

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4030867号
(P4030867)

(45) 発行日 平成20年1月9日(2008.1.9)

(24) 登録日 平成19年10月26日(2007.10.26)

(51) Int. Cl.	F I
C O 7 C 271/16 (2006.01)	C O 7 C 271/16
C O 7 C 269/04 (2006.01)	C O 7 C 269/04
C O 7 C 269/06 (2006.01)	C O 7 C 269/06
G O 1 N 33/543 (2006.01)	G O 1 N 33/543 5 2 5 U

請求項の数 11 (全 29 頁)

(21) 出願番号	特願2002-525092 (P2002-525092)	(73) 特許権者	301042608
(86) (22) 出願日	平成13年9月5日(2001.9.5)		ポハン アイアン アンド スチール カ
(65) 公表番号	特表2004-508349 (P2004-508349A)		ンパニー リミテッド
(43) 公表日	平成16年3月18日(2004.3.18)		大韓民国 790-785 キュンサンブ
(86) 国際出願番号	PCT/KR2001/001501		クード ポハン-シ ナム-ク コエドン
(87) 国際公開番号	W02002/020469		-ドン 1
(87) 国際公開日	平成14年3月14日(2002.3.14)	(73) 特許権者	502169490
審査請求日	平成15年4月24日(2003.4.24)		ポハン ユニヴァーシティ オブ サイエ
(31) 優先権主張番号	2000/52504		ンス アンド テクノロジー
(32) 優先日	平成12年9月5日(2000.9.5)		大韓民国 キョサンブクードー 790-
(33) 優先権主張国	韓国 (KR)		784 ポハン-シ ナム-ク ヒョジャ
		(74) 代理人	100090033
			弁理士 荒船 博司

最終頁に続く

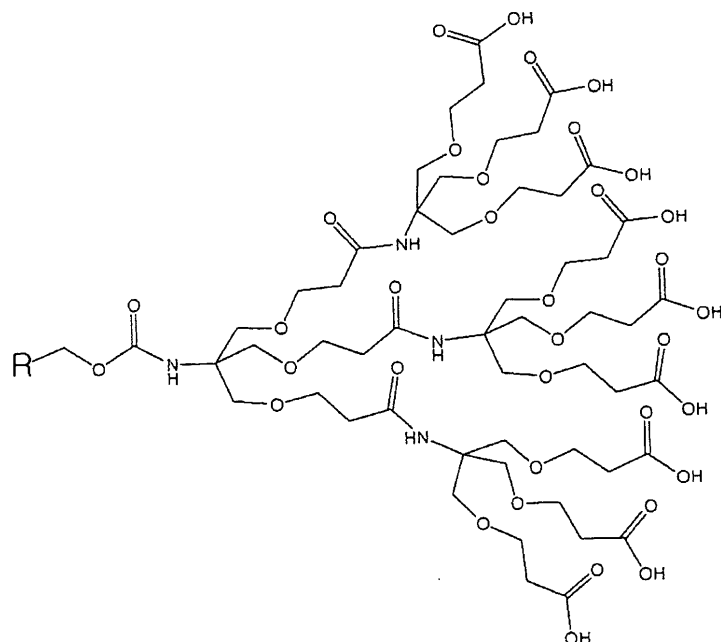
(54) 【発明の名称】 調節されたアミン基密度と空間を提供する分子層を表面に含む基質及びその製造方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

アミノシラン化された基質表面のアミン基と三角錐形態の下記の化学式(1)で表示されるカルボキシ酸を有する誘導体化合物を反応させて製造される分子層を表面に含む基質であって、

【化 7】



(1)

10

前記式で、Rはフェニルであるか、ニトロ基、ハロゲン、またはシアノ基に置換されたフェニル、ナフチル、またはアントリルである、基質。

20

【請求項 2】

前記基質表面のアミン基密度が 0.05 乃至 0.3 amines/nm² である、請求項 1 に記載の基質。

【請求項 3】

調節されたアミン基密度と空間を含有する分子層を表面に含む基質の製造方法において

a) アミノシランの分子層を表面に含む基質を提供する段階と、

b) 前記分子層に含まれているアミン基をカルボキシ酸を有する誘導体と反応させる段階と、を含む基質の製造方法。

30

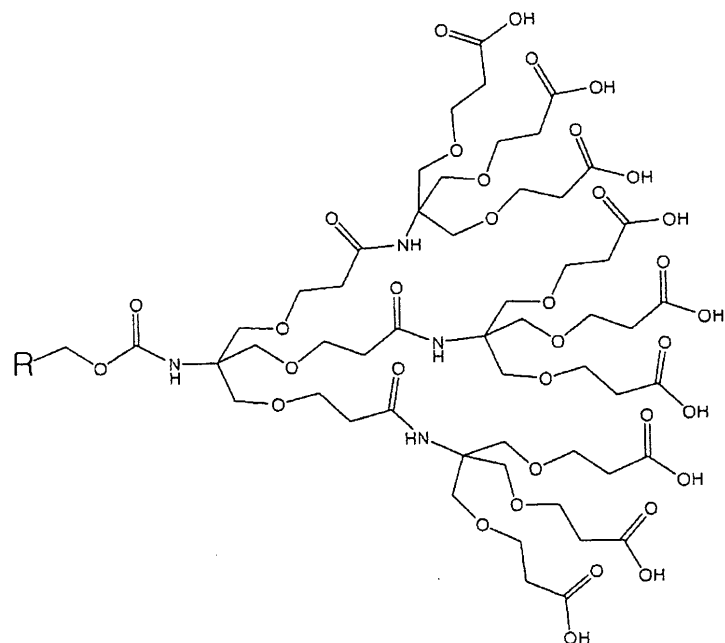
【請求項 4】

前記 b) 段階の誘導体が末端にカルボキシ酸及びアミン作用基を同時に含む、請求項 3 に記載の基質の製造方法。

【請求項 5】

前記 b) 段階の誘導体が下記の化学式 (1) で表示される化合物である、請求項 3 または 4 に記載の基質の製造方法であって、

【化 8】



(1)

10

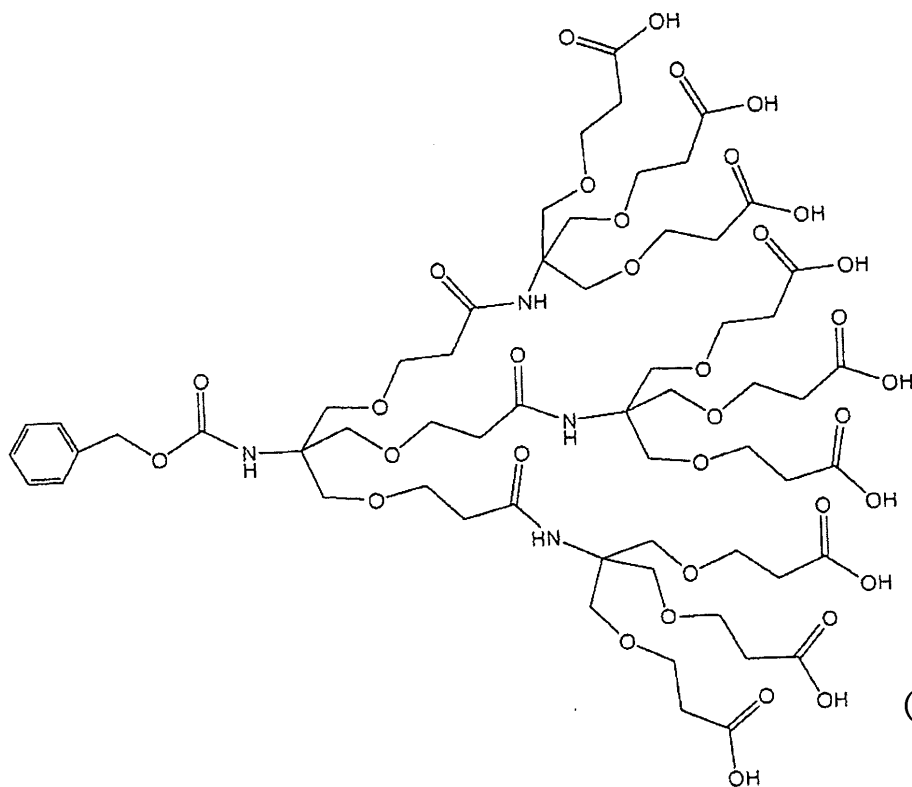
前記式で、Rはフェニルであるか、ニトロ基、ハロゲン、またはシアノ基に置換されたフェニル、ナフチル、またはアントリルである、基質の製造方法。

20

【請求項 6】

前記誘導体が下記の化学式(1a)で表示されるN-CBZ-[1]amine-[9]acid化合物である、請求項5に記載の基質の製造方法。

【化 9】



(1 a)

30

40

【請求項 7】

前記b)段階の反応は誘導体がイオン結合でアミノシラン化された基質表面に結合して薄膜を形成する、請求項3に記載の基質の製造方法。

50

【請求項 8】

前記 b) 段階の反応は不活性雰囲気下で実施される、請求項 3 に記載の基質の製造方法。

【請求項 9】

c) 前記反応済み基質の表面層にトリフルオロ酢酸を加えて誘導体を脱保護させる段階をさらに含む、請求項 3 に記載の基質の製造方法。

【請求項 10】

前記基質表面のアミン基密度が 0.05 乃至 0.3 amines/nm² である、請求項 3 に記載の基質の製造方法。

【請求項 11】

前記 a) の基質がシリコンウエハー、ガラス、シリカ、及び熔融シリカからなる群から選択される、請求項 3 に記載の基質の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明はバイオチップ等の基質として用いることができる低密度アミン基を含有する分子層を表面に含む基質に関し、特に低密度アミン基を含有する分子層を形成するための化合物及びその製造方法とその化合物を利用して製造される低密度アミン基を含有する分子層を表面に含む基質及びその製造方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

基質表面のシラン化、特にアミノシラン化は酵素、抗体のような生体分子の固定化、無機触媒の固定化、電極の改質、クロマトグラフィ及びイオン性高分子、非線形光学的発色団、フラーレン、ポルフィリン、遷移金属着物並びに無機コロイド性粒子を含有する様々な形態の分子の自己組織化用ビルディングファンデーション形成などの多くの分野に適用されている。

【0003】

基質表面に形成されたアミノシラン分子層の化学的物理的性質は非常に重要であるが、これは固定化されたり自己組織化される分子の形態及び表面密度に影響を与え、最終的に形成された機能性薄膜の構造及び性質を決定する因子であるためである。

【0004】

一方、現在まで知られたことによれば、固体支持体の表面にアミン基を形成する時のアミン基の個数は 100 当り 1 乃至 10 個である。表面にアミン基を有する固体基質は DNA チップやバイオチップを製造する基板として使用が可能である。しかし、表面に 100 当り 1 乃至 10 個のアミン密度を有する基質は表面に DNA オリゴヌクレオチドを付けたり効果が異なるバイオ分子を固定させる時、分子間の立体障害が大きいため良好に固定できない。また、DNA チップの場合には表面に固定された単一鎖 DNA の混成化が円滑に進められてチップの効率が高まるので、表面に固定させた単一鎖 DNA 間の距離が相当な間隔を維持しなければならない。

【0005】

このためにターロヴなど (Tarlov et al.) は表面反応に要求される自己組織化分子の濃度を低くすることによって密度を調節した研究結果を報告した (J. Am. Chem. Soc. 120, 9787(1998))。しかし、このような方法は表面の直接的な改質でない濃度による間接的な改質であり、作用基がある分子同士凝集する現象も起こることがあるため分布が不均一である。つまり、単一鎖 DNA 間の距離を均一に調節するのは難しいという短所がある。したがって、混成化効率と濃度の最適条件を探すことが重要である。また、一定の濃度以上の単一鎖 DNA の導入が難しいことが短所として指摘される。

【0006】

他の例として、オカハタなど (Okahata et al.) はビオチン (Biotin) とアビジン (Avidin) の結合を利用して表面に DNA を導入した (J. Am. Chem. Soc. 120, 8537(1998))。こ

10

20

30

40

50

れらはまず、QCM (Quartz Crystal Microbalance) 表面に金を蒸着した後、チオールとアビジンを作用基として有するスペーサ (隔離部材) を合成し、末端にビオチンを有する単一鎖DNAを導入した。この方法において、信号は混成化が進められることによって変わるQCMの周波数である。しかし、この方法も表面の直接的な構造調節でなく、間接的なビオチン - アビジンの結合を利用したものであり、QCMを利用するために多様な制約を伴うことが短所である。DNAだけでなく蛋白質の場合においても螺旋構造を構成するためには余裕空間が必要である。

【0007】

ホワイトセルなど (Whitesell et al.) はアミノトリチオール (aminotriethiol) を金の表面に単一層として積載しポリアラニン (polyalanine) が螺旋構造を構成できるようにした。また、ポリフェニル - アラニン (polyphenyl-alanine) の場合、単一層としては空間が不足で、螺旋構造を構成できないので二重に積層して余裕空間をさらにひろめて螺旋構造を構成するようにした (Scinece 261, 73(1993))。表面を直接変形して蛋白質を導入したこの方法はDNAの場合にも適用が可能であるように見えるが、蛋白質の二重螺旋よりDNAの二重螺旋がさらに大きい直径 (A型は25.5 Åであり、B型は23.7 Å) を有するのでここで利用したものよりもさらに大きなデンドリマーを表面に導入しなければならない。また、ここで利用したデンドリマーは硫黄が導入されていて金の表面にだけ適用できる限界がある。

【0008】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は前記従来の技術の問題点を考慮して、低密度のアミン基を含有する分子層を表面に含む基質を製造する時、有用な化合物及びその製造方法を提供することを目的とする。

【0009】

本発明の他の目的は、アミン基の密度が低くてもアミン基間の距離が一定になった分子層を表面に含む基質及びその製造方法を提供することにある。

【0010】

本発明の更に他の目的は、多重イオン結合により一層安定な形態の分子薄膜を基質表面に形成する方法を提供することにある。

【0011】

本発明の更に他の目的は、表面上にアミン基の密度が低くてもアミン基間の距離が一定になった分子層を表面に含有していて、基質表面に所望の分子を固定するのが容易な基質及びその製造方法を提供することにある。

【0012】

本発明の更に他の目的は、DNAチップやバイオチップを開発するのに有用であり、基質表面に所望の分子を固定し、これらの性質を明らかにする表面研究に使用できる基質及びその製造方法を提供することにある。

【0013】

【課題を解決するための手段】

本発明は前記目的を達成するために、下記の化学式 (1) で表示される化合物を提供する。

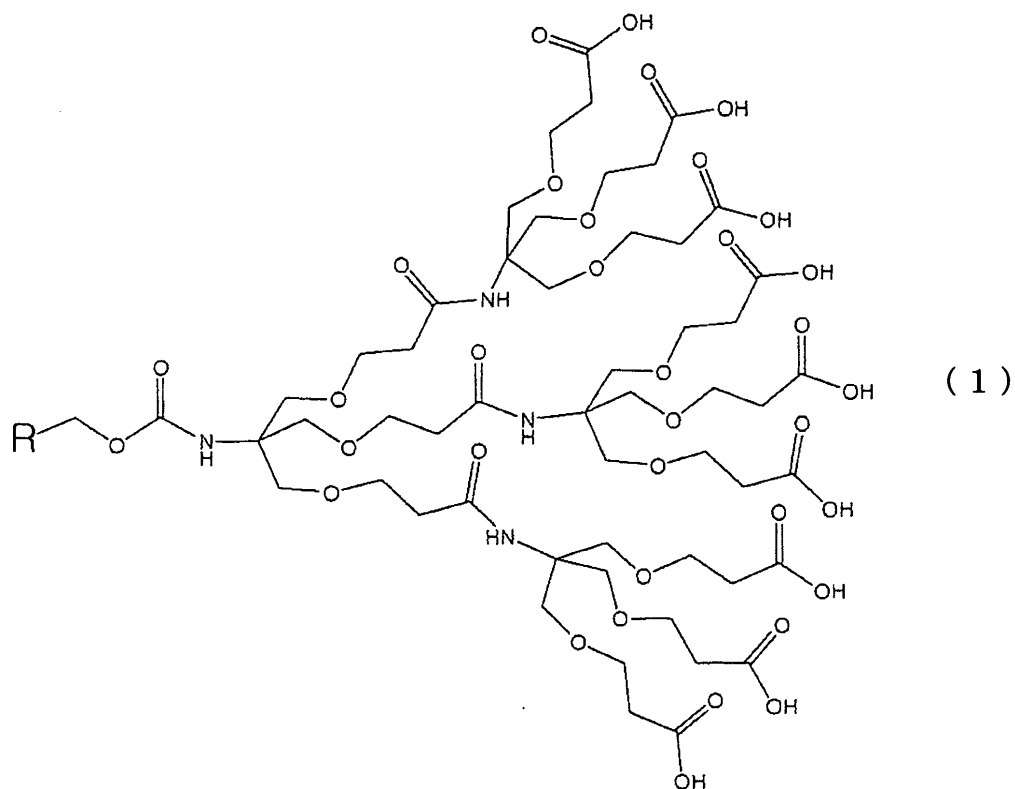
【化10】

10

20

30

40



前記式において、Rはフェニル (phenyl) であるか、ニトロ (nitro) 基、ハロゲン (halogen)、またはシアノ (cyano) 基に置換されたフェニル (phenyl)、ナフチル (naphthyl)、またはアントリル (anthryl) である。

【0014】

また、本発明は前記化学式 (1) で表示されるカルボキシ酸を有する誘導体の製造方法において、

- a) トリス (ヒドロキシメチル) アミノメタンとアクリロニトリルをシアノエチレーション反応させてトリス [(シアノエトキシ) メチル] アミノメタンを製造する段階と、
- b) 前記トリス [(シアノエトキシ) メチル] アミノメタンに濃い塩酸溶液を加え、還流させてトリス [(カルボキシエトキシ) エチル] メチル] アミノメタンを製造する段階と、
- c) 前記トリス [(カルボキシエトキシ) エチル] メチル] アミノメタンにメタノールの添加でエステル化反応させ、トリス [((メトキシカルボニル) エトキシ) メチル] アミノメタンを製造する段階と、
- d) 前記トリス [((メトキシカルボニル) エトキシ) メチル] アミノメタンに下記の化学式 (2) で表示される化合物を加えるプロテクティング (保護) 反応によって下記の化学式 (3) で表示される化合物を製造する段階



(前記式において、Rはフェニルであるか、ニトロ基、ハロゲン、またはシアノ基に置換されたフェニル、ナフチル、またはアントリル) と、

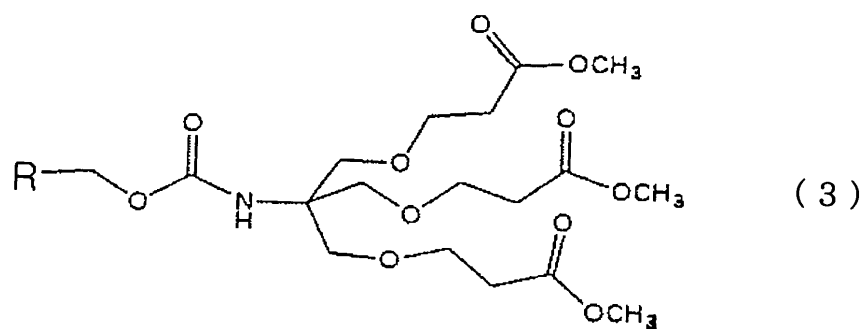
【化11】

10

20

30

40



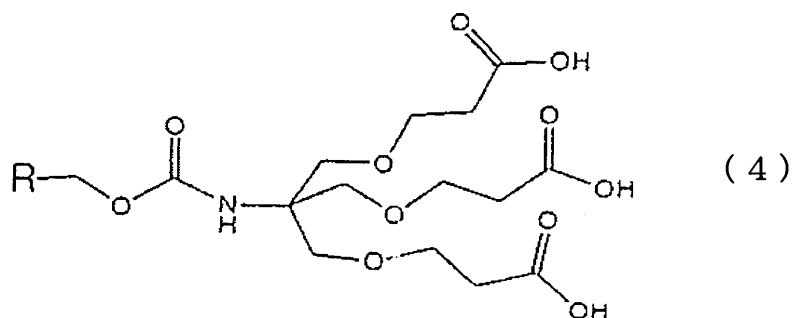
10

(前記式において、Rはフェニルであるか、ニトロ基、ハロゲン、またはシアノ基に置換されたフェニル、ナフチル、またはアントリル)

と、

e) 前記化学式(3)で表示される化合物に水酸化ナトリウム溶液を加え、加水分解させて下記の化学式(4)で表示される化合物を製造する段階

【化12】



20

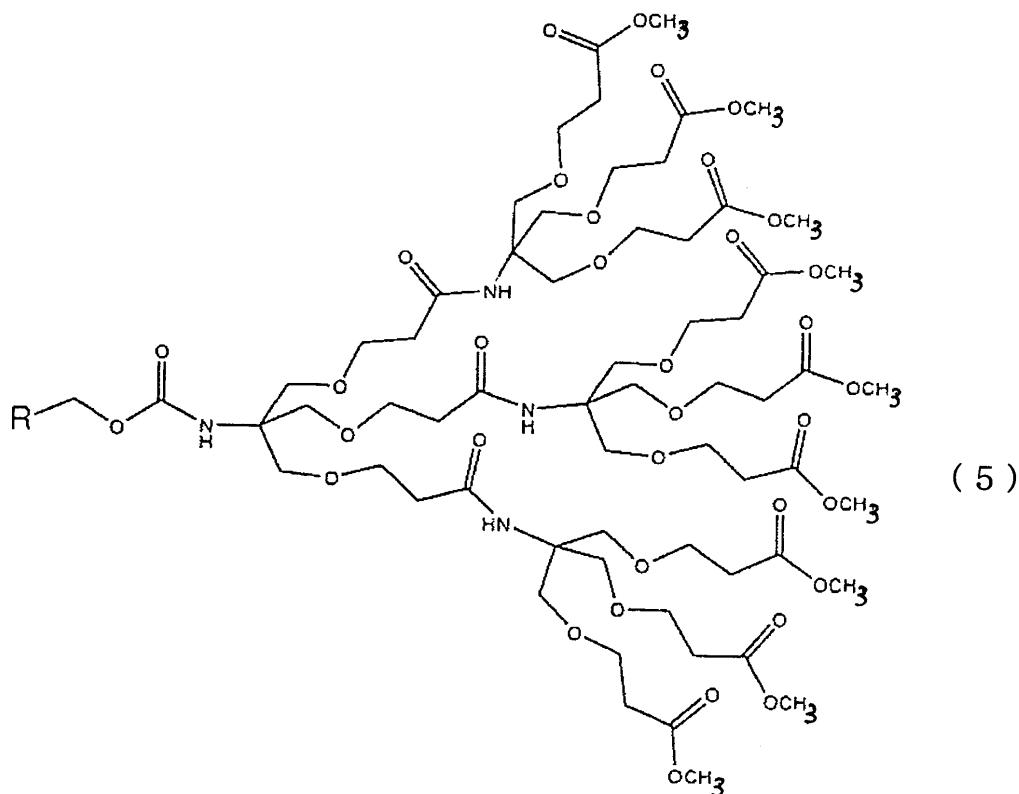
(前記式において、Rはフェニルであるか、ニトロ基、ハロゲン、またはシアノ基に置換されたフェニル、ナフチル、またはアントリル)

と、

f) 前記化学式(4)で表示される化合物とトリス[(メトキシカルボニル)エトキシ]メチル]アミノメタンをジメチルホルムアミド(DMF; dimethylformamide)に溶かし、ジシクロヘキシルカルボジイミド(DCC; dicyclohexylcarbodiimide)及びヒドロキシベンゾトリアゾール(HOBT; hydroxybenzotriazole)を添加し反応させ、下記の化学式(5)で表示される化合物を製造する段階

30

【化13】



(前記式において、Rはフェニルであるか、ニトロ基、ハロゲン、またはシアノ基に置換されたフェニル、ナフチル、またはアントリル)

と、

g) 前記化学式(5)で表示される化合物に水酸化ナトリウム溶液を加えて加水分解させ、前記化学式1で表示される化合物を製造する段階と、を含む化学式(1)で表示される化合物の製造方法を提供する。

【0015】

また、本発明はアミノシラン化された基質表面のアミン基と三角錐形態の前記化学式(1)で表示されるカルボキシ酸を有する誘導体化合物を反応させて製造される分子層を表面に含む基質を提供する。

【0016】

また、本発明は調節されたアミン基密度と空間を含有する分子層を表面に含む基質の製造方法において、

a) アミノシランの分子層を表面に含む基質を提供する段階と、

b) 前記分子層に含まれているアミン基をカルボキシ酸を有する誘導体と反応させる段階と、を含む基質の製造方法を提供する。

【0017】

また、前記b)段階の誘導体は末端にカルボキシ酸及びアミン作用基を同時に含むのが好ましく、前記誘導体が前記化学式(1)で表示される化合物がさらに好ましい。

【0018】

【発明の実施の形態】

本発明はアミン作用基間の距離が相当にあって、一定の分子層を基質上に形成される基質を提供するために、アミノシラン化された基質表面層のアミン基とカルボキシ酸を有する誘導体とを反応させて基質を製造する。特に、一定の間隔のアミン基を有する分子層の形成のために分子量が一定の前記化学式(1)の高分子誘導体を合成して使用するが、この高分子は1個のアミン基と9個のカルボキシ酸作用基を有する三角錐形態のハイパーブランチ分子である。言い換えれば、本発明はアミノシラン化された基質表面のアミン基と三角錐形態を有する高分子である化学式(1)の化合物を反応させて基質表面上にアミン基

の密度が低くてその距離が一定である分子層を形成できるようにしたものである。

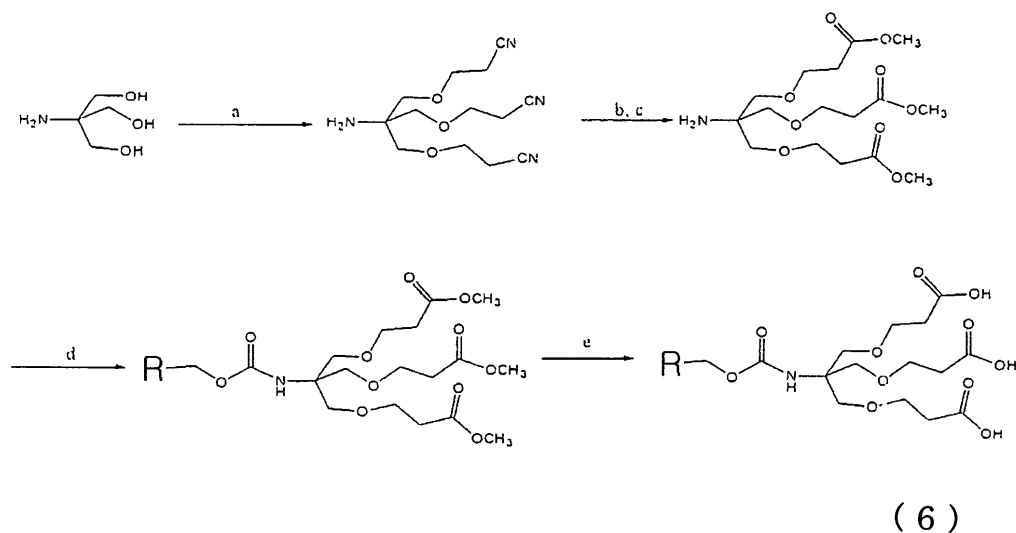
【 0 0 1 9 】

このために本発明は、前記化学式 (1) で示す化合物を製造する。合成される前記化学式 (1) の化合物のRはフェニル (phenyl) であるか、ニトロ基 (nitro)、ハロゲン (halo gen)、またはシアノ基 (cyano) に置換されたフェニル (phenyl)、ナフチル (naphthyl)、またはアントリル (anthryl) である。つまり、Rはベンゼン環のフェニルであるか、ベンゼン環の水素が各々、または同時に電子を惹きつける作用基に置換された2 - ニトロベンジル、3 - ニトロベンジル、4 - ニトロベンジル、2 - フルオロベンジル、3 - フルオロベンジル、4 - フルオロベンジル、2 - クロロベンジル、3 - クロロベンジル、4 - クロロベンジル、2 - 臭素ベンジル、3 - 臭素ベンジル、4 - 臭素ベンジル、2 - ヨードベンジル、3 - ヨードベンジル、4 - ヨードベンジル、2 - シアノベンジル、3 - シアノベンジル、4 - シアノベンジルなどであってもよく、ベンゼン環が変形された1 - ナフチル、2 - ナフチルまたは9 - アントリルなどであってもよい。

【 0 0 2 0 】

下記反応式 (6) 及び反応式 (7) は前記化学式 (1) の化合物を合成する方法を示す反応式である。

【 化 1 4 】



前記反応式 (6) において、

aは $\text{CH}_2=\text{CHCN}$ 、KOH、p-ジオキサンを加えて25 で48時間反応させることであり、

bは濃い塩酸を加えて3時間還流 (reflux) させることであり、

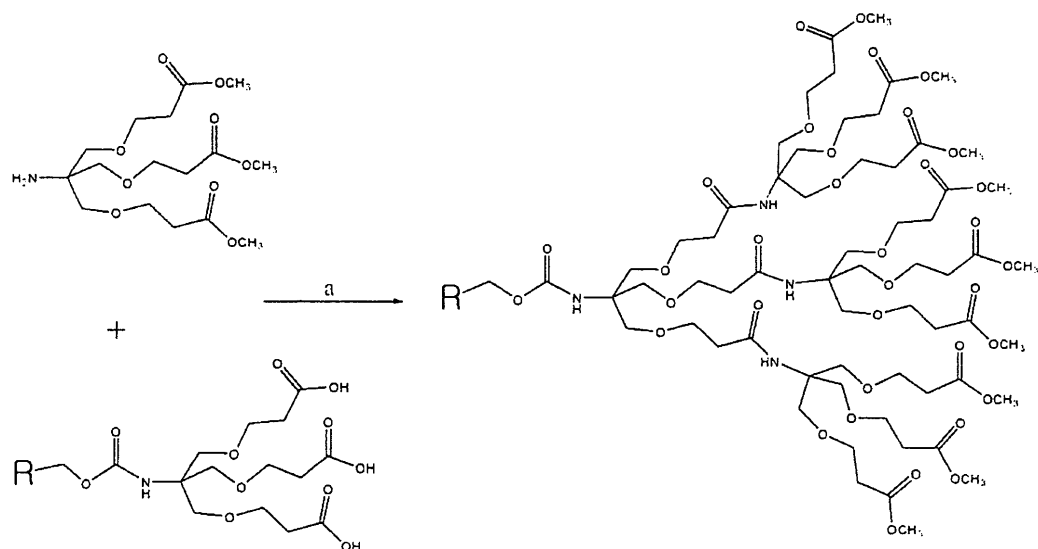
cはMeOHを加えて25 で24時間攪拌反応させることであり、

dは化学式 (2) の化合物、 NaHCO_3 、 H_2O を加え、25 で12時間反応させることであり、

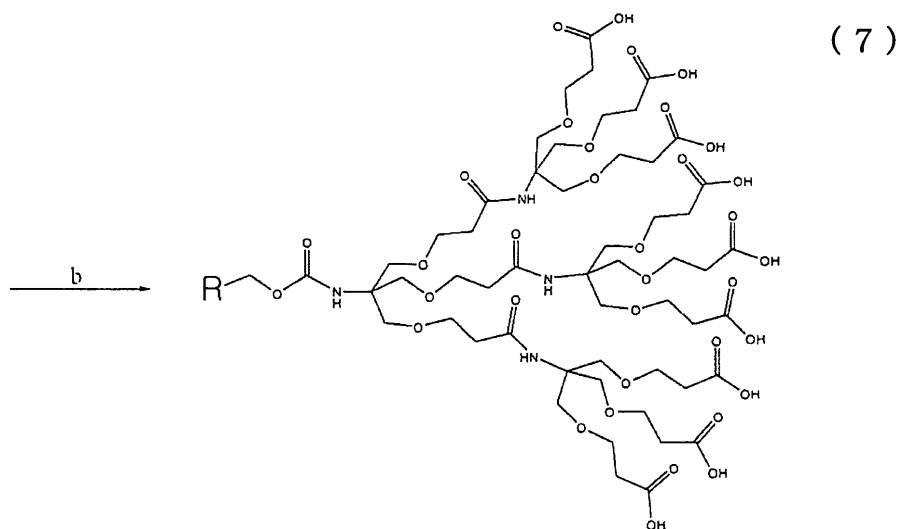
eは1N NaOHを加えて25 で12時間反応させることである。

【 0 0 2 1 】

【 化 1 5 】



10



20

30

【 0 0 2 2 】

前記反応式 (7) において、aはDCC、1 - ヒドロキシベンゾトリアゾール、及びDMFを加え、25 で48時間反応させることであり、bは1N NaOHを加えて25 で12時間反応させることである。

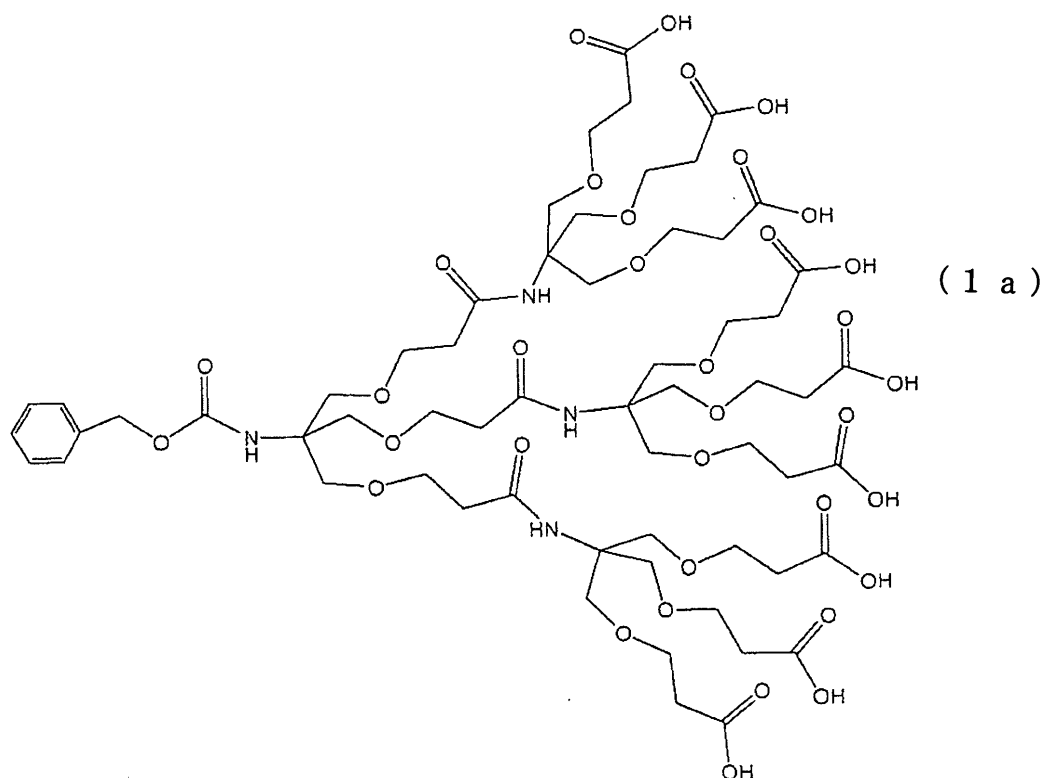
【 0 0 2 3 】

前記化学式 (1) の化合物の中で代表的な化学式 (1) のRがフェニルである下記の化学式 (1 a) で表示されるN-(ベンジルオキシカルボニル)-トリス[(N'-(カルボニル)-トリス[(カルボキシエトキシ)メチル]メチルアミノ)エトキシ)メチル]アミノメタン(以下、N-CBZ-[1]amine-[9]acid)である。

40

【 0 0 2 4 】

【 化 1 6 】



【 0 0 2 5 】

以下では、前記化学式 (1 a) で表示されるN-CBZ-[1]amine-[9]acid化合物を中心にして説明する。化学式 (1) の化合物の残りの化合物は化学式 (1 a) で表示されるN-CBZ-[1]amine-[9]acid化合物と原料選択にだけ差があって、同一な方法で製造することができ、その特性も基質表面上で同一な様相を示す。

【 0 0 2 6 】

本発明は基質表面に形成されるアミノシラン分子層のアミン基をN-CBZ-[1]amine-[9]acidのような構造を有する化学式 (1) で表示される化合物と反応させ、基質表面のアミン基密度を適切に減少させることができる。その中で、このようなN-CBZ-[1]amine-[9]acidは末端のアミン作用基がCBZ (carbobenzyloxy) で保護されている。

【 0 0 2 7 】

前記アミン作用基が保護されたN-CBZ-[1]amine-[9]acidは表面反応途中にアミン作用基が他の分子から損傷されず、また、合成過程に発生する副反応を最少化するための形態として考案された。CBZは脱保護が容易で、反応後、再び一次アミン作用基に戻すことができる。

【 0 0 2 8 】

前記化学式 (1 a) のN-CBZ-[1]amine-[9]acidを合成することにおいて最も重要な部分である反復単位 (repeating unit) は商業的に多く利用され、比較的値段が安いトリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン (tris (hydroxymethyl) aminomethane) を基本として合成する。言及していない化学式 (1) の残りの化合物を製造する時も同一である。

【 0 0 2 9 】

まず、ブルソン (Bruson) の方法を利用してトリス (ヒドロキシメチル) アミノメタンとアクリロニトリル (acrylonitrile) をシアノエチレーション (cyanoethylation) 反応させ、トリス [(シアノエトキシ) メチル] アミノメタンを合成する。合成に用いられるトリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン及び水酸化カリウムは吸湿性が強いので真空下で十分に乾燥させて反応に使用しなければならない。水酸化カリウムの量が反応において重要な部分である。水酸化カリウムは反応に使用したトリス (ヒドロキシメチル) アミノメタンの5乃至20重量%まで多様に用い、そのうち15重量%が最も適切である。水酸化カリ

10

20

30

40

50

ウムの量が多ければアクリロニトリルの高分子化が増加し、量が少なければシアノエチレーション反応が進められない。反応が完了した後、 ^{13}C NMRの118.5 ppmで確認した結果、ニトリルの特徴的なピークが現れ、これはニューコム (Newcome) などが合成した化合物のスペクトルと一致した。

【0030】

合成されたトリス[(シアノエトキシ)メチル]アミノメタンは有機溶媒によく溶けるのでコラムクロマトグラフィで分離してもよいが、他の分離過程無しに濃い塩酸溶液で3時間程度還流させれば、トリス[(カルボキシエトキシ)メチル]アミノメタンが得られる。ニトリル作用基がカルボキシ酸に変わりながら副産物として塩化アンモニウムが塩の形態で多量に得られる。アセトンに溶かして塩化アンモニウム塩をろ過した後、減圧蒸留してから、 ^{13}C NMRの118.5 ppmで確認した結果、ニトリルの特徴的なピークがなくなり、その代りにカルボキシ酸の176.2 ppmのピークが得られる。前記化合物トリス[(カルボキシエトキシ)メチル]アミノメタンを保護するために各種の保護試薬を試みしたが、末端のカルボキシ酸がアミン作用基と水素結合して反応が進められなかった。したがって、末端のカルボキシ酸もやはり保護する過程が要求される。

10

【0031】

合成されたトリス[(カルボキシエトキシ)メチル]アミノメタンは酸性を帯びる油状の化合物であり、メタノールを添加するとエステル化反応が進行する。この方法によれば非常に簡単にトリス[(メトキシカルボニル)エトキシ]メチル]アミノメタンが合成され、末端のカルボキシ酸が保護される。ニューコム等はこのような面倒なことをなくすためにトリス[(メトキシカルボニル)エトキシ]メチル]アミノメタンをエタノールに入れて塩酸ガスを注入する方法を利用したが、収率が低く、塩酸ガスを使用するので主義を要する反応であった。これに反し、エステル化反応を利用した本発明の方法はガスを使用せずに塩酸溶液を利用するのでニューコムなどの方法より一層簡単で安全であり、収率も遥かに高かった。トリス[(メトキシカルボニル)エトキシ]メチル]アミノメタンは ^{13}C NMRでエステルとメトキシ基に起因した各々176.2 ppm、51.6 ppmのピークが確認される。

20

【0032】

デンドリマー製造のための反復単位はトリス[(メトキシカルボニル)エトキシ]メチル]アミノメタンが利用され、コア単位はトリス[(メトキシカルボニル)エトキシ]メチル]アミノメタンを保護して使用する。アミンを保護するためにジ-t-ブチルジカーボネートとクロロ蟻酸ベンジルを使用した。2種類の試薬とも保護過程は容易に進められた。しかし、ジ-t-ブチルジカーボネートを利用したBOC (t-butoxycarbonyl) 基の場合、エステルをカルボキシ酸に変える過程で問題が発生することがある。

30

【0033】

反応が完結された後、合成されたN-(BOC)-トリス[(カルボキシエトキシ)メチル]アミノメタンを分離する過程で使用する希塩酸溶液でBOC基が壊れ、再びトリス[(カルボキシエトキシ)メチル]アミノメタンの形態に戻ってしまう。加水分解を防止するために塩酸を使用せずに水溶液状態でそのままDCC (Dicyclohexylcarbodiimide) を利用してカップリングさせてみたが、反応が全く進められなかったため、BOCに関連した問題点を解決することができなかった。収率が低い理由としてはDCCなどを利用するペプチド結合形成が水溶液では典型的に非常に低い収率を示す反応であるためと推測される。

40

【0034】

クロロ蟻酸ベンジルを利用するCBZはワークアップする時に用いられる塩酸に対して非常に安定で、反応が終わった後、N-(ベンジロキシカルボニル)-トリス[(カルボキシエトキシ)メチル]アミノメタンを有機層として分離するのが容易である。N-(ベンジロキシカルボニル)-トリス[(カルボキシエトキシ)メチル]アミノメタンは ^{13}C NMRでCBZに起因した128.7 ppm、128.2 ppm、及びカーバメート (carbamate) に起因した155.2 ppmなどのピークを示した。

【0035】

50

N-CBZ-[1]amine-[9]acidの合成で最も低い収率(33.3%)を示したカップリングは4.5当量のトリス[(メトキシカルボニル)エトキシ]メチル]アミノメタンとN-(ベンジルオキシカルボニル)-トリス[(カルボキシエトキシ)メチル]アミノメタンをDMF(N,N-dimethylformamide)に溶かした後、各々3当量のDCC、HOBTなどを添加して48時間程度攪拌すればよい。反応が進められればDMFに溶けないジシクロヘキシル尿素が発生する。

【0036】

このように合成されたN-(ベンジルオキシカルボニル)-トリス[(N'-(カルボニル)-トリス[(メトキシカルボニル)エトキシ]メチル)メチルアミノ)エトキシ]メチル]アミノメタンは¹³C NMRでエステルとアミドに起因した172.3 ppm、171.3 ppmの特徴的なピークを観察することができた。また、これらのサイズ比が1:3程度に現れた。そして、質量分析スペクトル(FAB)の結果は分子量が1556(M⁺+1)である所でN-(ベンジルオキシカルボニル)-トリス[(N'-(カルボニル)-トリス[(メトキシカルボニル)エトキシ]メチル)メチルアミノ)エトキシ]メチル]アミノメタンが合成された証拠となった。

【0037】

N-(ベンジルオキシカルボニル)-トリス[(N'-(カルボニル)-トリス[(メトキシカルボニル)エトキシ]メチル)メチルアミノ)エトキシ]メチル]アミノメタンを1NのNaOH溶液で加水分解すれば、末端がカルボキシ酸になるN-(ベンジルオキシカルボニル)-トリス[(N'-(カルボニル)-トリス[(カルボキシエトキシ)メチル)メチルアミノ)エトキシ]メチル]アミノメタンが得られる。N-(ベンジルオキシカルボニル)-トリス[(N'-(カルボニル)-トリス[(カルボキシエトキシ)メチル)メチルアミノ)エトキシ]メチル]アミノメタンの質量分析スペクトル結果、1429(M⁺)である所でピークが観察され、反応が進められたことが分かった。以外にも前記化合物の赤外線分光法と元素分析による結果を表1乃至6に示した。

【0038】

【表1】

トリス[(シアノエトキシ)メチル]アミノメタン	¹ H NMR(CDCl ₃)
	δ3.68(t, CH ₂ CH ₂ C N, 6), 3.42(s, CH ₂ OCH ₂ CH ₂ , 6H), 2.63(t, CH ₂ OCH ₂ CH ₂ , 6H), 1.83(s, H ₂ N, 2H).
	¹³ C NMR(CDCl ₃)
	δ118.5(CH ₂ CH ₂ C N), 72.7(CH ₂ OCH ₂ CH ₂), 66.1(CH ₂ OCH ₂ CH ₂), 56.4(H ₂ NC(CH ₂) ₃), 19.1(CH ₂ CH ₂ C N).

【0039】

【表2】

<p>トリス[((メトキシカルボニル) エトキシ) メチル] アミノメタン</p>	<p>^1H NMR(CDCl_3)</p> <p>δ3.72-3.68(m, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOCH}_3$, 15H), 3.34(s, $\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2$, 6H), 2.58(t, $\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2$, 6H), 1.83(s, H_2N, 2H).</p> <p>^{13}C NMR(CDCl_3)</p> <p>δ172.1($\text{CH}_2\text{COOCH}_3$), 72.6($\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2$), 66.8($\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2$), 56.0($\text{H}_2\text{NC}(\text{CH}_2-)_3$), 51.6($\text{CH}_2\text{COOCH}_3$), 34.8($\text{CH}_2\text{COOCH}_3$).</p> <p>IR($\text{CHCl}_3$)</p> <p>3376, 2953, 2871, 1740, 1587, 1438, 1361, 1265, 1197, 1112, 1074, 1023 cm^{-1}.</p> <p>Anal. Calcd for $\text{C}_{16}\text{H}_{29}\text{NO}_9$</p> <p>C, 50.65; H, 7.70; N, 3.69. Found: C, 50.63; H, 7.81; N, 3.97.</p>
--	--

10

20

【 0 0 4 0 】

【 表 3 】

<p>N- (ベンジルオキシカルボ ニル) ートリス[((メトキシ カルボニル) エトキシ) メチル]アミノメタン</p>	<p>^1H NMR(CDCl_3)</p> <p>δ7.33(m, $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2$, 5H), 5.28(s, OCONH, 1H), 5.03(s, $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2\text{O}$, 2H), 3.69-3.64(m, $\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{COOCH}_3$, 21H), 2.52(t, $\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2$, 6H).</p> <p>$^{13}\text{C}$ NMR(CDCl_3)</p> <p>δ172.1($\text{CH}_2\text{COOCH}_3$), 155.3($\text{OCONH}$), 137.1($\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2$), 128.7($\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2$), 128.2($\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2$), 69.6($\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2$), 67.0($\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2$), 66.3($\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2$), 59.0($\text{OCONHC}(\text{CH}_2-)_3$), 51.6($\text{CH}_2\text{COOCH}_3$), 34.8($\text{CH}_2\text{COOCH}_3$).</p> <p>IR($\text{CHCl}_3$)</p> <p>3379, ,3027, 2952, 2879, 1738, 1509, 1438, 1363, 1235, 1199, 1112, 1072, 1027 cm^{-1}.</p> <p>Anal. Calcd for $\text{C}_{24}\text{H}_{35}\text{NO}_{11}$</p> <p>C, 56.13; H, 6.87; N, 2.73. Found: C, 56.23; H, 6.90; N, 2.88.</p>
--	---

10

20

30

【 0 0 4 1 】

【 表 4 】

	¹ H NMR(CDCl ₃) δ 10.00(br, CH ₂ COOH, 3H), 7.32(m, C ₆ H ₅ CH ₂ , 5H), 5.28(s, OCONH, 1H), 5.03(s, C ₆ H ₅ CH ₂ O, 2H), 3.66(m, CH ₂ OCH ₂ CH ₂ COOH, 12H), 2.52(t, CH ₂ OCH ₂ CH ₂ , 6H). ¹³ C NMR(CDCl ₃) δ 177.5(CH ₂ COOH), 155.2(OCONH), 137.1(C ₆ H ₅ CH ₂), 128.7(C ₆ H ₅ CH ₂), 128.2(C ₆ H ₅ CH ₂), 69.8(CH ₂ OCH ₂ CH ₂), 66.8(CH ₂ OCH ₂ CH ₂), 60.9(C ₆ H ₅ CH ₂), 59.1(OCONHC(CH ₂ -) ₃), 35.0(CH ₂ COOH). IR(CHCl ₃) 3600-2300, 3340, 3026, 2927, 2882, 1714, 1517, 1455, 1417, 1241, 1193, 1110, 1071 cm ⁻¹ . Anal. Calcd for C ₂₁ H ₂₉ NO ₁₁ C, 53.50; H, 6.20; N, 2.97. Found: C, 53.49; H, 6.52; N, 2.64.
N- (ベンジルオキシカルボ ニル) -トリス[(カルボキシ エトキシ) メチル]アミノ メタン	

10

20

30

【 0 0 4 2 】

【 表 5 】

	¹ H NMR(CDCl ₃) 87.32(m, C ₆ H ₅ CH ₂ , 5H), 6.18(s, CH ₂ CONH, 3H), 5.64(s, OCONH, 1H), 5.03(s, C ₆ H ₅ CH ₂ O, 2H), 3.68–3.65(m, CH ₂ OCH ₂ CH ₂ COOCH ₃ , CH ₂ OCH ₂ CH ₂ CONH, 75H), 2.52(m, CH ₂ OCH ₂ CH ₂ , 24H).	10
N- (ベンジルオキシカルボニル)	¹³ C NMR(CDCl ₃)	
ートリス['(N' - (カルボニル)	8172.3(CH ₂ COOCH ₃), 171.3(CH ₂ CONH), 155.2(OCONH),	
ートリス ((メトキシカルボニル)	137.1(C ₆ H ₅ CH ₂), 128.7(C ₆ H ₅ CH ₂), 128.2(C ₆ H ₅ CH ₂),	
エトキシ) メチル) メチルアミノ)	69.6(CH ₂ OCH ₂ CH ₂), 67.8(C ₆ H ₅ CH ₂), 67.0(CH ₂ OCH ₂ CH ₂),	
エトキシ) メチル] メチル]	60.0(CH ₂ CONHC(CH ₂ -) ₃), 59.2(OCONHC(CH ₂ -) ₃), 51.9(CH ₂ COOCH ₃),	20
アミノメタン	37.6(CH ₂ CONH), 35.0(CH ₂ COOCH ₃).	
	MS(FAB ⁺ , m/z) 1556.2(M+1).	
	IR(CHCl ₃)	
	3369, 3067, 2953, 2877, 1736, 1668, 1528, 1438, 1368, 1328,	
	1265, 1199, 1109, 1026 cm ⁻¹ .	30
	Anal. Calcd for C ₆₉ H ₁₁₀ NO ₃₅	
	C, 53.27; H, 7.13; N, 3.60. Found: C, 53.03; H, 7.27; N, 3.78.	

【 0 0 4 3 】

【 表 6 】

<p>N- (ベンジルオキシ カルボニル) -トリス[(N' - (カルボニル) -トリス- (カルボキシエトキシ)- メチル) メチルアミノ)- エトキシ) メチル]アミノ メタン</p>	<p>^1H NMR(DMSO)</p> <p>δ12-10(br, CH_2COOH, 9H), 7.37(m, $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2$, 5H), 7.09(s, CH_2CONH, 3H), 6.27(s, OCONH, 1H), 5.02(s, $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2\text{O}$, 2H), 3.71-3.60(m, $\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$, $\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CONH}$, 48H), 2.45(m, $\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2$, 24H).</p> <p>$^{13}\text{C}$ NMR(DMSO)</p> <p>δ173.2(CH_2COOH), 171.0(CH_2CONH), 155.2(OCONH), 137.1($\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2$), 128.7($\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2$), 128.1($\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2$), 68.7($\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2$), 67.9($\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2$), 67.2($\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2$), 60.3($\text{CH}_2\text{CONHC}(\text{CH}_2-)_3$), 60.2($\text{OCONHC}(\text{CH}_2-)_3$), 37.6($\text{CH}_2\text{CONH}$), 35.0($\text{CH}_2\text{COOCH}_3$).</p> <p>MS(FAB$^+$, m/z) 1429.6(M$^+$).</p> <p>IR(neat)</p> <p>3600-2300, 3342, 3026, 2924, 2880, 1715, 1651, 1528, 1455, 1417, 1196, 1109 cm^{-1}.</p> <p>Anal. Calcd for $\text{C}_{60}\text{H}_{92}\text{NO}_{35}$</p> <p>C, 49.18; H, 6.60; N, 3.82. Found: C, 49.32; H, 6.84; N, 3.64.</p>
--	--

10

20

30

【 0 0 4 4 】

以下、基質表面に調節されたアミン基密度を有する分子層を形成する方法について説明する。

40

【 0 0 4 5 】

本発明の化学式 (1) の化合物は他の化合物の助けなく基質に自己組織化 (self-assembly) されて付着できる。

【 0 0 4 6 】

まず、基質表面をきれいに洗浄した後、これを乾燥する。その後、乾燥された基質をアミノシラン化合物と溶媒からなった溶液に所定時間浸してアミノシラン化をさせる。ここで、アミノシラン化合物としては酸性の副産物を形成しない物質で、3 - アミノプロピルトリエトキシシラン、3 - アミノプロピルジエトキシメチルシラン、3 - アミノプロピルエトキシジメチルシランなどがある。また、アミノシラン化合物を溶解するための溶媒とし

50

てトルエンを使用する。そして前記ベースとして用いられる基質は特に限定されず、シリコンウエハー、ガラス、シリカ、溶融シリカなどであってもよい。

【0047】

アミノシラン化反応が完結されれば、基質を溶媒で洗浄した後、これを乾燥する。その後、表面がアミノシラン化された基質をN-CBZ-[1]amine-[9]acidを含む溶媒に浸漬して不活性ガス雰囲気を維持する。反応時間は12時間程度が適当で、室温で反応させる。

【0048】

一方、N-CBZ-[1]amine-[9]acidは末端のアミン作用基が保護されているのでアミン基を基質表面に露出されるようにするためには保護基を除去する過程が必要である。保護基の除去は基質を高純度トリフルオロ酢酸に浸漬した後、室温で超音波処理する過程が必要である。この後、脱保護過程が完結されれば基質表面を多量の溶媒、例えばメタノールで洗浄し、基質表面に物理的に吸着されたトリフルオロ酢酸及び分離済み保護基を除去する。

【0049】

前記過程によって図1及び図2に示されたような分子層を有する基質が得られる。

【0050】

図1を眺めると、N-CBZ-[1]amine-[9]acidは末端のカルボキシ酸がアミノシラン化された基質表面のアミンとイオン結合で強く結合し、アミノシラン化された基質表面に強く吸着されている。この結合の安定性は図3に示した。広範囲なpHで安定性を示し、特に、中性のpHで相当に安定で分子薄膜の有用性が高い。そして、図2を見ると基質最上部表面上の保護されたアミン作用基群は全て一次アミンに変形されて大きな反応性を示す。

【0051】

本発明によって得られる表面に適切なアミン基密度を有する固体基質はアミン作用基の密度が0.05乃至0.3 amines/nm²を示し、それぞれのアミン基は非常に均一に分布されており、これを利用してDNAチップやバイオチップを製造するのに有利である。

【0052】

したがって、本発明の固体基質はDNAチップやバイオチップを開発するのに重要な機能を遂行できる。例えば、DNAチップはオリゴヌクレオチドを固体基質上部に固定させようとする時、基質表面に調節された個数のアミン基を有するならば導入される生分子相互間の立体障害が少ないため円滑に導入され、強く結合できる。これはチップの安定度を高めることができ、チップを製造する過程を一層容易に提供する。

【0053】

また、バイオチップの場合のように酵素や他のバイオ分子群を固定させようとする時にも基質表面の作用基密度が調節されるならば基質表面に円滑に固定できるので、チップの生産効率を向上させることができる。この他にも基質表面に所望の分子群を固定し、これらの性質を明らかにする表面研究に重要な表面基質として使用が可能である。また、このような方法によって提供される十分な空間はそれぞれの生分子が効率的なセンサーとして作用するのに大きく寄与できる。

【0054】

以下の実施例を通じて本発明をさらに詳細に説明する。但し、実施例は本発明を例示するためのものであり、これらだけに限定するわけではない。

【0055】

実施例 1

1) トリス[(シアノエトキシ)メチル]アミノメタン(Tris[(cyanoethoxy)methyl]amino methane)の合成

丸底フラスコ(21)にトリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン(20.2g、167mmol)と触媒量の水酸化カリウム(3.0g、53mmol)を入れ、12時間程度真空下で乾燥させる。パラ-ジオキサン(p-dioxane)溶媒を500ml入れた後、試料が溶けるまで攪拌する。3.5当量のアクリロニトリル(38.5ml、585mmol)を注射器ポンプでゆっくり注入する。反応の進行程度は薄い膜クロマトグラフィを通じて確認し、反応が完結すれば水とクロロホルムで抽出する。有機層を無水硫酸マグネシウムで乾燥してろ

10

20

30

40

50

過した後、有機溶媒を蒸発させる。展開溶媒 (ethyl acetate:methanol=4:1 (v/v)、 R_f ; 0.64) を利用してコラムクロマトグラフィすれば、粘度のある黄色液体が得られる。数回に掛けて分離した時、得られた総量は 34.8 g であった (34.8 g、収率 74.3%)。

【0056】

2) トリス[(メトキシカルボニル)エトキシ]メチル]アミノメタン (Tris[((methoxycarbonyl)ethoxy)methyl]aminomethane) の合成

トリス[(シアノエトキシ)メチル]アミノメタン (2.0 g、7.1 mmol) を丸底フラスコ (500 ml) に入れ、過量の濃塩酸を 20 ml 程度添加して 3 時間還流させる。真空下で溶媒を除去すれば白色の沈殿と共に濃い褐色の粘りのある液体が形成される。これをアセトンに溶かしてろ過する。白色沈殿は塩化アンモニウム塩であり、ろ過された液体は回転蒸留器 (rotary evaporator) を利用して減圧蒸留し、溶媒を除去する。褐色の粘りのある液体を水とクロロホルムで抽出して水層を採取する。水層を減圧蒸留した後、メタノールに溶かしてエステル化させる。24 時間程度メタノール中で攪拌した後、トリエチルアミンを過量添加し、アルカリ溶液に作る。溶液を減圧蒸留した後、水を入れてクロロホルムで抽出し、有機層を無水硫酸マグネシウムで乾燥してろ過する。溶媒を除去した後、純粋な化合物を得るために展開溶媒 (ethyl acetate:methanol=8:1 (v/v)、 R_f ; 0.25) を利用してコラムクロマトグラフィすれば、粘度のある黄色液体が得られる (2.33 g、収率 80.6%)。

【0057】

3) N-(ベンジロキシカルボニル)-トリス[(メトキシカルボニル)エトキシ]メチル]アミノメタン (N-(Benzyloxycarbonyl)-tris[((methoxycarbonyl)ethoxy)methyl]aminomethane) の合成

トリス[(メトキシカルボニル)エトキシ]メチル]アミノメタン (1.0 g、2.5 mmol) を 10 ml の水に溶かした後、0℃ に冷却しながら重炭酸ナトリウムを 0.3 g 添加して攪拌する。1 時間程度過ぎて溶液がさらにアルカリ化されればクロロ蟻酸ベンジル (0.50 ml、3.5 mmol) をゆっくり過量に添加する。反応が終われば水に溶けない油が沈んでいるように見え、これをエチルアセテートで抽出する。有機層を無水硫酸マグネシウムで乾燥してろ過する。溶媒を減圧蒸留で除去した後、展開溶媒 (ethyl acetate:hexane=1:1 (v/v)、 R_f ; 0.46) を利用してコラムクロマトグラフィすれば、粘度のある黄色液体が得られる (1.01 g、収率 77.3%)。

【0058】

4) N-(ベンジロキシカルボニル)-トリス[(カルボキシエトキシ)メチル]アミノメタン (N-(Benzyloxycarbonyl)-tris[(carboxyethoxy)methyl]aminomethane) の合成

N-(ベンジロキシカルボニル)-トリス[(メトキシカルボニル)エトキシ]メチル]アミノメタン (2.0 g、3.7 mmol) を 5 ml のメタノールに溶かした後、過量の 1.0 N 水酸化ナトリウム (15 ml、150 mmol) を加えて攪拌する。水酸化ナトリウムを加えれば、最初には白く濁って徐々にきれいな溶液状態となる。攪拌して 12 時間程度過ぎれば溶媒を減圧蒸留で除去した後、水とクロロホルムを入れて抽出する。有機層は捨てて水層だけ採取し、0℃ で希塩酸溶液で酸性化させる (pH 1~2)。pH 用紙で酸度を確認した後、エチルアセテートで抽出する。抽出した溶液を減圧蒸留し、展開溶媒 (ethyl acetate:methanol=2:1 (v/v)、 R_f ; 0.72) を利用してコラムクロマトグラフィすれば、粘度のある黄色液体が得られる (1.52 g、収率 82.4%)。

【0059】

5) N-(ベンジロキシカルボニル)-トリス[(N'-(カルボニル)-トリス[(メトキシカルボニル)エトキシ]メチル)メチルアミノ]エトキシ]メチル]アミノメタン (N-(Benzyloxycarbonyl)-tris[(N'-(carbonyl)-tris[((methoxycarbonyl)-ethoxy)methyl)methylamino]ethoxy)methyl]aminomethane) の合成

N-(ベンジロキシカルボニル)-トリス[(カルボキシエトキシ)メチル]アミノメタン (1.37 g、2.9 mmol) にジシクロヘキシルカルボジイミド (dicyclohexylcarbodiimide) を

10

20

30

40

50

ide;DCC;1.77g、8.66mmol)、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール(1-hydroxy benzotriazole;HOBt;1.17g、8.66mmol)を各々3当量ずつ入れ、25mlジメチルホルムアミド(DMF)溶媒中で攪拌する。この溶液にトリス[(メトキシカルボニル)エトキシ]メチル]アミノメタン(5.00g、13.2mmol)を4.5当量入れて48時間反応させる。反応が進められれば溶媒に溶けないジシクロヘキシル尿素が発生して固体状態で漂う。反応が終われば溶媒を減圧蒸留及び真空下で除去し、残ったものを二塩化メチレンに溶かした後、ろ過する。有機層を無水硫酸マグネシウムで乾燥してろ過する。溶媒を減圧蒸留で除去した後、展開溶媒(ethyl acetate:methanol=4:1(v/v)、 R_f ;0.82)を利用しコラムクロマトグラフィすれば、粘度の非常に強い黄色液体が得られる(1.50g、33.3%)。

10

【0060】

6)N-(ベンジルオキシカルボニル)-トリス[(N'-(カルボニル)-トリス((カルボキシエトキシ)メチル)メチルアミノ)エトキシ]メチル]アミノメタンの合成
N-(ベンジルオキシカルボニル)-トリス[(N'-(カルボニル)-トリス((メトキシカルボニル)エトキシ)メチル)メチルアミノ)エトキシ]メチル]アミノメタン(2.00g、1.28mmol)を5mlメタノールに溶かした後、過量の1.0N水酸化ナトリウム(15ml、150mmol)を加えて攪拌する。水酸化ナトリウムを加えれば、最初には白く濁って徐々にきれいな溶液状態となる。攪拌して24時間過ぎれば溶媒を減圧蒸留した後、水とクロロホルムで抽出する。有機層は捨てて水層だけを採取し、0で希塩酸溶液で酸性化させる(pH 1~2)。pH用紙で酸度を確認した後、塩化ナトリウム(2.0g)を入れてエチルアセテートで抽出する。抽出した溶液を減圧下で溶媒を揮発させれば、粘度のある黄色液体が得られる(1.34g、収率73.3%)。

20

【0061】

実施例2

きれいに洗浄されたシリカ基質を20mTorrの真空中で乾燥した。

窒素雰囲気下で丸底フラスコに(3-アミノプロピル)ジエトキシメチルシランのトルエン溶液(10^{-3} M)を入れた後、前記乾燥されたシリカ基質を浸漬させて常温で反応させた。

【0062】

前記シラン化反応が完結すれば、基質をトルエンで洗浄し、約120のオーブンで30分間乾燥した。各基質を常温に冷却させた後、トルエン、トルエンとメタノールの混合溶液(1:1体積比)次いでメタノールに順次に浸漬して3分間超音波洗浄を行った。この基質を約20mTorrの真空中で乾燥した後、表面がアミノシラン化された基質を前記実施例1で製造されたN-CBZ-[1]amine-[9]acidを含む溶媒に浸漬し、不活性ガス雰囲気を維持する。これを室温で12時間反応させた。

30

【0063】

反応が完結されれば製造された基質をメタノール、メタノール及び水の混合溶液(1:1体積比)、水、メタノールに順次に浸漬して3分間超音波洗浄をし、真空乾燥した。

【0064】

その後、CBZ作用基を除去するためにシリカ基質をトリフルオロ酢酸に浸漬し、これを室温で30分間超音波洗浄した。超音波洗浄が終われば基質を多量のメタノールで洗浄した後、メタノールを利用して10分間超音波処理した。

40

【0065】

前記N-CBZ-[1]amine-[9]acidと反応させる前後のアミノシラン分子層の厚さ及びアミン基の表面密度を測定した。その結果、アミノシラン分子層の厚さは約8であり、作用基の表面密度は3.5 amines/nm²であった。

【0066】

N-CBZ-[1]amine-[9]acidを反応させた後の厚さは10内外が増えた18乃至19であり、作用基の表面密度は0.18 amines/nm²で、大いに減少したことが分かる。この時、反応性アミン基の表面密度は9-アントラルデヒド(9-Anthraldehyde別名Anthracene-9-

50

calboxaldehyde) を利用し、これは以前に使用した 4 - ニトロベンズアルデヒドより水吸光係数が 6 倍程度大きな物質である。表面のアミン基密度が顕著に低くなるので、従来の 4 - ニトロベンズアルデヒドでは密度計酸が不可能であり、9 - アントラルデヒドを使用した。

【 0 0 6 7 】

また、表面の形態を AFM (Atomic Force Microscope) 装置を利用して観察した結果、アミノシラン化された表面の構造と大きな差がなかった。これはハイパーブランチ分子が表面に単一層で形成されたことを意味し、塊りができた部分が観察されず、目標としたように均一な分子薄膜が形成されたことを意味する。

【 0 0 6 8 】

一方、N-CBZ-[1]amine-[9]acid が導入された薄膜の安定性を測定するために中性の水で 30 分、1 時間、2 時間、4 時間間隔で超音波洗浄をしたが、厚さには変化がなかった。また、24 時間、48 時間を中性の水中に放置した後、測定した厚さもやはり特別な差がなかった。

【 0 0 6 9 】

様々な pH を有する水の中で測定した薄膜の安定性を図 3 に示した。pH 4 乃至 9 までは非常に安定な状態を示し、途中で pH 3 よりも酸性条件で、そして pH 10 よりも塩基性条件では急速に厚さが減ることが確認された。結局、生理的酸性度を含む広い領域の pH で安定であることが分かった。

【 0 0 7 0 】

また、高い温度の水の中でも安定である。様々な温度の水の中で表面の厚さの変化を図 4 に示した。40 から 100 まで 10 間隔で温度を変えながら水溶液に 30 分間浸しておいたが、厚さには差がなかった。結局、100 の水の中で 4 時間以上浸しておいた時に薄膜の厚さが減ることが確認できた。このような熱的安定性はバイオチップの基質として使用するのに適する。

【 0 0 7 1 】

前記図 3 及び図 4 の厚さ単位は である。

【 0 0 7 2 】

実施例 3

基質としてシリカの代りに溶融シリカを使用することを除いては実施例 2 と同様な方法で基質を処理した。製造された溶融シリカ基質は前記実施例 2 のシリカ基質と同一な様相を示した。

【 0 0 7 3 】

具体的な試験結果は下記のようなものである。

【 0 0 7 4 】

(アミノシリレーション)

二首 250 ml 丸フラスコが真空中に空気を排出し、窒素で充填した。連続的に無水トルエン (20 ml) とカップリング剤 (0.2 ml) を隔膜を通して加えた。洗浄された基質をこの用に 3 時間入れた。典型的に、4 個以上の基質が基質の間で物理的オーバーラップを避けるためにフラスコに入れられた。自己組織化後に、基質はフラスコから取り出し、トルエンで洗浄してガラスバイアルに入れた。前記バイアルをオープンに入れ、30 分間 110 で加熱した。前記プレートがトルエン、トルエン - メタノール (1 : 1 (v/v)) に順次に浸るようにし、それぞれの洗浄段階では 3 分間超音波洗浄した。洗浄されたプレートのそれぞれの片をバイアルに入れ、それぞれのバイアルは O - 環が付けられた大きなスクリーキャップを有するガラス容器に入れ、ひきつづき容器は乾燥のために真空にした (30 乃至 40 mTorr) 。

【 0 0 7 5 】

(“ nonapus ” の自己組織化、N-CBZ-[1]amine-[9]acid)

二首 250 ml 丸いフラスコが真空中に空気を排出し、窒素で充填した。N-CBZ-[1]amine-[9]acid の或る程度の量を混合溶媒 (DMF : 脱イオン水 = 1 : 1 (V/V)) に溶解して溶液 20 m

10

20

30

40

50

lを製造した。この溶液を前記窒素が充填されたフラスコに入れ、順次に前記で準備されたアミノシリレートされた基質を溶液に入れた。常温で自己組織化されれば、それぞれの基質片を特定時間後に取り出した。

【0076】

取り出した後、これらは豊富な量の脱イオン水で洗浄した。それぞれの基質は脱イオン水、脱イオン水 - メタノール (1:1 (V/V))、次いでメタノールで順次に3分間超音波洗浄した。超音波洗浄後、それぞれの基質片をバイアルに入れ、それぞれのバイアルはO-環が付けられた大きなスクリュウキャップを有するガラス容器に入れ、ひきつづき容器は乾燥のために真空にした (30乃至40 mTorr)。

【0077】

(無水酢酸による残留アミンの無力化)

N-CBZ-[1]amine-[9]acidのカルボキシ酸などとイオン結合せずに残っているかもしれない基質表面の残留アミン基は以降の全ての反応過程で妨害要素として作用するので、脱保護反応に先立って残留アミン基を無水酢酸で処理し、残留アミン基の反応性を除去すれば付着がさらに好ましい。この工程は必要時に実施する。

【0078】

4 - (ジメチルアミノ)ピリジン (1 mg、8.2 μ mol)が入った二重250 ml丸フラスコを真空にし、窒素で充填した。連続的に無水メチレンクロライド (20 ml)と無水酢酸 (1 ml、11 mmol)を隔膜を通して加えた。前記自己組織化された基質のいくつかの片を常温で12時間前記溶液に入れておいた。反応後、それぞれのプレートを取り出してメチレンクロライドで洗浄し、ガラスバイアルに入れた。前記バイアルを順次的な方法でメチレンクロライド、メタノール、次いでメチレンクロライドの順で満たして各段階で3分間超音波洗浄した。超音波洗浄後、各基質の片をバイアルに入れ、それぞれのバイアルはO-環が付けられた大きなスクリュウキャップを有するガラス容器に入れ、ひきつづき容器は乾燥のために真空にした (30乃至40 mTorr)。

【0079】

(厚さと吸収)

アミノシリル化された基質はN-CBZ-[1]amine-[9]acidで自己組織化される時、その平衡の水接触角が以外に70 ($\pm 2^\circ$)から65 ($\pm 2^\circ$)まで減少した。特に、さらに小さい接触角は分子層最上のフェニル基の疎水性を反映することではない。もし、疎水性尾基を有するコンパクトな分子層であれば、大いに増加した水接触角が観察されなければならない。その観察はN-CBZ-[1]amine-[9]acidの特徴的な分子構造と調和するものである。それは分子の錐形態は水がアミド及びエーテル基を含有する自己組織化された層の極性部分、おそらくカルボキシル酸とプロトン化されるアミン、に達するためである。したがって、CBZ保護基のフェニルは自己組織化による水接触角を増加させない。

【0080】

溶融シリカ基質は紫外可視光に透明であるために組立は分光光度計でモニターされる。実際に、260 nmで0.001 (± 0.0003)の吸収増加が自己組織化によって観察され、この増加値は機器の精密度を考慮する時、確かである。N-CBZ-[1]amine-[9]acidのメタノールでのmaxが258 nmである時、表面上の酸の吸収はむしろ広い。フェニル発色団が距離 (ca. 20 ~ 30 \AA)によってそれぞれ分離されて相互引力を避けるのに充分であるとしても、前記吸収バンドが広がる理由は明確でない。無水酢酸で処理した後、基質の吸収バンドは変化しなかった。不変性は前記組立てられたN-CBZ-[1]amine-[9]acidが無水酢酸で処理される間アミノシリル化された表面から脱着しないことを意味する。

【0081】

アミノシリル化された基質の厚さは8 (± 2) \AA であり、反面、N-CBZ-[1]amine-[9]acidで自己組織化されたものは18 (± 2) \AA まで増加した。

【0082】

(自己組織化された分子層のpH安定性)

N-CBZ-[1]amine-[9]acidの自己組織化後に、そのプレートを2.0乃至11.0の様々な

10

20

30

40

50

範囲のpHの水が入ったバイアルに浸漬した。溶液のpHは0.1 N NaOH、0.1 N HCl、またはこれらの組み合わせの適当な量を加えて調整した。典型的に、一つまたは二つのプレートは特定pHのバイアルに入れた。室温で3時間放置した後、そのプレートを溶液から取り出し、脱イオン水で洗浄した。そのプレートを脱イオン水、脱イオン水とメタノールの混合物(1:1 (v/v))、次いでメタノールに順次的方法で入れ、各々3分間超音波洗浄した。超音波洗浄後に、各基質の片をバイアルに入れ、それぞれのバイアルを0-環が付加された大きなスクリュキャップを有するガラス容器に入れ、最後にその容器を真空で乾燥した(30乃至40 mTorr)。無水酢酸で残留アミンを無力化した後、キャップがかぶせられた分子層のpH安定性も同じ方法で実験した。

【0083】

カルボキシル酸と1次アミンの間のイオン相互作用は組立に利用されるためにその引力はカルボキシル基がプロトン化されることにおける強い酸と塩基の全条件で不足しており、各々 RNH_3^+ がジプロトン化される。酢酸と RNH_3^+ の平衡定数Kaは各々 1.8×10^{-5} と $ca 10^{-10.5}$ であり、自己組織化された分子またはアミノシリレートされた表面のイオン水は4.7または10.5のpHで半分減少する。イオン密度の減少ははっきりと引力を減少させると予想される。分子層の厚さは脱イオン水でプレートを洗浄し、連続的にメタノールで洗浄した後、測定した。図5の符号(●:黒丸)は以前のN-CBZ-[1]amine-[9]acid層の厚さを示し、符号(○:白丸)は無水酢酸で処理された後のものを示す。図5を見れば、分子層はpH4乃至9で安定であった。平衡定数pKaを含んで考慮すれば、イオン相互作用はカルボキシル酸がプロトン化させることを開始したり、 RNH_3^+ 基がジプロトン化を開始すれば直ちに、そのまま分子層を維持するという程度には充分強くない。しかし、pH安定性の観点は大部分のバイオメディカル適用に充分な幅になることができる。

【0084】

(水での自己組織化された分子層の熱的安定性)

N-CBZ-[1]amine-[9]acidの自己組織化後に、そのプレートを脱イオン水が入った試験管に入れた。その試験管を温度が調節される油槽に入れた。特に、そのプレートの片が入った試験管を特定温度で30分間加熱した。100℃で加熱時間は段々に増加させた。沸騰状態での水の損失を注意して補償した。加熱後、そのプレートを脱イオン水で洗い、また、連続的にメタノールで洗いし、真空チャンバー(30乃至40 mTorr)中で排出した。無水酢酸で残留アミンの反応性を除去した後、キャップがかぶせられた分子層のpH安定性も同じ方法で実験した。

【0085】

脱イオン化された水での分子層の熱安定性を様々な温度で実験した。基質を特定温度で30分間加熱した後、有機フィルムの厚さを測定した。図6で符号(●)と符号(○)は各々無水酢酸で処理する前と後のN-CBZ-[1]amine-[9]acid分子層の厚さ示す。両分子層は100℃まで安定であり、単に100℃で加熱時間を増加させた時、厚さが減少しただけである。例えば、100℃で6時間の加熱で6μm厚さが減少した。この実験のように9個所のイオン性相互作用を通じて形成される分子層は100℃、1乃至2時間水で加熱して充分に残っている程度に強い。

【0086】

(自己組織化されたハイパーブランチされたカルボン酸からのCBZの脱保護)

他の適用のためにCBZを脱保護することが重要である。ここで、条件は表面上の分子を元の状態に維持させるように十分に柔軟でなければならない。常温で30分間高純度トリフルオロ酢酸に基質を浸漬することはCBZ保護基を脱保護する効果がある。分光学的分析でN-CBZ-[1]amine-[9]acidが特定の条件で表面上に維持されることを確認した。解釈すれば、万一基質が酸性環境でさらに長い時間残っているならば、自己組織化される分子は表面から離脱する。脱保護によって、有機層の厚さは典型的に2乃至3μmまで減少し、脱保護後のAFM像(図7、図8)と吸収スペクトラムはほとんど変化がなかった。したがって、トリフルオロ酢酸がCBZ保護基を加水分解し、自己組織化体それ自体の干渉なくハイパーブランチされた分子上で反応性1次アミンを生成するということが証明された。

10

20

30

40

50

【0087】

(1次アミンの表面密度)

<イミンの形成>

9-アントラルデヒド(10 mg、48 μ mol)が入った二首丸底250 mlが真空化された後、窒素が充填された。連続的に無水エタノール(20 ml)が隔膜を通じて加えられた。基質が50 の温度で12時間その溶液に放置された。典型的に2個乃至4個の基質が試験に使用された。イミン形成後に、プレートは溶液から出してメタノールで洗いされた。次に、プレートはメタノールが入ったビーカーに入れ、3分間超音波洗浄された。新鮮な溶媒で最後の超音波洗浄工程を3回反復実施した後、それぞれのプレートをバイアルに入れた結果、バイアルを入れたガラス容器が乾燥のために真空された(30乃至40 mTor r)。

10

【0088】

<加水分解>

イミン形成された基質が脱イオン水(3 ml)が10 ml試験管に入れられて50 で18時間放置された。加水分解後に、プレートは溶液から取り出し、正確な溶液の体積と9-アントラルデヒド蛍光強度が測定された。

【0089】

実験室で設定されたように、4-ニトロベンズアルデヒドが表面上の自由1次アミンの表面密度を測定するのに用いられた。4-ニトロベンズアルデヒドの分子吸着度(1.45×10^4 L/cm \cdot mol)は正確に1.0 amines/nm²程度高く、密度の検出には非常に充分である。さらに低い密度であれば、さらに大きい分子吸着度を有する分子が使用されなければならない。利点において、分子吸着度が 8.70×10^4 L/cm \cdot molである9-アントラルデヒドが適している。1.0 amines/nm²未満の密度で、アントラセン部分が占めるさらに大きい空間は全体アミン誘導体形成に問題とならなかった。

20

【0090】

調整反応のために9-アントラルデヒドのイミン形成がアミノシリレートされた表面で実験された。無水溶媒でのイミン形成と水での加水分解は典型的な条件で成功的である。しかし、アントラセン部分が占めるさらに大きな空間のために、測定されたアミノシリレート層上の自由1次アミンの表面密度は4-ニトロベンズアルデヒドで測定したものより低い。また、表面アミンの95%以上が用いられた条件で無水酢酸によってブロックされたことが観察された。他の調節反応で、9-アントラルデヒドのイミン形成が無水酢酸で処理する前と後のCBZが保護されたN-CBZ-[1]amine-[9]acid分子層に対して実験された。キャップがかぶせられなかった基質に対するイミンの測定可能な程度はイミン形成に有用な自由アミン基に残る一方、分光器で前記アミンはキャップがかぶせられなかった基質で発見されなかった。したがって、この操作実験は表面上に残る全ての活性1次アミン基が無水酢酸で処理されてキャップがかぶせられる。

30

【0091】

最後に、表面上に適用された9-アントラルデヒドはCBZ基を脱保護するためにトリフルオロ酢酸で処理された。図9のように、明確な259 nm付近の吸収増加がイミン形成によって観察された。イミン-誘導された表面は加水分解のために脱イオン水に浸るようにし、大部分のイミンは加水分解されて9-アントラルデヒドを作った。さらに信憑性のある計算のために9-アントラルデヒドの蛍光体が用いられた。較正計算曲線(calibration curve)は蛍光体の強度が濃度に比例することを示す(図10)。フルオロ孔(fluoro pore)の蛍光を測定することは0.1乃至0.25 amines/nm²の表面密度を与えた。言い換えれば、それぞれのハイパーブランチされた分子は4乃至10 nm²を占める。

40

【0092】

【発明の効果】

本発明によれば基質表面でのアミン基密度を適切に減少させることができる。このように表面に調節されたアミン基密度を有する固体基質はDNAチップやバイオチップを開発するのに重要な機能をする。また、本発明によって製作された薄膜は広いpHの範囲で安定であ

50

り、高い温度でも相当な安定性を有する。これは9個のカルボキシ酸が表面と多重結合を構成することに起因する。単一結合や3点結合の場合、それほど安定でない結合をするが、9点結合はこれとは比較できない程度の高い安定性を有する。この他にも基質表面に所望の分子を固定し、これらの性質を明らかにする表面研究に重要な表面基質として使用が可能である。

【図面の簡単な説明】

【図1】 本発明の化学式(1a)の化合物を使用して調節されたアミン基密度と空間を含有する分子層を表面に含む基質を製造する過程を示した概略図である。

【図2】 本発明の化学式(1a)の化合物を使用して調節されたアミン基密度と空間を含有する分子層を表面に含む基質を製造する過程を図1に引き続いて示した概略図である

10

【図3】 実施例2において製造される調節されたアミン基密度と空間を含有する分子層を表面に含む基質の様々なpHに対する安定度を示したグラフである。

【図4】 実施例2において製造される調節されたアミン基密度と空間を含有する分子層を表面に含む基質の熱に対する安定度を示したグラフである。

【図5】 実施例3において製造される調節されたアミン基密度と空間を含有する分子層を表面に含む基質の熱に対する安定度を示したグラフである。

【図6】 実施例2において製造される調節されたアミン基密度と空間を含有する分子層を表面に含む基質の様々なpHに対する安定度を示したグラフである。

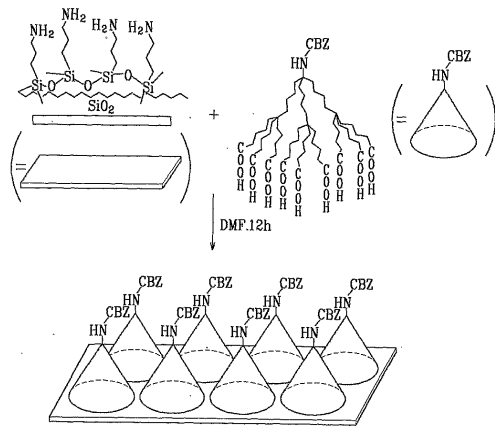
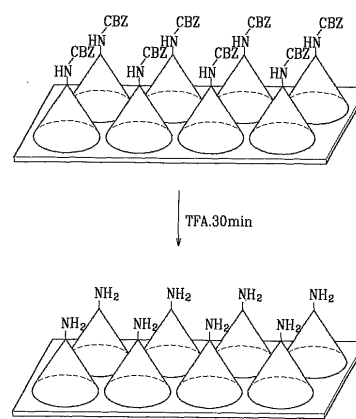
【図7】 ニートトリフルオロ酢酸によってCBZ基が脱保護される前のAFMイメージである

20

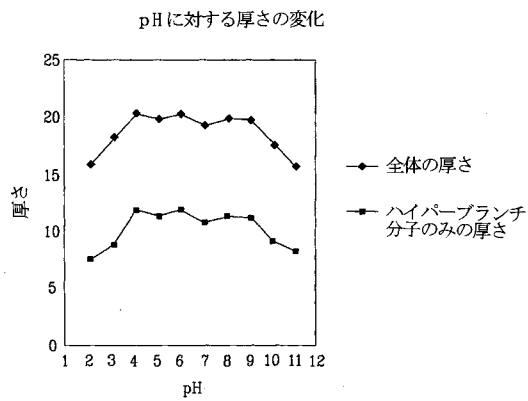
【図8】 ニートトリフルオロ酢酸によってCBZ基が脱保護された後のAFMイメージである

【図9】 化学式(1a)の化合物層の紫外-可視スペクトラムである。ここで、aはCBZ基の脱保護後であり、bは9-アントラルデヒドにイミンを形成した後であり、cは加水分解後である。

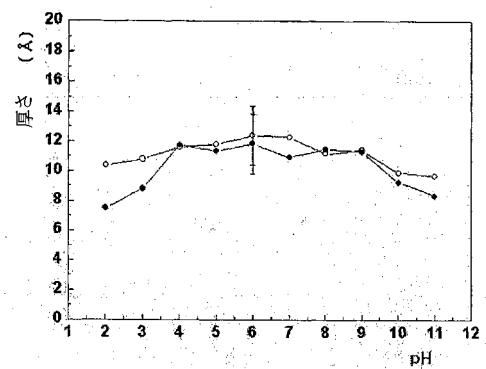
【図10】 20、40、60、80、10mMのそれぞれの濃度での蛍光体スペクトラムである。ここで、内部は校正計算曲線で、蛍光体強度対9-アントラルデヒドの濃度関係である。

【図 1】
FIG.1【図 2】
FIG.2

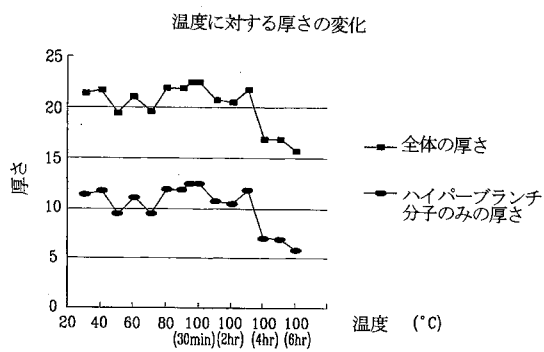
【図 3】



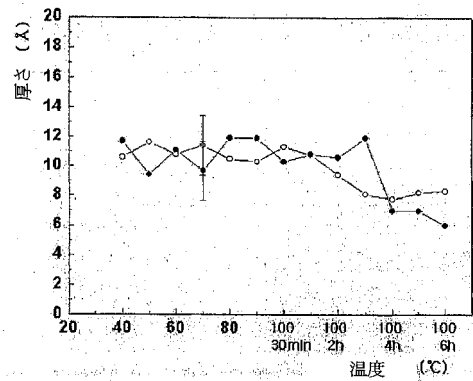
【図 5】



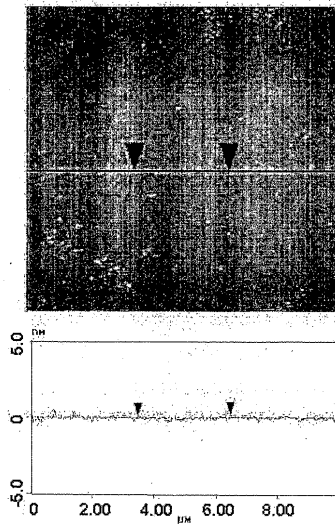
【図 4】



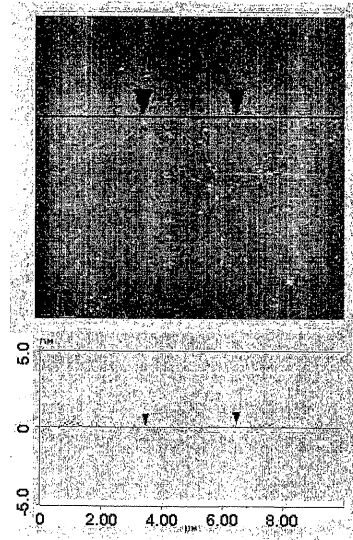
【図 6】



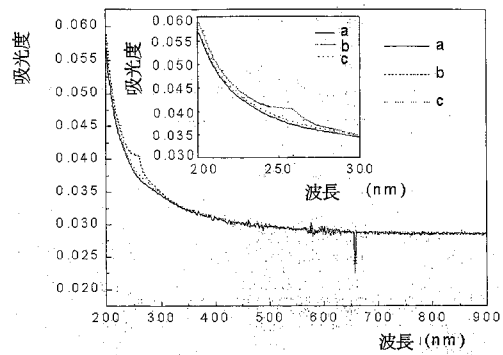
【図 7】
FIG.7



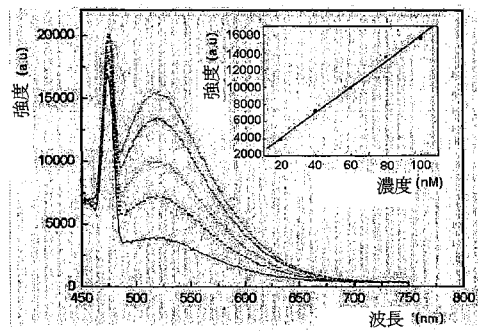
【図 8】
FIG.8



【図 9】



【図 10】



フロントページの続き

(74)代理人 100093045

弁理士 荒船 良男

(72)発明者 バク, ジュン - ウォン

大韓民国, 790-390 キュンサンブク - ド, ポハン - シティ, ナム - ク, ジゴク -
ドン, キョス アパートメント 8 - 1301

(72)発明者 シム, ジョ - ヨング

大韓民国, 630-042 キュンサンナム - ド, マサン - シティ, ホイウォン - ク, ホ
イウォン - 2ドン, 644-30

(72)発明者 ムン, ジュン - ホ

大韓民国, 641-860 キュンサンナム - ド, チャンウォン - シティ, ドン - イウプ,
ナムサン - リ, 143

(72)発明者 ホン, ボン - ジン

大韓民国, キュンサンボク - ド, 790-784, ポハン - シティ, ナム - グ, サン
31 ヒョジャ - ドン, ポハン ユニヴァーシティー オブ サイエンス アンド テクノロジ
ー グラデュエイト アpartment 2 - 1003

審査官 本堂 裕司

(56)参考文献 特開2001-108683(JP,A)

特開2000-210082(JP,A)

特表2000-506094(JP,A)

Helvetica Chimica Acta (1997), 80(7), 2238-2276

Helvetica Chimica Acta (1999), 82(7), 1066-1095

Chemical Communications (Cambridge) (1999), (18), 1915-1916

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C07C 271/16

C07C 269/04

C07C 269/06

G01N 33/543

CA(STN)

REGISTRY(STN)