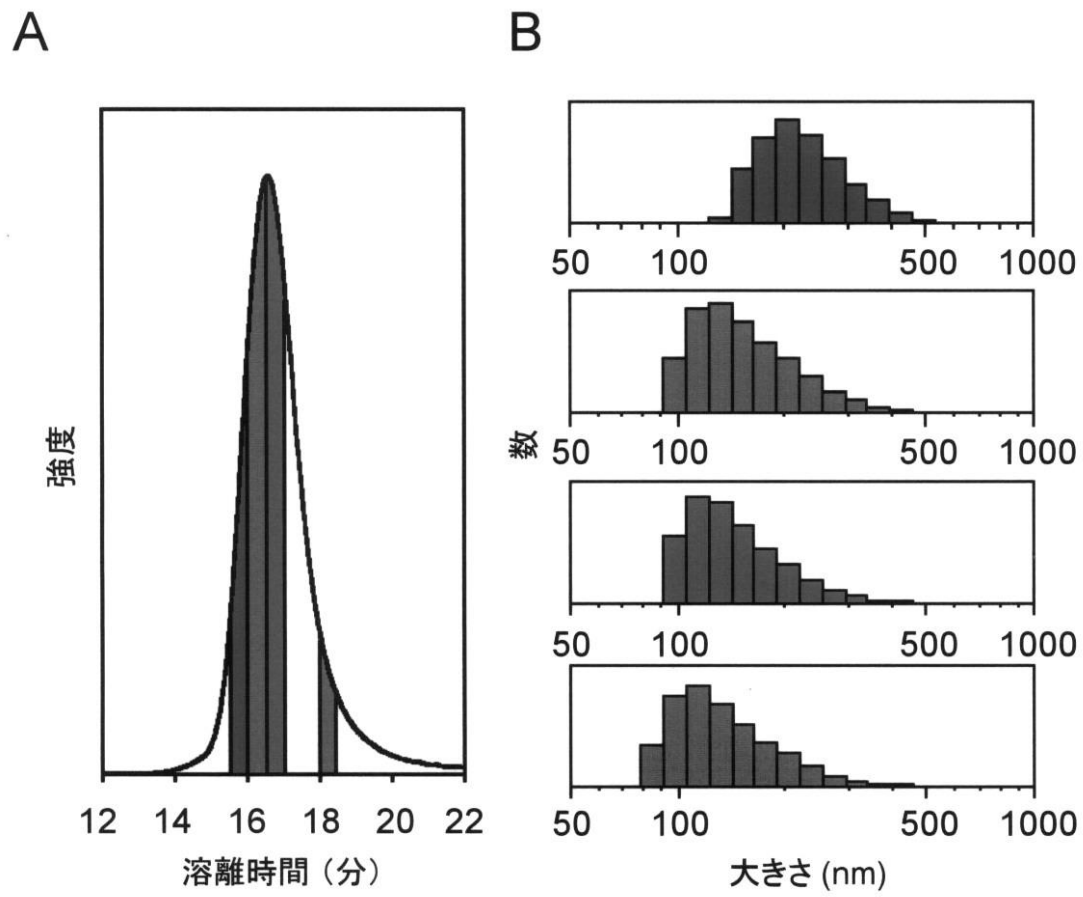


D



【図 6】

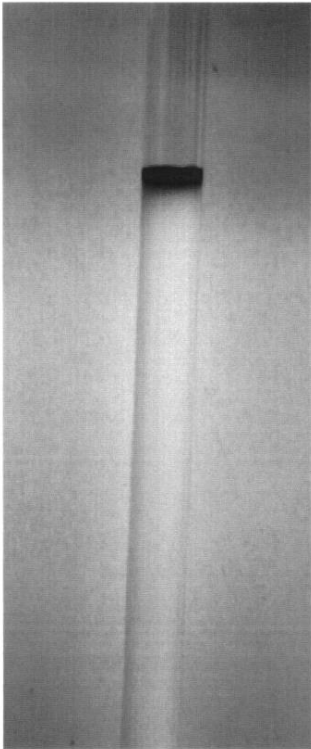
図 6



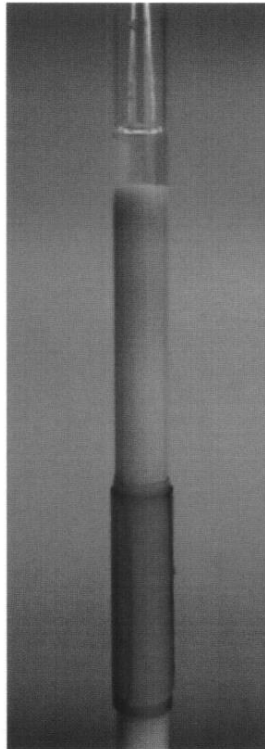
【図 7】

図 7

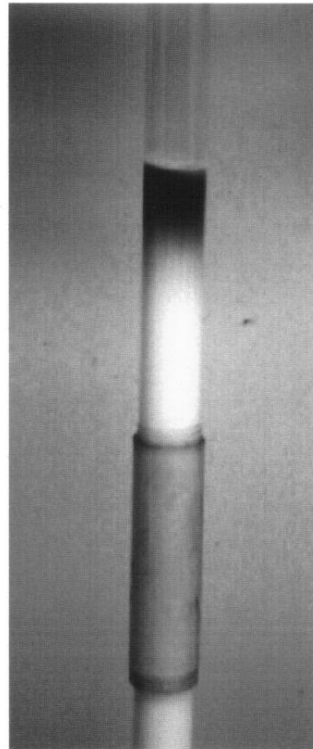
A



B

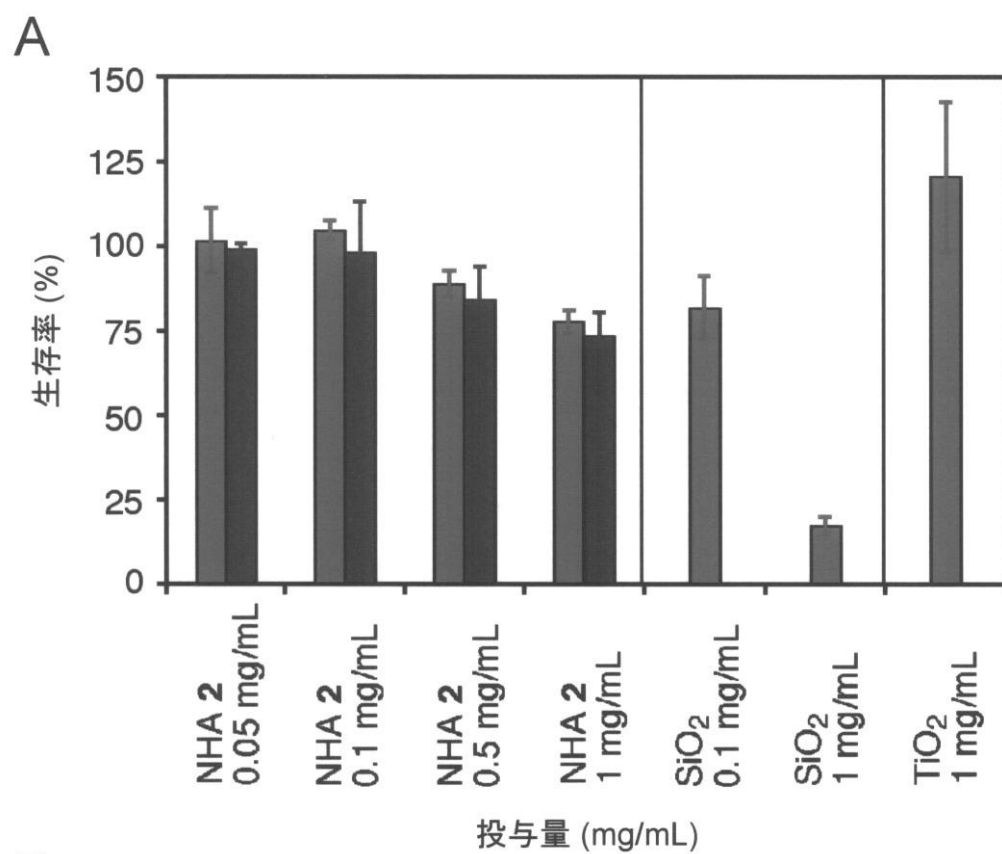


C

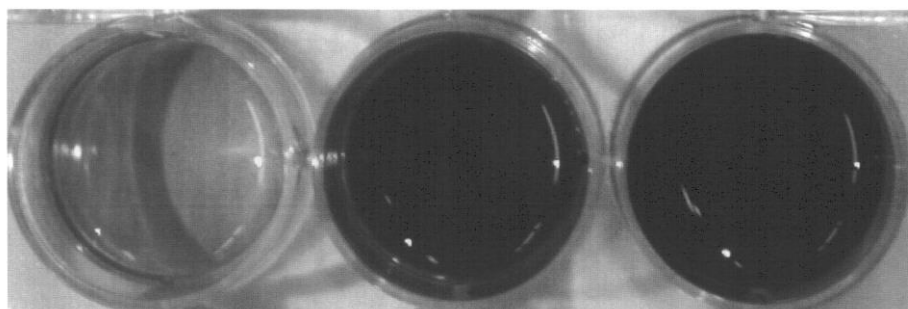


【図 9】

図 9



B



フロントページの続き

- (72)発明者 中村 栄一
東京都文京区本駒込 5 - 3 - 3 - 1 0 0 1
- (72)発明者 田中 隆嗣
東京都北区西ヶ原 1 - 1 - 1 0 - 2 0 1
- (72)発明者 高橋 祐介
東京都文京区白山 5 - 7 - 1 2 岡部ビル 7 0 3

審査官 吉田 直裕

- (56)参考文献 特開 2 0 0 2 - 0 8 8 0 7 5 (J P , A)
特表 2 0 0 2 - 5 4 0 2 3 1 (J P , A)
GROMOV ANDREI, et al., Covalent amino-functionalisation of single-wall carbon nanotubes
, J. Mater. Chem., 2 0 0 5 年 8 月 2 8 日, Vol.15, No.32, , Page.3334-3339
S.IIJIMA, et al., Nano-aggregates of single-walled graphitic carbon nano-horns, CHEM.P
HYS.LETT., 1 9 9 0 年, Vol.309, p.165-170

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

C01B 31/02
B82B 1/00
B82B 3/00
C07K 1/04
Science Direct
JSTPlus(JDreamII)