

図3. プロリン型誘導体 13 の合成スキーム

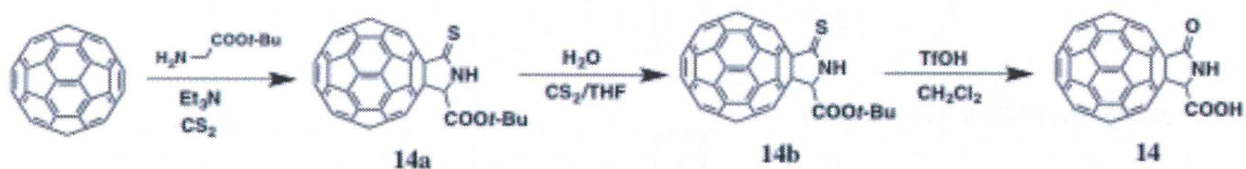


図4. プロリン型誘導体 14 の合成スキーム

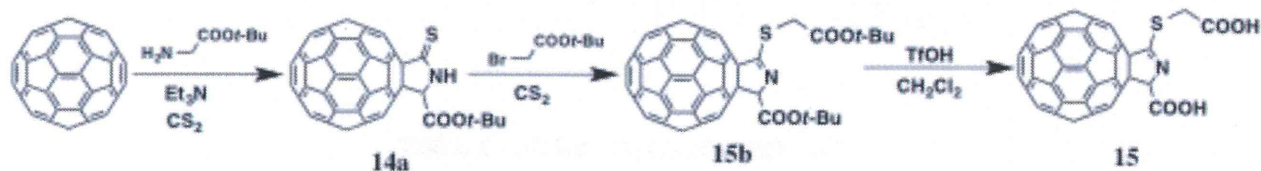
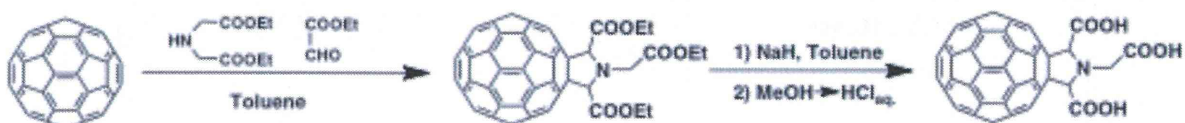


図5. プロリン型誘導体 15 の合成スキーム

従来法 (エチルエステル経由)



改良法 (tert-ブチルエステル経由)

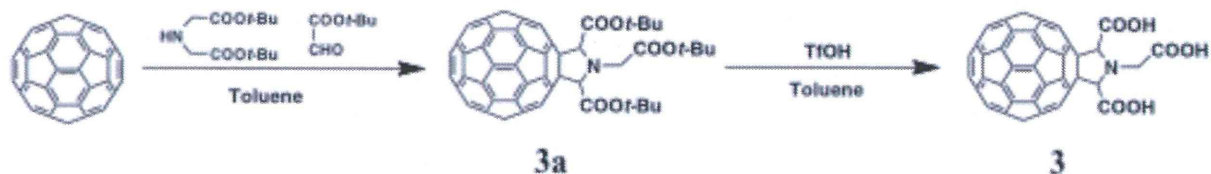


図6. プロリン型誘導体 3 の新規合成法



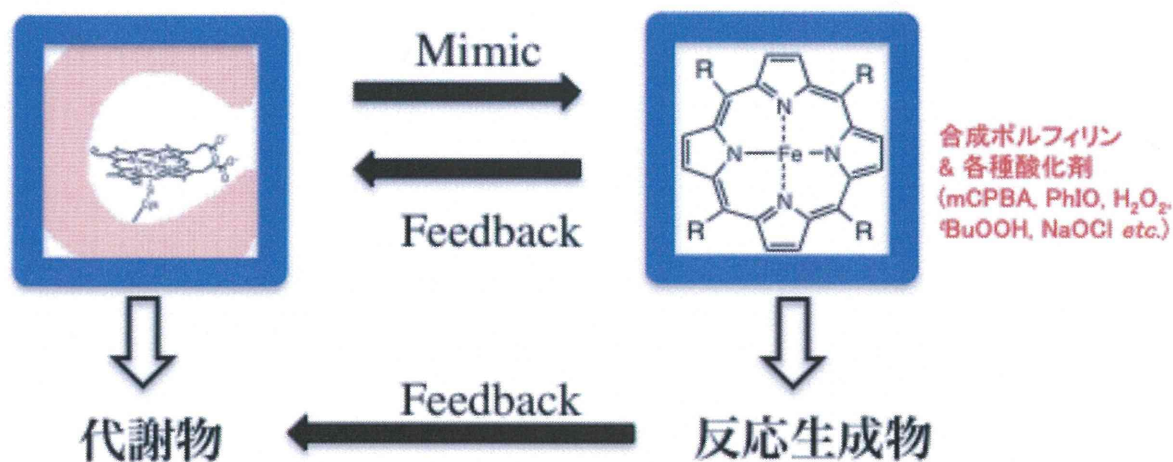


図9. Cytochrome P450化学モデルの概念図

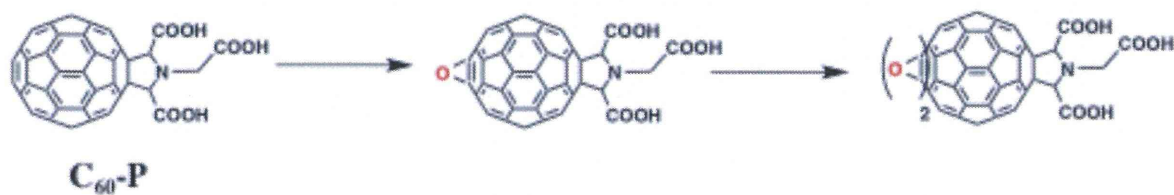
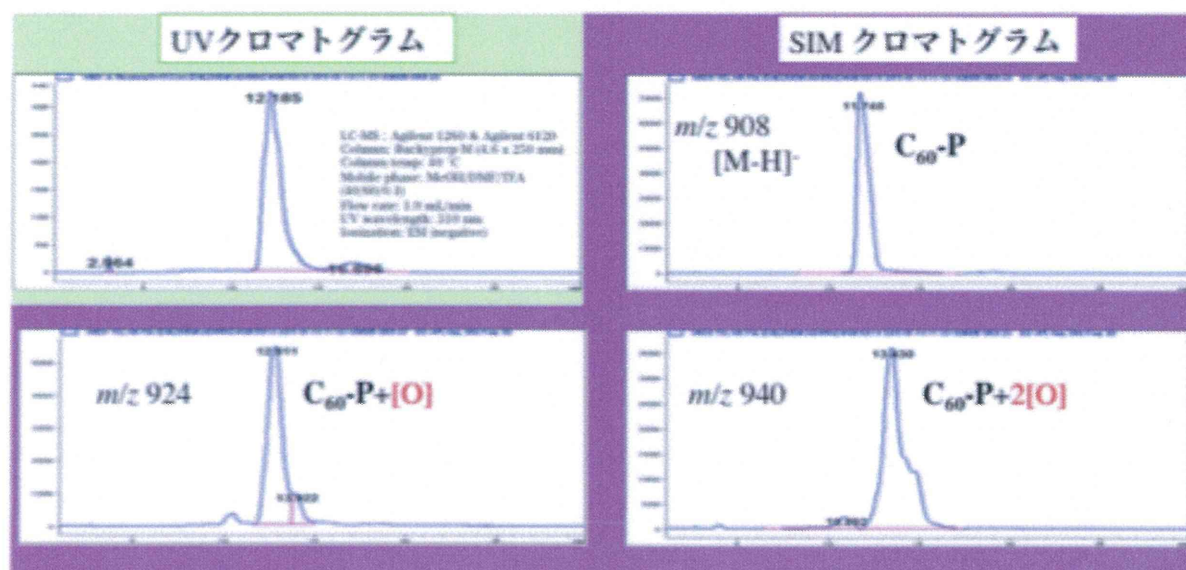


図10. プロリン型誘導体 3 のP450化学モデル系での酸化後のクロマトグラム

## 医薬品原体候補のフラレーン誘導体創製と基礎的効果に関する研究

研究分担者 青島 央江 ビタミン C60 バイオリサーチ株式会社 事業本部

### 研究要旨

医薬品原体候補のフラレーン誘導体を創製：これまでの研究で合成された様々なフラレーン誘導体のうち、細胞障害性、抗酸化・抗炎症作用等の観点から、最も優れていたプロリン型誘導体(3)（以降、C60-P）に着目した。従来法により C60-P を合成した場合、純度(60-70%)が低いことが課題であったが、増野先生らのグループにより、高純度に C60-P を合成する方法が開発された。当グループにおいて、その再現性およびスケールアップ検討のため、高純度 C60-P の合成を行った結果、再現性良く高純度な C60-P を合成することができた（純度 95.7%）。

フラレーン誘導体の医薬品としての基礎的効果の検証：平成 24 および 25 年度は、ESR を用いて、ヒドロキシルラジカル ( $\cdot\text{OH}$ )および脂質ペルオキシラジカル ( $\text{LOO}\cdot$ )に対する消去作用を測定し、ラジカル種と消去作用の関係を考察した。全てのフラレーン誘導体は、いずれも  $\text{LOO}\cdot$  よりも  $\cdot\text{OH}$  に対する消去作用の方が優れていた。本年度は、スーパーオキシド ( $\text{O}_2^-$ ) および DPPH ラジカルに対する消去作用を評価することにより、C60-P をはじめとするフラレーン誘導体の抗酸化作用に関する基礎的な効果を検証した。Pristine C60 の場合、水素を与えることができないため、DPPH ラジカル消去作用を示さない。しかしながら、プロリン型誘導体の中でも、特に C60-P は、アスコルビン酸に匹敵する DPPH 消去作用を示した。水酸化フラレーンにおいても、プロリン型誘導体と比べて弱いものの、DPPH ラジカル消去作用が認められた。 $\text{O}_2^-$  に対する消去作用は、総体的にプロリン型誘導体よりも水酸化フラレーンのほうが優れている傾向が認められた。プロリン型誘導体の場合、(1)、C60-P、(10)、および(11)の活性は高いものの、プロリン型誘導体(7)~(9)の活性は低かった。抗酸化作用を指標として、様々なラジカルに対する消去作用を比較した結果、総体的に C60-P の活性が優れていた。炎症性腸疾患に対する既存薬である 5-ASA 製剤と比較した場合にも、C60-P は 5-ASA 製剤に匹敵あるいは上回る抗酸化作用を示すことが明らかになった。フラレーン誘導体の中で、アルツハイマー治療薬として、先行して創薬研究が進められているマロン酸誘導体についてもラジカル消去作用を評価し、C60-P の活性と比較した。その結果、C60-P のラジカル消去作用は、マロン酸誘導体よりも優れていることが明らかになった。

フラレーン誘導体の体内動態解明：平成 24~25 年度にかけて、アーク放電法を用いて、フラレーン骨格に $^{14}\text{C}$  を導入した $^{14}\text{C}$ C<sub>60</sub> の合成方法の確立を試みた。その結果、先行文献よりも約 20 倍効率よく、 $^{14}\text{C}$  を C<sub>60</sub> へ導入することに成功し、最終的に得られた $^{14}\text{C}$ C<sub>60</sub> の比放射能=18.6  $\mu\text{Ci}/\text{mg}$  (Total Activity : 198.6  $\mu\text{Ci}$ )であり、収量=11.8 mg であった。しかしながら、アーク放電法は、比放射能の制御が難しく、導入できる  $^{14}\text{C}$  の数に限界がある。また管理区域内の放射能汚染が懸念される。この課題を解決するため、 $^{14}\text{C}$ -3-フェニルプロピオン酸を出発原料とした全合成法による $^{14}\text{C}$ C<sub>60</sub> の合成方法の確立を目指して研究を行った。その結果、収量・収率共に低く、今後、反応条件の最適化等を行う必要があるものの、世界で初めて、全合成法により、 $^{14}\text{C}$ C<sub>60</sub> を合成することに成功した。

## A. 研究目的

本研究は、抗酸化・抗炎症作用に優れるフラレーン誘導体を用いて、プロドラック化などの医用工学的アプローチにより、薬物治療の最適化に叶う「ナノ薬物送達システム (ナノ DDS)」を新規に合成・開発し、難治性炎症性腸疾患 (潰瘍性大腸炎・クローン病) を標的とし、非侵襲的 (経口投与) で、安全かつ有効な予防・治療戦略/技術の確立へと展開することを目指している。

平成 24~25 年度は、創薬開発に進めるべきフラレーン誘導体を選出するため、難治性炎症性腸疾患に対する有効性が期待される複数のフラレーン誘導体を合成した。合成したフラレーン誘導体は、医薬品原体としての基礎的効果を検証するため、ESR を用いてヒドロキシルラジカル ( $\cdot\text{OH}$ ) および脂質ペルオキシラジカル ( $\text{LOO}\cdot$ ) の消去活性を評価した。また、フラレーン誘導体の体内動態解明を目指し、 $^{14}\text{C}$  の合成方法を確立するため、RI 合成方法の最適化を行った。

本年度は、平成 24 年度の研究から、優れた薬効が期待されると考えられた C60-P に引き続き注力して研究を行うこととし、具体的には以下の研究項目を実施することを目的とした。

- (1) 増野先生 G により、高純度 C60-P 法が開発されたことから、再現性を確認するため、高純度 C60-P 合成を行う。
- (2) フラレーン誘導体の医薬品としての基礎的効果を検証するため、DPPH ラジカルおよび  $\text{O}_2$  ラジカルに対する消去作用を評価する。
- (3) 全合成による  $^{14}\text{C}$  の合成の可能性を検討する。

## B. 研究方法

### 1. C60-P の高純度合成 (再現性確認)

#### 1-1. tert-Butyl glyoxylate の合成

100mL 3 つ口フラスコに Di-tert-butyl tartrate (1.0 g)、Iodobenzene diacetate (1.5g)、ジクロロメタン (50 mL) を入れ、室温

で 2 時間攪拌した。反応後、エバポレーターにより溶媒を濃縮し、シリカゲルカラムクロマトグラフィ (展開溶媒: ヘキサン/酢酸エチル=2/1) によって分離精製を行った。展開溶媒を除去し、目的物 tert-Butyl glyoxylate を収量 0.66g、収率 66% で得た。

#### 1-2. ブチル体の合成

500mL 三口フラスコに Fullerene C<sub>60</sub> SUH (600 mg)、tert-Butyl glyoxylate (324 mg)、Di-tert-Butyl imminodiacetate (270 mg)、クロロベンゼン (300 mL) を入れ、90°C 3 時間の条件で加熱攪拌した。反応後、エバポレーターにより溶媒を除去し、シリカゲルフラッシュカラムクロマトグラフィ (展開溶媒: ヘキサン/トルエン=10/1) によって分離精製を行った。展開溶媒を除去後、真空乾燥し、目的物ブチル体(1) を収量 449mg、収率 50% で得た。

#### 1-3. ブチル体(1)→C60-P の合成

100mL 3 つ口フラスコにブチル体(1) (215mg)、Trifluoromethanesulfoonic acid (300 mg)、クロロベンゼン 40mL を入れ、室温で 5 時間攪拌した。沈殿が生成したことを確認し反応を止め、沈殿物をろ別した。ろ別した沈殿物をトルエン、エーテルで洗浄した後、真空乾燥し、目的物 C60-P を収量 160mg、収率 88% で得た。

#### 1-4. C60-P の分析

プロリン誘導体(3)の LC-MS 分析は、以下の条件で実施した。

カラム: Buckyprep, 4.6 x 250 mm, 40 °C  
移動相: DMF/Methanol/TFA=80/20/0.1 (v/v)  
流速: 0.5 mL/min  
注入量: 5 μL  
検出波長: 335 nm  
MS: APPI MS, Negative

## 2. フラーレン誘導体の抗酸化能評価

### 2-1. DPPH ラジカル消去作用

#### 【溶液調製】

MES Buf. (pH5.5) : MES (5g)に、水を約 200mL 加え、KOH を用いて pH5.5 に調整後、水で 250 mL にメスアップした。

0.5mM DPPH in EtOH : DPPH (4mg)を EtOH (20 mL)に溶解した。

MES Buf. (pH5.5):EtOH:DPPH = 1:1:0.5 で混合し、DPPH working Sol.とした。

#### 【反応液調製・測定】

96 穴マイクロプレートに、測定サンプル(10  $\mu$ L) および DPPH Working Sol. (190  $\mu$ L)を添加し、30 分後に 524 nm における吸光度を測定した。

DPPH・消去作用は、以下の式を用いて算出した。

DPPH・除去率(%) =  $[A_{0\text{DPPH}} - A_{t\text{sample}}] \times 100$

50%阻害濃度を挟む 2 点を用いた回帰式から、DPPH・を 50%消去する濃度(IC<sub>50</sub>)を算出した。

### 2-2. O<sub>2</sub><sup>-</sup>ラジカル消去作用

#### 【溶液調製】

WST working Sol. : WST solution (1 ml)を Buffer solution (19 ml)で希釈した。

Enzyme working Sol. : Enzyme solution をピペティング操作で、均一な懸濁液とした後、15  $\mu$ L を取り、Dilution buffer (2.5 ml)を用いて希釈した。

Sample Sol. : サンプル溶液を Dilution buffer あるいは DMSO で希釈した (DMSO は、妨害物質となりうるため、5%以下になるように調整)。

#### 【反応液調製・測定】 (表 1 参照)

1) 96 穴マイクロプレートにサンプル溶液 (sample, blank 2) もしくは純水 (blank 1, blank 3) を 20  $\mu$ L ずつ添加した。

2) 各ウェルに WST working Sol. を 200  $\mu$ L ずつ加え、プレートミキサーでよく混合した。

3) blank 2 と blank 3 のウェルに Dilution buffer を 20  $\mu$ L ずつ添加した。

4) サンプル溶液を入れたウェルと blank 1 のウェルに Enzyme working Sol. を 20  $\mu$ L ずつ加えた(Enzyme working Sol.を加えるとすぐにスーパーオキシドの発生開始)。

5) 37°Cで 20 分間インキュベートした。

6) プレートリーダーを用いて、450 nm における吸光度を測定した。

7) SOD 活性値(阻害率%) は、下記の計算式により求め、IC<sub>50</sub>を算出した。

SOD 活性値(Formazan 生成阻害率 %) =

$$\frac{[(A_{\text{blank1}} - A_{\text{blank3}}) - (A_{\text{sample}} - A_{\text{blank2}})]}{(A_{\text{blank1}} - A_{\text{blank3}})} \times 100$$

### 2-3. ESR による OH ラジカル消去作用

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> と Fe<sup>2+</sup>を混合し、フェントン反応により・OH を発生させた。スピントラップ剤として、5,5-Dimethyl-1-pyrroline N-oxide (DMPO)を用い、生成した・OH と DMPO が反応し、DMPO-・OH アダクトとして、電子スピン共鳴 (ESR; Electron Spin Resonance) を用いて検出した。測定試料の OH・消去作用は、試料添加による DMPO-・OH アダクトのシグナル強度減少を指標とした。シグナル強度の外部標準は、MnO の 3 番目のシグナルを使用することとした<sup>1)</sup>。

反応液調製 : 0.1 mM FeSO<sub>4</sub> (45  $\mu$ L)、DMSO (2  $\mu$ L)、試料 (98  $\mu$ L)、4 倍希釈した DMPO (10  $\mu$ L)をマイクロチューブに添加し、ボルテックスミキサーで混合した後、0.1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (45  $\mu$ L)を添加した。

マイクロピペッターを用いて、反応液 (100  $\mu$ L)をガラス製キャピラリーに吸上げ、パテでふたをした。石英管にガラス製キャピラリーを入れて ESR 装置 (日本電子製 JES-RE1X)にセットし、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 添加 1 分後のシグナルを測定した。

・OH 消去作用は、DMPO-・OH アダクトアダ



クト産生の競合阻害率 (Inh%) として、以下の式を用いて算出した。

$$\% \text{ Inh} = 100 - [(S.I_{\text{sample}}/S.I_{\text{Mn}^{2+}})/(S.I_{\text{lef}}/S.I_{\text{Mn}^{2+}})] \times 100$$

( $S.I_{\text{sample}}$  : サンプル添加時のシグナル強度,  
 $S.I_{\text{lef}}$  : サンプル無添加時のシグナル強度,  $S.I_{\text{Mn}^{2+}}$  : MnO マーカーのシグナル強度)

50%阻害濃度を挟む 2 点を用いた回帰式から、DMPO- $\cdot$ OH アダクトの生成を 50%阻害する濃度(IC<sub>50</sub>)を算出した。

1) 正木仁 監修、機能性化粧品素材開発のための実験プロトコール集

### 3. 全合成法による $[^{14}\text{C}]\text{C}_{60}$ 合成方法の検討

アーク放電チャンバーを用いた $[^{14}\text{C}]\text{C}_{60}$  の合成<sup>2)</sup>は、以下のような問題点があるため、継続的に管理区域で合成することが難しい。

- ・ $[^{14}\text{C}]\text{C}_{60}$  の生成効率が低い (約 1%)
- ・比放射能の制御は困難
- ・副生成物の放射性煤による汚染の危険性

上記問題点を解決するため、Otero らの  $\text{C}_{60}$  合成法<sup>3)</sup>に着目し、全合成により $[^{14}\text{C}]\text{C}_{60}$  の合成を試みることにした。この方法により $[^{14}\text{C}]\text{C}_{60}$  を合成することができれば、以下のような利点がある。

- ・比放射能を従来法の約 10 倍に向上 ( $\text{C}_{60}$  1 分子に対して、3 個の  $^{14}\text{C}$  を導入)
- ・比放射能の制御が可能
- ・放射能汚染や被爆の危険性が少ない

参考論文で記載されていた出発物質である Truxene ( $\text{C}_{60}\text{H}_{30}$ ) の RI 原料が市販されていないため、 $[^{14}\text{C}]\text{-3-phenyl propionic acid}$  (3-PPA) を出発原料とし、Truxene、中間体 I、中間体 II を経て $[^{14}\text{C}_3]^{12}\text{C}_{57}$  を合成する手法を採用した (図 1)。

Truxene 合成 : Truxene の生成収率を向上させるため、反応温度および加熱時間を検討した。その結果、160°C で 3h 加熱することにより、最

も高い収率であったことから、3-PPA (3.3 mmol, 0.5g) およびポリリン酸 (5.0 g) を三口フラスコに入れ、 $\text{N}_2$  雰囲気下で加熱攪拌 (65°C, 30min  $\rightarrow$  160°C, 3h) した後、室温まで冷却した。その後、脱イオン水 (5.5 ml) を加えて攪拌 (室温, 60min) し、吸引ろ過により得られた沈殿物をアセトンで洗浄した。洗浄後、ジメチルホルムアミドで再結晶することにより、Truxene を得た (3-PPA カルボキシ基の脱水反応)。

中間体 I ( $\text{C}_{60}\text{H}_{39}\text{Br}_3$ ) 合成 : 上記プロセスで生成した Truxene (1.0 mmol, 340 mg)、脱水 THF (50 ml)、n-BuLi/ヘキサン溶液 (1.6 mol/l, 3.2 mmol, 2 ml) を三口フラスコに入れ、 $\text{N}_2$  雰囲気下で温度を上げながら攪拌 (-78°C  $\rightarrow$  -10°C, 4h) した後、1-bromo-2-bromomethyl naphthalene (3.5 mmol, 10.5 mg) を加えて攪拌した (室温, 30min)。酢酸エチルで反応を停止させた後、飽和 NaCl 溶液で洗浄し、無水硫酸マグネシウムを用いて乾燥し、エバポレーターで濃縮することにより中間体 I を得た。

中間体 I 合成過程において、anti-化合物 : syn-化合物 = 3:1 の割合で生成するため、中間体 II の合成プロセスの前に、syn-化合物のみを得るためのステップを設けた (反応式 1)。中間体 I (0.5 mmol)、tert-butyl alcohol (30 ml)、potassium tert-butoxide (1 equivalent) を三口フラスコに入れ、 $\text{N}_2$  雰囲気下で還流 (80°C, 12h) し、冷却後に濃縮・ろ過した。残渣は水で洗浄し、エタノールまたはトルエンで再結晶を行った。

中間体 II ( $\text{C}_{60}\text{H}_{30}$ ) 合成 : dimethyl acetamide (8 ml)、中間体 I (0.15 mmol, 150 mg)、酢酸 Paradium (0.15 mmol, 34 mg)、 $\text{BnMe}_3\text{N}^+\text{Br}^-$  (0.3 mmol, 69 mg)、cesium carbonate (1.5 mmol, 207 mg) を三口フラスコに入れて還流 (140°C, 36h) した後、室温まで冷却する。ろ過し、固体をジクロロメタン+アセトンで洗浄した後、シアン化ナトリウム水溶液中で攪拌 (1h) し、ろ過した後に固体を水+アセトンで洗浄し、カラムを用いて精製した。

$[^{14}\text{C}_3]^{12}\text{C}_{57}$  ( $= [^{14}\text{C}]\text{C}_{60}$ ) 合成：中間体 II をクロロホルムに溶解し、白金粉末を滴下した後、クロロホルムを揮発させて乾燥し（図 1 下）、高真空下で加熱（ $10^{-4}$  mBar,  $427^\circ\text{C}$ , 20min）した後冷却した。

分析：先行文献<sup>3)</sup>では、 $\text{C}_{60}$ のケージが形成されているかどうか、STM(Scanning Tunneling Microscope)と呼ばれる顕微鏡で確認しているが、本研究においては、LC、NMR、MS、UV/VIS 吸収スペクトルの測定結果等を総合して、 $\text{C}_{60}$ の生成を確認することとした。また収量・収率は、放射活性の値から算出した。

<sup>2)</sup> Sumner S. et al., J. Appl. Toxicol., (30)4: 354-360, 2010.

<sup>3)</sup> Otero G. et al., Nature, 454: 865-869, 2008.

## C. 研究結果（次項 D にまとめて記載する）

### D. 考察

#### 1. 高純度 $\text{C}_{60}$ -P の合成および分析

従来法を用いて  $\text{C}_{60}$ -P を合成する場合、中間体としてエステル体を合成した後、 $\text{C}_{60}$ -P を合成していた。従来法によって合成された  $\text{C}_{60}$ -P の純度は、60~70%と低いことが問題点であった。

増野先生 G は、中間体としてブチル体を合成した後、 $\text{C}_{60}$ -P を合成することにより、不純物の極めて少ない高純度な  $\text{C}_{60}$ -P を合成できることを見出した。そこで当グループでは、合成の再現性確認およびスケールアップを検討した結果、高純度な  $\text{C}_{60}$ -P を合成することができることを確認した（図 2）。合成した  $\text{C}_{60}$ -P の FT-IR および  $^1\text{H}$ NMR スペクトルは、それぞれ図 3 および図 4 に示した。

#### 2. フラーレン誘導体の抗酸化能評価

#### 2-1. DPPH ラジカル消去作用

各測定サンプルにおける DPPH ラジカル消去作用をまとめて表 2 に示した。総体的に、プロリン型 1, 3 のラジカル消去力が高く、7 以降のラジカル消去力が低いという傾向は、平成 24, 25 年度に実施した ESR の測定結果と類似していた。水酸化フラレンは、 $\text{C}_{60}(\text{OH})_{12} \sim \text{C}_{60}(\text{OH})_{44}$  まで、水酸基数の異なる誘導体を用いてアッセイを行ったが、 $\text{C}_{60}(\text{OH})_{12}$  以外は、DPPH・消去率に濃度依存性が認められず、 $\text{IC}_{50}$  を算出することはできなかった。

各測定サンプルの  $\text{IC}_{50}$  とその構造を図 5 に示した。Pristine  $\text{C}_{60}$  は、水素供与能が無いため、DPPH ラジカルを消去することはできない。フラレン誘導体において、DPPH ラジカル消去活性は認められたという結果は、DPPH ラジカル消去に対しては、官能基の寄与によるものと考えられる。プロリン型誘導体においては、DPPH ラジカル消去作用が認められたことから、カルボン酸の OH がフェノール性の OH の役割を果たし、DPPH ラジカルに水素を供与していると考えられる。プロリン型誘導体間で比較した結果、カルボン酸と DPPH ラジカル消去活性の間に相関性が認められないことから、カルボン酸の構造も影響を及ぼしている可能性がある。

#### 2-2. $\text{O}_2^-$ ラジカル消去作用

各測定サンプルにおける  $\text{O}_2^-$  ラジカル消去作用をまとめて表 2 に示した。 $\text{O}_2^-$  ラジカルに対する消去作用は、 $\text{C}_{60}(\text{OH})_{24}$  およびアスコルビン酸が最も優れていた。総体的に、プロリン型誘導体よりも水酸化フラレンのほうが、 $\text{O}_2^-$  ラジカルの消去作用が高い傾向が認められた。水酸基数の数が少ないほうが、 $\text{O}_2^-$  ラジカル消去活性が高かった。プロリン型誘導体においては、高純度  $\text{C}_{60}$ -P の活性が最も高く、次いでプロリン型 (1) >  $\text{C}_{60}$ -P > (10), (9), (11) > (9), (8), (7) であり、構造と活性の間に明確な相関性は認められなかった。



O<sub>2</sub><sup>-</sup>ラジカル消去作用の評価は、Xanthine/Xanthine oxidase 反応により生成される O<sub>2</sub><sup>-</sup>ラジカルと WST-1 が反応して生成する WST-1 Formazan (最大吸収 450nm) を測定することにより評価した。この反応系は、酵素反応であること、フラレーン誘導体を溶解するために使用している DMSO が妨害物質になること、またフラレーン誘導体は 450nm 付近にも吸収がある等の理由から、データの再現性に問題があると思われる。そのため、新たに合成した誘導体は、ESR を用いた評価も実施することとした。

### 2-3. ESR による OH ラジカル消去作用

平成 24 年度に実施した結果と合わせて、結果をまとめて表 3 に示した。高純度 C60-P の OH ラジカル消去作用は、従来法で合成した C60-P の活性に比べると、やや低い結果が得られた。この理由として、従来法で合成した化合物中に含まれる不純物も、OH ラジカル消去作用を有している可能性が考えられた。

C60-P と既存の IBD 治療薬であるメサラジン (5-ASA 製剤) のラジカル消去作用を表 4 に示した。C60-P は、本研究で対象とした全てのラジカルに対して消去作用を有することが明らかになった。また、C60-P のラジカル消去作用は、5-ASA 製剤に匹敵する、あるいは 5-ASA 製剤を上回る活性を有していることが明らかになった。

Dugan らは、フラレーン誘導体の中でも、マロン酸誘導体に着目し、アルツハイマーの治療薬として、創薬研究が進められている。猿を用いた研究の結果、マロン酸誘導体はアルツハイマーの治療効果を示すことが報告されている<sup>4)</sup>。マロン酸誘導体は、ラジカルを消去することにより、薬効を示している可能性が示唆されている。このことから、マロン酸誘導体 (MTR 社製) についてもラジカル消去作用を評価し、C60-P と比較した (表 5)。その結果、C60-P のラジカル消去作用は、マ

ロン酸誘導体よりも優れていることが明らかになった。

<sup>4)</sup> L.L.Dugan et al., ANNALS of Neurology, 76(3): 393-402, 2014.

### 3. 全合成法による [<sup>14</sup>C]C<sub>60</sub> 合成方法の検討

昨年度から引き続き全合成法による [<sup>14</sup>C]C<sub>60</sub> 合成方法の検討を行った結果、収率および収量ともに低いものの、全合成により、各中間体および [<sup>14</sup>C]C<sub>60</sub> の合成に成功した (放射能から算出された収率: 6.5×10<sup>-5</sup>%、収量: 33ng)。収量が低かった原因としては、以下の理由が考えられた。

- ・ Truxene から化合物 2 を合成する過程において、反応が不十分なため、プロモナフタレンの付加数が少ないものが生成
- ・ 化合物 2 の五員環酸化
- ・ 副生成物の存在による C<sub>60</sub> 合成の阻害

以上のことから、各中間体を安定に収率を向上させるためには、反応条件を最適化し、各中間体の分離・精製方法を検討する必要がある。

### E. 結論

従来の合成法における C60-P 純度は、60~70%であり、不純物が 30~40%含まれるため、医薬品原体としての物性を正確に評価するためには、不純物の除去・目的物の高純度化が今後の課題であった。その後、増野先生 G によって改良された合成法を用いることにより、高純度な C60-P を合成できることが明らかになった。再現性を確認するために合成した C60-P の純度は 95%以上に向上しており、増野先生 G の合成時と同程度の純度に C60-P を合成することに成功した。しかしながら、医薬品原体規格を満たすためには、99.9%以上の純度が求められるため、カラム精製等により、さらに純度を高める方法を検討する必要がある。

本事業において創製されたフラレーン誘導体を用いて、医薬品原体としての基礎的効果を検証

するため、ESRにより・OHおよびLOO・に対する消去作用を測定した。また、DPPH・やO<sub>2</sub><sup>-</sup>ラジカルに対する消去作用も評価した。その結果、総体的に、水酸化フラレン誘導体よりもプロリン型誘導体のラジカル消去作用の方が、優れている傾向が認められた。これらの結果から、フラレン誘導体によるラジカル消去作用は、フラレン骨格の二重結合に加えて、官能基も寄与している可能性が考えられた。

アーク放電法を用いた<sup>14</sup>C]C<sub>60</sub> 合成による問題点を解決すべく、3-PPAを出発原料とし、全合成法により、各中間体および<sup>14</sup>C]C<sub>60</sub>の合成に成功した。しかしながら、収量および収率を向上させるため、各合成ステップ条件を最適化する必要がある。

## F. 健康危険情報

該当なし

## G. 研究発表

### ① 論文発表

該当なし

#### 【総説・その他】

該当なし

### ② 学会発表

#### 【シンポジウム等：合計0件】

該当無し

#### 【国内学会発表：合計9件】

1. 平井敏郎, 吉岡靖雄, 宇高麻子, 大江知之, 青島央江, 小久保 研, 大島 巧, 増野匡彦, 東阪和馬, 堤 康央: C<sub>60</sub> フラレン誘導体の免疫抑制剤としての有効性評価~*in vitro*における評価~, 第30回日本 DDS 学会学術集会., 東京, 2014年7月.
2. 植村瑛一郎, 吉岡靖雄, 平井敏郎, 宇高麻子, 大江知之, 青島央江, 小久保研, 大島 巧, 増野匡彦, 東阪和馬, 堤 康央: C<sub>60</sub> フラレン誘導体の炎症性腸疾患に対する医薬品応用に向けた検討~*in vivo*における獲得免疫抑制作用の検討~, 第87回日本生化学会大会., 京都, 2014年10月.
3. 佐上公一, 吉岡靖雄, 平井敏郎, 大江知之, 青島央江, 小久保研, 大島 巧, 増野匡彦, 東阪和馬, 堤 康央: C<sub>60</sub> フラレン誘導体の抗炎症メカニズムに関する基礎的検討., 第30回日本 DDS 学会学術集会., 東京, 2014年7月.
4. 高橋秀樹, 吉岡靖雄, 平井敏郎, 青島央江, 上野 裕, 小久保研, 大島 巧, 大江知之, 増野匡彦, 東阪和馬, 堤 康央: C<sub>60</sub> フラレン誘導体の体内動態解析に向けた基礎的検討., 第30回日本 DDS 学会学術集会., 東京, 2014年7月.
5. 小久保研, 青島央江, 吉岡靖雄, 堤 康央, 乾 重樹, 脇本 哲, 柳原 格, 遊道和雄, 石井亜紀子, 斉藤靖和, 三羽信比古: 高水溶性水酸化フラレンのバイオメディカル応用., フラレンナノチューブグラフェン学会、ナノバイオ応用サテライト., 名古屋, 2014年9月.
6. 青島央江: ライフサイエンス分野におけるフラレンの実用化~事業化から今後の展望~, フラレンナノチューブグラフェン学会、ナノバイオ応用サテライト., 招待講演, 名古屋, 2014年9月.
7. 吉岡靖雄, 宇高麻子, 平井敏郎, 植村瑛一郎, 高橋秀樹, 佐上公一, 角田慎一, 大江知之, 増野匡彦, 青島央江, 小久保研, 大島 巧, 東阪和馬, 堤 康央: C<sub>60</sub> フラレン誘導体の炎症性腸疾患に対する医薬品応用に向けた検討~*in vivo*における獲得免疫抑制作用の検討~, 第30回日本 DDS 学会学術集会., 東京, 2014年7月.
8. 佐上公一, 吉岡靖雄, 宇高麻子, 平井敏郎, 高橋秀樹, 植村瑛一郎, 角田慎一, 大江知之,

増野匡彦, 青島央江, 小久保研, 大島 巧, 東阪和馬, 堤 康央 : MAPK に注目した C<sub>60</sub> フラーレン誘導体による抗炎症作用メカニズムの検討., 第87回日本生化学会大会., 京都, 2014年10月.

9. 植村瑛一郎, 吉岡靖雄, 宇高麻子, 平井敏郎, 高橋秀樹, 佐上公一, 角田慎一, 大江知之, 増野匡彦, 青島央江, 小久保研, 大島 巧, 東阪和馬, 堤 康央 : C<sub>60</sub> フラーレン誘導体の炎症性腸疾患に対する医薬品応用に向けた検討~*in vitro*における抗体産生抑制能のメカニズム解明~, 第87回日本生化学会大会., 京都, 2014年10月.

#### 【国際学会発表 : 合計 2 件】

1. Yoshioka Y., Udaka A., Hirai T., Aoshima H., Kokubo K., Oshima T., Ohe T., Mashino T., Tsunoda S., Higashisaka K., Tsutsumi Y. : Fullerene C<sub>60</sub> derivatives suppress the acquired immune responses., Immunology 2014., Pittsburg (USA), 2014年4月.
2. Tadaï T., Akiyama K., Ibuki R., Aoshima H., Kubuki S. : Synthesis of <sup>14</sup>C labeled C<sub>60</sub> with higher specific radioactivity., APSORC2014., 名古屋, 2014年9月.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### ① 特許取得

発明の名称 : 炎症性腸疾患の予防または治療剤

出願日 : 平成 23 年 10 月 21 日

出願番号 : 特願 2011-231446

発明者 : 堤 康央、吉岡 靖雄、吉川 友章、大島巧、小久保 研、山名 修一、青島 央江

出願人 : 国立大学法人大阪大学、ビタミン C60 バイオリサーチ株式会社

発明の名称 : 炎症性腸疾患の予防または治療

剤と新規フラーレン誘導体

出願日 : 平成 25 年 2 月 19 日

国際出願 : 平成 26 年 2 月 19 日

出願番号 : 特願 2013-030455

国際出願番号 : PCT/JP2014/053950

発明者 : 堤 康央、吉岡 靖雄、東阪 和馬、増野匡彦、大江 知之、山名 修一、青島 央江

出願人 : 国立大学法人大阪大学、ビタミン C60 バイオリサーチ株式会社、増野匡彦、大江知之

##### ② 実用新案登録

該当なし

##### その他

該当なし

##### 研究協力者

大阪大学大学院薬学研究科長 毒性学分野 教授 堤康央 先生、准教授 吉岡靖雄 先生、助教 東阪和馬 先生

大阪大学大学院工学研究科 応用化学専攻 准教授 小久保研 先生

慶應義塾大学薬学部長 医薬品化学講座 教授 増野匡彦 先生准教授 大江知之 先生、助教 高橋恭子 先生

東邦大学薬学部副薬学部長 薬剤学教室 教授 寺田勝英 先生

首都大学東京大学院 理工学研究科 助教 秋山和彦 先生

理化学研究所 有機光電子工学研究チーム リーダー 田島右副 先生

FLOX 株式会社 小幡信允 様

ビタミン C60 バイオリサーチ(株) 林源太郎 代表取締役、伊吹リン太 技術顧問、長島一男 アドバイザー、伊藤雅之 研究員、兵頭小百合 研究員、村上美緒 研究員

表1. O<sub>2</sub>-ラジカル消去作用測定実験 反応液の調製

	Sample	Blank 1	Blank 2	Blank 3
サンプル溶液	20 μL	-	20 μL	-
純水	-	20 μL	-	20 μL
WST working Sol.	200 μL	200 μL	200 μL	200 μL
Dilution Buf.	-	-	20 μL	20 μL
Enzyme working Sol.	20 μL	20 μL	-	-

Blank1: 阻害無しでの全発色、Blank2: Sample Blank、Blank3: 試薬Blank  
 \*着色の強いサンプルは、サンプルの希釈液ごとにBlank2を設定

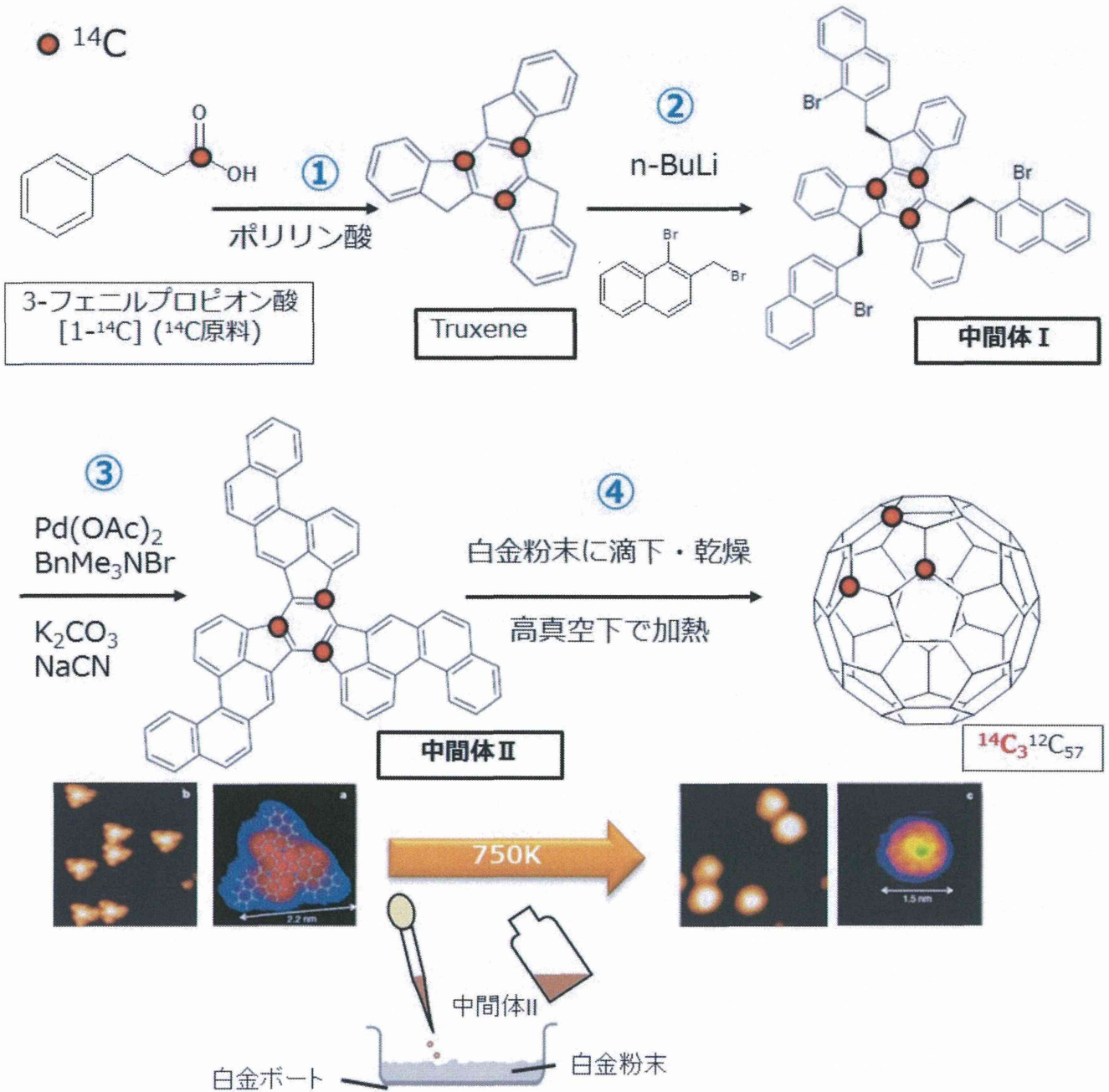
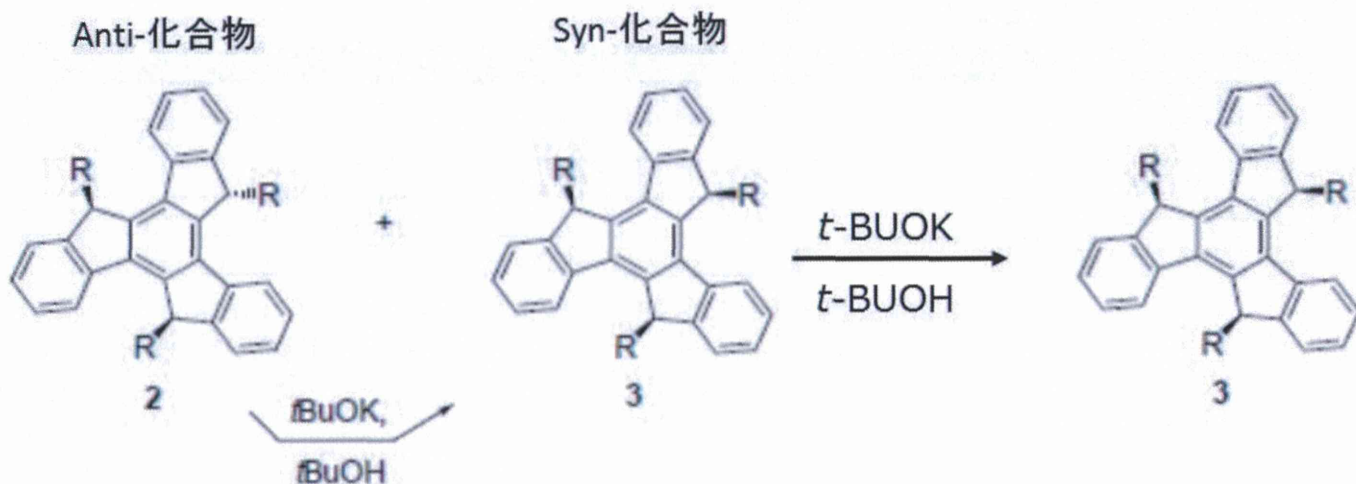


図1. 3-フェニルプロピオン酸→[<sup>14</sup>C<sub>3</sub>]<sup>12</sup>C<sub>57</sub>の合成プロセス概略図



反応式1. 中間体I : anti-化合物 → syn-化合物

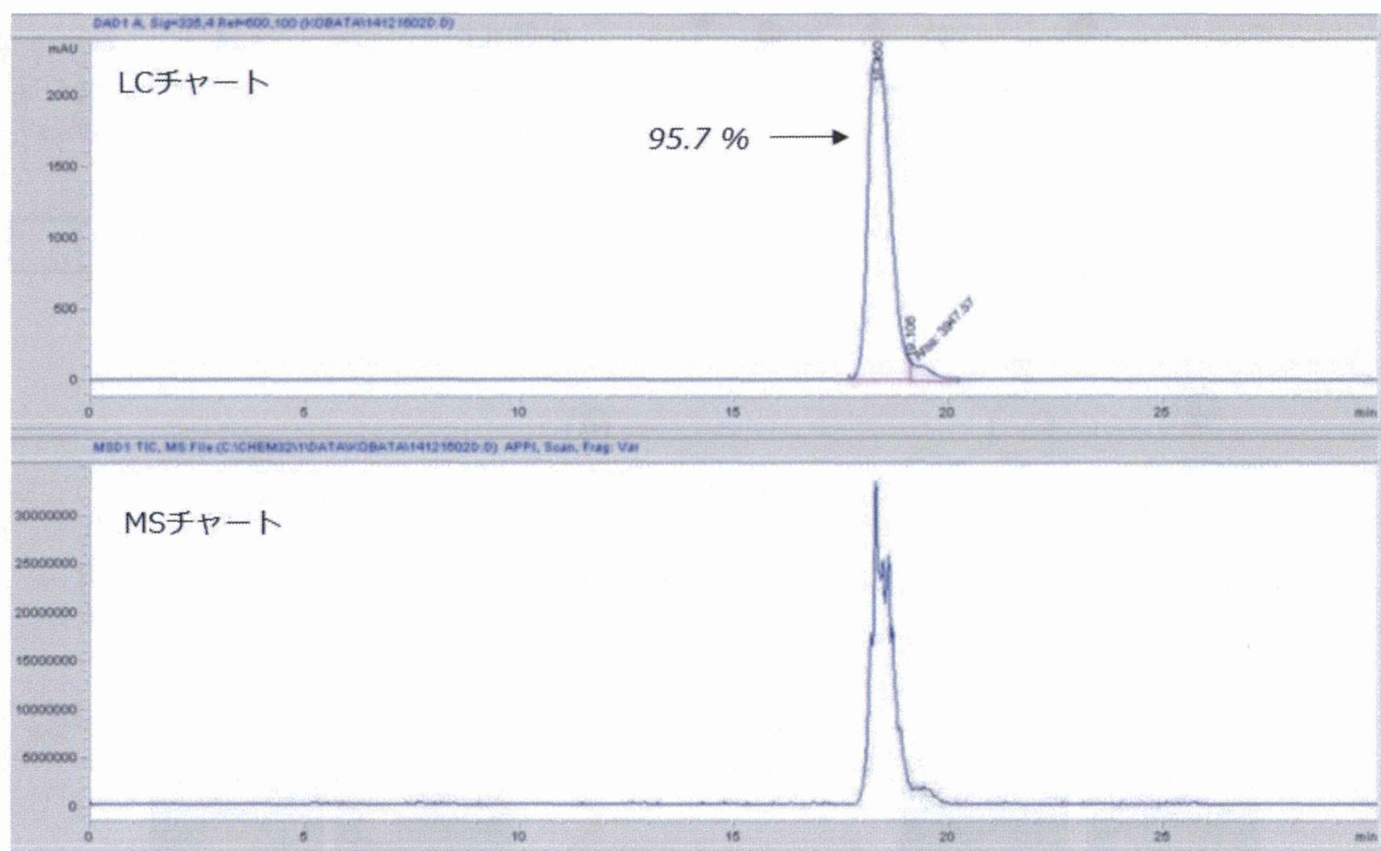


図2. 高純度C60-PのLC/MSチャート



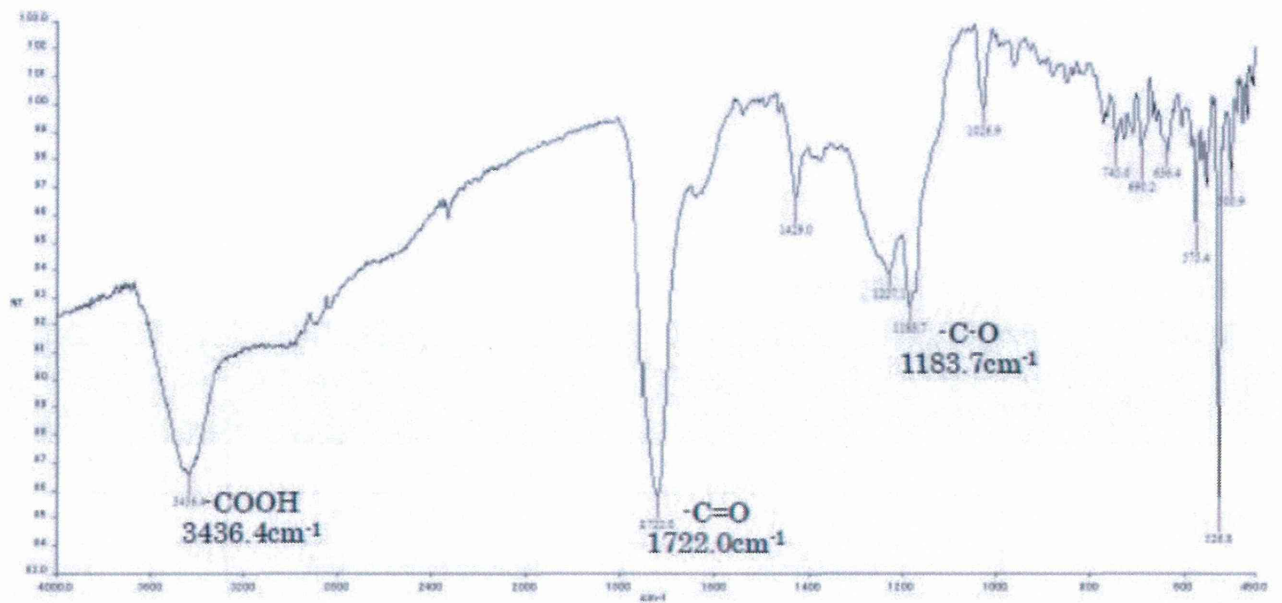


図3. 高純度C60-PのFT-IRスペクトル

(測定方法：KBr錠剤法、測定域：450～1000  $\text{cm}^{-1}$ )

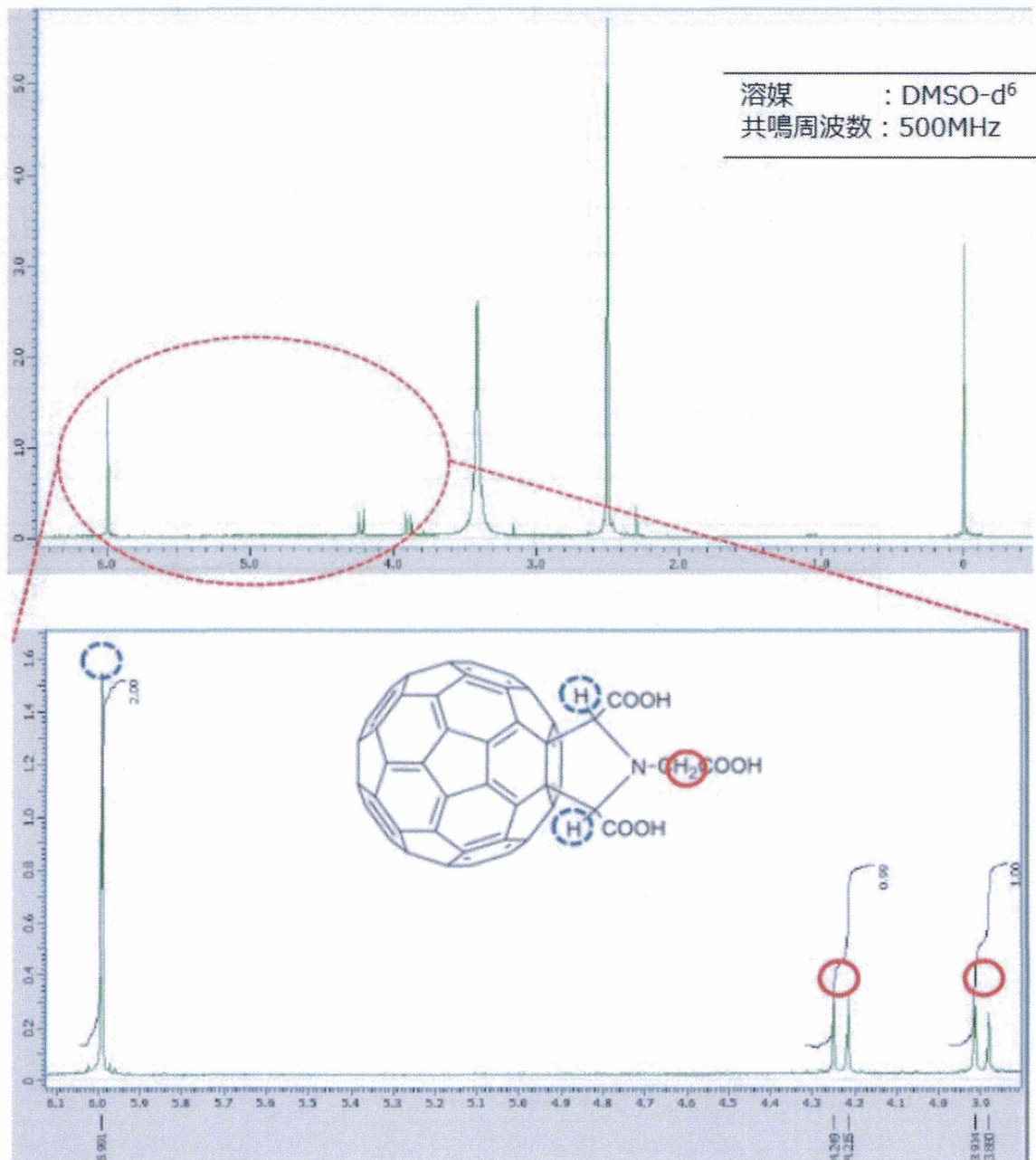


図4. 高純度C60-Pの $^1\text{H}$ NMR



表2. DPPHおよびO<sub>2</sub><sup>-</sup>ラジカル消去作用

分類	化合物	DPPHラジカル消去	O <sub>2</sub> <sup>-</sup> ラジカル消去
		IC <sub>50</sub> (μM)	IC <sub>50</sub> (μM)
水酸化フラーレン	C <sub>60</sub> (OH) <sub>44</sub>	最大消去率8.4%	150.0
	C <sub>60</sub> (OH) <sub>40</sub>	最大消去率7.8%	-
	C <sub>60</sub> (OH) <sub>36</sub>	最大消去率13.4%	161.9
	C <sub>60</sub> (OH) <sub>~24</sub> (MTR社製)	消去作用なし	消去作用なし
	C <sub>60</sub> (OH) <sub>24</sub>	最大消去率26.1%	22.0
	C <sub>60</sub> (OH) <sub>12</sub>	678.7	56.0
プロリン型誘導体	プロリン型(1)	70	152.7
	<b>C60-P (Lot.140528-1)</b>	<b>12.5</b>	<b>240.9</b>
	<b>高純度C60-P</b>	<b>250.2</b>	<b>73.0</b>
	プロリン型(7)	2311.1	7437.8
	プロリン型(8)	362.2	1229.6
	プロリン型(9)	474.8	1094.4
	プロリン型(10)	724.7	204.0
	プロリン型(11)	1836.1	199.0
比較対照	5-ASA	24.2	713.0
	NAC	108.3	429.5
	エダラボン	75.4	消去作用なし
	アスコルビン酸	39.6	28.6

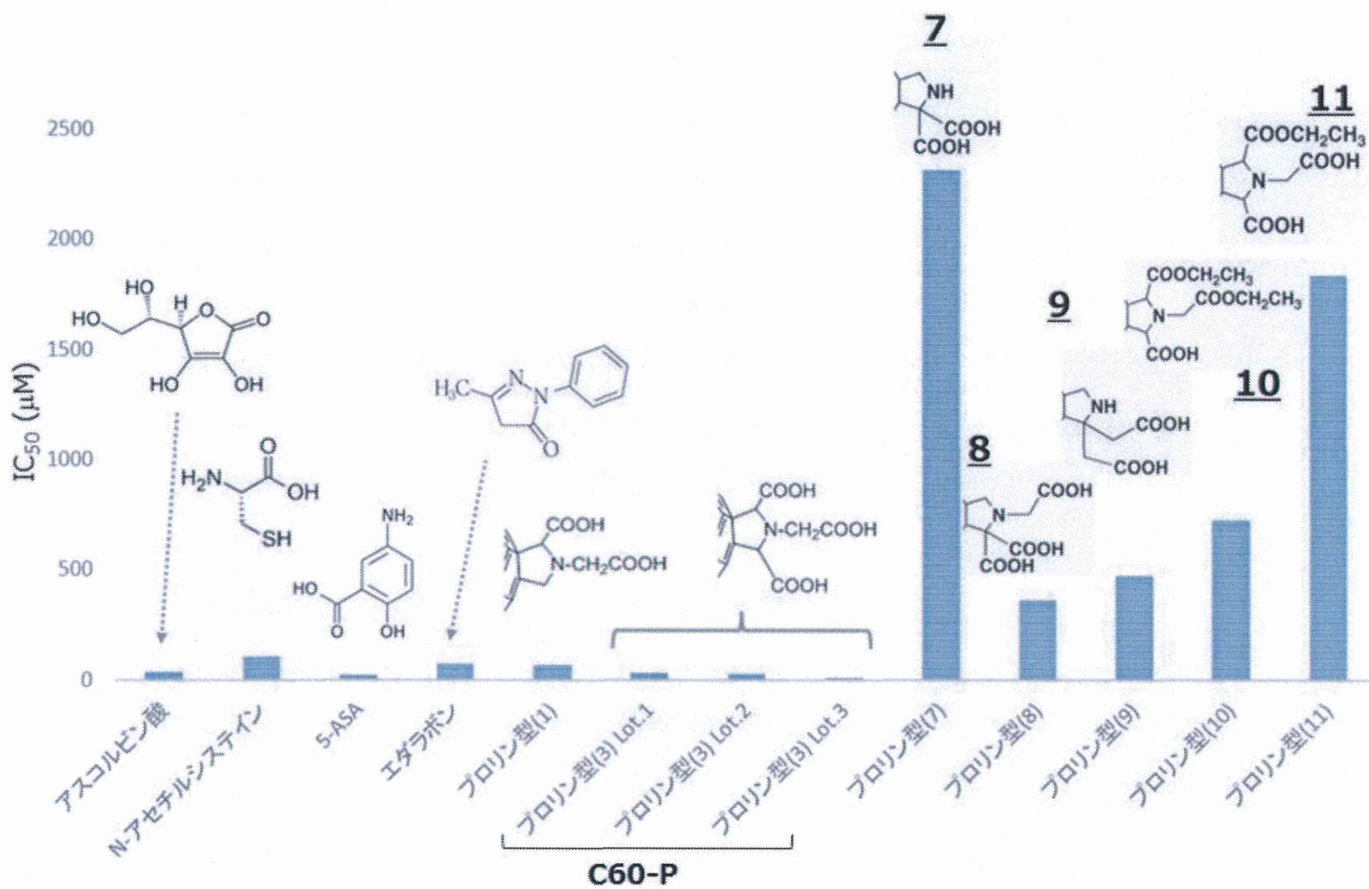


図5. DPPHラジカル消去作用と各化合物の構造比較



表3. ESR測定結果から算出したIC<sub>50</sub>

分類	化合物	IC <sub>50</sub> (μM)±標準誤差
水酸化フラーレン	C <sub>60</sub> (OH) <sub>44</sub>	33.73±1.83
	C <sub>60</sub> (OH) <sub>40</sub>	85.9±1.32
	C <sub>60</sub> (OH) <sub>36</sub>	9.80±0.12
	C <sub>60</sub> (OH) <sub>~24</sub>	38.66±0.58
	C <sub>60</sub> (OH) <sub>24</sub>	1.01±0.01
	C <sub>60</sub> (OH) <sub>12</sub>	7.83±0.16
プロリン型誘導体	プロリン型(1)Small合成	0.19±0.004
	プロリン型(1)Large合成	0.18±0.01
	C60-P (Small合成)	0.10±0.006
	C60-P (Large合成)	0.14±0.004
	<b>高純度C60-P</b>	<b>0.21±0.24</b>
比較対照	ジカルボン酸	0.24±0.001
	<b>マロン酸誘導体</b>	<b>0.45±0.22</b>
	エダラボン	31.06±0.02
	AsA	210.8±24.4
	PVP包接C60	7.80±0.46
	PVP	31.24±1.26

表4. C60-Pとメサラジンのラジカル消去作用比較

試験項目	IC <sub>50</sub>	
	メサラジン (5-ASA)	C60-P (Lot.140528) 高純度C60-P
DPPH還元作用	文献値：9.5 μM	12.5 μM
	実測値：24.2 μM	250.2 μM
O <sub>2</sub> 消去作用 (Xanthine Oxidase法)	文献値：消去作用なし (チトクロムC還元法)	240.9 μM
	実測値：713.0 μM	73.0 μM
・OH消去作用	文献値：0.7 μM (・OOH消去作用)	0.14 μM
	実測値：消去作用なし	0.22 μM
LOO・消去作用	文献値：データなし	227.2 μM
	実測値：消去作用なし	NT

NT: Not tested.

表5. C60-Pとマロン酸誘導体のラジカル消去作用比較

試験項目	マロン酸 誘導体	IC <sub>50</sub>	
		C60-P (Lot.140528)	高純度C60-P
DPPH還元作用	370.5 μM	12.5 μM	250.2 μM
O <sub>2</sub> -消去作用 (Xanthine Oxidase法)	消去作用なし	240.9 μM	73.0 μM
・OH消去作用	0.45 μM	0.14 μM	0.22 μM

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Ueno H, Kawakami H, Nakagawa K, Okada H, Ikuma N, Aoyagi S, Kokubo K, Matsuo Y, Oshima T.	Kinetic study of the Diels–Alder reaction of $\text{Li}^+\text{@C}_{60}$ with cyclohexadiene: Greatly increased reaction rate by encapsulated $\text{Li}^+$ .	J. Am. Chem. Soc.	136	11162-67	2014
Ueno H, Yamakura S, Arastoo R. S, Oshima T, Kokubo K.	Systematic evaluation and mechanistic investigation of antioxidant activity of fullerenols using $\beta$ -carotene bleaching assay.	J. Nanomater.	2014 (802 596)	1-8	2014
Ikuma N, Yamamoto H, Kokubo K, Oshima T.	Synthesis of pyrrolidinofullerenes via single electron transfer reaction of aryldienamines with $\text{C}_{60}$ .	Heterocycles	90	1168-78	2015
上野裕, 伊熊 直彦, 小久保 研	球面反応場に着目したフラーレン ケージ内外の制御による新規機能 分子の創製と応用	有機合成化学 協会誌	72	1348-135 9	2014
Watanabe T, Nakamura S, Ono T, Ui S, Yagi S, Kagawa H, Watanabe H, Ohe T, Mashino T, Fujimuro M.	Pyrrolidinium fullerene induces apoptosis by activation of procaspase-9 via suppression of Akt in primary effusion lymphoma.	Biochem Biophys Res Commun.	451	93-100	2014



# Kinetic Study of the Diels–Alder Reaction of $\text{Li}^+\text{@C}_{60}$ with Cyclohexadiene: Greatly Increased Reaction Rate by Encapsulated $\text{Li}^+$

Hiroshi Ueno,<sup>†,1</sup> Hiroki Kawakami,<sup>‡</sup> Koji Nakagawa,<sup>†</sup> Hiroshi Okada,<sup>‡</sup> Naohiko Ikuma,<sup>†</sup> Shinobu Aoyagi,<sup>§</sup> Ken Kokubo,<sup>\*,†</sup> Yutaka Matsuo,<sup>\*,‡</sup> and Takumi Oshima<sup>†</sup>

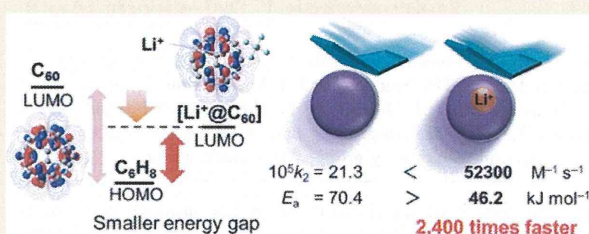
<sup>†</sup>Division of Applied Chemistry, Graduate School of Engineering, Osaka University, Suita, Osaka 565-0871, Japan

<sup>‡</sup>Department of Chemistry, School of Science, The University of Tokyo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033, Japan

<sup>§</sup>Department of Information and Biological Sciences, Nagoya City University, Nagoya 467-8501, Japan

**S** Supporting Information

**ABSTRACT:** We studied the kinetics of the Diels–Alder reaction of  $\text{Li}^+$ -encapsulated [60]fullerene with 1,3-cyclohexadiene and characterized the obtained product,  $[\text{Li}^+\text{@C}_{60}(\text{C}_6\text{H}_8)](\text{PF}_6^-)$ . Compared with empty  $\text{C}_{60}$ ,  $\text{Li}^+\text{@C}_{60}$  reacted 2400-fold faster at 303 K, a rate enhancement that corresponds to lowering the activation energy by 24.2  $\text{kJ mol}^{-1}$ . The enhanced Diels–Alder reaction rate was well explained by DFT calculation at the M06-2X/6-31G(d) level of theory considering the reactant complex with dispersion corrections. The calculated activation energies for empty  $\text{C}_{60}$  and  $\text{Li}^+\text{@C}_{60}$  (65.2 and 43.6  $\text{kJ mol}^{-1}$ , respectively) agreed fairly well with the experimentally obtained values (67.4 and 44.0  $\text{kJ mol}^{-1}$ , respectively). According to the calculation, the lowering of the transition state energy by  $\text{Li}^+$  encapsulation was associated with stabilization of the reactant complex (by 14.1  $\text{kJ mol}^{-1}$ ) and the [4 + 2] product (by 5.9  $\text{kJ mol}^{-1}$ ) through favorable frontier molecular orbital interactions. The encapsulated  $\text{Li}^+$  ion catalyzed the Diels–Alder reaction by lowering the LUMO of  $\text{Li}^+\text{@C}_{60}$ . This is the first detailed report on the kinetics of a Diels–Alder reaction catalyzed by an encapsulated Lewis acid catalyst rather than one coordinated to a heteroatom in the dienophile.



## INTRODUCTION

Since the discovery of the Diels–Alder (DA) reaction in 1928,<sup>1</sup> it has become the most widely studied pericyclic reaction because of its practical importance and fundamental interest in synthetic and theoretical organic chemistry.<sup>2</sup> According to the Woodward–Hoffmann rules, a normal-electron-demand DA reaction is a thermally allowed [4 + 2] cycloaddition that occurs through frontier molecular orbital (FMO) interactions between the HOMO of the diene and the LUMO of the dienophile. It is well-known that a smaller energy gap between the HOMO of the diene and the LUMO of dienophile often results in a higher reaction rate. A common strategy for accelerating normal-electron-demand DA reactions is to introduce an electron-donating group to the diene and/or an electron-withdrawing group to the dienophile. Another approach is Lewis acid (LA) catalysis. A heteroatom in the dienophile can serve as a coordination site for an LA, which can accelerate the DA reaction by lowering the LUMO of the dienophile (Figure 1a).<sup>3</sup> For example, DA reactions run in the presence of lithium ion ( $\text{Li}^+$ ), which serves as an LA, are accelerated up to 9-fold when acrylonitrile is used as the dienophile.<sup>4</sup> However, metal ions cannot be used as LA catalysts in DA reactions unless the dienophile contains a heteroatom that can serve as a coordination site. In addition, steric interactions between the reactants affect the reaction rate. Yet, in previous research on

the DA reaction,<sup>3c</sup> it has been difficult to separate the electronic and steric effects because electron-withdrawing and -donating groups inevitably have some steric effect. If electronic effects could be isolated from steric effects, this would provide useful information about the DA reaction.

The DA reaction can be used to synthesize fullerene-based n-type materials for organic photovoltaics, for example, indene- $\text{C}_{60}$  bis-adduct and methano/indene fullerenes.<sup>5</sup> However, the inherent equilibrium between the DA and retro-DA reactions lowers the yield and limits the scope of dienes that can be used.<sup>6</sup> Considering the enhancement of the DA reaction by LA activation of dienophiles, we have focused on the DA reaction of lithium-ion-encapsulated [60]fullerene  $\text{Li}^+\text{@C}_{60}$ .<sup>7</sup> Compared with empty  $\text{C}_{60}$ ,  $\text{Li}^+\text{@C}_{60}$  has a lower LUMO level<sup>7a</sup> but exactly the same size. When comparing the DA reactions of  $\text{C}_{60}$  and  $\text{Li}^+\text{@C}_{60}$ , the steric effects can therefore be ignored when considering the reaction kinetics and thermodynamics, and in particular, the reaction rate can be considered in terms of only the  $\text{HOMO}_{\text{diene}}\text{--LUMO}_{\text{dienophile}}$  gap (Figure 1b). In our previous study,<sup>8</sup> we used cyclopentadiene as a diene to efficiently synthesize the DA adduct of  $\text{Li}^+\text{@C}_{60}$ , and we observed a drastic rate enhancement due to the encapsulated

Received: June 13, 2014

Published: July 9, 2014