

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5714115号
(P5714115)

(45) 発行日 平成27年5月7日(2015.5.7)

(24) 登録日 平成27年3月20日(2015.3.20)

(51) Int.Cl.	F 1
A 61 K 47/48	(2006.01)
A 61 K 49/00	(2006.01)
B 82 Y 5/00	(2011.01)
B 82 Y 20/00	(2011.01)
B 82 Y 30/00	(2011.01)
A 61 K 47/48	
A 61 K 49/00	
B 82 Y 5/00	
B 82 Y 20/00	
B 82 Y 30/00	

A 61 K 47/48
A 61 K 49/00
B 82 Y 5/00
B 82 Y 20/00
B 82 Y 30/00

A

請求項の数 13 (全 19 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2013-536520 (P2013-536520)
(86) (22) 出願日	平成23年10月28日(2011.10.28)
(65) 公表番号	特表2014-505657 (P2014-505657A)
(43) 公表日	平成26年3月6日(2014.3.6)
(86) 国際出願番号	PCT/KR2011/008116
(87) 国際公開番号	W02012/057556
(87) 国際公開日	平成24年5月3日(2012.5.3)
審査請求日	平成26年5月30日(2014.5.30)
(31) 優先権主張番号	10-2010-0106731
(32) 優先日	平成22年10月29日(2010.10.29)
(33) 優先権主張国	韓国(KR)

(73) 特許権者	509021122 ポステック アカデミーインダストリー ファンデーション 大韓民国、ギュンブク 790-784、 ポハン、ナムグ、ヒョジャードン、サン 31
(74) 代理人	100091443 弁理士 西浦 ▲嗣▼晴
(74) 代理人	100130720 弁理士 ▲高▼見 良貴
(74) 代理人	100173657 弁理士 瀬沼 宗一郎
(74) 代理人	100186819 弁理士 酒井 俊尚

最終頁に続く

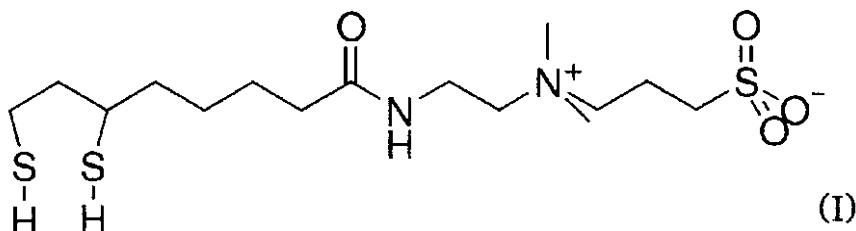
(54) 【発明の名称】両性イオンを有するナノ粒子表面改質用分子篩の合成とその応用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

下記化学式(I)で表される化合物からなる両性イオン分子篩で表面改質されたことを特徴とする、ナノ粒子。

【化 1】



【請求項 2】

前記ナノ粒子は、前記両性イオン分子篩で表面置換されたことを特徴とする、請求項1に記載のナノ粒子。

【請求項 3】

前記ナノ粒子が、金属、非金属、セラミック、プラスチック、高分子、半導体、量子ドット、またはこれらの1種以上の複合材質からなることを特徴とする、請求項1または2

20

に記載のナノ粒子。

【請求項 4】

前記ナノ粒子が光学的特性を有するナノ粒子であることを特徴とする、請求項 1 または 2 に記載のナノ粒子。

【請求項 5】

前記ナノ粒子は内部が充填された充填型、または内部の少なくとも一部に空間が含まれたキャビティ型であることを特徴とする、請求項 1 または 2 に記載のナノ粒子。

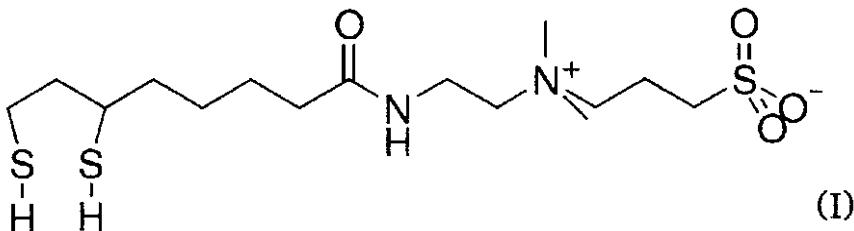
【請求項 6】

前記分子篩の長さがナノ粒子の外径より短いことを特徴とする、請求項 1 または 2 に記載のナノ粒子。10

【請求項 7】

ナノ粒子を下記化学式 (I) で表される化合物からなる両性イオン分子篩と反応させ、前記両性イオン分子篩で表面改質されたナノ粒子を製造することを特徴とする方法。

【化 2】



10

20

【請求項 8】

前記両性イオン分子篩と反応する前のナノ粒子は、表面に、前記両性イオン分子篩と置換可能なリガンドが形成され、前記リガンドが前記両性イオン分子篩と置換されることを特徴とする、請求項 7 に記載の方法。

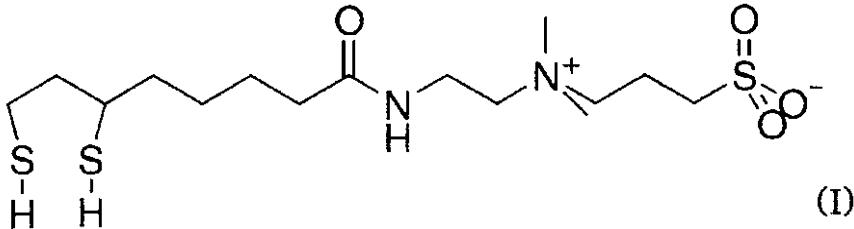
【請求項 9】

前記両性イオン分子篩と反応する前のナノ粒子は、有機溶媒、水、またはこれらの混合物からなる分散媒に分散したナノ粒子であることを特徴とする、請求項 7 に記載の方法。30

【請求項 10】

下記化学式 (I) で表される化合物からなる両性イオン分子篩とカルボキシ基を有する分子篩とで表面改質されたナノ粒子。

【化 3】



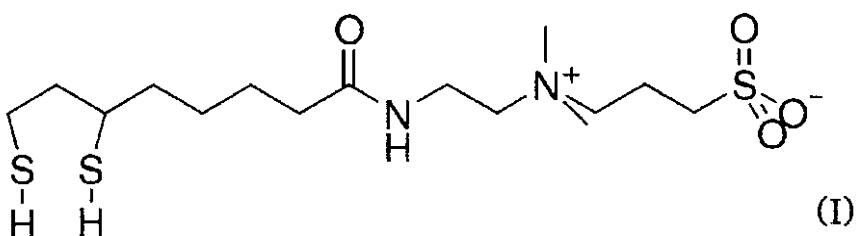
30

40

【請求項 11】

下記化学式 (I) で表される化合物からなる両性イオン分子篩。

【化4】

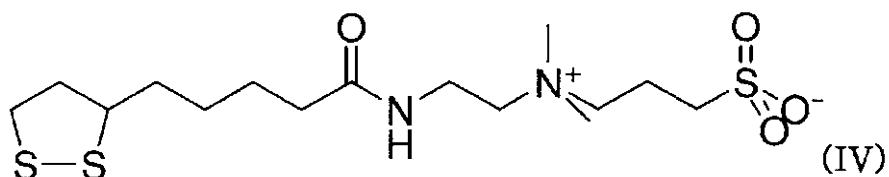


10

【請求項12】

請求項11に記載の化学式(I)で表される化合物を製造する方法であって、
下記化学式(IV)で表される化合物を水素化ホウ素ナトリウムと反応させて、前記化学式(I)で表される化合物を製造する方法。

【化5】

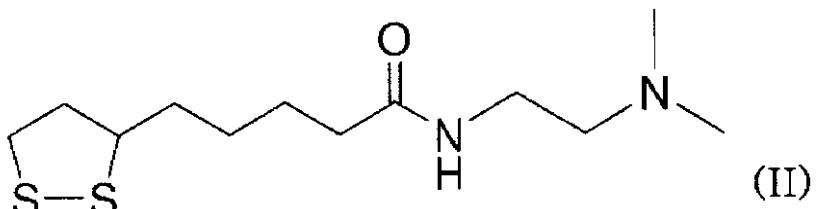


20

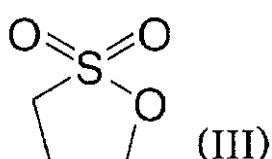
【請求項13】

請求項12に記載の化学式(IV)で表される化合物を製造する方法であって、
下記化学式(II)で表される化合物と下記化学式(III)で表される化合物とを反応させて、前記化学式(IV)で表される化合物を製造する方法。

【化6】



30



40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ナノ粒子の分散性を向上させることができ可能な表面改質方法、およびこれにより製造された、向上した分散性を有するナノ粒子に係り、より詳しくは、ナノ粒子の表面に両性化合物が結合して表面分散性を向上させる方法およびこれを用いたナノ粒子に関する。

【背景技術】

【0002】

ナノ粒子を製造するための様々な方案が提示されているが、伝統的な物理的粉碎方法以

50

外にも、火炎熱分解法 (flame pyrolysis)、噴霧熱分解法 (spray pyrolysis)、ゾルゲル法 (sol-gel process)、ソルボサーマル法 (solvothermal method) などが採用されている。ナノ粒子の場合、ナノ粒子の形成の際に、ナノ粒子表面の不安定性のため、ナノ粒子が形成されると同時に互いに絡み合う現象が生ずるが、これを克服するための方案が開発されている。

【0003】

三星電子株式会社は、韓国特許公開第2008-004831号公報では銅前駆体の表面をキャッピング分子で被覆して安定化させた金属酸化物ナノ粒子の製造方法および金属酸化物ナノ粒子を開示し、韓国特許第820231号公報では金属前駆体溶液をスプレーインジェクションして金属ナノ粒子を製造する方法を開示し、韓国特許第790948号公報では金属前駆体溶液に分散安定剤を用いて金属ナノ粒子を製造する方法を開示している。10

【0004】

成均館大学校産学協力団は無電解メッキ液を用いたナノ粒子の製造方法を韓国特許第861355号に開示し、韓国生産技術研究院は無電解メッキ液を基板にスプレーして金属ナノ粒子を製造する方法を韓国特許公開第2008-81630号公報に開示している。

【0005】

発明者 Che Yong-ho は電気分解法を用いた金属ナノ粒子の製造方法を韓国特許第555584号公報に開示し、高麗大学校産学協力団はオレイン酸を用いてスズ酸化物ナノ粒子を製造する方法及びスズ酸化物ナノ粒子を韓国特許第724807号公報に開示している。20

【0006】

また、金属ナノ粒子にアミンやアスコルビン酸ナトリウムなどのリガンドを導入して活性炭素、無機酸化物、高分子、ゼオライトなどに固定して安定化させる方案も提示されている。延世大学校は、多作用基リガンドを用いたナノ粒子の表面改質及び水溶性ナノ粒子の製造方法を韓国公開特許第10-2008-0021535号公報に開示している。

【0007】

水溶液に安定に分散するナノ粒子は、生命工学及び医療工学の研究に画期的な道具として脚光を浴びているため、その需要が国内外で非常に高い状況である。よって、様々なナノ粒子を水溶液に安定に分散させることが可能な技術は、依然として多角度の方法で研究されており、均一かつ安定なナノサイズの粒子を有する新規なナノ粒子およびその製造方法に対する要求が絶えず提起されている。30

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

本発明で解決しようとする課題は、広いpH範囲と塩の濃度で安定している新規なナノ粒子を提供することにある。

【0009】

本発明で解決しようとする他の課題は、広いpH範囲と塩の濃度で安定している新規なナノ粒子を製造する方法を提供することにある。40

【0010】

本発明で解決しようとする別の課題は、ナノ粒子の安定性を向上させることができ改質方法を提供することにある。

【0011】

本発明で解決しようとする別の課題は、ナノ粒子の安定性を向上させることができ新規化合物を提供することにある。

【0012】

本発明で解決しようとする別の課題は、広いpH範囲と塩の濃度で安定性を有する新規なナノ粒子の量子ドット及びその用途を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

10

20

30

40

50

【 0 0 1 3 】

上記課題を解決するために、本発明に係るナノ粒子は、表面に陰イオンと陽イオンを共に有する両性ナノ粒子であることを特徴とする。

【 0 0 1 4 】

本発明に係るナノ粒子は、理論的に限定されるものではないが、両性イオン分子が、広いpH範囲、高い塩濃度の条件で陽電荷或いは陰電荷のみを帯びる分子に比べてイオンによる電荷のスクリーン効果の影響が少なく、安定した分散体となる。

【 0 0 1 5 】

本発明において、ナノ粒子は、1000 nm未満の直径を有するナノ単位の任意粒子を意味する。一部の実施例において、ナノ粒子はアメリカ国立科学財団(National Science Foundation)で定義したところによれば、ナノ粒子は300 nm未満の直径を有する。一部の具体例において、ナノ粒子は、アメリカ国立衛生研究所(National Institutes of Health)で定義したところによれば、直径が100 nm未満である。

10

【 0 0 1 6 】

本発明において、ナノ粒子は、金属、非金属、セラミック、プラスチック、高分子、生物学的素材、半導体、量子ドット、複合材質などの様々な材質からなるものでよく、また蛍光性粒子であってもよい。複合材質は、例えば、内部はセラミックや高分子などの非金属材質の核材が入っており、外部は金属でコートされた粒子であってもよい。

【 0 0 1 7 】

本発明において、ナノ粒子は、一つのナノ粒子からなってもよく、また多数個の金属ナノ粒子が凝集して一つのナノ粒子を構成する形態であってもよく、ナノ粒子は、内部が充填された高密度のナノ粒子、或いは内部に隔壁または空間が形成されたナノ粒子の形態であってもよい。本発明の一実施において、ナノ粒子は単層または多層形態であってもよい。

20

【 0 0 1 8 】

本発明において、全体的に中性とは、粒子の表面にある陰イオンと陽イオンがバランスを取って実質的に中性をなすことを意味する。本発明において、前記中性とは、動的光散乱法を用いた表面電荷測定の際に一般に-5 mV ~ +5 mVの値を有し、その表面電荷の絶対値が10 mVを超えないことを意味する。

【 0 0 1 9 】

30

本発明は、一側面において、ナノ粒子は表面に両性イオン分子篩または両性イオン化合物が結合した両性ナノ粒子を対象とする。

【 0 0 2 0 】

本発明において、両性イオン分子篩または両性イオン化合物とは、化合物にそれぞれ一つ以上の陰イオンと陽イオンを含む化合物である。本発明において、分子篩または化合物は、单量体、二量体または三量体などのオリゴマー、高分子化合物であってもよく、好ましくは分子篩の長さがナノ粒子の外径より短いため、分子篩がナノ粒子を取り囲まず、分散した状態で粒子の中心から外部に伸び出る形で結合し、ナノ粒子の最外表面に両性イオンが分布するようにするのが好ましい。

【 0 0 2 1 】

40

本発明において、前記両性イオン化合物は、図1に示すように、ナノ粒子に結合する表面結合領域、連結領域及び作用基領域からなるものでよく、一端にナノ粒子との結合部が形成され、他端には両性イオンが形成される形態を有するのが好ましい。

【 0 0 2 2 】

本発明の実施において、表面結合領域は、ナノ粒子の表面に強く結合することが可能な能力を有する部分であって、ナノ粒子の表面に安定に結合することができる限り制限なく使用することができ、その例として、チオール基(-SH)、ジチオール基(-CS₂、-PS₂、-CH(SH)(CH₂CH₂SH))、アミン基(-NH₂、-NH)、ホスホネート基(-PO₃H)、ホスフィド基(-P)、ホスフィンオキシド基(-P=O)、カルボキシ基(-COOH)、ヒドロキシ基(-OH)、イミダゾール基、ジオール

50

基などが挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【0023】

本発明において、連結領域は、表面結合領域と作用基領域とを効果的に連結させる部分であって、その例としては、アミド結合(-CONH-)、炭素結合(-(CH₂)_n-)、ポリエチレングリコール(-((CH₂CH₂O)_n-)、トリアゾール(triazole)などが挙げられるが、これらに限定されるものではない。本発明の実施において、連結領域は、一つ以上の分子を結合させて形成することができ、好ましくは分子全体をナノ粒子の表面に高密度でコートすることができるように形成する。

【0024】

本発明において、作用基領域は、ナノ粒子を分散させる溶媒に安定に分散させることができ可能な能力を有し、これを連結領域と化学的に結合させた部分であって、両性イオンとして、スルホベタイン基(-N⁺(CH₃)₂CH₂CH₂CH₂SO³⁻)、カルボベタイン基(-N⁺(CH₃)₂CH₂CH₂CH₂COO⁻)、ホスホリルコリン基(-PO₄⁻CH₂CH₂N⁺)などがあり、目的によってこれに限る必要はない。この分子で表面置換したナノ粒子の最外表面に作用基領域が露出して両性イオン分子自体の特性をナノ粒子が帯びるようにすることができる。

【0025】

本発明の一実施において、システイン(cystein)は、一部にタンパク質を構成する単量体、すなわちアミノ酸の一種としてチオール基(-SH)を有してこの部分がナノ粒子の表面に結合する表面結合領域となり、他の一部にカルボン酸基(-COO⁻)とアミン基(-NH₃⁺)を共に有してこの部分が作用基領域となる。その結果、システインで表面処理されたナノ粒子において、pH 7近くでシステインが両性イオン分子篩の役割をして表面電荷を中性付近にすることができる。

【0026】

本発明は、一側面において、本発明に係るナノ粒子の製造方法が、ナノ粒子を両性イオン分子篩と反応させて両性イオンナノ粒子を製造することを特徴とする。

【0027】

本発明の実施において、前記両性イオンナノ粒子は、ナノ粒子の表面に、表面に両性イオン分子篩と置換可能な表面分子篩、例えばリガンドを導入する段階、および表面分子篩を両性イオン分子体と置換する段階を経て製造することができる。

【0028】

本発明は、一側面において、ナノ粒子の表面に両性イオン分子篩を形成してナノ粒子の非特異的吸着を抑制することを特徴とする。

【0029】

ここで、用語「非特異的吸着」とは、ナノ粒子またはナノ粒子の内部に含まれた物質と外部物質との特異的結合を除いた他の力、例えば、イオン結合または分子間引力によって行われる吸着を意味する。

【0030】

ここで、用語「抑制」とは、ナノ粒子の表面に両性イオン分子篩が形成された後、ナノ粒子の吸着力が特定の境界で減少することを意味する。

【0031】

理論的に限定されるものではないが、本発明に係るナノ粒子は、表面が中性状態に安定化されているから、様々な環境でイオン結合または分子間引力による非特異的吸着が減少するようになる。

【0032】

発明の一実施において、量子ドットなどの蛍光性ナノ粒子は、表面に両性イオン分子篩が形成された後、非特異的吸着が減少して被着体、例えば生体内の細胞膜やプラスチック表面などの表面、特に静電気的に正または負に帯電した被着体に対する吸着力が顕著に弱くなる。

【0033】

10

20

30

40

50

本発明は、一側面において、表面に両性イオン分子篩が形成されたナノ粒子と、ナノ粒子に結合した特異的結合体とを含む複合体であることを特徴とする。

【0034】

本発明において、特異的結合体とは、ナノ粒子の外部物質との特異的結合を誘導する物質を意味し、一例として、プローブ、探針、抗原・抗体などが挙げられる。

【0035】

本発明において、ナノ粒子は、蛍光体または運搬体として有用に用いられる。本発明の実施において、複合体におけるナノ粒子は蛍光性、吸光性または発光性ナノ粒子、例えばナノサイズの量子ドットであってもよく、この場合、複合体は、ナノ領域の非特異的吸着することなく特異的結合体によって特定物質に結合した後、蛍光、吸光または発光できる。ナノ粒子の独特な光学的特性を用いる場合、磁気共鳴画像化の造影剤、生体内近赤外線蛍光画像化に使用できる。両性イオン分子をナノ粒子の表面に導入することにより、非特異的吸着が最小化されたナノ粒子を実現することができる。この場合、画像化の標識因子として使用されるナノ因子の非特異的吸着を最小化することにより、画像化しようとする対象のみを選択的に観察することができるという利点がある。

【0036】

本発明の他の実施において、前記複合体におけるナノ粒子は、生理学的物質、薬学的物質または薬学的組成物を含むナノサイズの運搬体であってもよい。この場合、複合体は薬学的または生理学的物質が必要な部位に特異的結合体によって選択的に運搬または結合できる。

【0037】

本発明は、一側面において、分散媒でナノ粒子と両性イオン分子篩とを反応させて両性イオンナノ粒子を製造することを特徴とする方法を提供する。

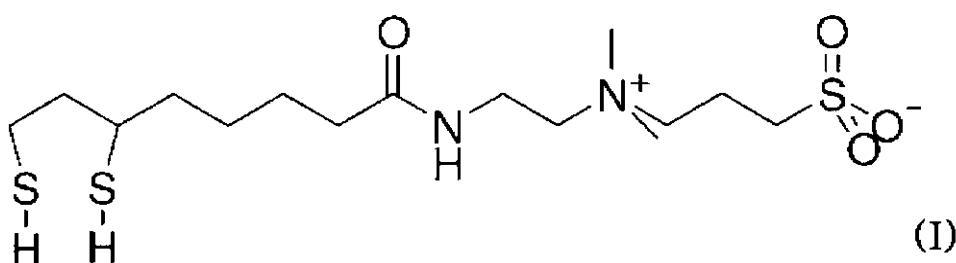
【0038】

本発明において、分散媒は有機溶媒、水またはこれらの混合物であり、両性イオン分子篩は分散したナノ粒子とリガンド置換などの方法で反応する。

【0039】

本発明は、他の側面において、下記化学式(I)からなる両性イオン分子篩を提供する。

【化1】



【0040】

本発明は他の側面において、図2によって化学式(I)の両性イオン分子篩を製造する方法を提供する。

【0041】

本発明は別の側面において、両性イオン分子篩を表面に結合して表面の非特異的吸着力を減少させることを特徴とする。

【0042】

本発明において、表面は、様々な物理化学的方法によって両性イオン分子篩が結合することが可能な表面を意味し、例えば、両性イオン分子篩が結合できるガラスまたは高分子薄膜が形成された表面であってもよい。

【0043】

本発明の実施において、前記表面はセンサーの表面であってもよい。本発明の実施にお

10

20

30

40

50

いて、センサーの表面は、生体内特定タンパク質（例えば、心臓発作発症の要因であるミオグロビン）に対するセンサーまたは特定の細胞（免疫細胞など）に対するセンサーであつてもよい。

【0044】

本発明でのように、表面に両性イオン分子篩が導入されるセンサーは、非特異的結合力が弱くて生体内の他のタンパク質との非特異的吸着を最小化することにより、センサーに要求される最も重要な条件の一つであるシグナル／ノイズの比(signal/noise ratio)を著しく高めることができる。

【発明の効果】

【0045】

10

両性イオン分子によって改質されたナノ粒子の表面は、広いpHの変化または高い塩濃度の環境で表面分子の作用基部分の性質が変わらなくなる。結局、両性イオン分子の全体電荷が0に近い特性を保つことができ、タンパク質及びリン脂質との非特異的吸着を最小化することができる。

【図面の簡単な説明】

【0046】

【図1】表面改質分子として使用できる両性イオン分子の構造模式図である。

【図2】両性イオン分子の合成過程を示し、(i)はカルボニルジイミダゾール(carbonyl diimidazole)、N,N-ジメチルエチレンジアミン／無水クロロホルム(N,N-dimethyl ethylenediamine/anhydrous chloroform)；(ii)は1,3-プロパンスルトン／無水クロロホルム(1,3-propanesultone/anhydrous chloroform)；(iii)は水素化ホウ素ナトリウム／脱イオン水(sodium borohydride/deionized water)である。

20

【図3】有機溶媒で合成されたナノ粒子を両性イオン分子で表面置換し、両性イオン分子が表面改質されたナノ粒子を作る模式図である。

【図4】有機溶媒で合成されたナノ粒子を、カルボキシ基を有する分子で表面置換し、改質されたナノ粒子を作る模式図である。

【図5】有機溶媒で合成されたナノ粒子を両性イオン分子及びカルボキシ基を有する分子で同時に表面置換することにより、2つの分子が混合されて表面改質されたナノ粒子を作る模式図である。

【図6】左側はpH環境の変化(pH 5～10)による量子ドットの水和されたサイズであり、右側は塩濃度の変化[イオン強度(ionic strength)：0.05～5M]による量子ドットの水和されたサイズである。大きくなるほど不安定になって水溶液で均一に分散せず凝集体を形成して量子ドットの応用の可能性が低くなる。

30

【図7】量子ドットとポリマービーズとの非特異的結合を確認するための蛍光顕微鏡写真であり、スケールバー(scale bar)=5 μmである。

【図8】量子ドットと共に育てられた子宮頸癌細胞の共焦点顕微鏡写真であり、写真的緑色が量子ドットを示し、スケールバー=20 μmである。

【図9】量子ドット-ストレプトアビシン複合体によって選択的標識された、ビオチンコートされたポリマービーズの蛍光及び透過画像化写真である。写真的黄色が量子ドットを示し、これは量子ドットが有する特別な光学的性質の一つである蛍光信号である。

40

【発明を実施するための形態】

【0047】

実施例1

【両性イオンリガンドの合成】

リポ酸(Lipoic acid)(図2の(1))を無水クロロホルムに溶かした後、常温、真空環境で1,3当量のカルボニルジイミダゾール(carbonyldiimidazole)に添加して5分間攪拌し、残っているカルボニルジイミダゾールを除いた反応溶液層を分離する。リポ酸(Lipoic acid)の5当量に相当するN,N-ジメチルエチレンジアミンを窒素環境で無水クロロホルムに溶かした後、氷槽で降温した状態で上記の溶液を添加して1時間攪拌する(得られる物質は図2の(3))。反応溶液を10%NaCl水溶液で3回、3次蒸

50

留水で1回抽出して精製し、1,3-プロパンスルトンを添加して常温で24時間攪拌した後、生成された固体を濾過する（得られる物質は図2の（4））。これを2NのNaOHを用いてpH9に調整した水溶液に溶かした後、2当量のNaBH₄を添加して常温で4時間攪拌する。合成した両性イオンリガンド（図2の（5））は精製過程を経ずに直ちに使用した。

【0048】

[ナノ粒子の合成]

本明細書で解説するナノ粒子の合成方法は、様々な合成方法の代表的な一例を挙げたに過ぎず、これに限定されるものではない。ナノ粒子の一種である量子ドットを合成するために、次のように準備する。オクタデセン（octadecene）、オレイルアミン（oleylamine）を丸底フラスコに仕込んで100℃で加熱しながら真空状態、窒素注入状態を交互に変えることにより、周辺環境を窒素気体のみで充填した環境に変える。その後、丸底フラスコの温度を300℃まで上げ、それぞれカドミウム（Cd）とセレン（Se）を別途に溶かしたオクタデセン（octadecene）溶液をCd:Se=1:5の比率で同時に高温のフラスコに仕込む。この際、Cd:Seの比率は所望のナノ粒子のサイズによって調節できる。その後、反応容器であるフラスコをゆっくり冷やし、有機溶媒に分散したナノ粒子を得る。

【0049】

実施例2

[両性イオン表面分子で表面改質されたナノ粒子の合成]

有機溶媒で合成されたナノ粒子をクロロホルムに分散させる。予め合成した両性イオン分子（図2の（5））が過剰に溶解されている水溶液と合成されたナノ粒子とを常温で攪拌する。この両性イオン分子が有する作用基の一つであるジチオール（dithiol）は、ホスホン酸（phosphonic acid）或いは1級アミン（primary amine）が作用基である有機分子リガンドに比べてナノ粒子（量子ドット）と強い表面結合力を持っている。そのため、量子ドットの表面の有機分子リガンドが両性イオン分子でリガンド置換されながら量子ドットを水溶液層に移して分散させる。その後、クロロホルム層は層分離の後に除去し、水溶液層のみを透析して余分なリガンドを除去する。図3では使用した両性イオン分子篩を図1のように図式化した。表面結合領域を四角、連結領域を波線、作用基領域を橢円で表した。

【0050】

実施例3（比較実施例1）

[カルボキシ基（-COOH）を有する分子で表面改質されたナノ粒子の合成]

有機溶媒で合成されたナノ粒子をクロロホルムに分散させる。予め合成したカルボキシ基を有する分子（図2の（2））が過剰に溶解されている水溶液と精製された量子ドットとを常温で攪拌する。この際、ナノ粒子表面の有機分子リガンドが、カルボキシ基を有する分子でリガンド置換されながら、ナノ粒子を水溶液層に移して分散させる。その後、クロロホルム層は層分離の後に除去し、水溶液層のみを透析して余分なリガンドを除去する。図4では使用したカルボキシ基を有する分子篩を図1のように図式化した。表面結合領域を四角、連結領域を波線、作用基領域を橢円で表した。

【0051】

実施例4

[両性イオン分子とカルボキシ基を有する分子とで表面改質されたナノ粒子の合成]

有機溶媒で合成されたナノ粒子をクロロホルムに分散させる。予め合成した両性イオン分子（図2の（5））とカルボキシ基を有する分子（図2の（2））が過剰に溶解されている水溶液と精製されたナノ粒子とを常温で攪拌する。この際、ナノ粒子表面の有機分子リガンドを、両性イオン分子及びカルボキシ基を有する分子で同時にリガンド置換しながら、量子ドットを水溶液層に移して分散させる。その後、クロロホルム層は層分離の後に除去し、水溶液層のみを透析して余分なリガンドを除去する。図5では使用した表面分子篩を図1のように図式化した。表面結合領域を四角、連結領域を波線、作用基領域を橢円

10

20

30

40

50

で表した。

【0052】

実施例5

[両性イオン分子が表面改質されたナノ粒子のpH及び塩濃度の変化による水和されたサイズの測定]

ナノ粒子に表面改質を施すと、両性イオン分子の作用基領域が帯びる性質をナノ粒子が帯びることになる。これを確認するために、実施例2と同様にナノ粒子を両性イオン分子で置換した場合と、実施例3と同様にナノ粒子をカルボキシ基(-COOH)を有する分子で表面置換させ、ナノ粒子の水和されたサイズを測定した。ここで使用したナノ粒子は量子ドットに受光して特定波長の光を発光する性質を持っており、この量子ドットが水和されたサイズは溶液中で均一に分散したときに約6~7nm程度である。

【0053】

両性イオン分子が置換されたナノ粒子の場合(実施例2)は、pHの変化または塩濃度の変化による水和されたサイズの変化が大きく観測されなかった。ところが、対照群として用いた、作用基領域として両性イオン分子ではなくカルボキシ基(-COOH)を有する分子で置換されたナノ粒子(実施例3)は、pHの変化、塩濃度の変化による顕著なサイズ変化が現れた。これは両性イオン分子が対照群に比べてナノ粒子の表面を広いpH及び塩濃度の範囲で安定化させることができるようになったことを示唆している。サイズが一定に維持されるということは、両性イオン分子が様々な水溶液環境でナノ粒子を効果的に分散および安定化させることができることを示す。

【0054】

実施例6

[高分子ビーズとの非特異的吸着能の確認]

図7は両性イオン分子が置換されたナノ粒子(実施例2)とポリマービーズ間の非特異的結合が両性イオン分子の表面置換のために低くなったことを示す結果である。一般にDNA配列分析、ラボオンチップ(DNA array assay、Lab on a chip)などのように、研究・携帯用として使用される基板ベースのセンサーは、非特異的吸着の程度を低めるために基板の表面にウシ血清アルブミン(Bovine serum albumine)などの生体分子をコートする。ところが、このように処理した表面においても非特異的結合が完全になくならずに現れた。

【0055】

したがって、これと同様に実現された高分子表面におけるナノ粒子の非特異的吸着が減少したことを確認した。まず、ウシ血清アルブミンがコートされたポリマービーズにナノ粒子を混ぜ、一定時間の経過後に余分な量子ドットを十分に洗浄し、ビーズの表面に非特異的吸着されたナノ粒子(本明細書では量子ドットを例として挙げた)の蛍光を蛍光顕微鏡で観察した。

【0056】

カルボキシ基分子(-COOH)を作用基領域として有する分子で表面置換されたナノ粒子(実施例3)は、容易にポリマービーズの表面に吸着されてビーズの表面からナノ粒子(すなわち、本明細書で例として挙げた量子ドット)の蛍光が観測されることを確認することができた。ところが、両性イオン分子で表面置換された量子ドットの場合、蛍光が殆ど観測されなかったことから、全体的に中性電荷を帯びて静電引力が最小化されて、非特異的吸着の程度が顕著に低くなつたことを確認することができた。

【0057】

実施例7

[生細胞との非特異的結合程度の確認]

図8は子宮頸癌細胞に、それぞれ両性イオン分子が表面置換された量子ドット(実施例2)と、カルボキシ基を有する分子で表面置換されたナノ粒子(実施例3)を処理した後、共焦点顕微鏡で観察した写真である。図8の下の写真において緑色で表示した部分は量子ドットの蛍光が観測される部分であり、該写真は細胞の内部から出てくる蛍光にのみ焦

10

20

30

40

50

点を合わせて選択的に写した図である。

【0058】

実施例6から分るように、両性イオン分子で置換されたナノ粒子（実施例2）とポリマービーズとの非特異的吸着が減少した場合と同様の結果を示した。作用基領域として両性イオン分子で表面置換した量子ドットの場合は、対照群として用いたカルボキシ基を有する分子で表面置換した量子ドットの場合に比べて細胞内、外殻部分で量子ドットの蛍光が全く観測されないことが分かる。

【0059】

両性イオン分子を置換したナノ粒子の場合、細胞表面との静電気的引力による相互作用を弱めることができるために、細胞内及び外殻部分で非特異的吸着による細胞内取り込み（エンドサイトーシス）が観測されない。ところが、対照群、すなわちカルボキシ基を有する分子で表面置換したナノ粒子の場合、細胞に対する非特異的結合が観測され、これによる細胞内取り込みも観測される。このような結果は、両性イオンを用いて細胞に対する量子ドットの非特異的吸着の程度を顕著に低下させることにより、生体画像化技術を開発するためのナノ粒子の表面改質技術に使用できる可能性を示唆する。

【0060】

実施例8

[量子ドット - タンパク質複合体を用いた選択的標識能力の確認]

カルボン酸と両性イオン分子を同時に表面置換したナノ粒子（実施例4）の場合、生体分子の一種であるストレプトアビジン（streptavidin）との生体接合によって強い共有結合を構成して複合体を形成することができる。本明細書では、ナノ粒子の例として量子ドットを、タンパク質の例としてストレプトアビジンを挙げ、量子ドット - ストレプトアビジン複合体を生体接合によって合成した。図9はビオチンコートされたポリマービーズに量子ドット - ストレプトアビジン複合体を混ぜ、その蛍光及び透過画像化写真を観測したものである。ストレプトアビジンとビオチンとの間には抗体と抗原間の結合などの強い分子間引力、すなわち多重水素結合で強力な引力が作用する。したがって、ストレプトアビジンは容易にビオチンコートされたポリマービーズに標識でき、量子ドット - ストレプトアビジン複合体も同じ原理でビオチンコートされたポリマービーズに識別できる。対照群として、実施例4で合成した量子ドットを、ストレプトアビジンとの複合体を形成せずに、ビオチンコートされたポリマービーズに混ぜたときは、量子ドットの表面の両性イオン分子によって非特異的吸着の程度が低いため、量子ドットの蛍光は観測されなかった。

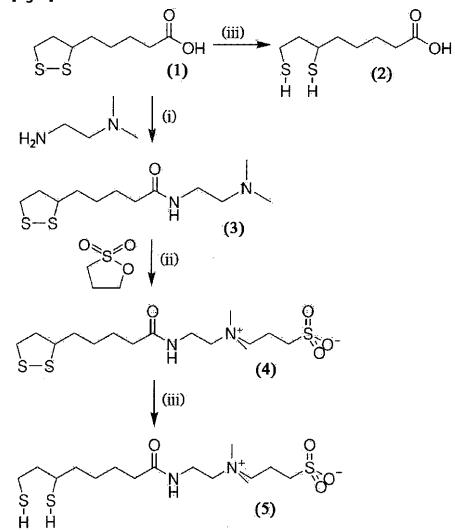
10

20

30

【図2】

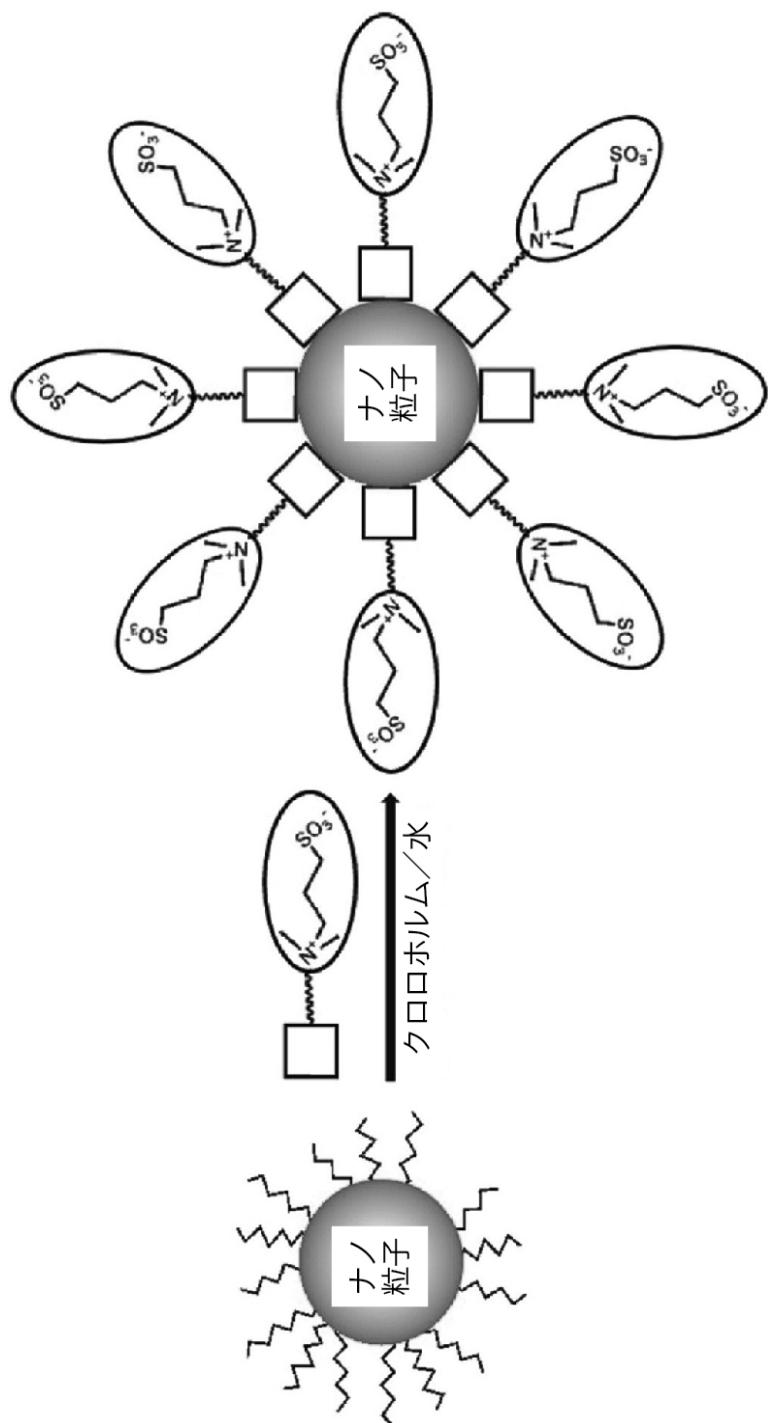
[Fig. 2]



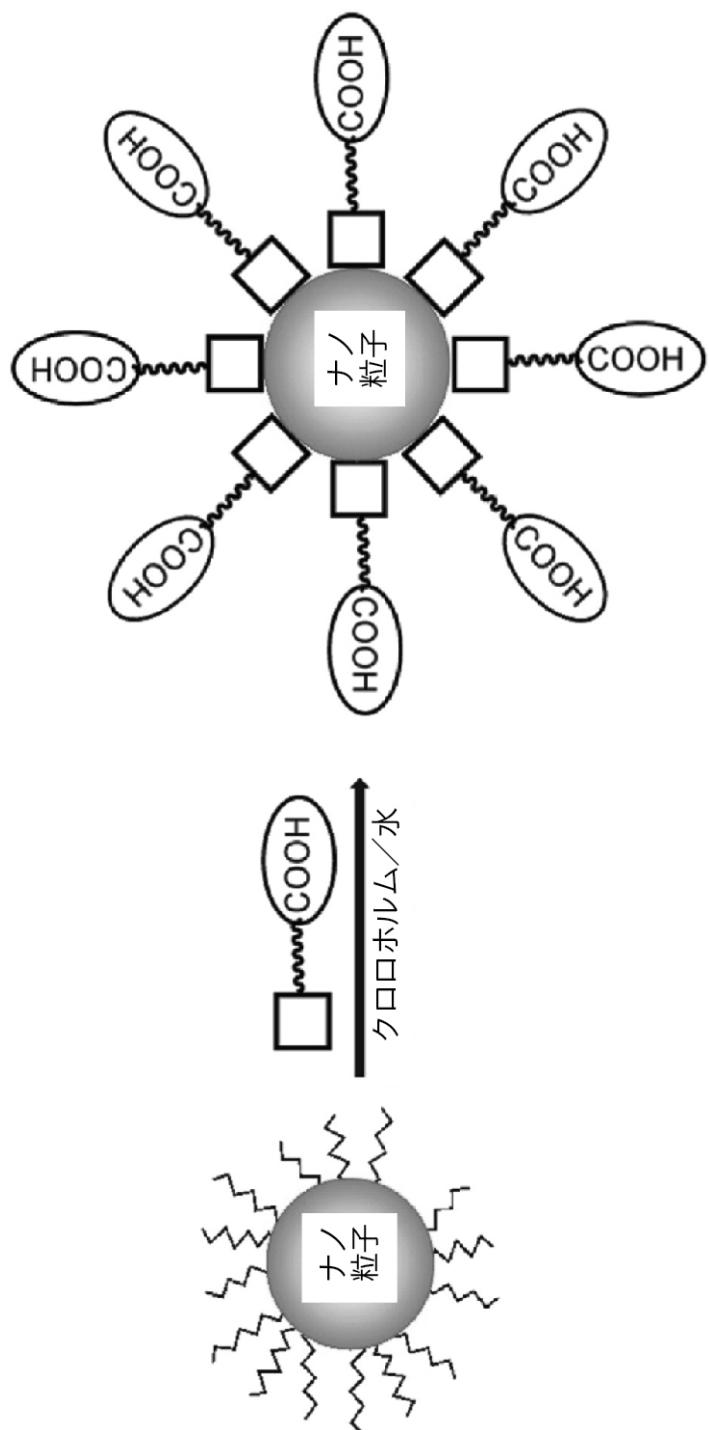
【図1】



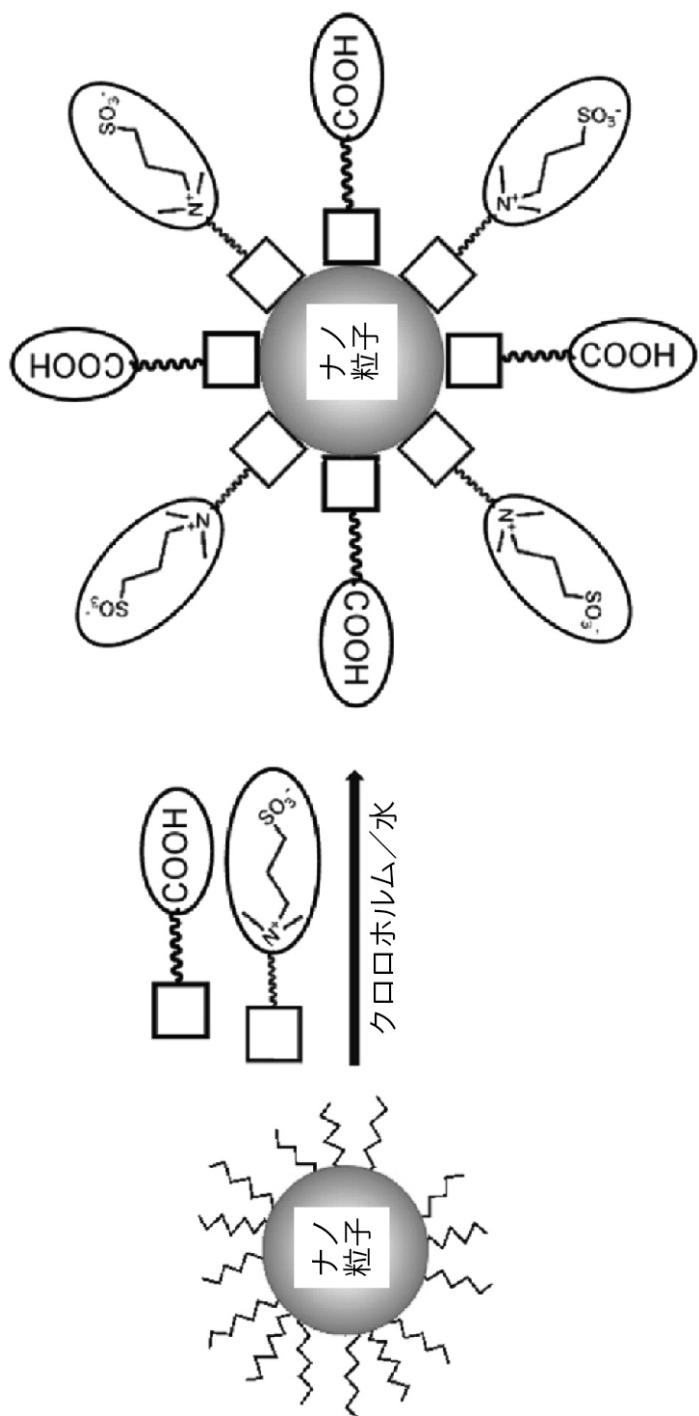
【図3】



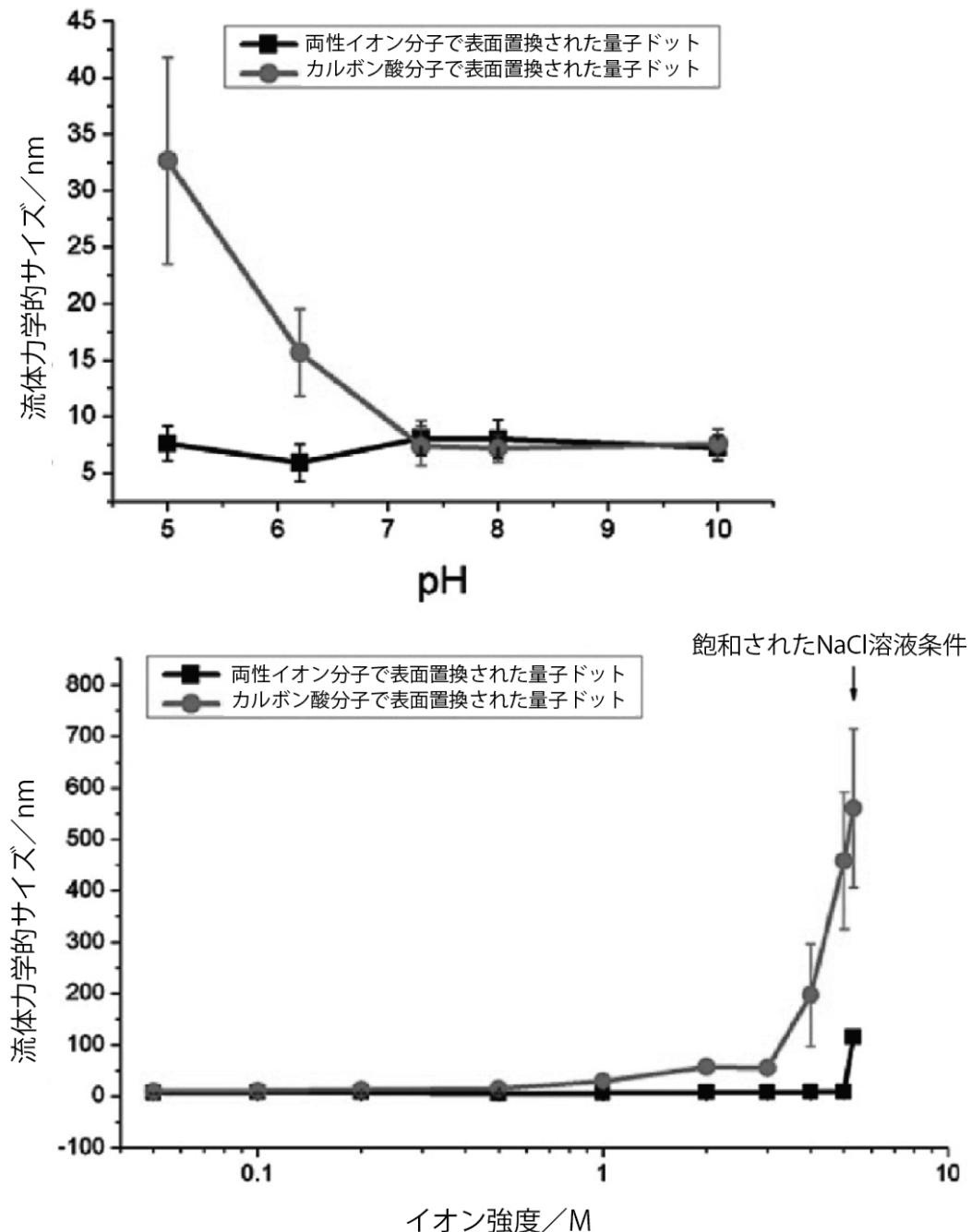
【図4】



【図5】

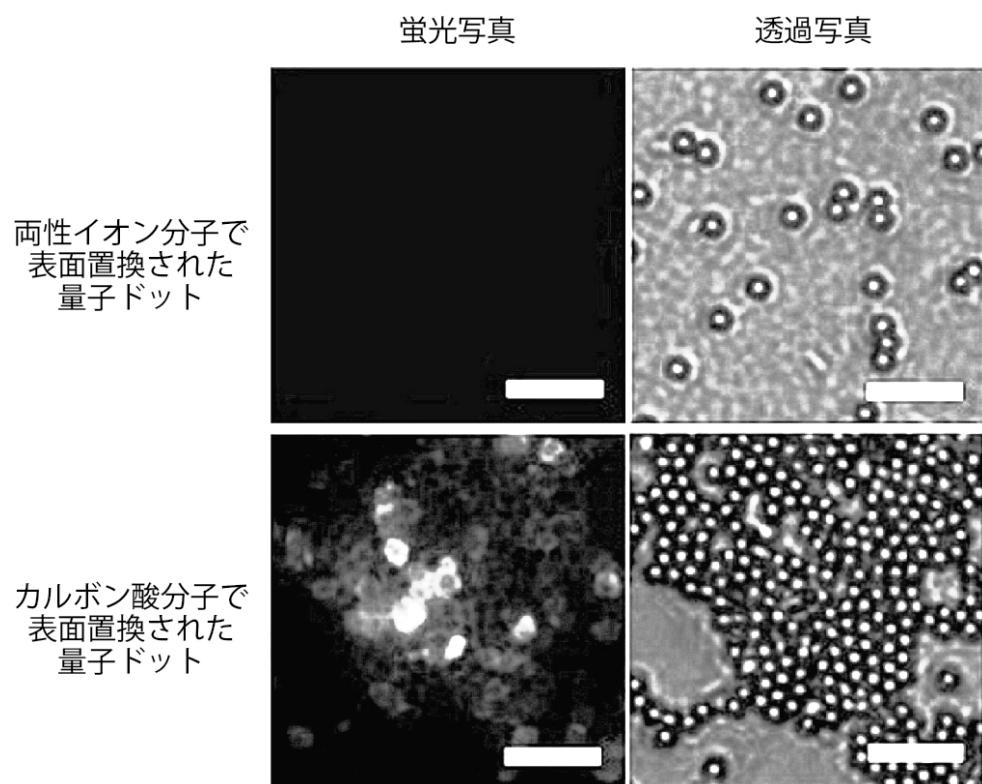


【図6】

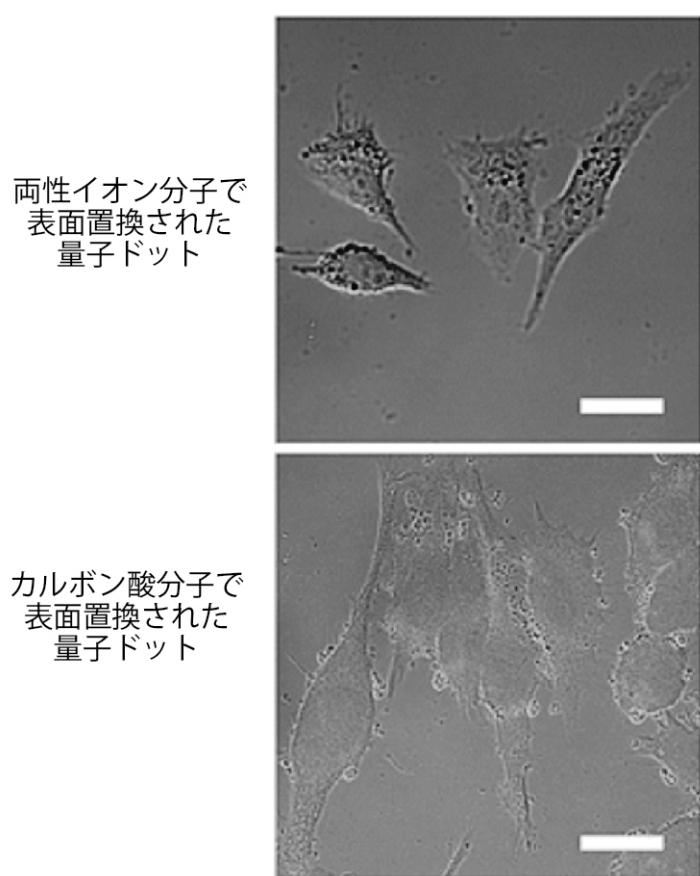


【図7】

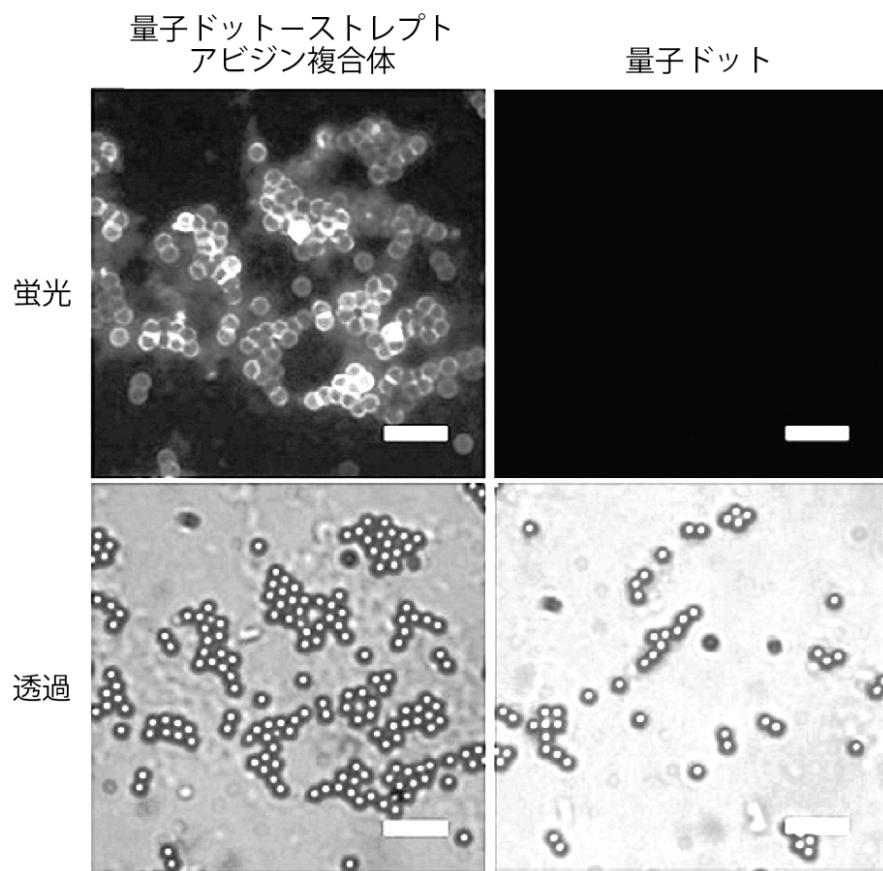
ウシ血清アルブミンがコートされたポリマービーズ



【図8】



【図9】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
B 8 2 Y 40/00 (2011.01) B 8 2 Y 40/00
C 0 7 C 321/04 (2006.01) C 0 7 C 321/04 C S P

(72)発明者 キム、スンジ
大韓民国、ギュンブク 790 - 751、ポハン - シ、ナム - グ、チゴク - ドン、ギヨス アパート、5 - 603
(72)発明者 パク、ジュンヒョク
大韓民国、ギュンブク 790 - 784、ポハン - シ、ナム - グ、ヒョジャ - ドン、浦項工科大学
化学棟、420
(72)発明者 ナム、ジュテク
大韓民国、ギュンブク 790 - 784、ポハン - シ、ナム - グ、ヒョジャ - ドン、浦項工科大学
校、15 - 314
(72)発明者 ジン、ホ
大韓民国、チュンナム 356 - 100、ソサン - シ、ヤンテ - ドン、397 - 3

審査官 加藤 文彦

(56)参考文献 国際公開第2010 / 002217 (WO , A2)
国際公開第2010 / 076237 (WO , A2)
米国特許出願公開第2009 / 0202816 (US , A1)
特表2007 - 526934 (JP , A)
特表2010 - 513639 (JP , A)

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)
A 61 K 47 / 48
A 61 K 49 / 00
B 8 2 Y 5 / 00
B 8 2 Y 20 / 00
B 8 2 Y 30 / 00
B 8 2 Y 40 / 00
C 0 7 C 321 / 04
C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)