

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5008977号
(P5008977)

(45) 発行日 平成24年8月22日(2012.8.22)

(24) 登録日 平成24年6月8日(2012.6.8)

(51) Int. Cl.	F I
A 6 1 K 9/14 (2006.01)	A 6 1 K 9/14 Z N M
A 6 1 K 9/10 (2006.01)	A 6 1 K 9/10
A 6 1 K 47/02 (2006.01)	A 6 1 K 47/02
A 6 1 K 31/70 (2006.01)	A 6 1 K 31/70
A 6 1 K 31/715 (2006.01)	A 6 1 K 31/715

請求項の数 24 (全 25 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2006-516378 (P2006-516378)
 (86) (22) 出願日 平成16年6月7日(2004.6.7)
 (65) 公表番号 特表2006-527245 (P2006-527245A)
 (43) 公表日 平成18年11月30日(2006.11.30)
 (86) 国際出願番号 PCT/GB2004/002408
 (87) 国際公開番号 W02004/108165
 (87) 国際公開日 平成16年12月16日(2004.12.16)
 審査請求日 平成19年6月5日(2007.6.5)
 (31) 優先権主張番号 0313259.4
 (32) 優先日 平成15年6月9日(2003.6.9)
 (33) 優先権主張国 英国 (GB)

前置審査

(73) 特許権者 593005895
 コンセホ・スベリオール・デ・インベステ
 イガシオネス・シエンティフィカス
 CONSEJO SUPERIOR DE
 INVESTIGACIONES CI
 ENTIFICAS
 スペイン、エー28006マドリッド、カ
 リェ・セラノ117番

(73) 特許権者 505454340
 ミーダテック・リミテッド
 イギリス・ロンドン・グレーター・ロンド
 ン・EC4A・3LX・セント・アンドリ
 ユー・ストリート・6

(74) 代理人 100108453
 弁理士 村山 靖彦

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 磁性ナノ粒子

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

金及び鉄を含む複合体である金属原子のコアを有する磁性ナノ粒子であって、前記コアにおける前記鉄原子に対する前記金原子の比が5:0.1から5:1であり、前記コアが複数の配位子に共有結合し、少なくとも1つの前記配位子は糖質基を備え、前記コアに結合している前記少なくとも1つの配位子が、ジスルフィド基を含むリンカー基によって前記コアに共有結合している磁性ナノ粒子。

【請求項2】

前記ナノ粒子の前記コアが5nm以下の平均直径を有する請求項1に記載の磁性ナノ粒子。

【請求項3】

少なくとも1つの前記配位子がランタニドを組み込んでいる請求項1または2に記載の磁性ナノ粒子。

【請求項4】

前記ランタニドがガドリニウムである請求項3に記載の磁性ナノ粒子。

【請求項5】

ナノ粒子がNMR活性原子を備えた請求項1から4のいずれか一項に記載の磁性ナノ粒子。

【請求項6】

前記NMR活性原子が、 Mn^{+2} 、 Gd^{+3} 、 Eu^{+2} 、 Cu^{+2} 、 V^{+2} 、 Co^{+2}

, Ni^{+2} , Fe^{+2} , Fe^{+2} , 又はランタノイド⁺₃である請求項5に記載の磁性ナノ粒子。

【請求項7】

前記糖質基は多糖、オリゴ糖、又は、単糖の基を備えた請求項1に記載の磁性ナノ粒子。

【請求項8】

少なくとも1つの前記配位子はグリカノコンジュゲートを備えた請求項1から7のいずれか一項に記載の磁性ナノ粒子。

【請求項9】

前記グリカノコンジュゲートが糖脂質又は糖タンパク質である請求項8に記載の磁性ナノ粒子。

10

【請求項10】

ナノ粒子がラベルを備えた請求項1から9のいずれか一項に記載の磁性ナノ粒子。

【請求項11】

前記ラベルは蛍光性基、放射性同位元素又はNMR活性原子である請求項10に記載の磁性ナノ粒子。

【請求項12】

少なくとも1つの前記配位子がペプチド又はタンパク質を備えた請求項1から11のいずれか一項に記載の磁性ナノ粒子。

【請求項13】

20

少なくとも1つの前記配位子が核酸分子を備えた請求項1から12のいずれか一項に記載の磁性ナノ粒子。

【請求項14】

前記核酸分子がDNA又はRNA分子、あるいはsiRNA又はmiRNA配位子である請求項13に記載の磁性ナノ粒子。

【請求項15】

前記ナノ粒子が薬剤活性コンポーネントを備えた請求項1から14のいずれか一項に記載の磁性ナノ粒子。

【請求項16】

前記コアが少なくとも20個の配位子と結合している請求項1から15のいずれか一項に記載の磁性ナノ粒子。

30

【請求項17】

前記コアが少なくとも50個の配位子と結合している請求項16に記載の磁性ナノ粒子。

【請求項18】

前記ナノ粒子が水溶性である請求項1から17のいずれか一項に記載の磁性ナノ粒子。

【請求項19】

複数の種類の配位子基を備えた請求項1から18のいずれか一項に記載の磁性ナノ粒子。

【請求項20】

40

請求項1から19のいずれか一項に記載の一又は二以上のナノ粒子の集団を備えた組成物。

【請求項21】

異なる配位子基を有する複数のナノ粒子を備えた請求項20に記載の組成物。

【請求項22】

治療で用いるものであって、請求項1から21のいずれか一項に記載の一又は二以上のナノ粒子の集団を備えた組成物。

【請求項23】

前記組成物がコロイドである請求項20から22のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項24】

50

前記ナノ粒子が2 nm以下の平均直径を有し、且つノ又はコロイドである前記組成物が少なくとも1年間安定である請求項23に記載のコロイドである組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は磁性ナノ粒子に関し、特に、固定化配位子を有する磁性ナノ粒子及びこれらの粒子と他の種との相互作用の研究におけるそれらの使用に関するものである。本発明はまた、例えば、スクリーニング、診断及び治療へのナノ粒子の応用に関するものである。

【背景技術】

【0002】

生体(バイオ)応答性粒子を有するナノ粒子を製造する方法の開発は、分子診断、治療及びバイオテクノロジーに役立つツールを製造するための道を開いてきた[1]。金属、半導体及び磁気コロイド状ナノ粒子は現在、応用可能性についての精力的な研究である[2]。

【0003】

外部の磁場の下で非常に強い磁氣的性質を示す酸化鉄のような常磁性材料を含むナノ粒子を作製してきた。これらの磁性ナノ粒子は、細胞分離、インビボでの細胞及び組織ラベリング、磁気共鳴イメージングにおけるコントラストの強調、腫瘍ターゲティング、温熱療法、及び、ドラッグ・デリバリーを含む多くの生物医学的用途で用いることができる。

【0004】

このような用途で、ナノ粒子は好適には、免疫反応が誘発されるのを回避し、必要なら細胞に取り込まれるのに十分小さいのが好ましい。同じ磁氣的特性を示すべく粒子がほぼ同じサイズであるように粒子サイズがコントロールできるならば、それも有効である。粒子は体内で壊れないように化学的に安定であるのが好ましい。

【0005】

また、生物医学的用途用の磁性ナノ粒子は、それらが効果的に格納され、管理されるように、特に水中で安定であるのが好ましい。このような粒子は、使用前に格納される時、又は、体内において、溶液中で安定であり、凝集しないのが理想的である。磁性ナノ粒子は、互いに当たり合うので溶液中で凝集しやすい。これが体内で起こると、これが血流を妨げ、危険となり得；コロイド溶液においてはコロイドの使用を困難にしている。

【0006】

これまで、市販されている鉄酸化物粒子を細胞選別及び分離で使用されてきた[3]。Fe/Pt[4]、Co及びCo/Fe[5]、Fe[6]、及び鉄酸化物[7]の単分散磁性ナノ粒子が最近、材料用途のために溶液化学によって合成されている[8]。凝集を防止するために架橋デキストランで被覆された鉄酸化物磁性ナノ粒子についてに記載されている。例えば、国際公開第03/005029号パンフレットを参照されたい。

【0007】

理想的には、磁性ナノ粒子は金属酸化物ではない元素金属からなり、元素金属は磁気イメージングの良好な強調材である。しかしながら、このようなナノ粒子は金属が化学的に安定でないこともよくある。磁性ナノ粒子の化学的安定性を向上させる可能性の一つは、磁性金属を安定化するために不動態化金属を用いて磁気金属からそれらを合成することである。

【0008】

米国特許出願公開第2002/0068187号明細書には、逆ミセルを用いて合成した表面活性剤(サーファクタント)で保護された金-鉄コアシェルナノ粒子が開示されている。しかしながら、この方法は複雑であり、3つの合成段階を要する。また、できた粒子の多層の組成は、非常に小さい粒子を要するならば、不都合となり得る粒子についてのサイズの小ささの限界を増大する。

【0009】

10

20

30

40

50

米国特許第 6, 254, 662 号明細書は、超高密度記録媒体を作製するのに用いる、固体表面上にナノ結晶薄膜を形成するための FePt 及び CoPt 合金ナノ粒子の使用について開示している。磁性バイアス膜及び磁力顕微鏡用磁気探針としての使用を含むこの膜の他の使用についても記載されているが、生物医学的用途については想定されていない。このような

【0010】

上述の用途の多くは、細胞内若しくは細胞外分子に結合する配位子のような生物活性（アクティブ）のある分子にナノ粒子を連鎖することを要する。このような配位子は例えば、糖質（炭水化物）、核酸、又はタンパク質である。

【0011】

米国特許第 6, 514, 481 号明細書は、スパーサーを介してペプチドのようなターゲット分子にリンクされたシリカシェルで被覆された鉄酸化物磁性ナノ粒子を開示している。国際公開第 02/098364 号パンフレット及び国際公開第 01/19405 号パンフレットは、デキストランで被覆され、ペプチド及びオリゴヌクレオチドで機能化された磁性金属酸化物ナノ粒子を開示する。同様な戦略は、細胞内ラベリング用ナノ粒子 [9] 及びナノセンサとしてのナノ粒子 [10] を準備するのに用いられてきた。これらの方法はすべて、ナノ粒子をデキストラン若しくはシリカで被覆し、被覆されたナノ粒子は配位子に結合するように機能化され、最終的に配位子がナノ粒子に結合されることを要する時間のかかる多段階法である。

【0012】

国際公開第 03/073444 号パンフレットは、少なくとも 3 : 7 の比の Au 及び Fe 金属原子からなるコアを有する超常磁性ナノ粒子を開示している。この文献では、配位子が硫化物群を介してコアにリンクでき、ナノ粒子はナノ電子デバイスを作製するのに用いられることが述べてられている。ナノ粒子のコアは 5 nm ~ 50 nm の範囲の直径を有する。

【0013】

国際公開第 03/073444 号パンフレットは、一又は二以上のセグメントと該セグメントの少なくとも一つで結合された官能基若しくは配位子とを備えた磁性ナノワイヤを開示している。ナノワイヤは約 10 ~ 300 nm の範囲の直径と、10 nm ~ 数 10 ミクロンの範囲の長さを有する。ナノワイヤのセグメントは、金、銀、白金、銅、鉄及びコバルトが単体若しくは合金でなる材料から成ってもよく、官能基はさらに、配位子をワイヤに付けるため若しくはターゲット分子と結合させるために配位子と反応するというような化学的反応が可能である原子若しくは原子群であってもよい。配位子とナノ粒子を結合する可能な方法の範囲を提案するが、例はカルボン酸基を含む配位子とナノワイヤとの間のイオン反応に基づく。

【0014】

米国特許第 6, 531, 304 号明細書は、反応され、かつ、多糖若しくは糖の“変性体（モディファイヤ）”に共有でなく結合する金属合金から形成されたナノスケールコロイドを開示している。

【0015】

国際公開第 02/32404 号パンフレットは、糖質媒介反応を研究する [11] [12] ための水溶性ナノツールを開示している。これらのツールは、金グリコ（糖）ナノ粒子と、糖質抗原を組み込んだカドミウム硫化物グリコナノドットである。これらの水溶性金及び半導体ナノドットは生理溶液内で数ヶ月安定であり、極めて小さなコアサイズを提供する。これらは、グリコシダーゼに対して耐性があり、細胞毒性を示さない。これらはまた、糖質相互作用の基礎研究用の有用なプラットフォームであり [13]、バイオテクノロジー用途及び生物医学的用途用のツールである。しかしながら、これらのナノ粒子は磁性はない。

【0016】

従って、生物医学的用途について安定化するために配位子に結合され、所望のサイズに

10

20

30

40

50

合成され得、簡単に信頼性の高い合成法によって生成され得る、安定な磁性ナノ粒子について依然としてニーズがある。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0017】

広く言えば、本発明は、生物医学的用途に使用するのに特に適した磁性ナノ粒子を製造する材料及びその方法を提供する。特に、本発明は複数の配位子を固定するための基板として使用される磁性ナノ粒子であって、配位子がナノ粒子のコアに共有結合（連鎖）されたものを提供する。配位子は、糖質群、ペプチド、タンパク質ドメイン、核酸セグメント又は蛍光性群を備えてもよい。従って、これらのナノ粒子は、例えば、他の糖質、タンパク質又は核酸との配位子媒介の相互作用を研究するために使用され、治療薬及び診断薬として使用され得る。実施形態によっては、粒子はさらに、例えば水及び有機溶媒において溶解性であり、種々の同種の用途において使用できるという利点がある。

10

【0018】

本発明は、安定なコロイド水溶液（強磁性流体）を形成するナノスケールサイズの磁性ナノ粒子を提供するものである。ここに記載の方法は、球状でかつ高多価糖質表面を有する安定で水溶性の磁性グリコナノ粒子を製造する方法として、重要な糖質のネオ複合糖質が金/鉄クラスターに共有結合する簡単に可変性する方法を構成する。この方法は、多くの他の分子をナノクラスターに直接付けることもできる。

【課題を解決するための手段】

20

【0019】

従って、第1の態様では、本発明は、複数の配位子に結合（連鎖）された金属コアのような磁性コアを備える粒子を提供する。配位子は、糖質、ペプチド、タンパク質ドメイン、核酸セグメント又は他の生物マクロ分子を備えてもよい。配位子はさらに、又は、代替として蛍光性群を備えてもよい。

【0020】

ここで、磁性コアが不動態化金属原子及び磁性金属原子を備え、コアにおいて磁性金属原子に対する不動態化金属原子の比は約5:0.1から約2:5の間であるのが好ましい。その比が約5:0.1から約5:1の間であるのがさらに好ましい。

【0021】

ここに使用されているように、用語“不動態化金属”は、磁性を示さず、酸化に対して化学的に安定である金属を意味する。

30

【0022】

本発明の不動態化金属は反磁性体であってもよい。“反磁性体”は、一原子あたり、ネットで永久磁気モーメントを有さない全てが対の電子を有する材料を意味する。“磁性”材料は対でない電子も有し、外部の磁場に対して正の感受性を有する - すなわち、外部磁場が、電子の磁気モーメントを並ばせるように、印加した場に対して電子を整列するようにする。

【0023】

磁性材料は、常磁性、超常磁性、又は強磁性であってもよい。常磁性材料は外部磁場に対して感受性は高くなく、外部磁場が動いたら、それらの磁性は保持されていない。強磁性材料は外部磁場に対して感受性が非常に高く、電子スピンの平行になるように隣接原子が協同するので、外部磁場が存在しないときでさえ、磁気ドメインを含んでいる。外部磁場は隣接ドメインの磁気モーメントを揃え、磁気的影響を拡大する。協同効果が300nm以下の粒子では起こらず、これによって材料が永久磁力を有しないので、通常強磁性を有する材料の非常に小さい粒子は強磁性ではない。しかしながら、粒子がまた外部磁場に対して非常に感受性が高く、強い常磁性を有し、超常磁性として知られている。本発明のナノ粒子は超常磁性であることが好ましい。

40

【0024】

一実施形態では、ナノ粒子は不動態化金属原子と磁性金属原子とを備えたコアからなる

50

ものであって、コアが複数の配位子に共有結合されているものである。コアにおいて磁性金属原子に対する不動態化金属原子の比は約5 : 0.1から約2 : 5の間であるのが好ましい。その比が約5 : 0.1から約5 : 1の間であるのがさらに好ましい。

【0025】

他の態様では、本発明は、一又は二以上の数の上述の粒子を備えた組成物を提供する。実施形態によっては、ナノ粒子の数はコアに結合された異なる密度の同じか又は異なる配位子を有してもよい。

【0026】

他の態様では、本発明は医学的な取り扱い法における使用のために上述で定義した粒子を提供する。

10

【0027】

さらに他の態様では、本発明は、配位子の管理による回復された状態の取り扱いのための薬剤の作製用の上述で定義した粒子の使用を提供する。例として、これは、配位子が病状につながる傾向がある糖質の媒介した相互作用をブロックするように起こってもよい。

【0028】

本実施形態では、本発明は、糖質媒介相互作用を含む状態を取り扱うための従来のアプローチに対する利点を有する。上述のように、相互作用は典型的には多価であり、相互作用を扱うのに用いられる薬剤はこれらの相互作用の一つ又はいくつかを調整することができることが多い。このため、所望の治療効果のための相互作用を信頼性高く調整できる相互作用のサイトに薬剤をデリバリーすることが困難となっている。この問題に比して、本発明は、糖質媒介相互作用を調整し、多価相互作用の調整の困難さを克服するための複数の配位子を有する薬剤を提供する。

20

【0029】

好適な実施形態では、コア好適には金属コアの平均直径は0.5 ~ 100 nm、好適には1 ~ 50 nmであり、さらに好適には1 ~ 20 nmである。さらには、コアの平均直径は5 nm以下であり、さらに好適には2.5 nm以下であり、もっと好適には2 nm以下である。平均直径は透過電子顕微鏡のような重体技術を用いて測定することができる。

【0030】

コア材料は金属（例えば、金若しくは他の不動態化金属原子）からなり得るし、又、2種類以上の原子から成ってもよい。コア材料はコンポジット又は不動態化金属原子と磁性金属との合金であるのが好ましい。好適な不動態化金属は、Au, Ag, Pt, 又はCuであり、好適な磁性金属はFe及びCoであり、最も好適なコンポジットはAu/Feである。他のコンポジット若しくは合金を用いてもよい。ナノ粒子コアは、Au/Fe, Au/Cu, Au/Gd, Au/Zn, Au/Fe/Cu, Au/Fe/Gd, Au/Fe/Cu/Gdを含む合金からなってもよく、本発明で用いてもよい。好適なコア材料はAuとFeであり、最も好適な材料はAuである。ナノ粒子のコアはナノメートルの範囲のコア径を有するように、100個から500個（例えば、金原子）であるのが好ましく、約20個から500個であるのがさらに好ましく、50個から500個であるのがもっと好ましい。本発明のナノ粒子のさらに好適な例はAu原子及びGd原子例えばGd I I Iから成るコアであって、例えば10 nm以下の平均直径、好適には5 nm以下の平均直径、さらに好適には2.5 nmの平均直径を有する。この種の好適な粒子は、ナノ粒子のコアに存在する金属原子の比で、約1 - 20%のGd原子と約99 - 80%のAu原子、好適には約1 - 10%のGd原子と約99 - 90%のAu原子を備える。

30

40

【0031】

用途によっては、コア材料にNMR活性な一又は二以上の原子をドーブし又はラベリングし、ナノ粒子をインピトロ又はインピボのいずれでもNMRを用いて検出可能とする。NMR活性な原子の例には、Mn⁺²、Gd⁺³、Eu⁺²、V⁺²、Co⁺²、Ni⁺²、Fe⁺²、Fe⁺³及びランタニド⁺³、又は、本願に記載した量子ドットを含む。

【0032】

ナノメートルスケールの半導体結晶は量子ドットとして作用できるので、半導体原子を

50

備えたナノ粒子のコアを検出することができる。すなわち、これらは光を吸収できるので、これによって材料内の電子をより高いエネルギー準位に励起して、続いて材料に特徴的な周波数でフォトンを放出できる。半導体コア材料の例にはセレン化カドミウム、硫化カドミウム、テルル化カドミウムがある。また、硫化亜鉛のような亜鉛化合物も含まれる。

【0033】

実施形態によっては、本願発明のナノ粒子又は配位子は検出可能なラベルを含んでもよい。ラベルはナノ粒子又は配位子のコアの元素であってもよい。ラベルは、ナノ粒子の元素の固有の特性のため、又は、検出可能な他の部分 (moiety) と結合 (リンク) し、共役し又は連結することによって、検出可能であってもよい。ラベルの好適な例には、蛍光性基、放射性核種、磁気ラベル又はダイであるラベルを含む。蛍光性基は、フルオレセイン、ローダミン若しくはテトラメチルローダミン、テキサスレッド、Cy3、Cy5、等を含み、蛍光ラベルの励起及びラマン散乱分光ロスコピーを用いて放出された光の検出によって検出してもよい (Y.C.Cao、R.Jin、C.A.Mirkin、Science、2002、297:1536-1539)。

【0034】

実施形態によっては、ナノ粒子は、例えばPET若しくはSPECTを用いることによって放射性核種から放出された放射線を用いてナノ粒子を検出するのに使用するために、又は、治療のためすなわちターゲット細胞を殺すために、放射性核種を備えてもよい。本発明で使用するのに適した従来通常用いている放射性核種の例には、 TcO_4^- が最も安定だが種々の酸化状態で存在する $^{99\text{m}}\text{Tc}$; ^{32}P 又は ^{33}P ; ^{57}Co ; ^{59}Fe ; Cu^{2+} 塩として使用されることが多い ^{67}Cu ; Ga^{3+} 塩例えばクエン酸ガリウムとして通常使用される ^{67}Ga ; ^{68}Ge ; ^{82}Sr ; ^{99}Mo ; ^{103}Pd ; In^{3+} 塩として一般に使用される ^{111}In ; ヨウ化ナトリウムとして一般に使用される ^{125}In 又は ^{131}In ; ^{137}Cs ; ^{153}Gd ; ^{153}Sm ; ^{158}Au ; ^{186}Re ; 塩化タリウムのような Tl^+ として一般に使用される ^{201}Tl ; $^{39}\text{Y}^{3+}$; $^{71}\text{Lu}^{3+}$; 及び $^{24}\text{Cr}^{2+}$; が含まれる。ラベル又はトレーサーとしての放射性核種の一般的な使用は従来周知であり、本願発明の態様での使用は当業者には容易に適用できる。放射性核種は、ナノ粒子のコアをドーピングすることによって、又は、それらをナノ粒子上に固定された配位子の一部として存在するラベルとして含むことによって、非常に容易に使用されてもよい。

【0035】

前述の生物学的用途の磁性ナノ粒子は大抵は磁気金属酸化物、通常は鉄酸化物 (マグネタイト) からなる。Fe及びAuを備えたナノ粒子は上述のように作製されるが、生物学的用途で用いたり、生物活性分子に結合されたりしない。これらのナノ粒子は、酸化を防止するために金で被覆された鉄の殻で囲繞された金コアを備えた“ナノ・オニオン”として合成される。金原子及び鉄原子のいずれをも備えたヘテロコアを有するここに記載のナノ粒子は上述の粒子を改良したものである。というのは、これらは、異なる殻のナノ・オニオンを作製するのに多段階の合成段階を必要とせず、簡単な一段階で合成できるからである。

【0036】

ナノ粒子及びこれらの相互作用の結果は、従来周知の多くの技術を用いて検出できる。これらは、例えば簡単な外観検査によって又は光散乱 (ナノ粒子を含む溶液の透過率) を用いることによってナノ粒子が他の種と結合するときに生ずる凝集を検出することから、透過型電子顕微鏡 (TEM) 又は原子間力顕微鏡 (AFM) のような洗練された手法を用いてナノ粒子を視覚化することまで含むことができる。金属粒子を検出する他の手法はプラズモン共鳴すなわち、通常光放射によって生ずる金属の表面での電子の励起を用いることである。金属 (例えば、銀若しくは金) と空気若しくは水のような誘電体材料との間の界面に表面プラズモン共鳴 (SPR) の現象が存在する。被分析物がナノ粒子の表面上に固定した配位子に結合して界面の屈折率が変化すると、SPRの変化が生ずる。SPRの他の利点は、リアルタイムの相互作用をモニターするのに利用できることである。上述の

10

20

30

40

50

ように、ナノ粒子がNMR活性の原子を含み若しくはドーブされると、この手法は従来周知の方法を用いて、インピトロ又はインピボのいずれの場合でも、ナノ粒子を検出することができる。銀(1)のナノ粒子促進の還元を用い、さらに、リーダーとして平床スキャナーを用いて、量的な信号増幅に基づくシステムを用いて、ナノ粒子は文献[18]に記載しているように検出できる。ナノ粒子が糖質基と蛍光プローブとを組み合わせた配位子を含むならば、蛍光スペクトロスコピーを用いることができる。また、糖質の同位元素ラベリングを用いてこれらの検出を容易にすることができる。

【0037】

コアに結合した配位子は、一又は二以上の糖質(糖類)基、例えば、多糖類、オリゴ糖、又は単糖類の基を備えてもよい。配位子は糖脂質又は糖タンパク質のようなグリカノコンジュゲートであってもよい。糖質基に加えて、配位子はさらに、一又は二以上のペプチド基、タンパク質ドメイン、核酸分子(例えば、DNAセグメント、一重若しくは二重核酸分子、一重若しくは二重RNA分子、17個から30個のリボヌクレオチドを有するRNA分子(例えば、siRNA若しくはmiRNA配位子)、及び/又は、蛍光プローブを備えてもよい。

10

【0038】

他の実施形態では、配位子はペプチド若しくはタンパク質であってもよい。これらは、細胞上のレセプターに結合するペプチドであってもよいし、抗体若しくは治療用タンパク質であってもよい。

【0039】

他の実施形態では、配位子は核酸分子であってもよい。核酸は細胞内のシーケンスに結合するオリゴヌクレオチドであってもよい。代替として、核酸は細胞にデリバリーするためにエンコーディング遺伝子シーケンスを備えてもよい。

20

【0040】

粒子はこれに固定した一種類以上の配位子、例えば2, 3, 4, 5, 10, 20又は100個の異なる配位子を有してもよい。代替として若しくは加えて、複数の異なる種類の粒子と一緒に用いることができる。多数の付着サイトを有する配位子が複数のナノ粒子コア例えば、2, 3若しくは4個の粒子に結合してもよい。この例としては、ポリペプチド若しくは核酸分子の端部に結合したナノ粒子コアがある。

【0041】

好適な実施形態では、粒子の個々の金属コアに結合した平均数の配位子は少なくとも20個の配位子であり、好適には少なくとも50個の配位子であり、さらに好適には少なくとも60個の配位子である。

30

【0042】

配位子が粒子のコアに共有結合しているのが好ましい。これを実施するプロトコルは従来公知であるが、ここに記載に仕事は粒子のコアに供給結合した配位子に使用される反応の最初の報告である。

【0043】

これは、還元条件のもとで金及び鉄を用いて還元端部を有する配位子を還元することによって実施してもよい。粒子を作製する好適な方法は、配位子を粒子に結合するのにチオール変性(誘導)された糖質部分を用いる。一態様では、本発明は、例えば金、又は、金及び鉄を備えたコアであって複数の配位子に共有結合したコアを有する、上述で規定した粒子を準備する方法を提供する。この方法は:

40

(a) 配位子の硫化物誘導体を合成する段階と;

(b) 粒子を製造するための還元剤の存在下で、硫化物誘導体配位子を、 HAuCl_4 (テトラクロロ金酸)及び任意でコア内に鉄原子が存在する第二鉄塩と反応する段階と; を備える。好適な鉄塩は FeCl_3 である。

【0044】

実施形態によっては、配位子はリンカーによって誘導体にされる。リンカーはジスルフィドリンカーであり、例えば、混合ジスルフィドリンカーである。リンカーはさらに、鎖

50

エチレン基、ペプチド若しくはアミノ酸基、ポリヌクレオチド若しくはヌクレオチド基であってもよい。

【0045】

リンカー基の例としては、一般式 $\text{HO} - (\text{CH}_2)_n - \text{S} - \text{S} - (\text{CH}_2)_m - \text{OH}$ (ここで、 n 及び m はそれぞれ独立に 1 から 5 の間の整数) が代表的である。配位子は適切な基を介してスパーサーに好都合に結合でき、好適な混合ジスルフィドリンカーの場合にはリンカーターミナルヒドロキシル基の一つを介して結合される。ナノ粒子が合成されるときは、リンカーの $-\text{S} - \text{S} -$ が分離して、 $-\text{S} -$ を介してそれぞれナノ粒子のコアに共有結合できる 2 つのチオリンカーを形成する。好適な実施形態では、配位子は保護されたジスルフィドとして誘導体化される。好都合にも、メタノール若しくは水中においてジスルフィド保護された配位子は、テトラクロロ金酸の水溶液に加えることができる。好適な還元剤は水素化ホウ素ナトリウムである。本願方法の他の好適な特徴を以下に例で示す。

10

【0046】

本発明は、従来技術で提案された他のアレイ型のものより利点を配位子の球型アレイを提供する。特に、ナノ粒子はほとんどの有機溶媒及び特に水の中で可溶性である。これはこれらの精製において使用でき、重要なことにはこれらが粒子の表面上に固定された配位子を用意するために溶液中で使用できることを意味する。ナノ粒子が可溶性であるという事実は、自然のコンフォメーションの配位子を用意する利点を有する。治療用途では、ナノ粒子は生理学的条件において無毒性、可溶性、及び安定である。

【0047】

20

溶液中のナノ粒子は強磁性流体として知られる磁気コロイドを形成する。強磁性流体は流体の流体特性と固体の磁気特性を有する。これらは以下に記載するように広範囲の用途を有する。従来公知の強磁性流体が直面する主要な問題は安定性の欠如である：これは、磁気粒子が互いに引き合うからであり、これらは一定時間後に凝集する。凝集を防止するためにこれまで使用された方法は、粒子をサーファクタントで被覆すること、ポリマー若しくは多糖類を架橋することが含まれる。ナノ粒子を配位子若しくはターゲット分子に結合すれば、他の合成段階も必要となる。

【0048】

本発明の粒子は水中で高い可溶性を有し、このため、強磁性流体を製造するのに理想的である。さらに、できる強磁性流体は極めて安定であり、凝集することなく何ヶ月にもわたって維持できる。本発明の強磁性流体は凝集の兆候なしで一年間維持した。本発明の方法は、粒子が予め被覆され、配位子に結合されることを必要とせず、安定で機能性配位子にすでに結合された磁性ナノ粒子が単一の反応で合成されるのを可能とするものである。

30

【0049】

安定性は目で評価してもよく、コロイド溶液は凝集がない状態では透明のままであるが、一旦凝集が始まると不透明になる。代替として、凝集の存在を、透過型電子顕微鏡 (TEM) によって、又は、重水中の粒子のプロトン NMR スペクトルと新しく準備 (製造) されたナノ粒子のそれとを比較することによって、決定してもよい。磁気粒子は準備後、少なくとも 1 年は凝集の兆候は示さないのが好ましい。

【0050】

40

ここに記載の方法では、コアの形成と配位子の共有結合は同時の工程であり、このため、ネオ複合糖質の存在がナノクラスターの形状及びサイズをコントロールする。この方法で製造した糖質 (グリコ) ナノ粒子は、従来公知の磁性ナノ粒子よりも小さく 2 nm 以下のコアを有する。超常磁性挙動を全温度で示し、超伝導量子干渉素子 (SQUID) 計は、室温での強磁性成分の存在も示す。この異常磁気特性はイメージング及び細胞分離には重要である。

【0051】

磁性ナノ粒子及び強磁性流体の応用についての以下の例は、ここに記載の技術の広範な応用性をサポートするために、例として挙げたのであって、限定的なものではない。

【0052】

50

本発明の一の態様では、本発明のナノ粒子の磁気特性は、カラム若しくは遠心分離の必要性を排除する細胞分離技術において利用される。これによって、非常に純粋な細胞群が迅速にかつ容易に得ることができる。一実施形態では、ナノ粒子は、対象の細胞上のレセプターに特定の結合する配位子に結合してもよい。次いでナノ粒子を、細胞懸濁液及び磁場の印加によって懸濁液の残りから分離された粒子に結合した細胞に加えてもよい。

【0053】

これは、例えば腫瘍細胞の存在のために体液を検査することによって腫瘍の診断において、多くの用途で使用できる非常に感度が良くかつ効率的な方法である。この手法の感度はこの点で大きな利点である。

【0054】

他の態様では、本発明は配位子との相互作用が生ずるか否かを決定する方法を提供し、この方法は、一又は二以上の配位子に結合したナノ粒子をパートナーと結合する候補に接触させる段階と、結合が生ずるか否かを決定する段階とを備える。

【0055】

さらに他の態様では、本発明は配位子に結合できる物質をスクリーニングする方法を提供し、この方法は：

不動態化金属、又は、不動態化金属及び磁気金属を備えたコアであって、複数の配位子に共有結合されたコアを有するここに規定したナノ粒子を、一又は二以上の候補化合物に接触させる段階と；

候補化合物が配位子に結合するか否かを検出する段階と；を備える。

【0056】

コアにおける磁気金属原子に対する不動態化金属原子の比は約5：0.1～約2：5であるのが好ましい。比が約5：0.1～約5：1であるばさらに好ましい。

【0057】

他の態様では、本発明は、配位子に結合できる物質の試料において存在を決定する方法を提供するものであり、この方法は、試料を配位子に結合したナノ粒子に接触される段階と、結合が生ずるか否かを決定する段階とを備える。この方法は、例えば被分析物の存在に関連した病気状態の診断を助けるのに用いるために、試料内に一又は二以上の被分析物の存在若しくは量を決定するのに用いてもよい。被分析物の存在は被分析物とナノ粒子との凝集の形成によって信号化されてもよく、この存在は試料中に流体の緩和特性を測定することによって検出し得るものである。緩和特性の変化は凝集の存在、従ってターゲット分子の存在を示すものである。

【0058】

配位子が糖質である場合、異なる糖質が介在する相互作用の範囲は従来公知であり、ここに開示したナノ粒子を用いて研究若しくは変調され得る。これらには、白血球 - 内皮細胞付着、糖質 - 抗体相互作用、糖質 - タンパク質バクテリア及びウィルス相互作用、腫瘍細胞の免疫学的認識、腫瘍細胞 - 内皮細胞（例えば、転移研究のために）、及び、異組織と細胞との認識が含まれる。

【0059】

他の態様では、本発明の磁性ナノ粒子及び強磁性流体を癌の治療に用いることができる。磁性ナノ粒子は腫瘍の温熱治療に用いてもよく、この場合、磁性ナノ粒子を腫瘍に注入し、高周波AC又はDC磁場にさらす。代替として、近赤外光を用いてもよい。磁気材料の緩和磁気エネルギーによって生ずる熱が粒子の周りの腫瘍組織を殺す。本発明の一実施形態では、腫瘍細胞は腫瘍特定抗原をナノ粒子に組み込むことによって特定のターゲットとしてもよい。これによって、注射によって容易には到達しない腫瘍を治療粒子によって標的にすることを可能とし、通常健康な細胞が殺されるのを回避する。

【0060】

所定の励起周波数について、最大特定吸収率(SAR)、さらに最大効率加熱を得る最適ナノ粒子サイズが存在する。この技術は、治療の効率を最大にし、管理される強磁性流体の量を最小にするために、狭いコアサイズ分散を有する磁性ナノ粒子を必要とする。本

10

20

30

40

50

発明の磁性ナノ粒子は、合成法がナノ粒子の厳密な制御を可能にするので、特にこの用途に適している。

【0061】

他の実施形態において、ナノ粒子は抗体又は殺腫瘍ドラッグのような治療活性物質に結合していてもよい。ナノ粒子の磁気特性は、ナノ粒子を腫瘍細胞にガイドする磁場を用いることによって腫瘍を標的にするのも用いることができる。しかしながら、腫瘍細胞にナノ粒子を向けるために磁場を用いるだけでは必ずしも実現可能若しくは正確ではなく、そのため、本発明はナノ粒子を腫瘍特定配位子を介して腫瘍細胞に特定して方向付けることができるという利点を提供する。これによって、使用するドラッグの量を減少することができ、副作用の可能性を低減する。というのも、ドラッグが必要とされる細胞にだけ向

10

【0062】

他の態様では、本発明の磁性ナノ粒子を磁気共鳴イメージング(MRI)の質を改善するのに用いられる。MRIは、腫瘍のような構造を効率的に見ることができるのに十分なコントラストを必ずしも提供しないが、得られたイメージをコントラスト媒体のような磁性ナノ粒子を用いることによってエンハンスすることができる。得られたエンハンス感度によって腫瘍を検出することができるが、まだ非常に小さく、治療が成功するチャンスが高いときに非常に早い段階で腫瘍の検出が可能となる。

【0063】

このように腫瘍細胞の検出を温熱治療とくみあわせることもできる：腫瘍細胞が一旦同

20

定されると、レーザー若しくは近赤外光を腫瘍サイトに向けて細胞を殺す。

【0064】

さらに、現在、肺はMRIイメージングによってイメージすることができない。ポジトロン放出断層撮影(PET)は肺をイメージすることができるが、放射線の繰り返し照射の危険のために、喘息及び肺気腫患者のような規則的な走査を要する患者については使用することができない。最近の研究では、過分極化気体MRIが喘息のような病気に適用できることを示している。これは、これらの気体の磁化が数秒で得られる肺全体のイメージ用に十分だからであり、患者に息を吸い込ませ、息を保持し、息を吐き出させる。患者が息を吸い、吐きときにイメージをとる能力は、MRIを用いて患者が息を吸い、吐くときに動的なイメージを精製することもできる。磁化された糖質ナノ粒子、及び、特にガドリ

30

ニウムを含むこれらの粒子はせいぜい0.8nmで製造できる。この小さな粒子は“磁化された気体”として有効に考えることができるので、従って、過分極化気体の使用よりはるかに便利なセッティングにおいて肺イメージング用に使用できる。

【0065】

本発明の配位子結合粒子は腫瘍細胞に特定してデリバリーされ得て、そのため、もともとの腫瘍サイトから離れた腫瘍細胞さえ治療のために標的化される。

【0066】

磁性元素金属を含むコアを有する本発明の実施形態は、元素金属は金属酸化物をイメージングする効率的なエンハンサーなので、特にイメージング用途によく適している。コア内の不動態化金属の存在は、これが磁性金属の酸化を防止するので有利である。不動態化

40

金属はナノ粒子の生体適合性も増大し、コアを配位子に結合することを許容し、生物学的使用に加えて、酸化から磁性金属を保護し、凝集の可能性を低減する。

【0067】

本発明のナノ粒子の他の利点は、標的分子又は治療分子に結合されるときにさえ、細胞に捕獲されるのに適した極端に小さいサイズであることである。

【0068】

他の点では、本発明の磁性ナノ粒子はドラッグデリバリー用のトレーサーとして使用される放射性材料の代わりに用いてもよい。放射性材料の代わりに磁気粒子を使用することによって、ドラッグデリバリーが磁気変動を測定することが可能となり、これによって放射線からの潜在的な害を排除する。

50

【0069】

一般的に、糖質のタンパク質のような他の種類又は他の糖質への結合が非常に弱く、多価の傾向があるので、糖質が媒介した相互作用を検出又は変調するのに従来困難な問題がある。従って、検出のために結合は弱く、また、相互作用を変調するために、一価の薬剤は多価の糖質をベースにした相互作用を破壊するのに限定的にしかうまくいかない。

【0070】

糖質 - 糖質相互作用に関連した本発明の実施形態では、2種類の相互作用を同定することができる。同種親和性相互作用では、同一の糖質同士が互いに相互作用し、凝集が起こるまで表面に固定した単一種の配位子を有する粒子の濃度の安定的な増大によって検出され得る。これは、光散乱又は電子的効果によって検出される。

10

【0071】

異好性相互作用は2又は3以上の異なるナノ粒子を混合し、粒子の凝集状態を決定することによって検出できる。

【0072】

本発明は、糖質を媒介した相互作用を研究し、変形するための多目的なプラットフォームを提供する。例えば、粒子は抗糖質抗体を検出するのに用いられ、粒子の凝集を検出するために光散乱を介して抗体の粒子上の配位子への結合を検出し、又は、粒子クラスター内の金属原子が一緒になるときに変わる表面プラズモン共鳴のような磁場効果を介してその配位子への結合を検出する。

20

【0073】

本発明は、糖質を媒介する相互作用が生ずるかどうかを決定する方法を提供するものであり、方法は、糖質を媒介した相互作用を介して本発明のナノ粒子と相互作用させるために、疑わしい一又は二以上の種を接触させる段階と、ナノ粒子が糖質媒介相互作用を変化させるかどうかを決定する段階と、を備える。

【0074】

本発明は、糖質と結合するパートナーとの間の相互作用を壊す方法を提供し、この方法は、糖質及び結合パートナーを本発明のナノ粒子と接触させる段階を備え、ナノ粒子は糖質と結合パートナーとの相互作用を壊すことができる糖質基を備える。

【0075】

他の態様では、配位子が抗原であるナノ粒子は例えば、表皮の外側層を介して経皮的通過を促進するためにデリバリーガンを用いることによって、ワクチンとして管理することができる。ナノ粒子は、例えばリンパ系を拡散しながら成熟する樹枝状細胞を細くすることができ、免疫応答の変形及び抗原に対するワクチン接種につながる。

30

【0076】

配位子が抗原をエンコーディングする核酸であるナノ粒子はワクチンとしても管理してもよい。ナノ粒子は特にこのような用途によく合っている。というのは、粒子が十分に小さくて使用される細胞のダメージなしで細胞膜を貫通するように、核酸ワクチンは有効である個々の細胞に入らなければならないからである。

【0077】

従来公知のワクチンデリバリーガンは、圧縮された空気又は気体通常はヘリウムガスの使用によってデリバリーを動かす。これは痛みを伴い、皮膚上にみみず腫れを生じ得る。本発明の磁性ナノ粒子は代替のデリバリーシステムで使用され、ここで、粒子をデリバリーする駆動力は磁場の印加によって供給する。磁場の反転によって、外側表皮層を介してナノ粒子を進ませるのに十分な急速な加速を生ずる。これによって、痛みを軽減し、圧縮ガスの使用によって生ずるみみず腫れの形成が低減される。

40

【0078】

他の用途では、細胞表面糖質はウィルス若しくはバクテリアレセプター用の配位子(いわゆる付着因子)として作用すること、及び、糖質のレセプターへの結合が感染中に要する事象であることが公知である。これらの相互作用を変調できる合成糖質例えば、複合糖質は本発明のナノ粒子内に固定することができ、これらの相互作用を研究するための試薬

50

として、また、ウィルス又はワクチン感染を防止するための治療のために、使用することができる。

【0079】

他の用途では、本発明は免疫反応の変調（モジュレーション）例えば、以下の移植可能性で有効である。組織の免疫学的認識が移植された組織上に存在する表面糖質と抗体のようなホストの免疫システムのコンポーネントとの間の糖質が媒介する相互作用によって始まる。これによって、これは、この相互作用を起因とする免疫反応を改善するためにターゲットとなり得る。例えば、糖質 Gal 1 - 3 Gal 1 - 4 Gl n Ac (“ Gal ” エピトープ (抗原決定基)) が、移植された組織の拒絶に含まれる重要な抗原エピトープとして関係している。こうして、 Gal エピトープと免疫系との相互作用の変調はこ

10

【0080】

代替アプローチは、多くの腫瘍関連抗原若しくは腫瘍自己分泌因子が糖質ベースなので、癌の治療に有効である。この事象においては、ナノ粒子はワクチンとして備えられ、免疫系を準備して、糖質を表す腫瘍細胞が抗体上を攻撃することができる場所の抗体を生成する。この点では、多くの細胞が、通常健康な細胞とは対照的に、ナノ粒子によって刺激された免疫応答を腫瘍細胞に特定して向けることができる異常なグリコシル化（糖化）パターンを保有することは公知である。ナノ粒子は、例えば、内皮細胞を介した腫瘍細胞のマイグレーションを通して、癌の転移を阻止するのに使用することもできる。

20

【0081】

前立腺癌におけるリンパ節転移の非侵襲的検出はすでに、MRI と組み合わせてリンパ向性超常磁性ナノ粒子を用いることによって立証されている。転移用の親和性若しくは特異性を増大した糖（グリコ）ナノ粒子の例のリストを以下に示す。

- | | | |
|-----------------------|------------------------|-----------------|
| Le ^x - GNP | Le ^y - GNP | STn - GNP |
| G l o g o - H - GNP | G g ³ - GNP | G l u c o - GNP |
| M a l t o - GNP | L a c t o - GNP | M a n - GNP |

【0082】

糖ナノ粒子のような存在する他の配位子に加えて、エストロゲン、DHEAのようなホルモンをナノ粒子に付けて、可溶性にし得る。これらは乳癌のような癌の検出における使用を有してもよい。ペプチドは細胞表面腫瘍遺伝子コード化レセプターのような特定のレセプターに局在化したナノ粒子に付けることもできる。脂質、特にトールレセプターに結合するものを付けることもできる。メチレンブルーのような化学的配位子が、メラノーマ転移の検出に使用され得る糖ナノ粒子に付くことができる。最後に、siRNA ナノ粒子は、細胞内へ取りこんだ後に、腫瘍遺伝子若しくはウィルス特定 mRNA の発現をイメージし得る。

30

【0083】

他の態様において、ナノ粒子は配位子に特定の結合し得る抗体を増加させるキャリアとして使用できる。これは配位子が糖質である場合に特に好都合である。というのは、抗体は小さいことが多く、強い免疫応答を生じないので、これは糖質含有部分に対する抗体を増大することが従来のチャレンジングな問題であり得るためである。

40

【0084】

他の態様では、糖質は、ナノ粒子によって必要となる細胞構成にガイドされ得る量子ドットを提供するために、セレン化カドミウムのナノ結晶に付けることができる。セレン化物に加えて硫化物のような他のアニオンを使用してもよい。量子ドットは生物学的イメージングにおける使用の可能性、電子デバイス及び光デバイスのいずれにおいても、量子コンピュータ及び候補ドラッグのスクリーニングにおける使用の可能性を有する。

【0085】

他の態様では、本発明は、心筋救済の査定例えば、心臓麻痺後に生存している心臓の組織の量のために、本願で定義するナノ粒子の使用を含む。現在、これは、テクネチウムのような放射性核種と組み合わせて、細胞によって捕獲（取り込み）され得るセスタミビ（

50

sestamibi) やテトロフォスミン (tetrafosmin) のような化合物を用いて - シンチグラフ技術 (例えば、SPECT) によって大部分はモニターされる。放射性トレーサーの取り込みは局所的な血流に比例し、心筋救済の程度の示唆を与えることになる - 取り込みが大きいほど、心筋救済も大きくなる。

【0086】

セスタミビやテトロフォスミンのような化合物は、これらが細胞膜を介して受動的に拡散する脂溶性陽イオン複合体なので作用する。このような複合体の機能化された配位子は、磁化したナノ粒子のセルフアセンブル中の表面配位子として容易に組み込まれ得る。他の広範囲の新規な化学的配位子がナノ粒子に付いて、それらを自由に拡散可能にし得る。

【0087】

本願に記載するナノ粒子は、拡散が細胞へ拡散し得るセスタミビ、テトロフォスミン等の他の化合物の誘導体の存在の下でセルフアセンブルしてもよい。その結果のナノ粒子を用いて、心筋救済を、放射能の必要なしで、磁気イメージングによってモニターし得る。磁気共鳴イメージングをナノ粒子の検出のために用いてもよい；放射性トレーサーについて、ナノ粒子の取り込み量は局所的な血流に比例する。現在通常用いられているシンチグラフィートレーサーは 99mTc - セスタミビ、及び、 99m - テトロフォスミンである (Recent Advances in 99Tc Radiopharmaceuticals - Annals of Nuclear Medicine 16: 79-93(2003) ; Contributions of Nuclear Cardiology to Diagnosis and Prognosis of Patients with Coronary Artery Disease - Circulation 2000: 100: 1465-1478)。好適な態様では、本発明のナノ粒子はセスタミビに共役され、磁気イメージング用に用いられる。このように、ナノ粒子は心筋救済をモニターするために、 99mTc の代用をするのに用いてもよい。

【0088】

他の用途では、ここに開示されている磁性ナノ粒子は磁気記録メディアの製造の際に用いてもよい。

【0089】

本発明の実施形態を例として、添付図面を参照して非限定的に説明する。

【発明を実施するための最良の形態】

【0090】

本願に記載したナノ粒子又はこれの誘導体は、薬剤組成で配合 (定式化) でき、種々の形で患者に投与できる。従って、ナノ粒子は、インビボ細胞及び組織ラベリングについて、腫瘍ターゲティング及び温熱治療用の薬品として、又は、磁気共鳴イメージングにおいてコントラスト強調媒体 (メディア) として使用してもよい。

【0091】

経口投与用の薬剤組成物はタブレット、カプセル、粉末又は液体であってもよい。タブレットは、ゼラチン、補助薬又は不活性希釈剤のような固形キャリアを含んでもよい。液体薬剤組成物は一般に、水、石油、動物性若しくは植物性油、鉱油若しくは合成油のような液体キャリアを含んでもよい。生理食塩水、又は、エチレングリコール、プロピレングリコール若しくはポリエチレングリコールのようなグリコールを含んでもよい。このような組成物及び調合液は一般に合成物の少なくとも0.1重量%を含む。

【0092】

非経口投与は以下のルートによる投与を含む：静脈、皮膚若しくは皮下、鼻、筋肉内、眼球、経上皮、腹腔、及び、局所的 (皮膚、眼、直腸、鼻、吸入、噴霧器)、及び、直腸系のルート。静脈、皮膚若しくは皮下の注射又は痛みサイトの注射については、有効成分は、発熱物質フリーでかつ適当な pH、等張性及び安定性を有する非経口的に受け入れられる水溶液の形である。当業者は例えば化合物若しくはその誘導体の溶液を用いる適当な溶液を、例えば、生理食塩水で、グリセロール、液体ポリエチレングリコール若しくはオイルを用いて準備した分散液で準備することができる。

【0093】

任意で他の活性材料と組み合わせた一又は二以上の化合物に加えて、組成物は調合可能

10

20

30

40

50

な賦形剤、キャリア、バッファ、安定剤、等浸透圧剤、防腐剤若しくは抗酸化剤若しくは当業者に周知の他の材料の一又は二以上を含むことができる。このような材料は非毒性であり、活性材料の有効性と干渉すべきではない。キャリア若しくは他の材料の精確な性質は投与ルート例えば、経口又は非経口に依存してもよい。

【 0 0 9 4 】

液体薬剤組成物は典型的には、約 3 . 0 から 9 . 0 の間、より好適には約 4 . 5 から 8 . 5 の間、さらに好適には約 5 . 0 から 8 . 0 の間の pH を有するように配合される。組成物の pH は、典型的には約 1 m M から 5 0 m M の範囲で使用される、酢酸塩、クエン酸塩、リン酸塩、コハク酸塩、トリス又はヒスチジンのようなバッファの使用によって維持できる。さもなければ、組成物の pH は生理学的に受け入れられる酸若しくは塩基を用いて調整できる。

10

【 0 0 9 5 】

防腐剤は一般に薬剤組成物に含まれて細菌の繁殖を抑制し、組成物の保存期間を延ばし、多様な使用パッキングを可能とする。防腐剤の例には、フェノール、メタクレゾール、ベンジルアルコール、パラヒドロキシ安息香酸及びそのエステル、メチルパラベン、塩化ベンザルコニウム、及び、塩化ベンゼトニウムを含む。防腐剤は典型的には約 0 . 1 から 1 . 0 % の範囲で使用される。

【 0 0 9 6 】

薬剤組成物は、“ 予防的な有効量 ” 又は “ 治療的な有効量 ” (この場合、病気予防は治療と考えてもよい) で個人に与えられ、これは個々に対する効果を示すのに十分である。典型的には、これは、個々に効果を出す治療的に有効な作用を引き起こす。投与される組成物の実際の量、及び投与の頻度は処置される状態の性質や深刻さに依存する。処置の処方箋、例えば、投与量の決定等は一般的な処置者や他の医師の責任の範囲内であり、典型的には処置される疾患、個々の患者の状態、デリバリーの場所、投与の方法及び処置者が知っている他の要素が考慮される。上述の手法及びプロトコルの例は、レミントン (Remington) の Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing 社、イーストン、ペンシルバニア州、第 19 版、1995 年)、Handbook of Pharmaceutical Additives (第 2 版、アッシュ (M. Ash) 及びアッシュ (I. Ash) 編著、2001 年 (Synapse Information Resources 社、エディコット、ニューヨーク州、米国)、Handbook of Pharmaceutical Excipients (第 2 版、1994 年)。例えば、組成物は体重の単位 k g あたり約 0 . 0 1 から 1 0 0 m g の活性組成物の

20

30

【 0 0 9 7 】

抗体

ナノ粒子はコア粒子に結合した配位子に対して抗体応答を生ずるキャリアとして使用してもよい。これらの抗体は従来標準の技術を用いて変成できる。ここにはじめて例示するものと類似の抗体も公知の方法に関連してここに教示したものを用いて生成できる。これらの抗体を製造する方法は、ナノ粒子を用いてほ乳類 (例えば、マウス、ラット、うさぎ、馬、やぎ、羊、又は猿) に免疫性を与える (免疫化する) ことを含む。抗体は従来公知の種々の技術のいずれを用いて、好ましくは抗体の対象の抗原への結合を用いることによ

40

【 0 0 9 8 】

ほ乳類をナノ粒子を用いて免疫性を与えることと代替で若しくはこれに補助して、配位子及び / 又はナノ粒子に対して特定の抗体が、発現免疫グロブリン可変ドメインの組み込み技術によって生成されたライブラリから、例えば、それらの表面上に機能的な免疫グロブリン結合ドメインを表示するラムダバクテリオファージ又は繊維状バクテリオファージを用いて、得られてもよい ; 例えば、国際公開 9 2 / 0 1 0 4 7 号パンフレットを参照されたい。ライブラリは素朴なものであってもよい。すなわち、ナノ粒子のいずれを用いても免疫性を与えられていない有機体 (生命体) から得られたシーケンスから構築しても

50

よいし、対象の抗原に曝された有機体から得られたシーケンスを用いて構築されてもよい。

【0099】

“単クローン性抗体”という語は、抗体の実質的に均一な個体群から得られた抗体例えば、個体群を構成する個々の抗体は、少量存在する突然変異体に自然に生ずる可能性があるものとは異なり、同一であることを意味する。単クローン性抗体は、コーラ (Kohler) 及びミルスタイン (Milstein) (Nature, 256:495, 1975年) に最初に記載された方法によって生産でき、又は、組み換え方法 (カビリー (Cabilly)) による米国特許第4,816,567号明細書、又は、単クローン性抗体生産技術及び応用 (Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, 79-97, Marcel Dekker社、ニューヨーク州、1987年) においてマージ (Mage) 及びラモイ (Lamoyi) を参照されたい。

10

【0100】

ハイブリドーマ法において、マウス若しくは他の適当な宿主動物を、免疫化 (免疫処置) に使用するナノ粒子に特定して結合する抗体を生産する若しくは生産し得るリンパ球を誘発する (発現する、引き出す) ために皮下、腹腔内、又は筋肉内のルートによって抗体を用いて免疫化する。代替として、リンパ球をインビトロで免疫化してもよい。次いで、リンパ球を、ポリエチレングリコールのような適当な融剤を使用して骨髄腫細胞を用いて融合し、ハイブリドーマ細胞を生成する (ゴーディング (Goding) による Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, 59-103 (Academic Press, 1996) を参照されたい)。

20

【0101】

こうして準備したハイブリドーマ細胞を、融合されていない親ハイブリドーマ細胞の成長若しくは生存を防止する一又は二以上の物質を好適に含む適当な培地 (培養液) に種がまかれ、成長し得る。例えば、親ハイブリドーマ細胞が酵素ヒポキサンチン・グアニン・ホスホリボシルトランスフェラーゼ (HGPRT 又は HPR T) を欠くならば、ハイブリドーマ用の培地は典型的には、HGPRT 不足細胞の成長を防止するヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン (HAT 媒体) を含む。

【0102】

好適な骨髄腫細胞は、効率的に融合し、選択された抗体生成細胞によって抗体の安定的な高レベルの発現を維持し、HAT 媒体のような媒体に敏感な細胞である。

30

【0103】

ハイブリドーマ細胞が成長する培地は、ナノ粒子 / 配位子に対して向かう単クローン抗体の生成のために検査 (評価、分析) される。好適には、結合特異性 (選択性) は、酵素結合免疫吸着体検査によって決定される。本発明の単クローン抗体はナノ粒子 / 配位子に特定の結合する抗体である。

【0104】

本発明の好適な実施形態では、例えば、スキャチャード分析 (ムンセン (Munson) 及びポラード (Pollard) の Anal. Biochem., 107:220, 1980年参照) 単クローン抗体はマイクロモル又はそれ以上の親和性 (例えば、 10^{-6} mol 以上の親和性) を有する。

【0105】

所望の特異性及び親和性の抗体を中和 (中性) 抗体を生成するハイブリドーマ細胞を生成し、クローンを希釈手順を制限することによってサブクローンして、標準法によって成長させ得る。この目的のための適当な培地には、ダルベッコ変性イーグル培地若しくは PRMI-1640 培地が含まれる。また、ハイブリドーマ細胞は、動物中の腹水腫瘍としてインビボで成長してもよい。

40

【0106】

サブクローンによって分泌された単クローン抗体は、例えばタンパク質 A - セファロース、水酸燐灰石クロマトグラフィ、ゲル電気泳動、透析、又は親和性クロマトグラフィのような従来の免疫グロブリン精製手法によって、培地、腹水流体若しくは血清から適当に分離される。

50

【 0 1 0 7 】

本発明の単クローン抗体をエンコーディングする核酸は、例えば、ネズミの抗体の重鎖及び軽鎖をエンコーディングする遺伝子に特定の結合し得るオリゴヌクレオチドプローブを用いることによって、従来周知の手法を用いて容易に分離（単離）され、配列が決定される。本発明のハイブリドーマ細胞は抗体若しくはそのフラグメントをエンコーディングする核酸の好適な源である。一旦分離されると、核酸は発現ベクター若しくはクローニング・ベクターに縛られ、次いで、宿主細胞に転写され、単クローン抗体を組み換え宿主細胞培地で生成されるように培養され得る。

【 0 1 0 8 】

所望の結合特性で抗体を生成できるハイブリドーマは本発明の範囲内であり、抗体（抗体フラグメントを含む）をエンコーディングする核酸を含む宿主細胞であり、それを発現し得る。本発明はまた、抗体が生成され、好適には分泌されている状態で抗体を生成できる細胞を成長させることを含む抗体の製法も提供する。

【 0 1 0 9 】

本発明による抗体は多くの方法で変性してもよい。実際、“抗体”との語は必要な特異性を有する結合ドメインを有するいかなる結合物質をもカバーするように解釈されたい。本発明は、合成分子や、抗原若しくはエピトープ、ここに記載したような糖質配位子に結合し得る抗体を形状が類似する分子を含む、抗体フラグメント、誘導體、抗体の機能同等物及び同族体をカバーする。

【 0 1 1 0 】

抗原若しくは他の結合パートナーを結合し得る抗体フラグメントの例には、V_L、V_H、C₁、及びC_H1ドメインからなるF_abフラグメント；V_H及びC_H1ドメインからなるF_vフラグメント；抗体の単一アームのV_L及びV_HドメインからなるF_vフラグメント；V_Hドメインからなるd_Abフラグメント；分離されたCDR領域及びF（a b'）₂フラグメント、ヒンジ領域でジスルフィドブリッジによって結合された2個のF_abフラグメントを含む二価フラグメントを含む。単鎖F_vフラグメントも含まれる。

【 0 1 1 1 】

本発明による単クローン抗体を生成するハイブリドーマは遺伝突然変異若しくは他の変異を受けてもよい。単クローン抗体に組み換えDNA技術の手法を用いて他の抗体、ヒト化抗体、又はオリジナル抗体の特異性を維持するキメラ分子を生成することができることは当業者は理解する。このような手法には、免疫グロブリン可変領域、又は、異なる免疫グロブリンの、抗体を一定（コンスタント）領域若しくは一定領域及びフレームワーク領域の相補決定領域（CDR：complementarity determining region）をエンコーディングするDNAを導入することを含む。例えば、欧州特許出願公開第0,184,187号明細書、英国特許出願公開第2,188,638号明細書、又は欧州特許出願公開第0,239,400号明細書を参照されたい。キメラ抗体のクローニング及び発現は欧州特許出願公開第0,120,694号明細書及び欧州特許出願公開第0,125,023号明細書に記載されている。

【 0 1 1 2 】

実験セクション例 1 - Au - Fe ナノ粒子

配位子に共有結合した磁気糖ナノ粒子を合成する方法を見出した。例として、2つの重要なオリゴ糖のチオール誘導ネオ複合糖質1及び2、非抗原性二糖マルトース（Glc（1-4）Glc-1-OR）、及び、抗原性ラクトース（Gal（1-4）Gal-1-OR）を、インサーチュ磁性ナノ粒子を機能化するように準備した（図3、スキーム1）。ジスルフィド1及び2の合成は、都合よく保護されたマルトース及びラクトース誘導體を、11-アセチルチオ-アンデカノール（11-acetylthio-undecanol）、11-アセチルチオ-3,6,9-トリオキサ-アンデカノール（11-acetylthio-3,6,9-trioxa-undecanol）のそれぞれを用いてグリコシド化することによって実施した[12]。いずれのリンカーも、材料全体の特性における疎水性若しくは親水性の影響をテストするために用いられてきた。

10

20

30

40

50

化合物 1 及び 2 はジスルフィドの形で分離し、金 - 鉄保護糖ナノ粒子の準備のためにこの形で用いた。水溶性糖ナノ粒子 1 - AuFe (マルト (malto) - AuFe) 及び 2 - AuFe (ラクト - AuFe) はワンポット合成を用いてメタノール / 水混合物において得た。1 : 4 の比の FeCl_3 及び HAuCl_4 をジスルフィド 1 又は 2 の存在下で NaBH_4 を用いて還元した。金属コアをネオ複合糖質単層で保護することにより、高安定性でバイオ機能化ナノクラスターとなる。これらは遠心濾過によって精製され、 $^1\text{H-NMR}$ 、 UV-vis 、 ICP 、 TEM 、 EDX 及び SQUID によってキャラクタライズされてきた。

【0113】

誘導的にカップリングされたプラズマ - 原子エミッションスペクトロスコピー (ICP) によって実施された粒子の鉄分析は、1 - AuFe 及び 2 - AuFe についてそれぞれ、0.27%、2.81% の鉄含有量を示した。これらのデータはそれぞれ 5 : 0.1、5 : 1 の平均 Au : Fe 比に対応する。図 1 は、5000 e の磁場で 5 k から 300 k の範囲で超伝導量子干渉素子 (SQUID) によって、ラクト (lacto) - AuFe (A) 及び マルト - AuFe (B) のナノ粒子についてゼロ磁場冷却及び磁場冷却磁化曲線を示す。磁気測定から、5 k から 300 k の範囲で超常磁性及び強磁性挙動の両方が存在していることが推察される。 SQUID 測定で、2 nm 直径の磁性ナノ粒子について予測される、5 k 以下のプロッキング温度 (TB) を有する糖ナノ粒子の超常磁性を確認している。超常磁性成分は、a) 磁化の実験的な熱依存性をキュリー - ワイス則に部分的にフィッティングしたもの；b) ヒステリシスループの印加磁場と温度との比 (H/T) に対する部分的依存性；c) ZFC 曲線と FC 曲線との間の差；から明確に観察される。

【0114】

図 2 は、ラクト - AuFe (A) 及び マルト - AuFe (B) のナノ粒子について透過電子顕微鏡写真 (左) 及び コアサイズ分布ヒストグラム (右) を示している。各黒点は単一の粒子に対応する。ドットは、コアに付いた配位子 (ネオ複合糖質) によって規則的に分離されており、これらは秩序化した単層を形成している。 TEM はフィリップス社の CM200 マイクロスコープで 200 kV 電子ビームエネルギーで記録された。

【0115】

2 - AuFe 試料 (ラクト - AuFe) の場合では、糖ナノ粒子は分散され、球形で均一である。金 / 鉄クラスターの平均直径は 2 nm と評価された。約 10 nm のサイズの数個の分離された粒子はグリッドのいくつかの領域で発見されたが、これらの粒子は、対応するヒストグラムで示したように、二峰性粒子サイズ分布を示す (図 2 B)。平均直径約 2.5 nm 及び 1.5 nm 以下の金 / 鉄クラスターを有する粒子が見つめられた。グリッドの拡張領域における一列に並んだ鎖の自発的な形成であって付加的な静磁力を示すものに留意する価値がある (図 2 B)。この挙動はナノ粒子間の双極子 - 双極子磁力又は量子トンネルに起因し得る。並んだ配置は 2 - AuFe ナノドットについて得られた顕微鏡写真に観察されなかったが、高秩序の単層が観察された。

【0116】

準備

マルト Cu11SauFe : 水 (0.5 mL) に FeCl_3 (2 mg ; 0.013 mmol ; 0.25 当量) が溶解した溶液を、 MeOH (11.5 mL) にジスルフィド 1 (80 mg ; 0.075 mol ; 3 当量) を溶解した溶液に入れ、次いで、水 (2 mL) に HAuCl_4 (17 mg ; 0.05 mmol ; 1 当量) が溶解した溶液を入れた。次いで、 NaBH_4 1 M (52 mg ; 1.38 mmol ; 27.5 当量) を高速攪拌しながら少量加えた。生成した黒い懸濁液をさらに 2 時間攪拌し、真空中で溶媒を除去した。糖ナノ粒子は MeOH で不溶性であるが、水には可溶である。

【0117】

ラクト EG_4SauFe : 水 (0.25 mL) に FeCl_3 (1 mg ; 0.0065 mmol ; 0.25 当量) が溶解した溶液を、 MeOH (12 mL) にジスルフィド 2 (70 mg ; 0.07 mol ; 5.5 当量) を溶解した溶液に入れ、次いで、水 (1 mL) に

HAuCl_4 (8 mg ; 0.25 mmol ; 1 当量) が溶解した溶液を入れた。次いで、 NaBH_4 1 M (26 mg ; 0.69 mmol ; 27.5 当量) を高速攪拌しながら少量加えた。生成した黒い懸濁液をさらに2時間攪拌し、真空中で溶媒を除去した。糖ナノ粒子は MeOH で不溶性であるが、水には可溶である。

【0118】

精製

精製を遠心濾過によって実施した。粗生成物を水 (~ 15 mL) NANOPure で溶解し、溶液を遠心濾過器 (CENTRIPLUS YM30, MICROCON, MWC O = 30000) 内にロードし、遠心力 (3000 x g, 40分) を印加した。黒っぽい糖ナノ粒子残留物を MeOH 及び水で洗い、開始材料がもはや薄層クロマトグラフィ (TLC) で検出できなくなるまで複数回繰り返した。残留物を水に溶解し、複数回遠心力をかけて、不溶性材料を除去した。透明な溶液を凍結乾燥し、得られた生成物は塩及び開始材料がなかった (^1H 及び ^{23}Na NMR スペクトロスコピー - においてジスルフィド及び Na^+ からの信号がなかった)。

【0119】

キャラクタリゼーション

サンプルの TEM 検査を 200 kV (フィリップス社の CM200 マイクロスコープ) で実施した。Au/Fe 糖ナノ粒子の水溶液の一滴 (20 μL) をカーボン膜で被覆された銅グリッド上に置いた。グリッドは室温で数時間空气中で乾燥した。Au/Fe クラスターの粒子サイズ分布を、自動イメージアナライザーを用いて複数の顕微鏡写真から評価した。EDX 分析は顕微鏡に取り付けたフィリップス社の DX4 装置で実施した。ICP 分析は PEC-009 プロトコルに従ってアグルクエム S.L. によって実施した。UV スペクトルを UV/vis パーキンエルマーラムダ 12 分光光度計によって得た。 ^1H -NMR スペクトルはブルーカー DRX-500 スペクトロメータによって得た。化学シフトを D_2O に対して ppm () で与えられている。

【0120】

1 - AuFe : TEM : 金属コアの平均直径、1.5 nm と 2.5 nm
ICP : 0.27% Fe
UV (H_2O) : = 500 nm、表面プラズモン共鳴 ^1H -NMR (500 MHz、 D_2O) : 5.32 (brd, 1H, H-1'), 4.37 (brd, 1H, H-1)、4.00 - 3.30 (m, 13H)、2.70 (s, 2H, CH_2S)、1.85 - 1.20 (m, 17H)

【0121】

2 - AuFe : TEM : 金属コアの平均直径、2 nm
ICP : 2.81% Fe
UV (H_2O) : = 500 nm、表面プラズモン共鳴 ^1H -NMR (500 MHz、 D_2O) : 4.49 (brd, 1H, H-1'), 4.40 (brd, 1H, H-1)、4.10 - 3.30 (m, 23H)、2.92 (m, 0.5H)

【0122】

例 2 - 磁性 Au ナノ粒子

異なる糖質分子の自己組織化単層 (SAM) で安定化された水溶性金糖ナノ粒子 (GNP) は、過剰なチオール誘導ネオ複合糖質の存在下で、水溶液中に金属塩前駆体の化学的還元によって準備した。サンプル準備手順では、出発として、金属クラスターが同時に保護されかつ有機分子で機能化された金 GNP を生成するペナデらによるもの [11]、[19] を用いた。Au-S 共有結合の形成は、その成長を妨害する金属クラスター (コア直径 ~ 2 nm) を分離し、溶液中においてナノクラスター上で大きな安定性を付与する。

【0123】

この例では、我々は平均 1.4 nm から 1.5 nm の平均直径を有する金糖ナノ粒子において室温まで磁気ヒステリシスを実験的に観察したことを報告する。ペナデ法においてチオール：金の比を増大することによって、1.5 nm 以下の直径を有する GNP サンプル

10

20

30

40

50

ルを得ることができる。これは、チオールリンカー種としてマルトースネオ複合糖質 1 を用いて得られた Au-GNP の準備及び磁気特性によって図解している (図 4)。

【0124】

金糖ナノ粒子の準備 マルト-Au:

四塩化金酸 (HAuCl_4 , 0.018 mmol) 及び過剰なジスルフィドネオ複合糖質 (0.2 mmol) の水溶液を質問で水素化ホウ素ナトリウム (NaBH_4 , 22 当量) で還元した。茶色の懸濁液が直ちに形成した。懸濁液を約 2 時間振り、次いで、溶媒を除去し、糖ナノ粒子 (GNP) を水で洗いかつ遠心濾過 (CENTRIFLUS, Mr 30000, 1 時間, 3000 x g) することによって精製した。フィルタにおける残留物は水に溶解し、凍結乾燥した。GNP は透過型電子顕微鏡 (TEM)、 ^1H NMR、UV-可視分光鏡、導結合高周波プラズマ (ICP)、及び元素分析によってキャラクタライズした。TEM: 平均直径; Au 原子数、それぞれ 1.5 nm、79 個。UV-VIS (H_2O): $\lambda = 520 \text{ nm}$ 。ICP: 28% Au。 ($\text{C}_{23}\text{H}_{43}\text{O}_{11}\text{S}$)_n Au_n (n = 79) について計算した元素分析: C 38.18; H 5.98; S 4.40; Au 27.18。見つかった: C 39.5; H 6.07; Au 28.0。

【0125】

図 4 は、a) において、マルト Au GNP、マルト Au GNP についての TEM 顕微鏡写真、サンプルについての対応する粒子サイズ分布ヒストグラムについての合成スキームを; b) において、 D_2O 及び $\text{DMSO}-d_6$ についてのスペクトルを示している。マルト Au GNP は、いずれの場合も、平均 1.5 nm 以下の狭い粒子サイズ分布を示す。チオール保護されたマルト Au GNP の fcc 構造を示す高解像度電子顕微鏡 (HRTEM) 写真を図 5 に示す。

【0126】

超伝導量子干渉装置 (SQUID) 磁気計は室温まで強磁性挙動を示した。5 K で測定したヒステリシスループは 1200 e の保磁力を示している。保磁力の熱依存性から得られたブロック温度は、白金 (III) 表面上の単一の Co 原子において観察されるものと類似の有効異方的定数 10 meV / 原子に対応する 395 K であることがわかった [12]。磁化はキュリ-ワイス則に沿わず、かなりゆっくりした T 依存性を示した。Au 原子あたり 0.003 μ_B の原子磁気モーメントを低 T 磁気測定から導出した。

【0127】

図 6 は、金チオールでキャップされたマルト Au GNP について 5 K で測定したヒステリシスループを示す。図 5 から、チオールで保護された糖ナノ粒子の磁化工程は、室温でさえヒステリシスループを示す典型的な強磁性材料と同様な挙動を示す。加えて、サンプルはいかなる温度でも飽和しなかったことが観察された。1 T での磁化の半値程度の残留磁化が測定され、これは、GNP と共に原子が永久磁気モーメントを保持し、金 GNP 系がランダムに方向を向いた磁気モーメントのアセンブリからなることを示している。

【0128】

観察された挙動が強磁性不純物の存在に起因するか否かを議論できる。誘導結合高周波プラズマ (ICP) 分析は、マルト-Au における Fe 不純物の量 (0.007 重量%) が得られる磁化を説明するには非常に低いことを示していた。この分析にもかかわらず、0.2 重量% の鉄を含むマルト-Au Fe GNP のサンプルは、磁氣的挙動における Fe の影響をキャラクタライズするのに準備した。図 6 は、GNP の両セットについての 5 K で測定されたヒステリシスループを示している。マルト-Au Fe ナノ粒子における鉄 (強磁性不純物) の増大した量の存在がこの温度での強磁性挙動を低減し、他方、マルト-Au サンプルにはヒステリシスループが残留している。GNP が分散されるので、粒子間相互作用は静磁気性となり得る。金コア間の平均距離はマルトースネオ複合糖質 1 の連続する分子の長さ (6 nm) によって決定される。各粒子の永久磁気モーメントは非常に低いので、単一の隣接 GNP によって GNP に作用する磁場は 100 e より低い。従って、漂遊磁界の影響は無視できる。

【0129】

バルク Au は反磁性なので、強磁性挙動はサイズと結合効果との組み合わせに起因してもよい [2 1]。離散的な電子エネルギー構造 [2 2]、スタッキングフォルトの存在 [2 3]、S に共有結合した表面原子の極端に高い割合 (8 0 %) [2 4] は強磁性の開始に起因し得てもよい。

【 0 1 3 0 】

結論として、非常に小さなチオールで保護された金 (ゴールド) 糖ナノ粒子は、他の非チオール保護金ナノ粒子若しくは金バルクの金属反磁性特性に比して、局所的な永久磁性を示すことを示している (図 6)。この観察は、チオール - 金の結合が、金結合近傍に局在した余分の d ホールと関連すると考えられる金糖ナノ粒子永久磁気モーメントを誘起することを示唆している。これは、磁気記録についての本発明のナノ粒子の技術的用途を示唆する。さらに、これらの G N P の水溶性及び生物的ラベルは生物分野においてそれらの用途を大きく増幅する。

10

【 0 1 3 1 】

例 3 - Au - Gd (III) ナノ粒子

金糖ナノ粒子 (G N P) は Gd (III) 及び他のランタノイドに複合されて新しいコントラスト剤を提供する。G N P に存在するネオ複合糖質配位子 (6 0 から 1 0 0 分子) はキレート部分である。

【 0 1 3 2 】

ラクト E G₄ - Au (Gd) 糖ナノ粒子の準備 : 水 (1 m L) に対応する金糖ナノ粒子を溶解した溶液に、GdCl₃ (0 . 5 M、1 . 0 8 m L) を加えた。混合物を 2 0 時間光のないところで攪拌した。溶液は遠心濾過した (M I C R O C O N Y M 3 0、1 3 0 0 0 r p m、8 分)。残留物を洗浄した (8 x 0 . 5 m L、メタノール / 水、1 / 3)。ナノ粒子を水に溶解し、凍結乾燥すると、1 7 . 5 m g の暗紫色ナノ粒子ができる。TEM : 平均直径 2 . 5 n m、EDX : Gd 6 . 8 % ; Au 3 3 . 2 原子 %。

20

【 0 1 3 3 】

緩和能の決定 : 水溶液中における水プロトンの ¹H NMR 緩和時間 T₁ 及び T₂ (3 7、p H 7 . 2) はブルッカー・ミニスペック NMR スペクトロメータにおいて 1 . 5 テスラで測定した。T₁ 値は反転回復法によって決定し、T₂ 値はカール - パーセル - マイブーム - ギルシーケンスによって決定された。5 つの異なる濃度 (0 . 0 1、0 . 1、1、1 0、1 0 0 μ g / m L) でラクト - Au (Gd) ナノ粒子の溶液を、1 5 0 m M の NaCl を用いてヘペスパッファに準備した。緩和能は、糖ナノ粒子の存否における水プロトンの縦緩和時間及び横緩和時間の差、及び、m M で表した Gd (III) の濃度の差から計算した。図 7 及び図 8 は結果を示している。

30

【 0 1 3 4 】

結論として、ここに示した例では、本発明は、抗原性オリゴ糖に共有結合した水溶性超常磁性ナノ粒子を形成するための簡単な方法を提供する。この方法は糖質及び他の分子を組み込んだハイブリッドナノ粒子の形成に拡張できる。糖質 - レセプター相互作用は磁性糖ナノ粒子をターゲット細胞及び組織にそれらの選択的ラベリングを許容しながら、向けることができる。これは、この種の多価磁性糖ナノ粒子がほとんど利用できなかった生物活性磁性ナノ粒子を補完することを立証する [9]、[1 0]、[1 1]。従って、本発明のナノ粒子の生理学的状態における安定性及び溶解性、簡単な作成及び精製は、診断用の潜在的候補、腫瘍ターゲティング [1 5]、温熱治療 [1 6]、及び磁気共鳴イメージング [1 7] への応用においてこれらのツールを変えるものである。

40

【 0 1 3 5 】

参考文献

ここに記載した参考文献はすべて参考として組み込まれている。

[1] Niemeyer, C.M. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2001, 40, 4128-4158.

[2] Bergemann, C.; Mueller-Schulte, D.; Oster, J.; Brassard, L.; Luebbe, A.S. *J. Magn. Mater.* 1999, 194, 45.

[3] Whitesides, G.M.; Kazlauskas R.J.; Josephson L. *Trends Biotechnol.* 1983, 1

50

, 144-148.

- [4] Sun, S.; Murray, C.B.; Weller, D.; Folk, S.L.; Moser, A. *Science* 2000, 287, 1989.
- [5] a) Shafi, K.V.P.M.; Gedanken, A.; Prozorov, R. *Adv. Mater.* 1998, 10, 590-593. b) Fried, T.; Shemer, G.; Markovich, G. *Adv. Mater.* 2001, 13, 1158-1161. c) Momen, N.; Veillet, P.; Pileni, M.P. *J. Magn. Mater.* 1995, 149, 67-71.
- [6] Park, S.-J.; Kin, S.; Lee, S.; Khim, A.G.; Chart K.; Hyeon, T. *J. Am. Chem. Soc.* 2000, 122, 8581-8282.
- [7] a) Suslick, K.S.; Fang, M.L.; Hyeon, T. *J. Am. Chem. Soc.* 1996, 118, 11960-11961. b) Sun, S.; Zeng, H. *J. Am. Chem. Soc.* 2002, 124, 8204-8205. c) Guo, Q.; Teng, X.; Rahman, S.; Yang, H. *J. Am. Chem. Soc.* 2003, 125, 630-631. 10
- [8] Sun, S.; Anders, S.; Hamann, H.F.; Thiele, J.-U.; Baglini, J.E.E.; Thomson, T.; Fullerton, E.E.; Murray, C.B.; Terris, B.D. *J. Am. Chem. Soc.* 2002, 124, 2884-2885.
- [9] a) Josephson, L.; Tung, C.-H.; Moore, A.; Weissleder, R. *Bioconjugate Chem.* 1999, 10, 186-191. b) Lewin, M.; Carlesso, N.; Tung, C.-H.; Tang, X.-W.; Cory, D.; Scadden, D.T.; Weissleder, R. *Nat. Biotechnol.* 2000, 18, 410-414.
- [10] Josephson, L.; Perez, J.M.; Weissleder, R. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2001, 40, 3204-3206.
- [11] de la Fuente, J.M.; Barrientos, A.G.; Rojas, T.C.; Rojo, J.; Canada, J.; Fernandez, A.; Penades, S. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2001, 40, 2257-2261. 20
- [12] Barrientos, A.G.; de la Fuente, J.M.; Rojas, T.C.; Fernandez, A.; Penades, S. *Chem. Eur. J.* 2002, 9, 1909-2001.
- [13] Hernaiz, M.J.; de la Fuente, J.M.; Barrientos, A.G.; Penades, S. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2002, 41, 1554-1557.
- [14] Zhou, W.L.; Carpenter, E.E.; Lin, J.; Kumbhar, A.; Sims, J.; O'Connor, C.J. *Eur. Phys. J. D.* 2001, 16, 289-292.
- [15] Mykhaylyk, O.; Cherchenko, A.; Ilkin, A.; Dudchenko, N.; Ruditsa, V.; Novoseletz, M.; Zozulya, Y. *J. Magn. Mater.* 2001, 225, 241-247.
- [16] Jordan, A.; Scholz, R.; Wust, P.; Fahling, H.; Felix, R. *J. Magn. Mater.* 1999, 201, 413-419. 30
- [17] Josephson, L.; Kircher, M.F.; Mahmood, U.; Tang, Y.; Weissleder, R. *Bioconjugate Chem.* 2002, 13, 554-560.
- [18] Taton et al., *Science* 2000 289, 1757-1760.
- [19] Barrientos, A.G. et al., *Chem. Eur. J.* 9, 2003, 1909-1921.
- [20] Gambardella, P. et al., Giant Magnetic Anisotropy of Single Cobalt Atoms and Nanoparticles, *Science*, 2003, 300, 1130-1133.
- [21] Di Felice, R.; Selloni, A.; Molinari, E.; *J. Phys. Chem. B.*, 2003, 107, 1151-1156.
- [22] D. Davidovic and M. Tinkham, *Phys. Rev. Lett.*, 1999, 83 (8), 1644-1647. 40
- [23] Vitos, L., Johansson, B., *Phys. Rev. B.*, 2000, 62 (18), R11957.
- [24] Villas, I.M.I.J., Chatelain, A., de Beer, W.A., *Science*, 1994, 265, 1682-1684.

【図面の簡単な説明】

【0136】

【図1】乳（ラクト）-AuFe糖ナノ粒子（a）及びマルト-AuFe糖ナノ粒子（b）についてのゼロ磁場冷却（ZFC、黒）及び磁場冷却（FC、白抜き）の曲線を示すものである。

【図2A】ラクト-AuFe糖ナノ粒子（A）の透過型電子顕微鏡（左）及びコアサイズ分布ヒストグラム（右）を示す。 50

【図2B】 マルト - AuFe糖ナノ粒子 (B) の透過型電子顕微鏡 (左) 及びコアサイズ分布ヒストグラム (右) を示す。

【図3】 磁性糖ナノ粒子の合成を模式的に示す。

【図4A】 マルト - AuFe糖ナノ粒子の作製に用いるネオ複合糖質1及びこれのTEM写真及びヒストグラムを示す。

【図4B】 マルト - Auナノ粒子のD₂O及びDMSO - d₆の¹H - NMRを示す。

【図5】 fcc構造を示すマルト - Auナノ粒子のHRTEM写真を示すものである。

【図6】 5Kでの1.5nm金 - チオール保護糖ナノ粒子についてのヒステリシスループを示す。磁化は金の単位グラムあたりのemuで与えている。すなわち、配位子に起因する磁化の寄与は仮定されていない。

【図7A】 Gd(III)濃度の増大に対するマルト - Auナノ粒子のT₁の値の変化を示す。

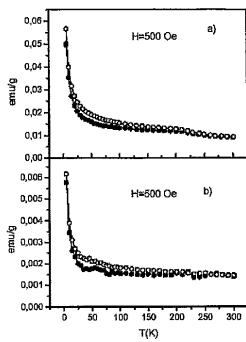
【図7B】 Gd(III)濃度の増大に対するマルト - Auナノ粒子のT₂の値の変化を示す。

【図8A】 Gd(III)濃度の増大に対するマルト - Auナノ粒子のr₁の値の変化を示す。

【図8B】 Gd(III)濃度の増大に対するマルト - Auナノ粒子のr₂の値の変化を示す。

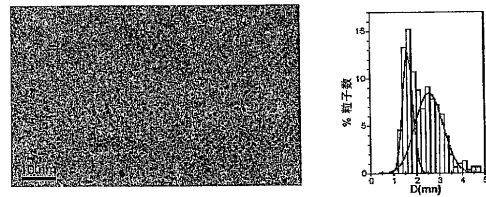
【図1】

Figure 1



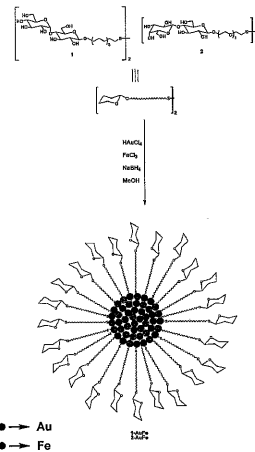
【図2B】

Figure 2B



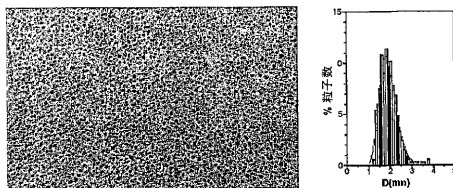
【図3】

Figure 3



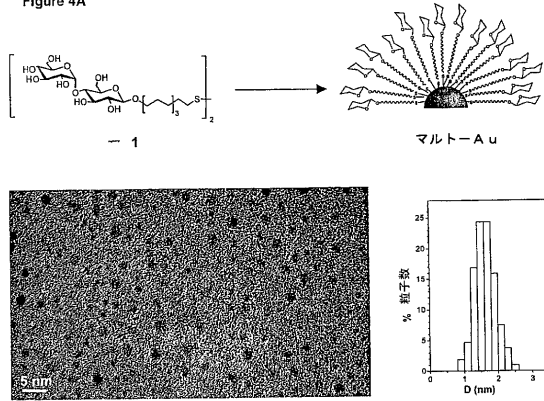
【図2A】

Figure 2A



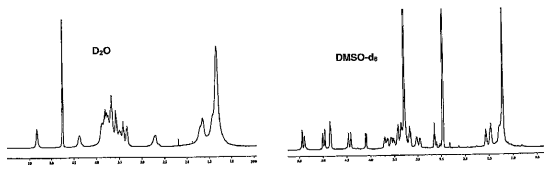
【 4 A 】

Figure 4A



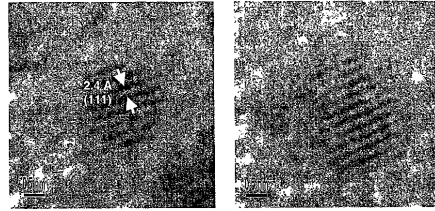
【 4 B 】

Figure 4B



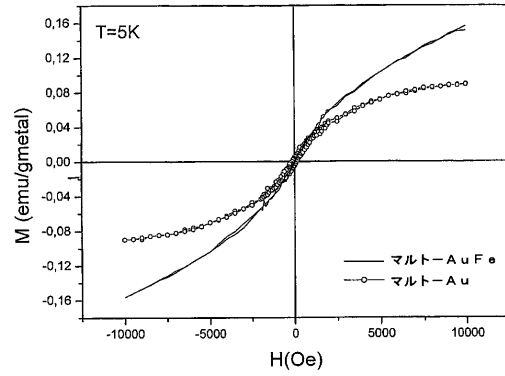
【 5 】

Figure 5



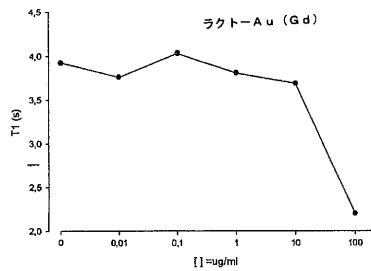
【 6 】

Figure 6



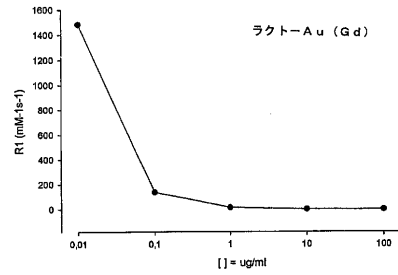
【 7 A 】

Figure 7A



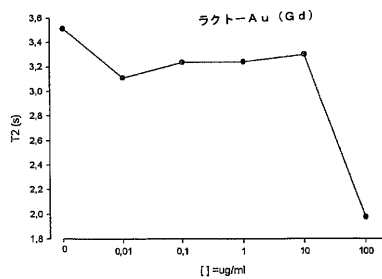
【 8 A 】

Figure 8A



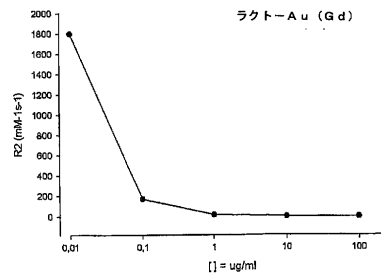
【 7 B 】

Figure 7B



【 8 B 】

Figure 8B



フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 6 1 K	31/711 (2006.01)	A 6 1 K	31/711
A 6 1 K	31/7105 (2006.01)	A 6 1 K	31/7105
A 6 1 K	38/00 (2006.01)	A 6 1 K	37/02
A 6 1 K	39/385 (2006.01)	A 6 1 K	37/20
A 6 1 K	49/00 (2006.01)	A 6 1 K	39/385
A 6 1 K	51/00 (2006.01)	A 6 1 K	49/00 A
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 K	49/00 C
		A 6 1 K	49/02 A
		A 6 1 P	35/00

(74)代理人 100064908

弁理士 志賀 正武

(74)代理人 100089037

弁理士 渡邊 隆

(74)代理人 100110364

弁理士 実広 信哉

(72)発明者 ソレダッド・ペナデス

スペイン・E - 2 8 0 0 6 ・マドリッド・カリェ・セラーノ・1 1 7 ・コンセホ・スペリオール・デ・インヴェスティガシオネス・シエンティフィカス内

(72)発明者 マヌエル・マルティン・ロマス

スペイン・E - 2 8 0 0 6 ・マドリッド・カリェ・セラーノ・1 1 7 ・コンセホ・スペリオール・デ・インヴェスティガシオネス・シエンティフィカス内

(72)発明者 ヘサス・マルティネス・デ・ラ・フエンテ

スペイン・E - 2 8 0 0 6 ・マドリッド・カリェ・セラーノ・1 1 7 ・コンセホ・スペリオール・デ・インヴェスティガシオネス・シエンティフィカス内

(72)発明者 ウィリアム・トーマス・レイドマチャー

イギリス・オックスフォード・オックスフォードシャー・OX 1 ・3 QU ・ボアーズ・ヒル・ザ・リッジウェイ・フォックスコーム・(番地なし)

審査官 伊藤 清子

(56)参考文献 国際公開第0 2 / 0 3 2 4 0 4 (WO , A 1)

特表2 0 0 4 - 5 1 1 5 1 1 (JP , A)

特表2 0 0 0 - 5 0 4 3 7 4 (JP , A)

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

A61K 9/00-9/72

A61K 47/00-47/48

A61K 31/70

A61K 31/7105

A61K 31/711

A61K 31/715

A61K 38/00

A61K 39/385

A61K 49/00

A61K 51/00

A61P 35/00