

DOCUMENT MADE AVAILABLE UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

International application number:	PCT/JP2019/049348
International filing date:	17 December 2019 (17.12.2019)
Document type:	Certified copy of priority document
Document details:	Country/Office: JP
	Number: 2018-236451
	Filing date: 18 December 2018 (18.12.2018)
Date of receipt at the International Bureau:	09 January 2020 (09.01.2020)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a),(b) or (b-bis)

CERTIFICATE OF AVAILABILITY OF A CERTIFIED PATENT DOCUMENT IN A DIGITAL LIBRARY

The International Bureau certifies that a copy of the patent application indicated below has been available to the WIPO Digital Access Service since the date of availability indicated, and that the patent application has been available to the indicated Office(s) as of the date specified following the relevant Office code:

Document details: Country/Office: JP

Filing date: 18 Dec 2018 (18.12.2018)

Application number: 2018-236451

Date of availability of document: 19 Dec 2018 (19.12.2018)

The following Offices can retrieve this document by using the access code:

JP, GE, NZ, EA, BR, GB, CA, IB, MA, FI, DK, US, AR, SE, KR, IL, IN,
AU, EP, ES, NL, EE, CN, CL

Date of issue of this certificate: 11 Jan 2020 (11.01.2020)

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application: 2018年12月18日

出 願 番 号
Application Number: 特願2018-236451

パリ条約による外国への出願
に用いる優先権の主張の基礎
となる出願の国コードと出願
番号

The country code and number
of your priority application,
to be used for filing abroad
under the Paris Convention, is

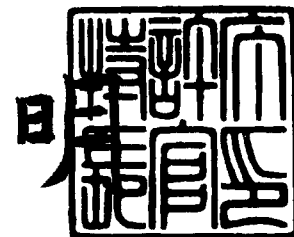
J P 2 0 1 8 - 2 3 6 4 5 1

出 願 人
Applicant(s): 東レ株式会社

2020年 1月 9日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

松 永



【書類名】 特許願
【整理番号】 660M09380A
【提出日】 平成30年12月18日
【あて先】 特許庁長官 殿
【国際特許分類】 C12Q 1/68
【発明者】
【住所又は居所】 神奈川県鎌倉市手広6丁目10番1号 東レ株式会社 基礎研究センター内
【氏名】 関口 翔太
【発明者】
【住所又は居所】 滋賀県大津市園山3丁目3番7号 株式会社東レリサーチセンター滋賀事業場内
【氏名】 松田 和大
【発明者】
【住所又は居所】 神奈川県鎌倉市手広6丁目10番1号 東レ株式会社 基礎研究センター内
【氏名】 伊藤 正照
【特許出願人】
【識別番号】 000003159
【氏名又は名称】 東レ株式会社
【代表者】 日覺 昭廣
【電話番号】 0467-32-9916
【手数料の表示】
【予納台帳番号】 005186
【納付金額】 14,000円
【提出物件の目録】
【物件名】 明細書 1
【物件名】 特許請求の範囲 1
【物件名】 要約書 1
【物件名】 図面 1

【書類名】明細書

【発明の名称】ポリマーで被覆された酸化セリウムのナノ粒子

【技術分野】

【0001】

本発明は、ポリマーで表面が被覆された酸化セリウムのナノ粒子および当該ナノ粒子を用いた核酸またはポリペプチドの分解方法に関する。

【背景技術】

【0002】

近年、安全や衛生管理に対する意識が高まる中で、有害物質や微生物を分解する抗菌技術が注目されている。例えば、酸化チタンは、光触媒特性によって活性酸素種を発生させ、有機物を酸化分解する特性を有しており、抗菌剤としての利用の他、アセトアルデヒドやアンモニアなどの低分子、アレルゲン、ウイルスなどの各種有害物質を分解する用途への利用も期待されている。

【0003】

酸化セリウムのナノ粒子（ナノセリア）は、酸化作用、抗酸化作用、抗菌作用など様々な特性を有し、カタラーゼ、オキシダーゼ、ペルオキシダーゼ、スーパーオキシドジスムターゼ、ホスファターゼ等の酵素と同様の触媒活性を有することも知られている。また、酸化セリウムのナノ粒子は、光触媒特性を有する酸化チタンとは異なる用途への利用が期待できる。

【0004】

一般に、ナノ粒子は凝集しやすい性質がある。酸化セリウムのナノ粒子も凝集しやすいため、粒子表面をポリマーなどでコーティングして粒子の分散性を向上させ、酸化剤や抗菌剤等に用いる場合がある。

【0005】

非特許文献1、2には、表面がポリアクリル酸やデキストランで被覆された酸化セリウムのナノ粒子が記載されており、酸化活性や抗菌活性などが検討されている。

【0006】

また、非特許文献3には、ポリマーの代わりにスルホコハク酸ービス（2-エチルヘキシル）ナトリウムで表面が被覆された酸化セリウムのナノ粒子が記載されており、ホスファターゼ活性について検討されている。さらに、非特許文献3には、酸化セリウムのナノ粒子は、リン酸エステルを加水分解するホスファターゼ活性を有しているが、核酸については分解できなかったことが開示されている。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0007】

【非特許文献1】A. Asati, Angew. Chem. Int. Ed. 2009, 48, 2308-2312.

【非特許文献2】M. H. Kuchma, Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine 2010, 6, 738-744.

【非特許文献3】Q. Wang, International Journal of Nanomedicine 2013, 8, 3395-3399.

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

本発明者らは、ポリマーで表面が被覆された酸化セリウムのナノ粒子を用いる新たな用途の検討を行った。しかし、後述する比較例2、3のとおり、非特許文献1に記載のポリアクリル酸で表面が被覆された酸化セリウムのナノ粒子を用いて、プラスミドやポリペプチドの分解を試みたところ、プラスミドについては、非特許文献3において報告されている結果と同様に、分解を確認することができなかった。また、ポリペプチドについては、

分解率が非常に低いことがわかった。

【0009】

これらの結果から、核酸やポリペプチドを高い分解率で分解することができる新規な酸化セリウムのナノ粒子を見いだすことを課題として、検討を行った。

【課題を解決するための手段】

【0010】

本発明者らは、上記課題を解決するために、酸化セリウムのナノ粒子の表面を被覆するポリマーについて検討した。その結果、ピペラジン、ピリジン、イミダゾールまたはカルバゾールの骨格を有するビニル系ポリマーまたはポリアミドで表面が被覆された酸化セリウムのナノ粒子が、核酸やポリペプチドを高い分解率で分解可能であることを見出し、本発明を完成させた。

【0011】

本発明は以下のとおりである。

(1) ピペラジン、ピリジン、イミダゾールまたはカルバゾールの骨格を有するビニル系ポリマーまたはポリアミドで、表面が被覆された酸化セリウムのナノ粒子。

(2) 前記ビニル系ポリマーが、前記骨格を側鎖に有するポリマーであることを特徴とする(1)に記載のナノ粒子。

(3) 前記ポリアミドが、前記骨格を主鎖に有するポリマーであることを特徴とする(1)に記載のナノ粒子。

(4) 核酸の分解方法であって、前記核酸を含む試料を(1)～(3)のいずれかに記載のナノ粒子と接触させることを特徴とする方法。

(5) ポリペプチドの分解方法であって、前記ポリペプチドを含む試料を(1)～(3)のいずれかに記載のナノ粒子と接触させることを特徴とする方法。

(6) ポリマーで表面が被覆された酸化セリウムのナノ粒子の製造方法であって、
工程a：ピペラジン、ピリジン、イミダゾールまたはカルバゾールの骨格を有するポリマーの溶液と、セリウム(III)イオンを含む溶液またはセリウム(III)塩とを混合し、混合溶液を得る工程、および

工程b：工程aで得られた混合溶液に酸化剤を添加する工程、
を含む、ナノ粒子の製造方法。

【発明の効果】

【0012】

本発明の酸化セリウムのナノ粒子を用いれば、核酸やポリペプチドを、従来のナノ粒子より高い分解率で分解することが可能となる。

【図面の簡単な説明】

【0013】

【図1】本発明で用いるポリマーの構造を説明する図

【図2】本発明で用いるピペラジン骨格を有するポリマーの構造を説明する図

【発明を実施するための形態】

【0014】

本発明のピペラジン、ピリジン、イミダゾールまたはカルバゾールの骨格を有するビニル系ポリマーまたはポリアミドで表面が被覆された酸化セリウムのナノ粒子は、本明細書中で、本発明の酸化セリウムのナノ粒子と記載する場合がある。

【0015】

本発明で用いるビニル系ポリマーまたはポリアミドは、図1に示すように、ピペラジン、ピリジン、イミダゾールまたはカルバゾールの骨格を主鎖または側鎖に有する。主鎖や側鎖の任意の位置に置換基を有していてもよいし、ピペラジン、ピリジン、イミダゾールまたはカルバゾール骨格の任意の位置に置換基を有していてもよい。本明細書中で特に断らない限り、置換基は、アルキル基、アセチル基、ヒドロキシル基、アミノ基、シアノ基、カルボキシル基、エステル基、アルデヒド基、アミド基、エーテル基、ケトン基、ハロゲン基、スルホン酸基またはリン酸基である。置換基の数は単数でも複数でもよい。

【0016】

本発明で用いるビニル系ポリマーは、主鎖にメチレン基を有しているポリマーである。例として、ピペラジン骨格を主鎖または側鎖に有するビニル系ポリマーの構造を図2（a）、（b）に示す。図2（a）に示すように、ピペラジン骨格を主鎖に有する場合、主鎖のメチレン基とメチレン基の間に、ピペラジン骨格を有する。

【0017】

本発明で用いるビニル系ポリマーの側鎖に、ピペラジン、ピリジン、イミダゾールまたはカルバゾール骨格を有する場合、図2（b）に示すように、メチレン基の炭素にピペラジン、ピリジン、イミダゾールまたはカルバゾール骨格直接が結合していてもよいし、アルキル基、アミノ基を介して結合していてもよい。

【0018】

本発明で用いるビニル系ポリマーは、側鎖にピペラジン、ピリジン、イミダゾールまたはカルバゾール骨格を有するビニル系ポリマーが好ましい。側鎖にピペラジン、ピリジン、イミダゾールまたはカルバゾール骨格を有するビニル系ポリマーは、ビニル基を有するビニル系モノマーの重合反応によって得られる。

【0019】

ビニル系モノマーの具体例としては、1-ビニルピペラジン、（4-ビニルピペラジン-1-イル）メタンアミン、2-（4-ビニルピペラジン-1-イル）エタン-1-アミン、2-ビニルピペラジン、（3-ビニルピペラジン-1-イル）メタンアミン、2-（3-ビニルピペラジン-1-イル）エタン-1-アミン、（2-ビニルピペラジン-1-イル）メタンアミン、2-（2-ビニルピペラジン-1-イル）エタン-1-アミン、2-ビニルピリジン、3-ビニルピリジン、4-ビニルピリジン、1-ビニルイミダゾール、2-ビニルイミダゾール、4-ビニルイミダゾール、9-ビニルカルバゾールなどが挙げられる。また、上記ビニル系モノマーは、ビニル基以外の任意の位置に、置換基を有していてもよく、ビニル基には、メチル基やシアノ基を置換基として有していてもよい。

【0020】

本発明で用いるビニル系ポリマーは、ホモポリマーであってもよいし、2種類以上のビニル系モノマーを原料としたコポリマーであってもよい。

【0021】

本発明で用いるビニル系ポリマーの好ましい具体例は、ポリ（1-ビニルピペラジン）、ポリ（（4-ビニルピペラジン-1-イル）メタンアミン）、ポリ（2-（4-ビニルピペラジン-1-イル）エタン-1-アミン）、ポリ（2-ビニルピリジン）、ポリ（3-ビニルピリジン）、ポリ（4-ビニルピリジン）、ポリ（1-ビニルイミダゾール）、ポリ（2-ビニルイミダゾール）、ポリ（4-ビニルイミダゾール）、ポリ（9-ビニルカルバゾール）である。

【0022】

本発明で用いるポリアミドは、図2（c）（d）に示すように、ピペラジン骨格を主鎖または側鎖に有するポリマーが好ましく、図2（c）に示す、ピペラジン骨格を主鎖に有するポリマーがより好ましい。

本発明で用いる主鎖にピペラジン骨格を有するポリアミドは、ピペラジン骨格を有するアミンと、ジカルボン酸との重縮合反応によって得られる。

【0023】

ピペラジン骨格を有するアミンの好ましい例としては、ピペラジン、アミノメチルピペラジン、アミノエチルピペラジン、アミノプロピルピペラジン、アミノブチルピペラジン、1, 4-ビス（アミノメチル）ピペラジン、1, 4-ビス（2-アミノエチル）ピペラジン、1, 4-ビス（3-アミノプロピル）ピペラジン、1, 4-ビス（4-アミノブチル）ピペラジンなどが挙げられる。これらの中でも、アミノエチルピペラジン、1, 4-ビス（3-アミノプロピル）ピペラジンがより好ましい。また、これらのアミンは、アミド結合を形成し得る窒素以外の任意の位置に、置換基を有していてもよい。

【0024】

ジカルボン酸の好ましい例としては、1H-イミダゾール-2, 4-ジカルボン酸、1H-イミダゾール-2, 5-ジカルボン酸、1H-イミダゾール-4, 5-ジカルボン酸、ピリジン-2, 3-ジカルボン酸、ピリジン-2, 4-ジカルボン酸、ピリジン-2, 5-ジカルボン酸、ピリジン-2, 6-ジカルボン酸、ピリジン-3, 4-ジカルボン酸、ピリジン-3, 5-ジカルボン酸、アジピン酸、セバシン酸、ドデカジカルボン酸、テレフタル酸、イソフタル酸などが挙げられる。また、これらのジカルボン酸は、アミド結合を形成し得るカルボキシル基以外の任意の位置に、置換基を有していてもよい。

【0025】

本発明で用いるポリアミドは、上記のアミンとジカルボン酸の組み合わせで得られるポリアミドであれば好ましく用いることができ、アミノエチルピペラジンとアジピン酸の組み合わせで得られるポリアミドが特に好ましい。

【0026】

また、本発明で用いるポリアミドは、主鎖にポリアルキレングリコールの構造を有していてもよい。具体的には、アミノエチルピペラジン、アジピン酸、およびビスアミノプロピルポリエチレングリコールの骨格を有するポリアミドが挙げられる。

【0027】

また、本発明で用いるポリアミドは、ピペラジン、ピリジン、イミダゾールまたはカルバゾールの骨格を有するポリアミドと、その他のポリマーとの混合物や、共重合体であってもよい。この場合、その他のポリマーの具体例としては、ポリカプロアミド（ナイロン6）、ポリヘキサメチレンアジパミド（ナイロン66）、ポリテトラメチレンアジパミド（ナイロン46）、ポリペンタメチレンアジパミド（ナイロン56）、ポリペンタメチレンセバカミド（ナイロン510）、ポリヘキサメチレンセバカミド（ナイロン610）、ポリヘキサメチレンドデカミド（ナイロン612）、ポリヘキサメチレンアジパミド／ポリヘキサメチレンテレフタルアミドコポリマー（ナイロン66／6T）、ポリヘキサメチレンアジパミド／ポリヘキサメチレンテレフタルアミド／ポリヘキサメチレンイソフタルアミドコポリマー（ナイロン66／6T／6I）、ポリヘキサメチレンテレフタルアミド／ポリヘキサメチレンイソフタルアミドコポリマー（ナイロン6T／6I）、ポリキシレンアジパミド（ナイロンXD6）などが挙げられる。

【0028】

本発明で用いるビニル系ポリマーやポリアミドの分子量は、3000以上100000以下であればよく、10000以上50000以下であることが好ましい。

【0029】

本発明の酸化セリウムのナノ粒子は、 Ce_2O_3 と CeO_2 の混合物で構成される酸化セリウム粒子（本明細中では中心核と記載する場合がある）を中心として、その表面が上記のポリマーで被覆された構造を有する。中心核の粒径は、1nm以上100nm以下程度であればよい。当該粒径は、透過型電子顕微鏡を使って、長軸径、短軸径、定方向径のうち2つ以上の長さを測定し、その平均値を粒子径として算出する。

【0030】

中心核の Ce_2O_3 と CeO_2 の比率は、セリウム（III）とセリウム（IV）の比として算出することができる。比を算出する際には、本発明の酸化セリウムのナノ粒子を乾燥させ、X線光電子分光法（XPS）により算出すればよい。

【0031】

本発明の酸化セリウムのナノ粒子の好ましい粒径は、表面のポリマー層を含めて、流体力学的直径として、200nm以下が好ましい。流体力学的直径は、本発明の酸化セリウムのナノ粒子を、水、エタノール、ピリジンなどの任意の溶媒に溶解し、動的光散乱を測定して自己相関関数を導き、マルカート法（Marquadt法）によって解析し、個数変換ヒストグラムから平均粒子径として算出する。動的光散乱の測定には、大塚電子株式会社のELS-Zを用いる。

【0032】

本発明の酸化セリウムのナノ粒子は、工程 a：ピペラジン、ピリジン、イミダゾールまたはカルバゾールの骨格を有するポリマーの溶液と、セリウム（III）イオンを含む溶液またはセリウム（III）塩とを混合し、混合溶液を得る工程、および

工程 b：工程 a で得られた混合溶液に酸化剤を添加する工程、を含む、酸化セリウムのナノ粒子の製造方法によって製造することができる。以下、本発明の酸化セリウムのナノ粒子の製造方法を工程別に説明する。

【0033】

工程 a は、ピペラジン、ピリジン、イミダゾールまたはカルバゾールの骨格を有するポリマーの溶液と、セリウム（III）イオンを含む溶液またはセリウム（III）塩とを混合し、混合溶液を得る工程である。工程 a で用いるポリマーの溶液は、上記のポリマーを任意の溶媒に溶解して調製することができる。溶媒は、水または水と相溶性のある溶媒が好ましい。水と相溶性のある溶媒の具体例としては、例えば、メタノール、エタノール、プロパノール、ブタノール、テトラヒドロフラン、グリセロール、エチレングリコール、アセトン、ジメチルホルムアミド（DMF）、ジメチルスルホキシド（DMSO）、トリエチルアミン、ピリジンなどが挙げられる。ポリアミドやポリビニルイミダゾールであれば水に溶解することが好ましく、ポリ（4-ビニルピリジン）、ポリ（2-ビニルピリジン）であれば80%エタノール水溶液に溶解することが好ましく、ポリビニルカルバゾールであればピリジンに溶解することが好ましい。ポリマーが溶解しにくい場合、加温や超音波処理をして溶解してもよい。

【0034】

ポリマーの溶液の濃度は重量濃度で、0.01%以上5%以下が好ましく、0.1%以上2%以下がより好ましい。

【0035】

ポリマーの溶液と、セリウム（III）イオンを含む溶液またはセリウム（III）塩との混合方法は、ポリマーの溶液と、セリウム（III）イオンを含む溶液をそれぞれ調製して混合してもよいし、ポリマーの溶液の溶媒が水または、水と相溶性のある溶媒である場合には、ポリマーの溶液にセリウム（III）塩を添加して混合してもよい。セリウム（III）イオンを含む溶液は、セリウム（III）塩を任意の溶媒に溶解して調製すればよい。セリウム（III）塩には、例えば硝酸セリウム（III）・六水和物を用いればよい。

【0036】

セリウム（III）塩として、硝酸セリウム（III）・六水和物を用いる場合には、ポリマーに対する硝酸セリウム（III）・六水和物の重量比が、0.1以上5.0以下になるように混合することが好ましい。混合溶液は、溶液が均一になるまで5分以上混合することが好ましい。

【0037】

工程 b は、工程 a で得られた混合溶液に酸化剤を添加する工程である。工程 b で用いる酸化剤は、硝酸、硝酸カリウム、次亜塩素酸、亜塩素酸、塩素酸、過塩素酸、ハロゲン、ハロゲン化水素、過マンガン酸塩、クロム酸、ニクロム酸、シュウ酸、硫化水素、二酸化硫黄、チオ硫酸ナトリウム、硫酸、過酸化水素などが挙げられる。これらの中でも特に過酸化水素が好ましい。添加量は、セリウム（III）イオンに対してモル等量として、0.1等量以上10等量以下であればよく、好ましくは1等量以上2等量以下である。

【0038】

工程 a で得られた混合溶液に酸化剤を添加すると、セリウム（III）イオンがセリウム（IV）に酸化され、 Ce_2O_3 と CeO_2 の混合物で構成される酸化セリウム粒子を中心として、その表面が上記のポリマーで被覆された粒子の形成反応が開始される。ポリマーとセリウム（III）イオンの混合溶液に酸化剤を添加すると、本発明の酸化セリウムのナノ粒子の形成反応が始まる。また、その反応の際には、溶液が黄色、橙色、赤色、褐色などに着色する。これは、セリウム（III）イオンが、セリウム（IV）に変化することによる呈色であり、着色度合いは、酸化セリウムのナノ粒子の表面に存在するセリ

ウム（III）とセリウム（IV）の比で決定する。反応終了は色の変化がなくなった点で判断することができる。通常30分～1時間程度で反応は終了する。

【0039】

例えば、0.1重量%のポリビニルイミダゾール水溶液5mlに対し、10重量%の硝酸セリウム（III）六水和物水溶液を100 μ l添加して混合し、その後、1.2重量%の過酸化水素水溶液を100 μ l添加して40℃に加温すると、溶液が最初は黄色に変化し、その後徐々に黄色が濃くなり、最終的に橙色に変化して反応が終了する。

【0040】

本発明の酸化セリウムのナノ粒子の大きさは、ポリマーの溶液の濃度によって調整することができる。高い濃度のポリマーの溶液を用いれば、大きな粒径の粒子が得られ、低い濃度のポリマーの溶液を用いれば、小さな粒径の粒子が得られる。

【0041】

本発明の酸化セリウムのナノ粒子は、反応終了後の溶液中で保存してもよいし、本発明の酸化セリウムのナノ粒子を反応終了後の溶液から取り出して、乾燥させた状態で保存してもよい。溶液中で保存する場合、冷蔵保存が好ましい。本発明の酸化セリウムのナノ粒子を乾燥させる場合には、まず、反応終了後の溶液を限外ろ過膜で濾過したり、半透明膜で透析したりして、反応終了後の溶液中に残存している未反応の酸化剤およびセリウム（III）イオン並びに余分なポリマーを除去し、エバポレーターや凍結乾燥機などを用いて乾燥させればよい。

【0042】

本発明の酸化セリウムのナノ粒子を用いれば、核酸やポリペプチドを分解することができる。例えば、核酸とポリペプチドを主成分とする、ウイルスを分解できる可能性がある。

【0043】

本明細書において、核酸を分解するとは、核酸を構成するヌクレオチド鎖に切断が起こることを意味する。核酸が分解されると、核酸の立体構造が変化したり、核酸の断片化がおきたりする。例えば、プラスミドのような環状2本鎖核酸の場合、核酸が切断されていない状態では、クロズドサーキュラー構造、2本鎖のうちの1本が切断されるとオープンサーキュラー構造、2本鎖が両方切断されるとリニア構造となる。

【0044】

本明細書において、ポリペプチドを分解するとは、ポリペプチド鎖に切断が起こることを意味し、ポリペプチドの立体構造が変化したり、ポリペプチドの断片化がおきたりする。

【0045】

本発明の酸化セリウムのナノ粒子を用いて核酸やポリペプチドを分解する場合には、乾燥させた状態で、核酸やポリペプチドを含む試料と接触させてもよいし、本発明の酸化セリウムのナノ粒子を含む溶液として、上記反応終了後の溶液をそのまま核酸やポリペプチドを含む試料と接触させてもよい。接触の方法としては、核酸やポリペプチドを含む試料が液体である場合には、本発明の酸化セリウムのナノ粒子または、本発明の酸化セリウムのナノ粒子を含む溶液を添加して混合すればよい。また、本発明の酸化セリウムのナノ粒子を含む溶液を、霧状にして空間に散布すれば、ウイルス等の空气中に存在する核酸やポリペプチドを含む試料と接触させることができる。また、本発明の酸化セリウムのナノ粒子を、繊維、チューブ、ビーズ、ゴム、フィルム、プラスチック等に添加剤として練り込んだり、これらの表面に塗布したりして、核酸やポリペプチドを含む試料と接触させることもできる。本発明の酸化セリウムのナノ粒子を含む溶液を調製する場合には、水や任意の溶液と混合すればよい。

【0046】

本発明の酸化セリウムのナノ粒子で分解可能な核酸は、ヌクレオチドが直鎖状または環状に重合した核酸であれば、特に限定はなく、人工核酸でもよい。核酸には、例えば、RNA、DNA、RNA/DNA（キメラ）などが挙げられる。DNAには、cDNA、マ

マイクロDNA (miDNA)、プラスミドDNA、ゲノムDNA、及び合成DNA、セルフリーDNA (cfDNA)、ctDNA、ミトコンドリアDNA (mtDNA)などが挙げられる。また、RNAには、total RNA、mRNA、rRNA、miRNA、siRNA、snRNA、snRNAもしくはnon-coding RNA、それらの前駆体又は合成RNAなどが挙げられる。合成DNA及び合成RNAは、所定の塩基配列(天然型配列又は非天然型配列のいずれでもよい)に基づいて、例えば自動核酸合成機を用いて、人工的に調製したものである。人工核酸には、例えばLNA、BNAが挙げられる。分解にあたっては、これらの核酸を含む任意の試料を用いることができる。

【0047】

本発明の酸化セリウムのナノ粒子で分解可能なポリペプチドは、タンパク質や、所定のアミノ酸配列(天然型配列又は非天然型配列のいずれでもよい)に基づいて、人工的に合成したポリペプチドなどが挙げられる。

【0048】

また、主鎖にポリペプチド構造を保持した核酸様の構造を有するポリペプチド核酸(PNA)や、タンパク質と核酸が主成分であるウイルスなども、核酸またはポリペプチドを含む試料として用いることができる。

【0049】

核酸が分解されたことを確認する方法には、アクリルアミドゲル電気泳動、アガロースゲル電気泳動およびキャピラリー電気泳動などの電気泳動、サイズ排除クロマトグラフィー、質量分析等を用いて核酸を分析する方法が挙げられる。核酸が分解された場合、分解前と比べて対象のバンド濃度やピーク強度が減少、バンドやピークの消失などを確認することができる。また、分解前と比べて、小さい断片の存在を示す新規バンドやピークが出現したりすることでも確認できる。具体的には、環状2本鎖核酸が分解した場合、クローズドサーキュラー構造、オープンサーキュラー構造、リニア構造は、電気泳動で別々のバンドとして確認できる。また、核酸が分解によって立体構造が変化すると、電気泳動の結果、分解前と比べてバンドの位置が変化する場合もある。

【0050】

ポリペプチドが分解されたことは、上記の核酸の分解の確認と同様の方法で確認することができる。

【0051】

核酸やポリペプチドの分解率は、以下の方法で分解率を算出することができる。まず、核酸やポリペプチドを含む試料を本発明の酸化セリウムのナノ粒子と接触させたサンプル(以降本明細書中では、単にサンプルと記載する場合がある。)を調製する。コントロールのバンドには、本発明の酸化セリウムのナノ粒子と接触させていない核酸やポリペプチドを含む試料を用いる。前記本発明の酸化セリウムのナノ粒子と接触させたサンプルと、コントロールを上記の電気泳動、サイズ排除クロマトグラフィーなどで分析する。電気泳動を用いる場合は、コントロールとサンプルを電気泳動して、同じ位置のバンド濃度を確認して、それぞれバンドの濃度を数値化し、コントロールのバンド濃度値を(X)、サンプルのバンド濃度値を(Y)として、(X)と(Y)の差を取り、この値の(X)に対する割合を分解率とする。本発明の酸化セリウムのナノ粒子と、核酸やポリペプチドを含む試料を接触させた際に、本発明の酸化セリウムのナノ粒子に、核酸やポリペプチドが吸着した場合には、任意の溶出液を用いて核酸やポリペプチドを溶出させて回収すればよい。溶出液には、クエン酸とクエン酸ナトリウムを含むクエン酸緩衝液、リン酸とリン酸ナトリウムを含むリン酸緩衝液、トリスヒドロキシアミノメタンと塩酸を含むTris-塩酸緩衝液にEDTAを添加したTris-EDTA緩衝液などを用いることができる。

【実施例】

【0052】

本発明を以下の実施例によってさらに具体的に説明する。

【0053】

<材料と方法>

ポリアクリル酸ナトリウム、ポリ（４－ビニルピリジン）、ポリ（２－ビニルピリジン）はメルク株式会社より、ポリ（１－ビニルイミダゾール）とポリ（９－ビニルカルバゾール）は丸善石油化学株式会社より、硝酸セリウム（Ⅲ）六水和物と３０重量％過酸化水素水は富士フイルム和光純薬株式会社より入手した。

【００５４】

その他の試薬については、富士フイルム和光純薬株式会社、東京化成株式会社、シグマ－アルドリッチジャパン合同会社から購入し、特に精製することなくそのまま用いた。

【００５５】

以下の実施例では、アミノエチルピペラジンとアジピン酸を構造単位として有するポリマーをポリアミド（１）、アミノエチルピペラジンとビスアミノプロピルポリエチレングリコールとアジピン酸を構造単位として有するポリマーをポリアミド（２）としてそれぞれ記載し、これらのポリマーは、特開平１１－１６６１２１を参考に調製した。

【００５６】

ホットプレートはIKAジャパン株式会社のIKA C-MAG HP4を用いた。ポリマーで表面が被覆された酸化セリウムのナノ粒子の流体力学的直径の測定には、大塚電子株式会社のゼータ電位・粒子測定システムELS-Zを用い、セリウム（Ⅲ）とセリウム（Ⅳ）の比は、PHI社のQuanter a SXMを用いた。

【００５７】

（実施例１）ポリアミド（１）で表面が被覆された酸化セリウムのナノ粒子の調製
ピペラジン骨格を有するポリマーの水溶液として、０．１％のポリアミド（１）水溶液を用いた。０．１重量％のポリアミド（１）水溶液５ｍｌに対し、１０重量％の硝酸セリウム（Ⅲ）六水和物水溶液を１００μｌ添加し、室温で５分間攪拌した。その後、１．２重量％の過酸化水素水溶液を１００μｌ添加し、４０℃に加温して１時間反応させ、ポリアミド（１）で表面が被覆された酸化セリウムのナノ粒子の黄色水溶液を得た。当該水溶液を３０ｋＤの限外ろ過膜で精製し、ポリアミド（１）で表面が被覆された酸化セリウムのナノ粒子を溶液として得た。

【００５８】

（実施例２）ポリアミド（２）で表面が被覆された酸化セリウムのナノ粒子の調製
ピペラジン骨格を有するポリマーの水溶液として、０．１％のポリアミド（２）水溶液を用いた以外は実施例１と同様の条件で反応を行い、ポリアミド（２）で表面が被覆された酸化セリウムのナノ粒子の黄色水溶液を得た。当該水溶液を３０ｋＤの限外ろ過膜で精製し、ポリアミド（２）で表面が被覆された酸化セリウムのナノ粒子を溶液として得た。

【００５９】

（実施例３）ポリ（１－ビニルイミダゾール）で表面が被覆された酸化セリウムのナノ粒子の調製

イミダゾール骨格を有するポリマーの水溶液として、０．１％のポリ（１－ビニルイミダゾール）水溶液を用いた以外は実施例１と同様の条件で反応を行い、ポリ（１－ビニルイミダゾール）で表面が被覆された酸化セリウムのナノ粒子の橙色水溶液を得た。当該水溶液を３０ｋＤの限外ろ過膜で精製し、ポリ（１－ビニルイミダゾール）で表面が被覆された酸化セリウムのナノ粒子を溶液として得た。

【００６０】

（実施例４）ポリ（４－ビニルピリジン）で表面が被覆された酸化セリウムのナノ粒子の調製

ピリジン骨格を有するポリマーの水溶液として０．１％のポリ（４－ビニルピリジン）の８０％エタノール水溶液５ｍｌを用いた以外は実施例１と同様の条件で反応を行い、ポリ（４－ビニルピリジン）で表面が被覆された酸化セリウムのナノ粒子の赤褐色溶液を得た。当該水溶液にエタノール添加して７０容量％に希釈し、３０ｋＤの限外ろ過膜で精製し、遠心エバポレーターで溶媒を除去してジメチルスルホキシドに再溶解して、ポリ（４－ビニルピリジン）で表面が被覆された酸化セリウムのナノ粒子を溶液として得た。

【００６１】

（実施例5）ポリ（2-ビニルピリジン）で表面が被覆された酸化セリウムのナノ粒子の調製

ピリジン骨格を有するポリマーの水溶液として0.1%のポリ（2-ビニルピリジン）の80%エタノール水溶液を用いた以外は実施例1と同様の条件で反応を行い、ポリ（2-ビニルピリジン）で表面が被覆された酸化セリウムのナノ粒子の褐色溶液を得た。当該水溶液にエタノール添加して70容量%に希釈し、30kDの限外ろ過膜で精製し、遠心エバポレーターで溶媒を除去してジメチルスルホキシドに再溶解して、ポリ（2-ビニルピリジン）で表面が被覆された酸化セリウムのナノ粒子を溶液として得た。

【0062】

（実施例6）ポリ（9-ビニルカルバゾール）で表面が被覆された酸化セリウムのナノ粒子の調製

カルバゾール骨格を有するポリマーの水溶液として、0.1%のポリ（9-ビニルカルバゾール）のピリジン溶液を用いた以外は実施例1と同様の条件で反応を行い、ポリ（9-ビニルカルバゾール）で表面が被覆された酸化セリウムのナノ粒子の橙色溶液を得た。当該水溶液を、10000Gで1時間遠心して上清を除き、ジメチルスルホキシド（DM SO）に再溶解して、ポリ（9-ビニルカルバゾール）で表面が被覆された酸化セリウムのナノ粒子を溶液として得た。

【0063】

（比較例1）ポリアクリル酸で表面が被覆された酸化セリウムのナノ粒子の調製

ポリマー水溶液として、1重量%のポリアクリル酸ナトリウム水溶液を用いた以外は、実施例1と同様の条件で反応を行い、ポリアクリル酸ナトリウムで表面が被覆された酸化セリウムのナノ粒子の黄色水溶液を得た。当該水溶液を、30kDの限外ろ過膜で精製し、ポリアクリル酸で表面が被覆された酸化セリウムのナノ粒子を溶液として得た。

【0064】

（実施例7）表面がポリマーで被覆された酸化セリウムのナノ粒子の流体力学的直径の測定

実施例1～6で調製したポリマーで表面が被覆された酸化セリウムのナノ粒子の流体力学直径を動的光散乱（DLS）によって測定した。測定時の溶媒は、ポリマーがポリアミド（1）、ポリアミド（2およびポリ（1-ビニルイミダゾール）の場合は水、ポリ（4-ビニルピリジン）またはポリ（2-ビニルピリジン）の場合はエタノール、ポリ（9-ビニルカルバゾール）の場合はピリジンを用いた。個数換算により流体力学直径の平均粒子径を得た。得られた値を表1に示す。

【0065】

【表1】

【表1】

表面をポリマーで被覆された酸化セリウムのナノ粒子		流体力学直径 [nm] (実施例7)	Ce ³⁺ /Ce ⁴⁺ (実施例8)
ポリアミド（1）	実施例1	12.6±2.9	1.92
ポリアミド（2）	実施例2	9.8±2.1	1.88
ポリ（1-ビニルイミダゾール）	実施例3	12.4±2.9	1.75
ポリ（4-ビニルピリジン）	実施例4	9.4±1.8	1.24
ポリ（2-ビニルピリジン）	実施例5	10.9±4.0	1.42
ポリ（9-ビニルカルバゾール）	実施例6	24.8±3.6	4.00

【0066】

（実施例8）表面がポリマーで被覆された酸化セリウムのナノ粒子のCe³⁺/Ce⁴⁺比の測定

実施例1～6で得られた酸化セリウムのナノ粒子のCe⁴⁺に対するCe³⁺の比をX

線光電子分光法（XPS）によって測定した。測定において、励起X線をmonochromatic AlK_{α1,2}線（1486.6 eV）、X線径を200 μm、光電子脱出角度を45°とした。測定にあたり、実施例1～3で調製した酸化セリウムのナノ粒子は精製後に水で凍結乾燥し、実施例4～6で調製した酸化セリウムのナノ粒子は精製後に遠心エバポレーターで乾燥したものをを用いた。得られた値を表1に示す。

【0067】

（実施例9）核酸の分解試験

実施例1～6で調製したナノ粒子の溶液をそれぞれ2 mg/mlになるように濃度を調整した。最初に、実施例1～6で調製したナノ粒子の溶液中に含まれる本発明の酸化セリウムのナノ粒子の濃度を以下のように算出した。重量を測定したカバーガラスに、実施例1～6で調製したナノ粒子の溶液を滴下し、ホットプレートで加熱した。空冷後、カバーガラスの重量をもう一度測定し、加熱前の重量と差を取ることで、本発明の酸化セリウムのナノ粒子の重量を求めた。この重量を滴下した溶液量で割り、本発明の酸化セリウムのナノ粒子溶液の濃度とした。この濃度の値を基に、本発明の酸化セリウムのナノ粒子の濃度をそれぞれ調整し、以下の実験に用いた。

【0068】

実施例1～3で調製した本発明の酸化セリウムのナノ粒子の溶液2 μl、核酸を含む試料として100 ng/μlのpUC19の溶液0.5 μl、および50 mM酢酸緩衝液（pH5）2.5 μlを加え、室温で1時間静置し、核酸の分解反応を行った。

【0069】

実施例4～6で調製した2 mg/mlの本発明の酸化セリウムのナノ粒子の溶液を2 μl、核酸を含む試料として100 ng/μlのpUC19の溶液0.5 μl、および150 mM酢酸緩衝液（pH5）0.5 μlを加え、室温で1時間静置し、核酸の分解反応を行った。

【0070】

コントロールとして、水2 μl、100 ng/μlのpUC19を0.5 μl、および50 mM酢酸緩衝液（pH5）2.5 μlを加え、室温で1時間静置した。

【0071】

それぞれの反応後の溶液に、10% SDSを2 μlと0.5 Mのリン酸緩衝液（pH7）を3 μl加えてアガロースゲルで電気泳動を行った。

【0072】

電気泳動したアガロースゲルをエチジウムブロマイドで染色し、pUC19のバンドを検出した。核酸を含む試料を実施例1～6に記載の酸化セリウムのナノ粒子と接触させると、pUC19が切断されて、pUC19のクローズドサーキュラー構造のバンドと、オープンサーキュラー構造の新規バンドが確認できた。一方、コントロールでは、オープンサーキュラー構造のバンドは確認されず、クローズドサーキュラー構造のバンドのみが確認された。

【0073】

それぞれのクローズドサーキュラー構造のバンド濃度（Y）を算出して、コントロールのクローズドサーキュラー構造のバンド濃度を（X）との差を取り、この値の（X）に対する割合を分解率として算出した。結果を表2に示した。

【0074】

これらの結果から、本発明の酸化セリウムのナノ粒子を用いると、高い分解率で核酸を分解できることが確認できた。

【0075】

（比較例2）核酸の分解試験

比較例1で調製した酸化セリウムのナノ粒子の溶液を用いた以外は、実施例8と同様の操作および条件で核酸の分解反応を行い、結果を表2に示した。本比較例2では、pUC19切断は観察されなかった。

【0076】

【表2】

【表2】

表面をポリマーで被覆された 酸化セリウムのナノ粒子		核酸の分解率 [%]
ポリアミド (1)	実施例 1	78.3
ポリアミド (2)	実施例 2	73.7
ポリ (1-ビニルイミダゾール)	実施例 3	82.2
ポリ (4-ビニルピリジン)	実施例 4	39.4
ポリ (2-ビニルピリジン)	実施例 5	58.1
ポリ (9-ビニルカルバゾール)	実施例 6	51.6
ポリアクリル酸	比較例 1	7.4

【0077】

(実施例10) ポリペプチドの分解試験

0.2 mg/ml になるように調整した実施例2で調製した本発明の酸化セリウムのナノ粒子の溶液 3 μ l、ポリペプチドを含む試料として 1 mg/ml のオボアルブミン (OVA) 3 μ l、および 50 mM 酢酸緩衝液 (pH 5) 6 μ l を加え、40°C で 1 時間静置し、ポリペプチドの分解反応を行った。

【0078】

コントロールとして、滅菌蒸留水 3 μ l、1 mg/ml の OVA 3 μ l、および 50 mM 酢酸緩衝液 (pH 5) 6 μ l を加え、40°C で 1 時間静置し、ポリペプチドの分解反応を行った。

【0079】

それぞれの反応後の溶液に、NuPAGE LDS Sample Buffer (ThermoFisher 社) を 4 μ l 加え、95°C で 10 分間加熱し、アクリルアミドゲルで電気泳動を行った。

【0080】

電気泳動したアクリルアミドゲルを Oriole (Bio-RAD 社) で染色し、OVA のバンドを検出した。ポリペプチドを含む試料を実施例2に記載の酸化セリウムのナノ粒子と接触させると、OVA が分解されてバンド濃度が低下し、スメアな新規バンドが確認できた。一方、コントロールでは、分解を示すスメアなバンドは確認されなかった。

【0081】

コントロールのバンドの濃度 (X) と、コントロールと同じ分子量の位置の本実施例10のバンドの濃度 (Y) をそれぞれ算出し、(X) と (Y) の差を取り、この値の (X) に対する割合を分解率として算出した。結果を表3に示した。

【0082】

本結果から、本発明の酸化セリウムのナノ粒子を用いると、高い分解率でポリペプチドを分解できることが確認できた。

【0083】

(比較例3) ポリペプチドの分解

比較例1で調製した酸化セリウムのナノ粒子の溶液を用いた以外は、実施例10と同様の操作および条件でポリペプチドの分解反応を行い、ポリペプチドの分解率を算出して、結果を表3に示した。ポリペプチドの分解はほとんど確認できなかった。

【0084】

【表3】

【表3】

表面をポリマーで被覆された 酸化セリウムのナノ粒子		ポリペプチドの分解率[%]
ポリアミド(2)	実施例2	82.7
ポリアクリル酸	比較例1	17.2

【書類名】特許請求の範囲

【請求項1】

ピペラジン、ピリジン、イミダゾールまたはカルバゾールの骨格を有するビニル系ポリマーまたはポリアミドで、表面が被覆された酸化セリウムのナノ粒子。

【請求項2】

前記ビニル系ポリマーが、前記骨格を側鎖に有するポリマーであることを特徴とする請求項1に記載のナノ粒子。

【請求項3】

前記ポリアミドが、前記骨格を主鎖に有するポリマーであることを特徴とする請求項1に記載のナノ粒子。

【請求項4】

核酸の分解方法であって、前記核酸を含む試料を請求項1～3のいずれかに記載のナノ粒子と接触させることを特徴とする方法。

【請求項5】

ポリペプチドの分解方法であって、前記ポリペプチドを含む試料を請求項1～3のいずれかに記載のナノ粒子と接触させることを特徴とする方法。

【請求項6】

ポリマーで表面が被覆された酸化セリウムのナノ粒子の製造方法であって、
工程a：ピペラジン、ピリジン、イミダゾールまたはカルバゾールの骨格を有するポリマーの溶液と、セリウム（III）イオンを含む溶液またはセリウム（III）塩とを混合し、混合溶液を得る工程、および
工程b：工程aで得られた混合溶液に酸化剤を添加する工程、を含む、ナノ粒子の製造方法。

【書類名】要約書

【要約】

【課題】本発明は、新規な酸化セリウムのナノ粒子を提供すること、および当該ナノ粒子の新しい用途を見いだすことを課題とする。

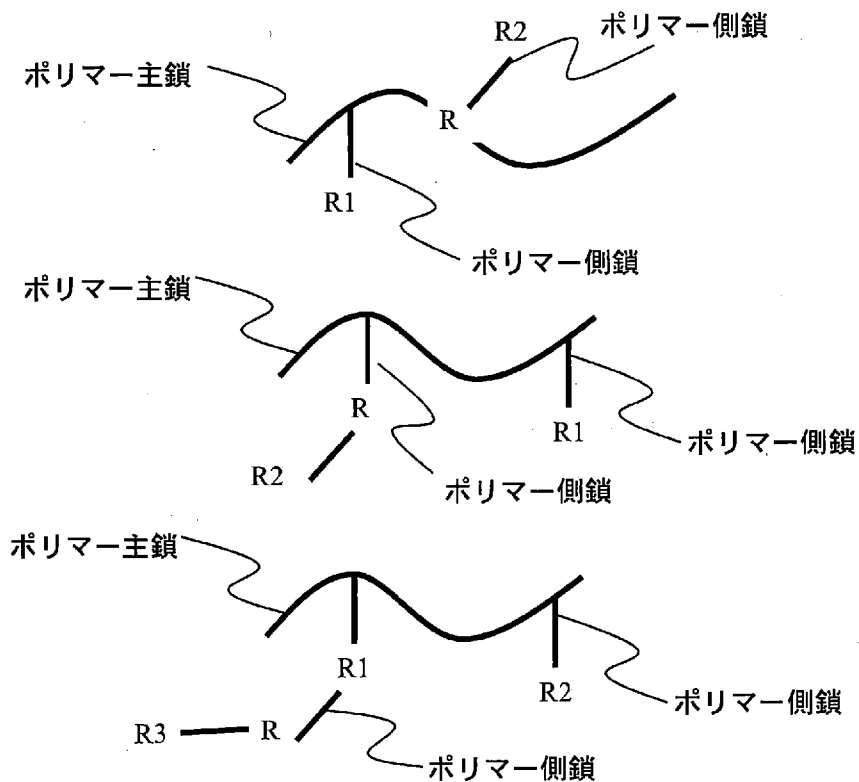
【解決手段】本発明は、ピペラジン、ピリジン、イミダゾールまたはカルバゾールの骨格を有するビニル系ポリマーまたはポリアミドで、表面が被覆された酸化セリウムのナノ粒子および当該酸化セリウムのナノ粒子を用いる核酸またはポリペプチドを分解する方法を提供する。

【選択図】なし

【書類名】 図面

【図 1】

【図 1】

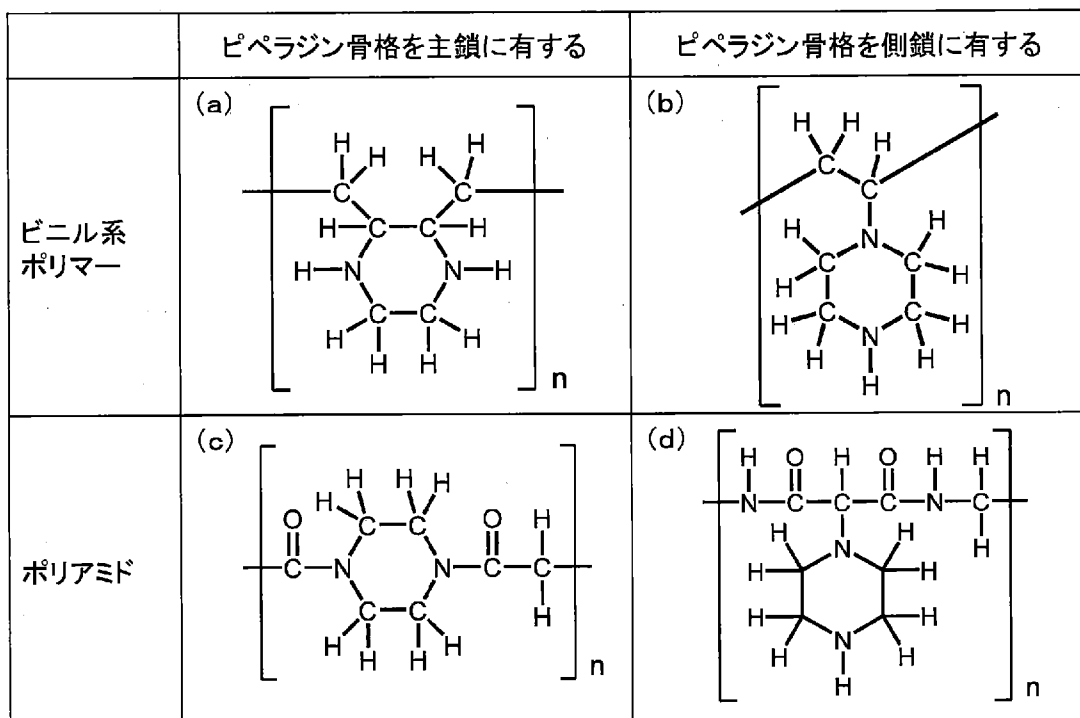


Rはピペラジン、ピリジン、イミダゾールまたはカルバゾール骨格

R1、R2、R3は任意の置換基

【図 2】

【図 2】



nは任意の整数

出願人履歴

000003159

20050818

住所変更

東京都中央区日本橋室町2丁目1番1号

東レ株式会社