

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7565687号
(P7565687)

(45)発行日 令和6年10月11日(2024.10.11)

(24)登録日 令和6年10月3日(2024.10.3)

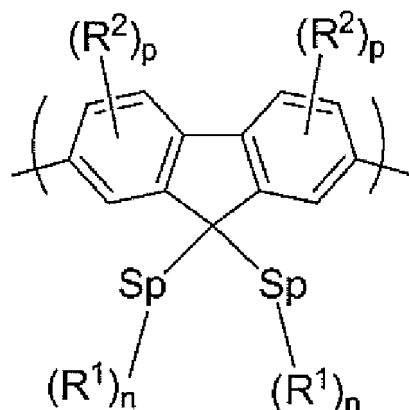
(51)国際特許分類		F I	
C 0 8 L	83/02 (2006.01)	C 0 8 L	83/02 Z N M
A 6 1 K	51/06 (2006.01)	A 6 1 K	51/06 2 0 0
C 0 8 G	77/02 (2006.01)	C 0 8 G	77/02
C 0 8 G	77/04 (2006.01)	C 0 8 G	77/04
C 0 8 L	101/12 (2006.01)	C 0 8 L	101/12
請求項の数 24 (全29頁) 最終頁に続く			
(21)出願番号	特願2019-516684(P2019-516684)	(73)特許権者	000002093
(86)(22)出願日	平成29年9月29日(2017.9.29)		住友化学株式会社
(65)公表番号	特表2019-535844(P2019-535844		東京都中央区日本橋二丁目7番1号
	A)	(74)代理人	100114188
(43)公表日	令和1年12月12日(2019.12.12)		弁理士 小野 誠
(86)国際出願番号	PCT/GB2017/052924	(74)代理人	100119253
(87)国際公開番号	WO2018/060722		弁理士 金山 賢教
(87)国際公開日	平成30年4月5日(2018.4.5)	(74)代理人	100124855
審査請求日	令和2年8月4日(2020.8.4)		弁理士 坪倉 道明
審判番号	不服2022-12450(P2022-12450/J	(74)代理人	100129713
	1)		弁理士 重森 一輝
審判請求日	令和4年8月9日(2022.8.9)	(74)代理人	100137213
(31)優先権主張番号	1616714.0		弁理士 安藤 健司
(32)優先日	平成28年9月30日(2016.9.30)	(74)代理人	100143823
(33)優先権主張国・地域又は機関			弁理士 市川 英彦
最終頁に続く		最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 複合粒子

(57)【特許請求の範囲】
【請求項1】

シリカポリマーと、主鎖およびこの主鎖から懸垂した極性基を含む発光ポリマーとの混合物を含む複合粒子であって、
前記発光ポリマーが、アルコール溶媒中で少なくとも0.1mg/mlの溶解度を有し、
前記発光ポリマーが、共役ポリマーであって、前記発光ポリマーの主鎖が式(Ia)の繰り返し単位を含む、

【化 1】



10

(Ia)

(式中、 S_p はスペーサー基であり、 R^1 は極性基であり、 n は少なくとも1であり、 R^2 は非極性置換基であり、 p は0または正の整数であり、式中、 S_p 、 R^1 および R^2 は、各出現において独立して、同一でも異なってもよい) 複合粒子。

20

【請求項 2】

前記極性基が、式 $-O(R^3O)_q-R^4$ (式中、 R^3 はそれぞれの出現において、1または複数の非隣接C原子がOで置き換えられていてもよい C_{1-10} アルキレン基であり、 R^4 はHまたは C_{1-5} アルキルであり、 q は少なくとも1である)の基を含むか、またはそれからなる、請求項1に記載の複合粒子。

【請求項 3】

前記極性基がイオン性基を含むか、またはそれからなる、請求項1又は2に記載の複合粒子。

【請求項 4】

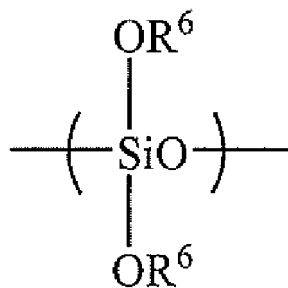
30

前記イオン性基が $-COO^-$ 基である、請求項3に記載の複合粒子。

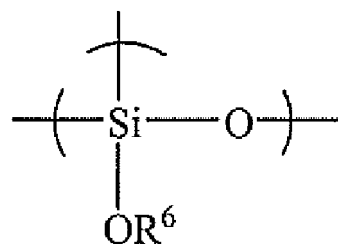
【請求項 5】

前記シリカポリマーが、式 II a および / または II b の繰り返し単位を含む、請求項1から4のいずれか一項に記載の複合粒子：

【化 3】



(IIa)



(IIb)

40

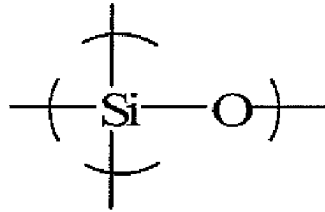
(式中、 R^6 は各出現において独立して、Hまたは C_{1-12} ヒドロカルビルから選択される)。

50

【請求項 6】

前記シリカポリマーが、式 I I c の繰り返し単位をさらに含む、請求項 5 に記載の複合粒子：

【化 4】



(IIc)

10

【請求項 7】

前記複合粒子がナノ粒子である、請求項 1 から 6 のいずれか一項に記載の複合粒子。

【請求項 8】

前記複合粒子が蛍光性である、請求項 1 から 7 のいずれか一項に記載の複合粒子。

【請求項 9】

前記シリカポリマーの表面に共有結合した生体分子に結合するための受容体基を含む、請求項 1 から 8 のいずれか一項に記載の複合粒子。

20

【請求項 10】

ポリエーテル鎖が、前記シリカポリマーの表面に共有結合している、請求項 1 から 9 のいずれか一項に記載の複合粒子。

【請求項 11】

ポリエーテル鎖が、前記シリカポリマーの表面と前記受容体基との間に設けられている、請求項 9 に記載の複合粒子。

【請求項 12】

液体中に懸濁されている、請求項 1 から 11 のいずれかに記載の複合粒子を含むコロイド懸濁液。

30

【請求項 13】

前記液体がプロトン性液体である、請求項 12 に記載のコロイド懸濁液。

【請求項 14】

前記プロトン性液体が、1 または複数の塩をその中に溶解させて含む、請求項 13 に記載のコロイド懸濁液。

【請求項 15】

前記発光ポリマーの存在下におけるシリカモノマーの重合による前記シリカポリマーの形成を含む、請求項 1 から 11 のいずれか一項に記載の複合粒子を調製する方法。

【請求項 16】

溶媒に溶解したシリカモノマーを塩基の存在下で重合させる、請求項 15 に記載の方法。

40

【請求項 17】

前記シリカモノマーがトリアルコキシシランまたはテトラアルコキシシランである、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 18】

前記発光ポリマーおよび前記シリカモノマーが極性溶媒に溶解される、請求項 15 から 17 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 19】

前記発光ポリマーおよび前記シリカモノマーが、水、C₁-C₁₀ アルコールおよびそれらの組合せから選択される溶媒に溶解される、請求項 15 から 18 のいずれか一項に記載の

50

方法。

【請求項 20】

前記発光ポリマー：シリカモノマーの重量比が 1 : 1 ~ 1 : 500 の範囲内である、請求項 15 から 19 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 21】

アルコール溶液中の前記発光ポリマーの濃度が少なくとも 0.1 mg/ml である、請求項 15 から 20 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 22】

以下の工程を含む、請求項 15 から 21 のいずれか一項に記載の方法：

(a) 前記発光ポリマーを溶媒に溶解する工程；

(b) 工程 (a) で得られた溶液に塩基を添加する工程；ならびに

(c) 工程 (b) の溶液にシリカモノマーの溶液を添加する工程。

【請求項 23】

前記複合粒子の表面が、生体分子に結合することができる基で官能化されている、請求項 15 から 22 のいずれかに記載の方法。

【請求項 24】

請求項 9 に記載の複合粒子に生体分子を結合させる工程を含む、生体分子を標識する方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、複合発光粒子および発光マーカとしてのその使用に関する。本発明はさらに、前記複合粒子を調製する方法に関する。

【背景技術】

【0002】

シリカナノ粒子は、それらの親水性のために、非常に高い固形分であっても、水性溶媒、例えば水性生物学的緩衝液中で非常に安定な懸濁液を形成する。シリカおよび発光材料のナノ粒子は、標識試薬または検出試薬として開示されている。

【0003】

Nanoscale Res. Lett., 2011, vol. 6, p 328 は、シリカマトリックス中への小分子の捕捉を開示している。

【0004】

Langmuir, 1992, vol. 8, pp 2921 - 2931 は、シランカップリング剤への染料のカップリング、およびその後のシリカ球への組み込みを開示している。

【0005】

J. Mater. Chem., 2013, vol. 1, pp 3297 - 3304, Behrendt et al. は、LEP がシリカに共有結合しているシリカ - LEP ナノ粒子を記載している。発光ポリマーは、ナノ粒子の形成中にシリカモノマーと反応する、ポリマー主鎖から懸垂したアルコキシシラン基を有する。

【0006】

Nanoscale, 2013, vol. 5, pp 8593 - 8601, Geng et al. は、LEP がペンダント非極性アルキル側鎖を有し、ナノ粒子が「SiO₂@CP@SiO₂」構造を有するシリカ - 共役ポリマー (CP) ナノ粒子を記載している。

【0007】

Chem. Mater., 2014, vol. 26, pp 1874 - 1880, Geng et al. は、ポリ(9,9-ジヘキシルフルオレン-alt-2,1,3-ベンゾチアジアゾール)(PFBT)担持ナノ粒子を開示している。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0008】

10

20

30

40

50

【文献】Nanoscale Res. Lett., 2011, vol. 6, p 328

【文献】Langmuir, 1992, vol. 8, pp 2921 - 2931

【文献】J. Mater. Chem., 2013, vol. 1, pp 3297 - 3304, Behrendt et al.

【文献】Nanoscale, 2013, vol. 5, pp 8593 - 8601, Geng et al.

【文献】Chem. Mater., 2014, vol. 26, pp 1874 - 1880, Geng et al.

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

10

【0009】

本発明の目的は、構造的に安定な発光粒子を提供することである。

【0010】

本発明のなおさらなる目的は、高いコロイド安定性を有する発光粒子を提供することである。

【0011】

本発明のなおさらなる目的は、前記発光粒子の簡単な合成を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0012】

本発明者らは、シリカポリマーと極性基で置換された発光ポリマーとの組合せが、良好なコロイド形成特性を有する安定な発光粒子を提供し得ることを見出した。

20

【0013】

したがって、本発明の第1の態様では、シリカポリマーと、主鎖およびこの主鎖から懸垂した極性基を含む発光ポリマーとを含む複合粒子を提供する。

【0014】

第2の態様では、本発明は、液体中に懸濁した本発明の第1の態様による複合粒子を含むコロイド懸濁液を提供する。

【0015】

第3の態様では、本発明は、発光ポリマーの存在下におけるシリカモノマーの重合によるシリカポリマーの形成を含む、本発明の第1の態様による複合粒子の調製方法を提供する。

30

【0016】

本発明者らは、シリカを含む粒子のコロイド安定性、特に塩水溶液中のコロイド安定性が、粒子の表面上にポリエーテル基を提供することによって増強され得ることを見出した。

【0017】

したがって、第4の態様では、本発明は、その表面にポリエーテル基を有する、シリカを含む粒子を提供する。

【0018】

第5の態様では、本発明は、液体と第4の態様の粒子とを含むコロイドを提供する。液体は好ましくはプロトン性液体であり、水またはアルコールであってもよい。液体は、1または複数の塩をその中に溶解させて含み得る。液体は緩衝液であり得る。

40

【0019】

第6の態様では、本発明は、第4の態様による粒子を形成する方法であって、反応基とポリエーテル基とを含む化合物の反応基を粒子と反応させて、ポリエーテル基を粒子表面に共有結合させることを含む方法を提供する。

【0020】

粒子の表面での反応は、表面での反応基とシリカとの間の反応であっても、またはシリカ表面の別の反応基（アミンであってもよい）と化合物の反応基との間の反応であってもよい。

【0021】

50

第４の態様の粒子は、シリカを含み得るか、またはそれからなってもよい。

【００２２】

第４の態様の粒子は、シリカおよび少なくとも１つの発光材料を含み得る。発光材料は、ポリマー性または非ポリマー性であり得る。発光材料は粒子に共有結合していても、していなくてもよい。粒子は、第１の態様による複合粒子であり得る。

【００２３】

本発明は、図面を参照してより詳細に説明される。

【図面の簡単な説明】

【００２４】

【図１】図１は、本発明の実施形態による青色発光シリカ－ＬＥＰナノ粒子についての平均数％対直径（nm）のグラフである。

10

【図２】図２は、本発明の実施形態による青色発光シリカ－ＬＥＰナノ粒子の吸収スペクトルを示す図である。

【図３】図３は、本発明の実施形態による青色発光シリカ－ＬＥＰナノ粒子のフォトルミネッセンススペクトルを示す図である。

【図４】図４は、表面処理されていない複合粒子およびその表面にアミノ基を形成するように処理された複合粒子の、メタノール中コロイド懸濁液の粒度分布のグラフである。

【図５】図５は表面処理されていない複合粒子およびその表面にアミノ基を形成するように処理された複合粒子の、水中コロイド懸濁液の粒度分布のグラフである。

【図６】図６は、表面処理されていない複合粒子およびその表面にポリエチレングリコール鎖を形成するように処理された複合粒子の、リン酸緩衝生理食塩水（pH 7.4）中コロイド懸濁液の粒度分布のグラフである。

20

【図７】図７は、一実施形態による緑色発光複合ナノ粒子のUV吸収スペクトルを示す図である。

【図８】図８は、一実施形態による緑色発光複合ナノ粒子のフォトルミネッセンススペクトルを示す図である。

【図９】図９は、一実施形態による緑色発光複合ナノ粒子のZ平均直径対発光ポリマー濃度のグラフである。

【図１０】図１０は、一実施形態に係る緑色発光複合ナノ粒子のZ平均直径対基本体積のグラフである。

30

【図１１】図１１は、一実施形態による緑色発光複合ナノ粒子のZ平均直径対シリケート体積のグラフである。および

【図１２】図１２は、一実施形態による緑色発光複合ナノ粒子のZ平均直径対総希釈率のグラフである。

【発明を実施するための形態】

【００２５】

本発明の第１の態様では、シリカポリマーと、主鎖およびこの主鎖から懸垂した極性基を含む発光ポリマーとの混合物を含む複合粒子を提供する。

【００２６】

本明細書で使用される「シリカポリマー」は、シロキサン基を含むポリマーを意味する。シリカポリマーは、交互のSiおよびO原子を含むかまたはそれらからなる直鎖、分枝鎖または架橋主鎖を有することができる。

40

【００２７】

シリカポリマーは、発光ポリマーが分散しているマトリックスを形成することができる。複合体の発光ポリマーとシリカポリマーは互いに共有結合していない。したがって、粒子の形成中にそのような共有結合を形成するために、シリカポリマーおよび/または発光ポリマーを反応基で置換する必要はない。

【００２８】

発光ポリマーは、蛍光、燐光、またはそれらの組合せを放射してもよい。

【００２９】

50

発光ポリマーは、ホモポリマーであってもよく、または2つ以上の異なる繰り返し単位を含むコポリマーであってもよい。

【0030】

発光ポリマーは、ポリマー主鎖から懸垂して、またはポリマー主鎖の末端基として、ポリマー主鎖中に発光基を含んでもよい。燐光性ポリマーの場合、燐光性金属錯体、好ましくは燐光性イリジウム錯体は、ポリマー主鎖中に、ポリマー主鎖から懸垂して、またはポリマー主鎖の末端基として提供され得る。

【0031】

発光ポリマーは、非共役主鎖を有していてもよく、共役ポリマーであってもよい。「共役ポリマー」とは、隣接する繰り返し単位に直接共役しているポリマー主鎖中に繰り返し単位を含むポリマーを意味する。共役発光ポリマーとしては、ポリマー主鎖に沿って互いに共役した1または複数のアリーレン、ヘテロアリーレンおよびビニレン基を含むポリマーが挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0032】

発光ポリマーは、直鎖、分枝状または架橋主鎖を有し得る。

【0033】

発光ポリマーは、少なくとも1つの極性基で置換された1または複数の繰り返し単位をポリマー主鎖中に含み得る。1または複数の極性基は、前記繰り返し単位の唯一の置換基であり得るか、または前記繰り返し単位は、1または複数の非極性基（1または複数の C_{1-40} ヒドロカルビル基であってもよい）でさらに置換されていてもよい。1または複数の極性基で置換された1または複数の繰り返し単位は、ポリマーの唯一の繰り返し単位であってもよく、またはポリマーは、その共繰り返し単位または各繰り返し単位が、非置換であるか、または複数の非極性基（1または複数の C_{1-40} ヒドロカルビル基であってもよい）で置換されている1または複数のさらなる共繰り返し単位を含み得る。

20

【0034】

本明細書に記載の C_{1-40} ヒドロカルビル基としては、 C_{1-20} アルキル、非置換フェニルおよび1または複数の C_{1-20} アルキル基で置換されたフェニルが挙げられるが、これらに限定されない。

【0035】

本明細書で使用される「極性基」は、アルコール性溶媒中少なくとも 0.0005 mg/ml 、好ましくは少なくとも 0.001 、 0.01 、 0.1 、 1 、 5 または 10 mg/ml の溶解度を発光ポリマーにもたらすもう1つの基を指すことができる。溶解度は25において測定される。好ましくは、アルコール溶媒は、 C_{1-10} アルコール、より好ましくはメタノールである。

30

【0036】

極性基は、好ましくは水素結合を形成できる基またはイオン性基である。

【0037】

本発明の第1の態様の一実施形態では、発光ポリマーは式 $-O(R^3O)_q-R^4$ （式中、 R^3 はそれぞれの出現において C_{1-10} アルキレン基であり、 C_{1-5} アルキレン基であってもよく、前記アルキレン基の1または複数の隣接していない非末端C原子はOで置換されていてもよく、 R^4 はHまたは C_{1-5} アルキルであり、 q は少なくとも1であり、 $1\sim10$ であってもよい）の極性基を含む。好ましくは、 q は少なくとも2である。より好ましくは、 q は2～5である。 q の値は、式 $-O(R^3O)_q-R^4$ のすべての極性基において同じであってもよい。 q の値は、同じポリマーの極性基間で異なってもよい。

40

【0038】

R^3 に関して本明細書で使用される「 C_{1-5} アルキレン基」とは、式 $-(CH_2)_f-$ （式中、 f は1～5である）の基を意味する。

【0039】

好ましくは、発光ポリマーは式 $-O(CH_2CH_2O)_qR^4$ （式中、 q は少なくとも1であり、 $1\sim10$ であってもよく、 R^4 は C_{1-5} アルキル基、好ましくはメチルである）

50

の極性基を含む。好ましくは、 q は少なくとも 2 である。より好ましくは、 q は 2 ~ 5 であり、最も好ましくは q は 3 である。

【0040】

本発明の第 1 の態様の一実施形態において、発光ポリマーは式 - $N(R^5)_2$ (式中、 R^5 は H または C_{1-12} ヒドロカルビルである) の極性基を含む。好ましくは、各 R^5 は C_{1-12} ヒドロカルビルである。

【0041】

本発明の第 1 の態様の一実施形態では、発光ポリマーは、アニオン性、カチオン性または双性イオン性であり得るイオン性基である極性基を含む。好ましくは、イオン性基はアニオン性基である。

10

【0042】

例示的なアニオン性基は、 $-COO^-$ 、スルホン酸基、水酸化物、硫酸、リン酸、ホスフィン酸、またはホスホン酸の基である。

【0043】

例示的なカチオン性基は - $N(R^5)_3^+$ (式中、各 R^5 は各出現において、H または C_{1-12} ヒドロカルビルである) である。好ましくは、各 R^5 は C_{1-12} ヒドロカルビルである。

【0044】

カチオン性基またはアニオン性基を含む発光ポリマーは、これらのイオン性基の電荷のバランスをとるために対イオンを含む。

20

【0045】

アニオン性またはカチオン性基および対イオンは同じ価数を有することができ、対イオンは各アニオン性またはカチオン性基の電荷のバランスをとる。

【0046】

アニオン性またはカチオン性基は、一価または多価であってよい。好ましくは、アニオン性基およびカチオン性基は一価である。

【0047】

発光ポリマーは、複数のアニオン性またはカチオン性極性基を含むことができ、ここで 2 以上のアニオン性またはカチオン性基の電荷は、単一の対イオンによってバランスがとられている。極性基は、二価または三価の対イオンを含むアニオン性またはカチオン性基を含んでいてよい。

30

【0048】

対イオンは、カチオンであってもよく、金属カチオンであってもよく、 Li^+ 、 Na^+ 、 K^+ 、 Cs^+ であってもよく、好ましくは Cs^+ であり、または有機カチオンであり、アンモニウム、例えばテトラアルキルアンモニウム、エチルメチルイミダゾリウムまたはピリジニウムであってもよい。

【0049】

対イオンはアニオンであってもよく、ハロゲン化物；スルホン酸基（メシル酸またはトシル酸の基であってもよい）；水酸化物；カルボン酸、硫酸、リン酸、ホスフィン酸、ホスホン酸またはホウ酸の基であってもよい。

40

【0050】

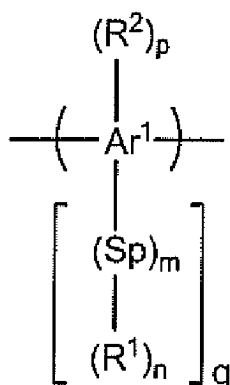
本発明の第 1 の態様の一実施形態では、発光ポリマーは、式 - $O(R^3O)_q - R^4$ の基、式 - $N(R^5)_2$ の基、式 OR^4 の基および / またはイオン性基から選択される極性基を含む。好ましくは、発光ポリマーは、式 - $O(CH_2CH_2O)_q R^4$ の基、式 - $N(R^5)_2$ の基、および / または式 - COO^- のアニオン性基から選択される極性基を含む。好ましくは、極性基は、式 - $O(R^3O)_q - R^4$ の基、式 - $N(R^5)_2$ の基、および / またはイオン性基からなる群から選択される。好ましくは、極性基は、式 - $O(CH_2CH_2O)_q R^4$ のポリエチレングリコール (PEG) 基、式 - $N(R^5)_2$ の基、および / または式 - COO^- のアニオン性基からなる群から選択される。 R^3 、 R^4 、 R^5 、および q は、本発明の他の実施形態に関して説明したとおりである。

50

【 0 0 5 1 】

発光ポリマーの主鎖は共役ポリマーであってもよい。共役発光ポリマーの主鎖は式 (I) の繰り返し単位を含んでいてもよい：

【 化 1 】



(I)

10

20

【 0 0 5 2 】

(式中、 Ar^1 はアリーレン基またはヘテロアリーレン基であり、 Sp はスペーサー基であり、 m は 0 または 1 であり、各出現において独立して、 R^1 は極性基であり、 m が 0 である場合 n は 1 であり、 m が 1 である場合、 n は少なくとも 1 であり、1、2、3 または 4 であってもよく、 R^2 は、各出現において独立して、非極性基であり、 p は 0 または正の整数であり、 q は少なくとも 1 であり、1、2、3 または 4 であってもよく、式中、 Sp 、 R^1 および R^2 は、各出現において独立して、同一でも異なってもよい)。

【 0 0 5 3 】

好ましくは、 m は 1 であり、 n は 2 ~ 4、より好ましくは 4 である。好ましくは p は 0 である。

30

【 0 0 5 4 】

式 (I) の Ar^1 は、 $C_6 - 20$ アリーレン基または 5 ~ 20 員ヘテロアリーレン基であってもよい。 Ar^1 は、好ましくは $C_6 - 20$ アリーレン基であり、フェニレン、フルオレン、ベンゾフルオレン、フェナントレン、ナフタレンまたはアントラセンであってもよく、より好ましくはフルオレンまたはフェニレン、最も好ましくはフルオレンであってもよい。

【 0 0 5 5 】

$Sp - (R^1)_n$ は分枝基であってもよく、極性基 ($-NH_2$ または $-OH$ 基であってもよい) で置換された樹状基、例えばポリエチレンイミンであってもよい。

【 0 0 5 6 】

好ましくは、 Sp は以下から選択される：

- 1 または複数の非隣接 C 原子が O、S、N または $C=O$ で置き換えられていてもよい $C_1 - 20$ アルキレンまたはフェニレン - $C_1 - 20$ アルキレン；

- 1 または複数の置換基 R^1 に加えて、非置換であっても、または 1 もしくは複数の非極性置換基 (1 または複数の $C_1 - 20$ アルキル基であってもよい) で置換されていてもよい $C_6 - 20$ アリーレンまたは 5 ~ 20 員ヘテロアリーレン、より好ましくはフェニレン。

【 0 0 5 7 】

本明細書で使用される「アルキレン」は、分枝または直鎖の二価アルキル鎖を意味する。

【 0 0 5 8 】

本明細書で使用されるアルキル基の「非末端 C 原子」は、 n - アルキル基の末端のメチ

40

50

ル基または分枝アルキル鎖の末端のメチル基以外のC原子を意味する。

【0059】

より好ましくは、Spは以下から選択される：

- 1または複数の非隣接C原子がO、SまたはCOで置き換えられていてもよいC₁₋₂₀アルキレン；および

- 非置換であっても、または1もしくは複数の非極性置換基で置換されていてもよいC₆₋₂₀アリーレンまたは5～20員ヘテロアリーレン、より好ましくはフェニレン。

【0060】

R¹は、本明細書のどこかに記載されている極性基であり得る。好ましくは、R¹は以下のものである：

- 式 - O(CH₂CH₂O)_qR⁴のポリエチレングリコール(PEG)基(式中、qは少なくとも1であり、1～10であってもよく、R⁴はC₁₋₅アルキル基、好ましくはメチルである)；

- 式 - N(R⁵)₂(式中、R⁵はHまたはC₁₋₁₂ヒドロカルビルである)の基；または

- 式 - COO⁻のアニオン性基。

【0061】

nが少なくとも2である場合、各R¹は、各出現において独立して、同じでも異なってもよい。好ましくは、所与のSp基に結合している各R¹は異なる。

【0062】

pが正の整数であり、1、2、3または4であってもよい場合、基R²は、以下から選択することができる：

- アルキル(C₁₋₂₀アルキルであってもよい)；および

- 非置換であっても、または1もしくは複数の置換基で置換されていてもよいアリールおよびヘテロアリール基、好ましくは1または複数のC₁₋₂₀アルキル基で置換されているフェニル；

- それぞれの基が独立して置換されていてもよい直鎖または分枝鎖のアリールまたはヘテロアリール基、例えば式 - (Ar³)_sの基(式中、各Ar³は独立してアリールまたはヘテロアリール基であり、sは少なくとも2である)、好ましくはそれぞれの基が非置換であっても、または1もしくは複数のC₁₋₂₀アルキルで置換されていてもよい分枝鎖または直鎖のフェニル基；ならびに

- 架橋性基、例えばビニル基またはアクリレート基、またはベンゾシクロブタン基などの二重結合を含む基。

【0063】

好ましくは、各R²は、存在する場合、独立してC₁₋₄₀ヒドロカルビルから選択され、より好ましくはC₁₋₂₀アルキル；非置換フェニル；1または複数のC₁₋₂₀アルキル基で置換されたフェニル；ならびに、非置換であっても1または複数の置換基で置換されていてもよい、直鎖または分枝鎖のフェニル基から選択される。

【0064】

本明細書に記載のポリマーは、1つの形態の式(I)の繰り返し単位のみを含むか、もしくはそれからなってもよく、または2つ以上の異なる式(I)の繰り返し単位を含むか、もしくはそれからなってもよい。

【0065】

式(I)の1または複数の繰り返し単位を含むポリマーは、1または複数の共繰り返し単位を含むコポリマーであってもよい。

【0066】

共繰り返し単位が存在する場合、式(I)の繰り返し単位は、ポリマーの繰り返し単位の0.1～99モル%を形成し、50～99モル%または80～99モル%を形成していてもよい。好ましくは、式(I)の繰り返し単位は、ポリマーの繰り返し単位の少なくとも50モル%、より好ましくは少なくとも60、70、80、90、95、98または9

10

20

30

40

50

9 モル%を形成する。最も好ましくは、ポリマーの繰り返し単位は、式 (I) の 1 または複数の繰り返し単位からなる。

【 0 0 6 7 】

ポリマーのその繰り返し単位または各繰り返し単位は、ポリマーの所望の発光色を生じるように選択することができる。

【 0 0 6 8 】

本明細書に記載の複合粒子の青色発光ポリマーは、500 nm 以下、好ましくは 400 ~ 500 nm の範囲 (400 ~ 490 nm であってもよい) のピークを有するフォトルミネッセンススペクトルを有することができる。

【 0 0 6 9 】

本明細書に記載の複合粒子の緑色発光ポリマーは、500 nm を超え 580 nm までの (500 nm を超え 540 nm までであってもよい) ピークを有するフォトルミネッセンススペクトルを有することができる。

【 0 0 7 0 】

本明細書に記載の複合粒子の赤色発光ポリマーは、580 nm 以下から 630 nm までの (585 nm から 625 nm までであってもよい) ピークを有するフォトルミネッセンススペクトルを有することができる。

【 0 0 7 1 】

本明細書に記載の発光ポリマーのフォトルミネッセンススペクトルは、Hamamatsu によって供給される装置 C9920 - 02 を使用して溶液中で測定することができる。

【 0 0 7 2 】

式 (I) の単位を含むポリマーの主鎖は、非共役であっても、または共役であってもよい。

【 0 0 7 3 】

ポリマーは、好ましくは、互いに共役している、および / または式 (I) の繰り返し単位に隣接する共繰り返し単位の芳香族もしくはヘテロ芳香族基に共役している、式 (I) の繰り返し単位を含む共役ポリマーである。例示的な共役ポリマーとしては、アリーレンビニレン繰り返し単位 ; アリーレン繰り返し単位 ; ヘテロアリーレン繰り返し単位 ; アミン繰り返し単位 ; およびそれらの組合せを含むポリマーが挙げられる。

【 0 0 7 4 】

存在する場合、その共繰り返し単位または各共繰り返し単位は、非置換であるか、または 1 もしくは複数の非極性置換基で置換されていてもよく、1 または複数の繰り返し単位は、C₆₋₂₀ アリーレン基および 5 ~ 20 員のヘテロアリーレン基から選択される 1 もしくは複数の基を含むか、またはそれからなっていてよく、前記アリーレン基またはヘテロアリーレン基は、それぞれ独立に、各出現において、非置換であっても、または 1 もしくは複数の非極性置換基で置換されていてもよい。

【 0 0 7 5 】

ポリマーのアリーレン繰り返し単位は、フルオレン、好ましくは 2 , 7 - 結合フルオレン ; フェニレン、好ましくは 1 , 4 - 結合フェニレン ; ナフタレン、アントラセン、インデノフルオレン、フェナントレンおよびジヒドロフェナントレンの繰り返し単位を含むがこれらに限定されない。アリーレン共繰り返し単位は、式 (I I I) ~ (V I) の繰り返し単位から選択することができる :

10

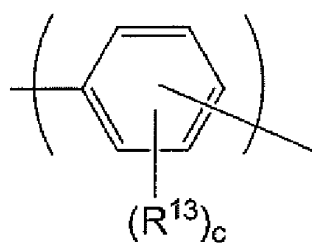
20

30

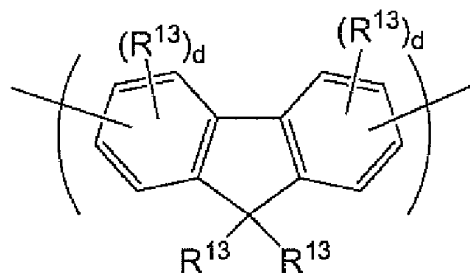
40

50

【化 2】

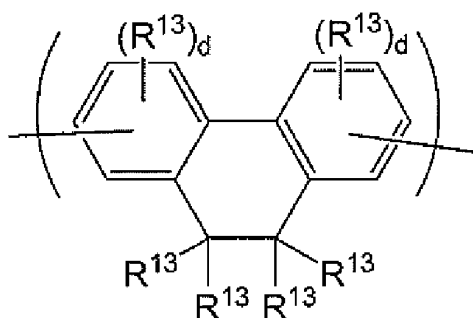


(III)

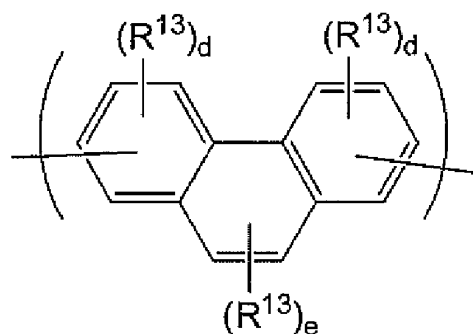


(IV)

10



(V)



(VI)

20

【 0 0 7 6 】

(式中、 R^{13} は、各出現において、独立して置換基であり、 c は0、1、2、3または4、好ましくは1または2であり、各 d は独立して0、1、2または3、好ましくは0または1であり、 e は0、1または2、好ましくは2である)。

【 0 0 7 7 】

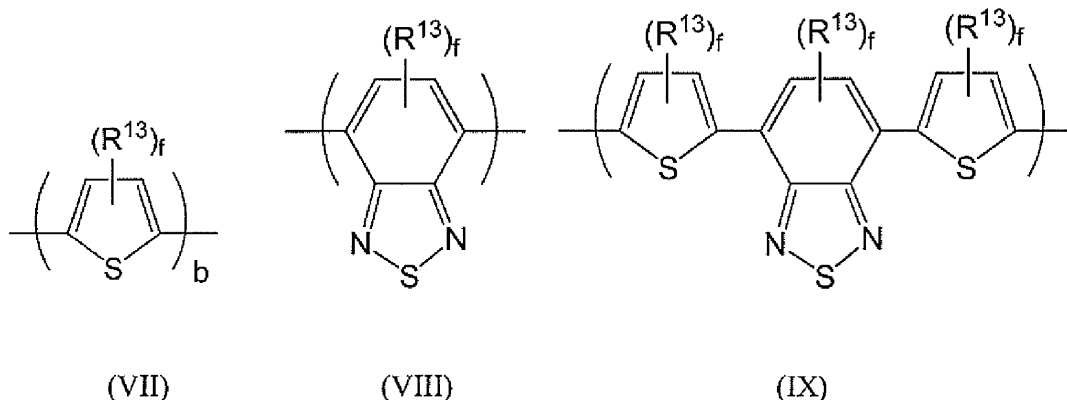
ポリマー主鎖中に1もしくは複数の非置換もしくは置換の5～20員ヘテロアリーレン基を含むか、またはそれからなる繰り返し単位としては、チオフェン繰り返し単位、ピチオフェン繰り返し単位、ベンゾチアジアゾール繰り返し単位、およびそれらの組合せが挙げられるが、これらに限定されない。例示的なヘテロアリーレン共繰り返し単位は、式(VII)、(VIII)および(IX)の繰り返し単位を含む：

30

40

50

【化 3】



10

【0078】

(式中、 R^{13} は、各出現において、独立して置換基であり、 f は0、1または2である)。

【0079】

R^{13} は、各出現において独立して、極性基(極性置換基 - $(Sp)_m - (R^1)_n$ であってもよい)もしくは非極性置換基 R^2 を含むか、またはそれらからなる基であり得、 Sp 、 m 、 R^1 および R^2 は、式(I)に関して記載したとおりである。

20

【0080】

1または複数の極性基で置換されたアリーレン繰り返し単位またはヘテロアリーレン繰り返し単位(式 - $(Sp)_m - (R^1)_n$ の1つの基で置換されている式(III)~(IX)の繰り返し単位であってもよい)は、式(I)の繰り返し単位である。

【0081】

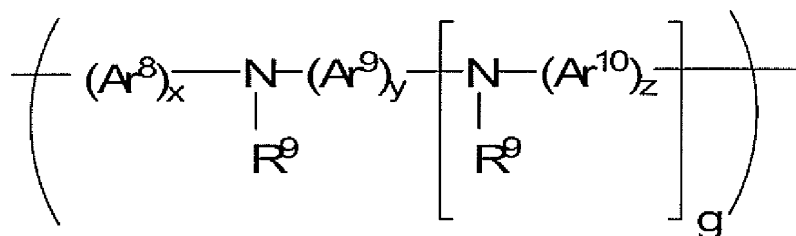
非置換であるか、または1もしくは複数の非極性基のみで置換されている、アリーレン繰り返し単位またはヘテロアリーレン繰り返し単位(式(III)~(IX)の繰り返し単位であってもよい)は、ポリマーの共繰り返し単位である。

【0082】

ポリマーのアミン繰り返し単位は、式(XII)を有し得る：

30

【化 4】



(XII)

40

【0083】

(式中、 Ar^8 、 Ar^9 および Ar^{10} は、各出現において独立して、置換もしくは非置換のアリールまたはヘテロアリールから選択され、 g は0、1または2、好ましくは0または1であり、 R^{13} は各出現において独立して置換基であり、 x 、 y および z はそれぞれ独立して1、2または3である)。

【0084】

R^9 は、 g が1または2である場合、各出現において同一でも異なってもよく、好ましくはアルキルであり、 C_{1-20} アルキルであってもよく、 Ar^{11} および Ar^{12} 基

50

の分枝鎖または直鎖からなる群から選択され、 Ar^{11} は各出現において独立して、置換または非置換のアリールまたはヘテロアリールである。

【0085】

同じN原子に直接結合している Ar^8 、 Ar^9 、および存在する場合には Ar^{10} および Ar^{11} から選択される任意の2つの芳香族またはヘテロ芳香族基は、直接結合または二価の連結原子もしくは基によって連結され得る。好ましい二価の連結原子および基には、O、S、置換NおよびCが含まれる。

【0086】

Ar^8 および Ar^{10} は、好ましくは C_{6-20} アリール、より好ましくはフェニルであり、これらは非置換であっても、または1もしくは複数の置換基で置換されていてもよい。

10

【0087】

$g = 0$ の場合、 Ar^9 は、好ましくは C_{6-20} アリール、より好ましくはフェニルであり、これらは非置換であっても、または1もしくは複数の置換基で置換されていてもよい。

【0088】

$g = 1$ の場合、 Ar^9 は、好ましくは C_{6-20} アリール、より好ましくはフェニルまたは多環式芳香族基、例えばナフタレン、ペリレン、アントラセンまたはフルオレンであり、これらは非置換であっても、または1もしくは複数の置換基で置換されてもよい。

【0089】

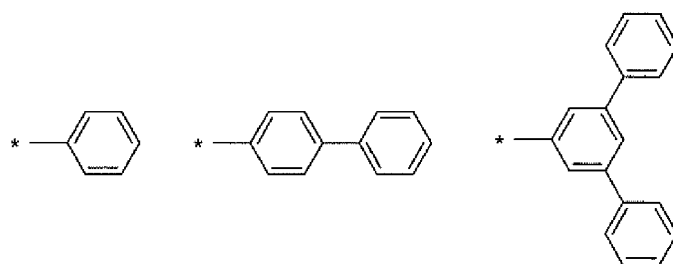
R^9 は、好ましくは Ar^{11} または分枝鎖もしくは直鎖の Ar^{11} 基である。 Ar^{11} は、各出現において好ましくはフェニルであり、これらは非置換であっても、または1もしくは複数の置換基で置換されていてもよい。

20

【0090】

例示的な基 R^9 としては、以下のものが挙げられ、これらはそれぞれ、非置換であっても、または1もしくは複数の置換基で置換されていてもよく、式中*はNへの結合点を表す：

【化5】



30

【0091】

(x 、 y および z は好ましくはそれぞれ1である)。

【0092】

Ar^8 、 Ar^9 、および存在する場合、 Ar^{10} および Ar^{11} は、それぞれ独立して、非置換であるか、または1もしくは複数の置換基(1、2、3または4の置換基であってもよい)で置換されている。

40

【0093】

置換基は独立して、極性基(極性置換基 - $(Sp)_m - (R^1)_n$ であってもよい)または非極性置換基 R^2 を含むか、もしくはそれらからなる基であり得、 Sp 、 m 、 R^1 および R^2 は、式(I)に関して記載したとおりである。

【0094】

Ar^8 、 Ar^9 、および存在する場合には Ar^{10} および Ar^{11} の好ましい置換基は、 C_{1-40} ヒドロカルビル、好ましくは C_{1-20} アルキルである。

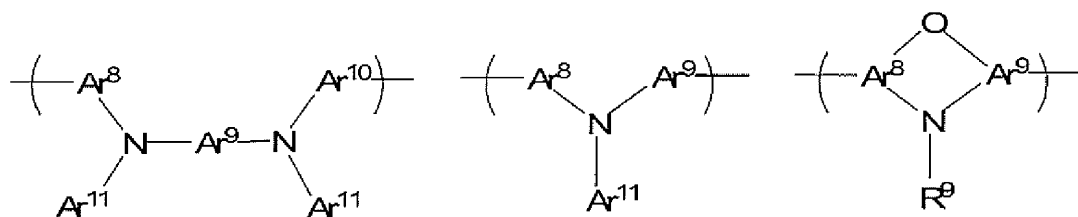
【0095】

式(XII)の好ましい繰り返し単位は、式(XII-1)、(XII-2)および(

50

XII-3) の非置換単位または置換単位を含む：

【化 6】



XII-1

XII-2

XII-3

10

【0096】

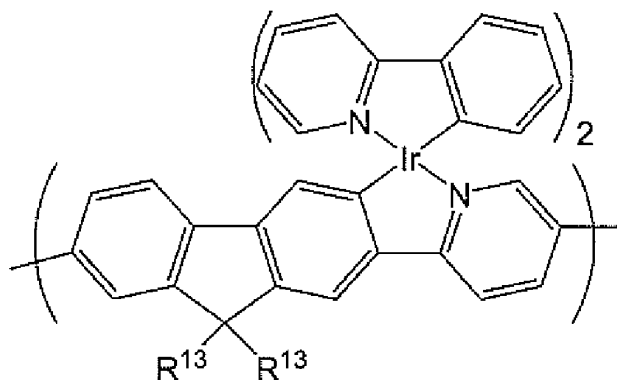
好ましくは、式(XII)の繰り返し単位を含むポリマーは、1または複数のアリーレン繰り返し単位(式(III)~(IX)から選択される1または複数のアリーレン繰り返し単位であってもよい)をさらに含む。0.1~50モル%の発光ポリマーは、式(XII)の1または複数の繰り返し単位であってもよい。発光ポリマーの繰り返し単位は、1または複数の式(XII)の繰り返し単位、および1または複数のアリーレン繰り返し単位(1または複数の式(III)~(IX)の繰り返し単位であってもよい)を含むか、それからなってもよい。

20

【0097】

発光共役ポリマーの場合、発光基、好ましくは金属錯体、より好ましくはイリジウム錯体が、ポリマーの主鎖、側鎖基および/または末端基として提供されてもよい。イリジウム錯体を含む例示的な共役繰り返し単位は、以下の式を有する：

【化 7】



30

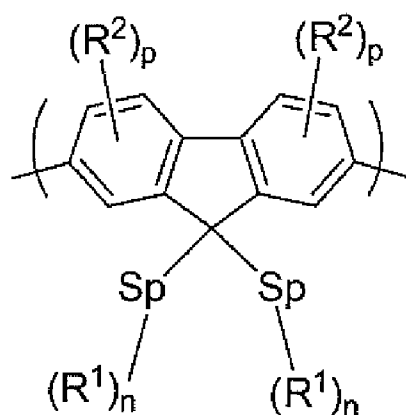
【0098】

好ましくは、式(I)の繰り返し単位は式(Ia)の繰り返し単位である：

40

50

【化 8】



10

(Ia)

【 0 0 9 9 】

(I a)

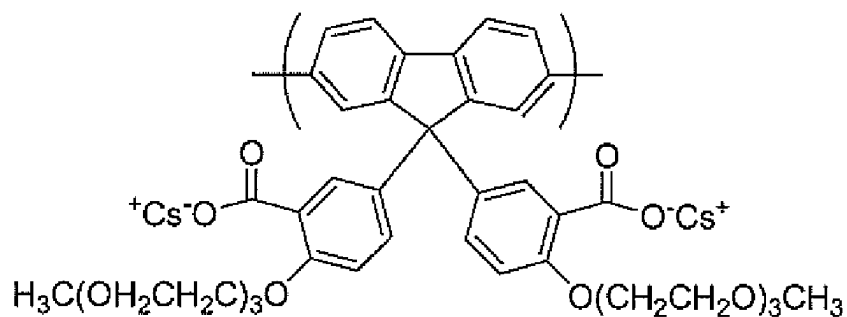
(式中、 R^2 、 p 、 Sp 、 R^1 および n は、各出現において独立して、式(I)の繰り返し単位に関して記載したとおりである)。好ましくは、 n は各出現において2である。好ましくは、 p は各出現において0である。

20

【 0 1 0 0 】

式(I a)の例示的繰り返し単位は以下のものである：

【化 9】



30

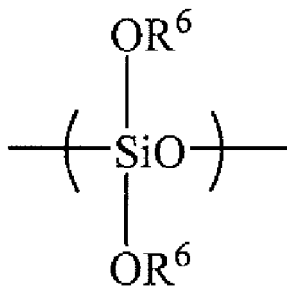
【 0 1 0 1 】

シリカポリマーは、式 I I a および / または I I b の繰り返し単位を含んでいてよい：

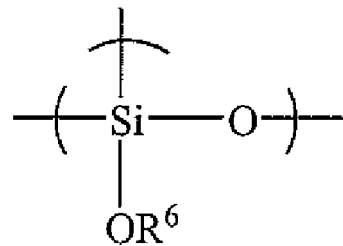
40

50

【化 1 0】



(IIa)



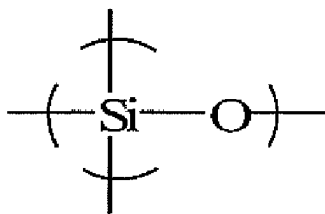
(IIb)

10

【0 1 0 2】

(式中、 R^6 は各出現において、Hまたは C_{1-12} ヒドロカルビル(Hまたは C_{1-12} アルキルであってもよい)から独立して選択される)。シリカポリマーは、式(IIc)の繰り返し単位をさらに含んでもよい:

【化 1 1】



(IIc)

20

【0 1 0 3】

式(II)の繰り返し単位のSi原子は、ポリマー主鎖中のO原子または式 OR^6 の基に結合していることは理解されよう。

【0 1 0 4】

好ましくは、複合粒子の総重量の少なくとも0.1重量%が発光ポリマーからなる。好ましくは、複合粒子の総重量の少なくとも1、10、25、または50重量%が発光ポリマーからなる。

【0 1 0 5】

好ましくは、複合粒子の総重量の少なくとも50重量%がシリカポリマーからなる。好ましくは、複合粒子の総重量の少なくとも60、70、80、90、95、98、99、99.5、99.9重量%がシリカポリマーからなる。

40

【0 1 0 6】

本発明の第1の態様の一実施形態では、複合粒子の総重量の少なくとも70重量%が発光ポリマーおよびシリカポリマーからなる。好ましくは、複合粒子の総重量の少なくとも80、90、95、98、99、99.5、99.9重量%が発光ポリマーおよびシリカからなる。より好ましくは、複合粒子は本質的に発光ポリマーおよびシリカポリマーからなる。

【0 1 0 7】

本発明の第1の態様の一実施形態では、複合粒子はナノ粒子である。好ましくは、ナノ粒子は、Malvern Zetasizer Nano ZSで測定して、5000nm

50

以下、より好ましくは2500nm、1000nm、900nm、800nm、700nm、600nm、500nmまたは400nm以下の数平均直径を有する。好ましくは、ナノ粒子は、Malvern Zetasizer Nano ZSで測定して、5~5000nmの数平均直径、10~1000nmであってもよく、好ましくは25~600nm、より好ましくは50~500nm、最も好ましくは75~400nmの数平均直径を有する粒子を含む。

【0108】

複合粒子は、液体中に懸濁された複合粒子を含むコロイド懸濁液として提供することができる。好ましくは、液体は水、C₁-10アルコールおよびそれらの混合物から選択される。好ましくは、コロイド懸濁液は界面活性剤を含まない。

10

【0109】

複合粒子は蛍光性または燐光性である。好ましくは複合粒子は蛍光性である。好ましくは、複合粒子は蛍光プローブとしての使用のためのものであり、より好ましくはラテラルフローまたは固体イムノアッセイなどのイムノアッセイにおける蛍光プローブとしての使用のためのものである。複合粒子は蛍光顕微鏡法またはフローサイトメトリーで使用するのためのものであってもよい。

【0110】

本発明の第3の態様によれば、本発明の第1の態様の任意の実施形態の複合粒子は、発光ポリマーの存在下でのシリカモノマーの重合によって形成することができる。

【0111】

一実施形態では、この方法は、シリカモノマーと発光ポリマーの溶液を塩基で処理すること、またはシリカモノマーの溶液を発光ポリマーと塩基の溶液に添加することを含み、前記溶液の溶媒は水、1もしくは複数のC₁-10アルコールまたはそれらの組合せである。

20

【0112】

別の実施形態では、この方法は、酸性条件下でモノマーと発光ポリマーとの溶液中でシリカモノマーを重合することを含む。

【0113】

このようにして形成された複合粒子のシリカポリマーと発光ポリマーの混合物は均質であってもなくてもよく、粒子内に封入された発光ポリマーの1または複数の鎖、および/または粒子を通して伸長する1または複数の鎖を含み得るがこれに限定されない。

30

【0114】

発光性ポリマーの極性基は、極性溶媒へのポリマーの溶解性を高め、極性基が存在しない発光性ポリマーが極性溶媒中に配置されている場合と比較して、ポリマーがきついコイル状形成するのを妨げる。

【0115】

複合粒子は、発光ポリマーの存在下でのシリカモノマーの重合のワンステップ方法において、発光ポリマーとシリカモノマーとから形成することができる。

【0116】

シリカモノマーはアルコキシシランであってもよく、好ましくはトリアルコキシまたはテトラアルコキシシランであり、C₁-12トリアルコキシまたはテトラアルコキシシラン、例えばテトラエチルオルトシリケートであってもよい。シリカモノマーは、アルコキシ基のみで置換されていても、または1もしくは複数の基で置換されていてもよい。一実施形態では、シリカモノマーはポリエーテル基で置換されている。別の実施形態では、シリカモノマーは、以下により詳細に記載されるように、シリカモノマーの重合中に反応しないか、またはシリカモノマーの重合中に保護されている反応性結合基で置換されている。

40

【0117】

溶液はイオン性溶媒またはプロトン性溶媒を含むかまたはそれからなっていてよく、好ましくは水、アルコールおよびそれらの混合物から選択される溶媒を含むかまたはそれからなる。例示的なアルコールとしては、限定されないが、メタノール、エタノール、1-

50

プロパノール、イソプロパノール、1 - ブタノール、2 - ブタノール、t - ブタノールおよびそれらの混合物が挙げられる。好ましくは、溶液は、メタノール、エタノール、イソプロパノールまたはそれらの混合物から選択されるアルコール性溶媒を含むかまたはそれからなり、より好ましくは、溶液はメタノール、エタノールまたはそれらの混合物から選択される溶媒を含むかまたはそれからなる。好ましくは、溶媒系は水以外の非アルコール溶媒を含まない。

【0118】

本発明の第3の態様の一実施形態では、塩基は、塩基水溶液、好ましくは金属水酸化物、好ましくはアルカリ金属水酸化物、水酸化アンモニウムまたは水酸化テトラアルキルアンモニウムなどの水酸化物の水溶液、好ましくは水中10～40% w/wの NH_3 、好ましくは水中20～30% w/wの NH_3 である。

10

【0119】

本発明の第3の態様の一実施形態では、発光ポリマー：シリカモノマーの重量比は、1：1から1：500、好ましくは1：3から1：300、または1：5から1：200、最も好ましくは1：10～1：100である。本発明者らは、発光ポリマー：シリカの重量比を選択することによって粒子の直径を調整できることを見出した。

【0120】

本発明の第3の態様の一実施形態では、溶液中の発光ポリマーの濃度は25で少なくとも0.0005 mg/ml、好ましくは少なくとも0.001、0.01、0.1、1または10 mg/mlである。

20

【0121】

複合粒子を形成する方法は、以下の工程を含んでよい：

(a) 1または複数のプロトン性溶媒（水、アルコールおよびそれらの組合せであってもよい）から選択される溶媒系に発光ポリマーを溶解する工程；

(b) 工程(a)で得られた溶液に塩基を添加する工程、ならびに

(c) 工程(b)の溶液にシリカモノマーの溶液を添加する工程。

【0122】

この方法は均質溶液中で行われていてもよい。

【0123】

複合粒子は、形成後に単離され、水性溶媒、有機溶媒またはそれらの混合物中に再懸濁することができる。複合粒子は遠心分離によって反応混合物から単離することができる。

30

【0124】

複合粒子の表面のシリカを反応させて、受容体をシリカの表面に共有結合させることができる。受容体はシリカ表面に直接結合していてもよく、またはシリカ表面から間隔があってもよい。

【0125】

受容体をシリカ表面に結合させる鎖は、水または1もしくは複数の溶質を溶解させることができるアルコールなどのプロトン性液体中で複合粒子を含むコロイドの安定性を高めるコロイド安定化基を含むか、またはそれからなる。液体は緩衝液であり得る。

【0126】

40

- 一実施形態では、受容体は、以下の工程を含む方法で複合ナノ粒子に共有結合する：シリカの表面に第1の反応基RG1を形成する工程；

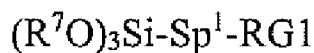
- 前記反応基を、第1の反応基と反応して共有結合を形成することができる第2の反応基RG2と第3の反応基RG3とを含む化合物と反応させる工程；ならびに

- 第3の反応基RG3を受容体と反応させて、受容体を複合ナノ粒子に共有結合させる工程。

【0127】

複合粒子の表面のシリカは、反応性結合基BG1で置換されたオルガノシラン（式(X)のオルガノシランであってもよい）と反応させることができる：

50



(X)

(式中、 R^7 は H または置換基、好ましくは C_{1-10} アルキル基であり、

Sp^1 はスペーサー基であり、および

$RG1$ は第 1 の反応基である)。

10

【0128】

$RG1$ は、以下からなる群から選択されていてもよい：

アミン、好ましくは $-N(R^8)_2$ (式中、 R^8 は各出現において H または置換基、好ましくは H または C_{1-5} アルキル、より好ましくは H；

カルボン酸またはそのエステル (N-ヒドロキシスクシンイミドエステルであってもよい)；

アルケン；アルキン；または SH；アジドである)。

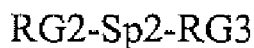
【0129】

例示的なオルガノシランは、3-アミノプロピルトリエトキシシランである。

【0130】

20

反応性結合基 $BG1$ を式 (XI) の化合物と反応させる：



(XI)

(式中、 $RG2$ は $RG1$ と反応して共有結合を形成することができる基であり、 $Sp2$ はスペーサー基であり、 $RG3$ は受容体に結合することができる反応性結合基である)。

30

【0131】

$RG1$ はアミンであり、 $RG2$ はアミンと反応することができる基 (アミンと反応してアミド (カルボン酸または酸塩化物であってもよい) を形成することができる基であってもよい) であってもよい。

【0132】

$Sp1$ および $Sp2$ はそれぞれ、それらのコロイド安定化特性に従って選択され得る。

【0133】

本発明者らは、シリカ粒子の表面のポリエーテル鎖スペーサー基が、特に 10 mM を超える塩濃度を有する水性緩衝液などの緩衝水溶液中で、粒子を構成するコロイドを安定化し得ることを見出した。

40

【0134】

本明細書で使用される「ポリエーテル鎖」とは、少なくとも 2 つのエーテル基を含む二価鎖を意味する。

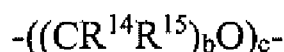
【0135】

$Sp1$ および $Sp2$ は、それぞれ独立して、1 または複数の非隣接 C 原子が O、S、C (=O)、C (=O)O、C (=O)NR¹² または NR¹² (式中、 R^{12} は、各出現において独立して H および C_{1-12} ヒドロカルビル (C_{1-12} アルキルであってもよい) から選択される) で置き換えられていてもよい直鎖または分枝の二価アルキレン鎖から選択されていてもよい。

【0136】

50

好ましくは、 $S p^1$ および $S p^2$ の少なくとも一方は、式 (X I) の繰り返し単位を含むか、またはそれからなる：



(XI)

(式中、 R^{14} および R^{15} はそれぞれ独立して H または C_{1-6} アルキルであり、 b は少なくとも 1 であり、1 ~ 5 であってもよく、好ましくは 2 であり、 c は少なくとも 2 であり、2 ~ 1,000 であってもよく、好ましくは 10 ~ 500、10 ~ 200 または 10 ~ 100 である)。式 (X I) の基は多分散性であり得る。式 (X I) の基は、少なくとも 500 の M_n を有し、少なくとも 2,000 の M_n を有していてもよい。

【0137】

好ましくは、 $S p^1$ および $S p^2$ の少なくとも一方はポリエチレングリコール鎖を含むか、またはそれからなる。

【0138】

基 $S p^1$ および $S p^2$ の一方は、1 ~ 10 原子の鎖長を有していてもよく、 C_{1-10} アルキレン鎖を有していてもよく、 $S p^1$ および $S p^2$ の他方は式 (X I) の繰り返し単位を含む。

【0139】

結合基 B G 3 は、限定するものではないが、生物材料 (ペプチド、炭水化物、抗体、抗原、酵素、タンパク質、細胞受容体、DNA、RNA、PNA、アプタマーおよび天然生成物であってもよい)；生物由来材料 (組換え抗体、人工タンパク質であってもよい)；ならびに生物模倣物 (合成受容体、バイオミメティック触媒、コンビナトリアルリガンドおよびインプリントポリマーであってもよい) を含む合成基または受容体であり得る受容体と反応することができる。好ましいバイオレセプターはストレプトアビジンである。

【0140】

限定するものではないが、コロイド安定化基および / または非保護もしくは保護された反応基 R G 1 で置換されたシリカモノマーを重合すること；および複合粒子を式 (R^7O)₃Si - $S p^1$ - R G 3 (式中、 $S p^1$ はコロイド安定化基を含む) の化合物と反応させることを含む他の方法を使用して、受容体および / またはコロイド安定化基をシリカ粒子上面に共有結合させ得ることは理解されよう。

【0141】

使用時に、その表面に受容体基を有する粒子は、試料中の標的生体分子に結合することができる。生体分子としては、限定するものではないが、DNA、RNA、ペプチド、炭水化物、抗体、抗原、酵素、タンパク質およびホルモンが挙げられる。好ましい生体分子はビオチンである。

【0142】

試料を、本明細書に記載の複合ナノ粒子と接触させた、好ましくは本明細書に記載の複合ナノ粒子を含むコロイド懸濁液で処理した表面に固定化することができる。

【0143】

本明細書に記載の発光ポリマーまたはシリカポリマーのゲル浸透クロマトグラフィーによって測定されるポリスチレン換算の数平均分子量 (M_n) は、約 $1 \times 10^3 \sim 1 \times 10^8$ 、好ましくは $1 \times 10^4 \sim 5 \times 10^6$ の範囲であり得る。本明細書に記載のポリマーのポリスチレン換算重量平均分子量 (M_w) は、 $1 \times 10^3 \sim 1 \times 10^8$ 、好ましくは $1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^7$ であり得る。

【0144】

本明細書に記載のポリマーは、適切には非晶質ポリマーである。

【 0 1 4 5 】

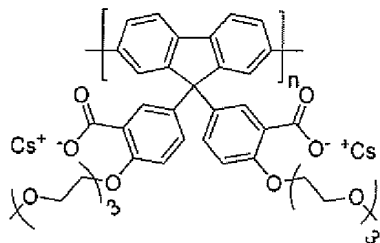
本明細書に記載の複合粒子は、限定するものではないが、生物学的イメージング蛍光顕微鏡法、フローサイトメトリーおよび蛍光に基づく免疫アッセイにおいて使用することができる。

【 0 1 4 6 】

[実施例 1]

S t o b e r 法による青色発光シリカ - L E P 複合ナノ粒子の形成方法：

【 化 1 2 】



LEP1の構造

10

【 0 1 4 7 】

その内容が参照により本明細書に組み込まれる国際公開第 2 0 1 2 / 1 3 3 2 2 9 号に開示されている L E P 1 を、6 0 で 1 時間加熱することによりメタノール (1 m g / m L または 1 0 m g / m L のいずれか) に溶解し、次いで溶液を室温に冷却した。この溶液 2 m L に 0 . 1 5 m L の水酸化アンモニウム (3 0 % 水溶液) を加え、続いて室温で撹拌しながらテトラエチルオルトシリケート (T E O S 、 0 . 2 m L) およびメタノール (0 . 5 m L) からなる溶液を素早く加えた。室温で 1 時間撹拌を続け、その後、溶液を 1 4 , 0 0 0 r p m で 1 0 分間遠心分離して、得られたシリカ - L E P ナノ粒子を過剰の未反応 T E O S および水酸化アンモニウムを含有する上清から単離した。上清をデカンテーションにより除去し、穏やかな超音波処理を用いて、単離したナノ粒子のペレットを 2 . 5 m L の新鮮なメタノール中に再分散させた。遠心分離、デカンテーションおよびメタノール (2 . 5 m L) 中への再分散からなる洗浄サイクルをさらに 2 回繰り返し、続いて 2 . 5 m L の脱イオン水を用いて 3 回同様に洗浄した。最後に、M a l v e r n Z e t a s i z e r N a n o Z S を用いた動的光散乱による粒子サイズの測定のために、ナノ粒子を 1 . 5 m L の脱イオン水中に再分散させた。

20

30

【 0 1 4 8 】

調製したままのナノ粒子懸濁液の固形分 (ナノ粒子の質量 / 体積) は、1 0 分間 1 4 , 0 0 0 r p m で遠心分離することによって 1 m L の分散液から固体ナノ粒子を単離することによって決定した。遠心分離、デカンテーションおよび再分散 (上記のとおり) によりメタノールで 2 回洗浄し、固体ペレットを一晩乾燥させた後、固体の質量を微量天秤を用いて測定した。

40

【 0 1 4 9 】

調製したままのナノ粒子分散液の光学密度を、C a r y 5 0 0 0 U V - v i s - I R 分光計を使用して決定した。

【 0 1 5 0 】

積分球アクセサリを備えた H a m a m a t s u C 9 9 2 0 - 0 2 P L 量子収率分光計を使用して、水性分散液中のナノ粒子のフォトルミネッセンス量子収率を決定した。

50

【表 1】

表 1:様々な比率の LEP1 および TEOS を用いて調製されたシリカ-LEP ナノ粒子の PLQY

LEP/TEOS 比	数平均直径(nm)	調製した分散液の固形分 (mg/mL)	PLQY(%)
1:100	75	3.7	29
1:10	409	13.5	36

10

【0151】

これらの複合粒子の粒度分布、吸収スペクトルおよびフォトルミネッセンススペクトルを図 1 ~ 3 に示す。

【0152】

それらの非常に高い蛍光輝度、水性緩衝液中での安定性および生体分子への表面付着の容易さのために、調製されたシリカ - LEP ナノ粒子は、蛍光トレーサーまたは光学的検出アッセイ用のタグとしての使用に特に適している。

【0153】

複合ナノ粒子のアミノ修飾

メタノール中複合ナノ粒子の 3 mL 懸濁液（動的光散乱による数平均直径 = 165 nm、固形分約 4 mg/mL）に 120 μ L の（3 - アミノプロピル）トリエトキシシランを添加し、この懸濁液を室温で 1 時間撹拌した。懸濁液を 14,000 rpm で 2 分間遠心分離して、得られたシリカ - LEP ナノ粒子を、過剰の未反応（3 - アミノプロピル）トリエトキシシランを含有する上清から単離した。上清をデカンテーションにより除去し、穏やかな超音波処理を用いて、単離したナノ粒子のペレットを 3 mL の新鮮なメタノール中に再分散させた。遠心分離、デカンテーションおよびメタノール（3 mL）中への再分散からなる洗浄サイクルをさらに 2 回繰り返し、最後に 3 mL メタノール中に再分散させた。動的光散乱分析用の試料を調製するために、懸濁液 100 μ L を遠心分離し、上清を上記のようにデカントし、単離したナノ粒子をメタノールまたは水のいずれか 1 mL に再懸濁した。

20

30

【0154】

アミノ修飾複合ナノ粒子の PEG 化

上記の例で形成されたメタノール中アミノ修飾複合ナノ粒子懸濁液 1 mL を 2 分間 14,000 rpm で遠心分離して、上清のデカンテーションによってナノ粒子を単離した。 α 、 ω - ビス{2 - [(3 - カルボキシ - 1 - オキソプロピル) アミノ] エチル} ポリエチレングリコール (Mr = 2000 g/mol、10 mg)、N - (3 - アミノプロピル) - N - エチルカルボジイミド (2.1 mg) および N - ヒドロキシスクシンイミド (2.5 mg) のメタノール中溶液 1 mL を使用して、穏やかな超音波処理によってナノ粒子ペレットを再分散させ、得られた懸濁液を室温で 1 時間撹拌した。懸濁液を 14,000 rpm で 2 分間遠心分離して、得られたシリカ - LEP ナノ粒子を、過剰の未反応 PEG 化試薬を含有する上清から単離した。上清をデカンテーションにより除去し、穏やかな超音波処理を用いて、単離したナノ粒子のペレットを 1 mL の新鮮なメタノール中に再分散させた。遠心分離、デカンテーションおよびメタノール（1 mL）中への再分散からなる洗浄サイクルをさらに 2 回繰り返した。最後の遠心分離およびデカンテーションの前に、懸濁液を 4 つの 250 μ L 部分に等分し、得られたペレットを使用前に -20 °C で貯蔵した。

40

【0155】

ストレプトアビジンの PEG 化複合ナノ粒子への共役

50

上記の例における単離されたPEG化複合ナノ粒子ペレットのうちの1つを、穏やかな超音波処理によって1 mLのリン酸緩衝生理食塩水(pH 7.4)に再懸濁し、続いて同じ緩衝液中ストレプトアビジン溶液(1 mg/mL)の50 µLを直ちに添加した。懸濁液を室温で1時間攪拌した後、(150 mLのリン酸緩衝食塩水で予備洗浄した)Sephaacryl S-300 HR分離媒体を充填した、高さ4.5 cm、直径3 cmのカラムの頂部に添加した。カラムを同じ緩衝液で溶出し、1.5 mLの画分を集めた。(蛍光強度に基づいて)最高濃度のナノ粒子を含有するカラム画分を、その後のバイオアッセイにおける使用のために選択した。

【0156】

様々な分散剤中の複合ナノ粒子のコロイド安定性の評価

10

以下の試験を用いて、様々な分散剤中の裸および官能化された複合ナノ粒子(同じバッチから製造された)の相対的安定性を決定した。遠心分離およびデカンテーションの後、単離した複合ナノ粒子(約0.4 mg)をバスソニケーター中で5分間の超音波処理によって分散剤(1 mL)中に再分散させた。DLS分析の直前に、ナノ粒子懸濁液をさらに1分間超音波処理し、次いでMalvern Zetasizer Nano ZSを使用して分析した。表2は、DLSによって決定された、様々な分散剤中の裸および表面修飾複合ナノ粒子の多分散性指数(PdI)を示し、図4~6は対応する数平均粒度分布を示す。

【表2】

20

表 2

複合粒子表面改質	メタノール中のPdI	水中のPdI	リン酸緩衝生理食塩水(pH7.4)中のPdI
なし(「裸」の粒子)	0.083	0.155	0.409
アミノ	0.060	0.474	-
PEG-COOH (Mr2000)	-	-	0.131

バイオアッセイのためのビオチン-BSA修飾スライドガラスの調製

30

【0157】

(3-アミノプロピル)シランの自己組織化単層で官能化されたガラス顕微鏡スライドを、アセトニトリル(50 mL)中に無水コハク酸(1 g)およびトリメチルアミン(1.3 mL)を含有する溶液に16時間浸漬した後、新鮮なアセトニトリル(50 mL)で3回洗浄した。乾燥後、その後の結合アッセイに使用するために、Grace-Biolabs Secure Sealingイメージングスパーサーを、得られたカルボキシ官能化ガラススライドの表面に固定して、4つの円形領域(直径=9 mm)を単離した。スライドのそれぞれの単離された領域内に、N-(3-アミノプロピル)-N-エチルカルボジイミド(77.0 mg)およびN-ヒドロキシルスルホスクシンイミド(33.0 mg)を含有する1 mL溶液のうちの80 µLを添加した。室温で30分間放置した後、溶液を除去し、単離した領域を水(80 µL)で3回洗浄した。最後の洗浄液を除去した後、これらの領域のうちの2つに、80 µLのリン酸緩衝食塩水(pH 7.4)中ビオチン化ウシ血清アルブミン(50 µg/mL)溶液を添加し、残りの2つの領域に、0.01重量%のTween-20を含有するリン酸緩衝食塩水(pH 7.4)中にウシ血清アルブミン(3重量%)を含有するブロッキング緩衝液80 µLを添加した。室温で1時間後、ビオチン化ウシ血清アルブミン溶液を含有する2つの領域から溶液を除去し、それらの場所に上記のブロッキング緩衝液80 µLを添加した。室温でさらに1時間後、溶液を4つの領域すべてから除去し、それぞれを、0.01重量%のTween-20を含有するリン酸緩衝食塩水(pH 7.4)で3回洗浄した。

40

【0158】

50

ストレプトアビジン修飾複合ナノ粒子を用いたビオチン結合アッセイ

上記の実施例で作製したウシ血清アルブミン修飾領域（２つはビオチン化および２つは非ビオチン化）のそれぞれに、先の実施例に記載のストレプトアビジン修飾複合ナノ粒子を含有する 60 μ L のカラム画分を加えた。室温で 1 時間放置した後、溶液を除去し、0.01 重量%の Tween-20 を含有するリン酸緩衝食塩水（pH 7.4）80 μ L で 3 回洗浄し、80 μ L の脱イオン水で 1 回洗浄した。空气中で乾燥させた後、４つのアッセイ領域のそれぞれの蛍光強度を、顕微鏡ベースの分光計を使用し、励起源として水銀灯（ $\lambda_{ex} = 365\text{ nm}$ ）および検出のための光ファイバー分光計を使用して測定した。図 X に示されるように、ビオチンを含有する 2 つのアッセイの平均積分蛍光強度は、非ビオチン化対照領域のそれよりも高く、Si-LEP ナノ粒子が特異的ストレプトアビジン-ビオチン相互作用を通じて表面に固定化されたことを実証している。

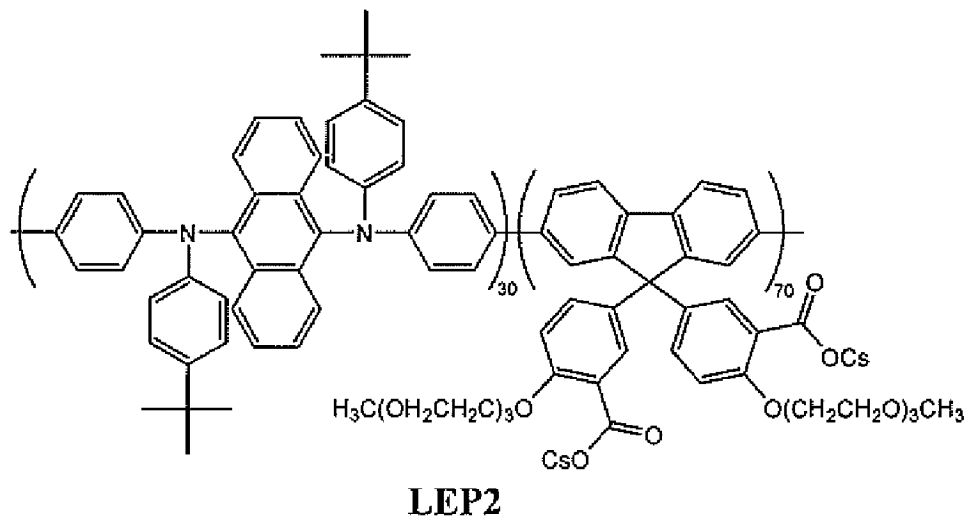
10

【0159】

[実施例 2]

緑色発光シリカ-LEP 複合粒子を、共役ポリマーとして LEP2 を使用して、実施例 1 と同じ Stober の手順に従って得た。

【化 13】



20

30

【0160】

これらのナノ粒子の UV 吸収スペクトルおよびフォトルミネッセンススペクトルを、それぞれ図 7 および図 8 に示す。

【0161】

シリカ-LEP2 複合ナノ粒子のフォトルミネッセンス量子収率（PLQY）は 46% であることが分かった。

【0162】

粒子は以下の寸法を有する：

Z 平均 - 195.5 nm

数平均 - 137.0 nm

強度平均 - 225.5 nm

粒子は 0.131 の PDI を有する。

40

【0163】

複合ナノ粒子のサイズは、図 9 ~ 12 にそれぞれ示されるように、共役ポリマーの濃度、シリケート体積、塩基体積および / または全体希釈を変えることによって制御することができ、Z 平均直径は動的光散乱によって測定される。

【0164】

本発明を特定の例示的な実施形態に関して説明してきたが、以下の特許請求の範囲に記載の本発明の範囲から逸脱することなく、本明細書に開示された特徴の様々な修正、変更

50

および/または組合せが当業者に明らかであることは理解されよう。

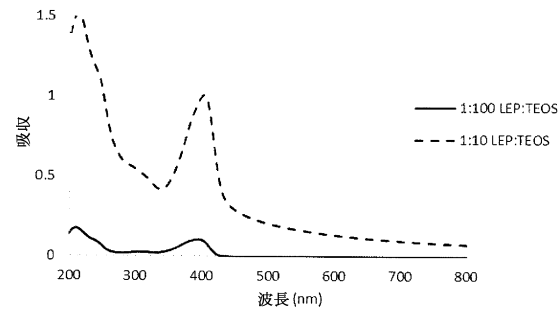
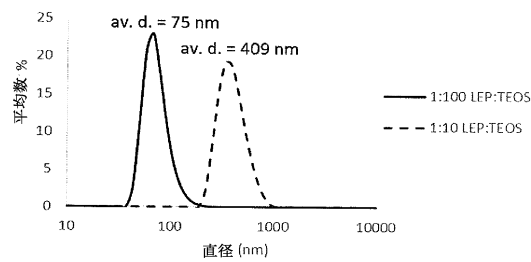
【図面】

【図 1】

【図 2】

FIGURE 1

FIGURE 2



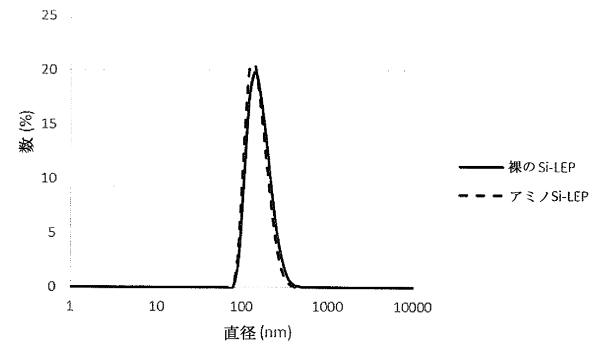
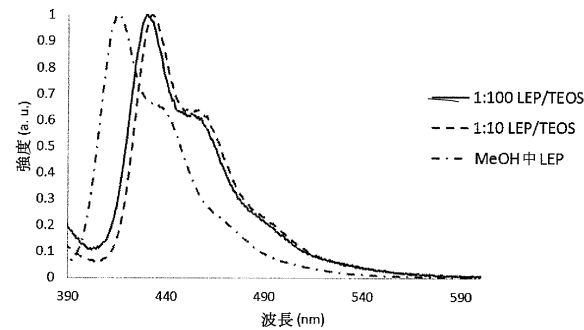
10

【図 3】

【図 4】

FIGURE 3

FIGURE 4



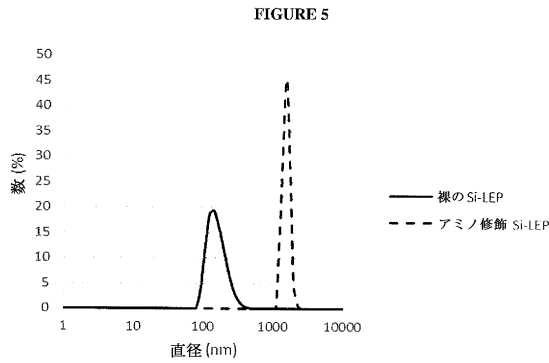
20

30

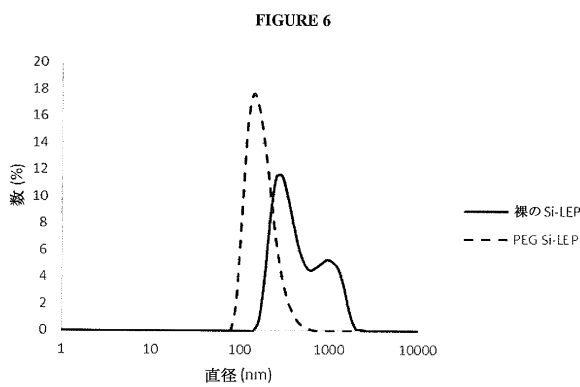
40

50

【図 5】

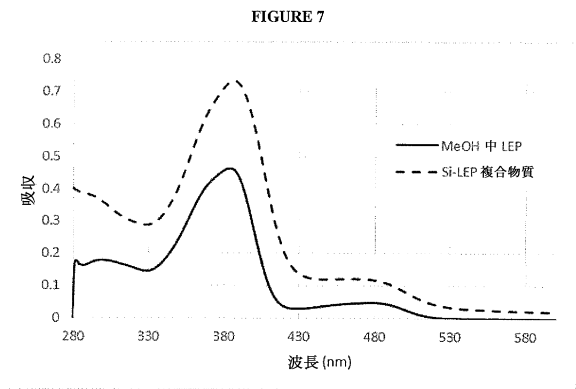


【図 6】

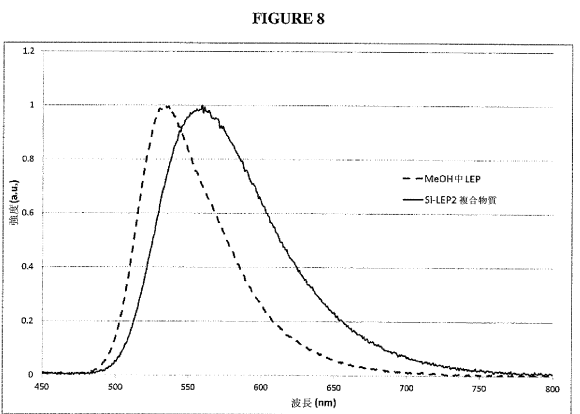


10

【図 7】



【図 8】



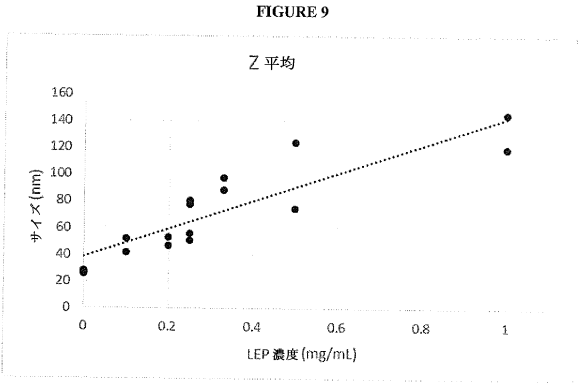
20

30

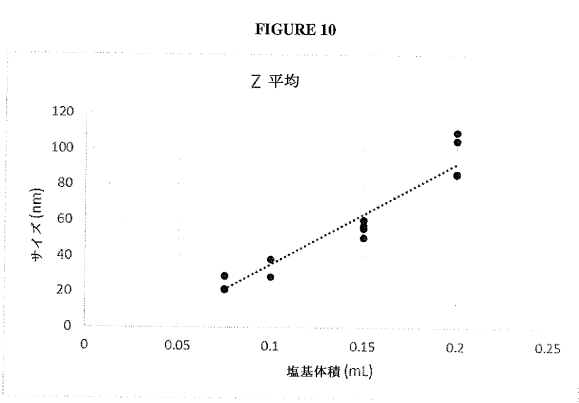
40

50

【図 9】

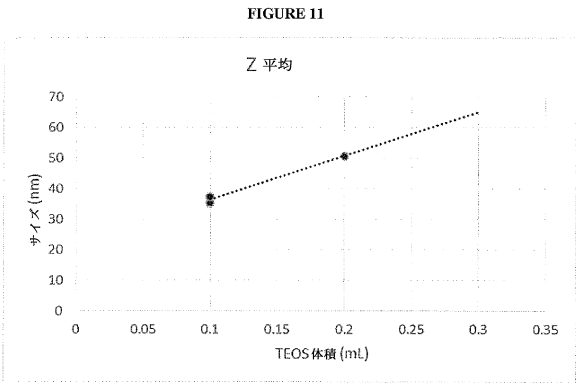


【図 10】

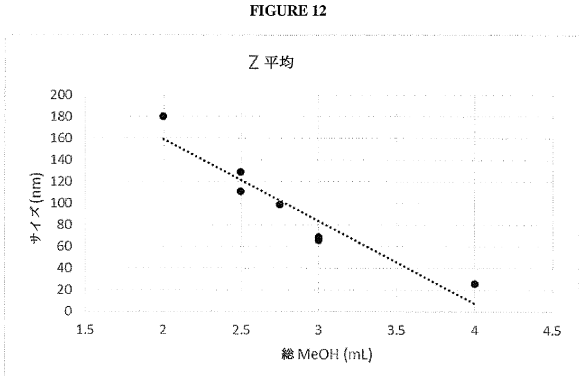


10

【図 11】



【図 12】



20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類	F I			
C 0 9 K	11/06	(2006.01)	C 0 9 K	11/06
G 0 1 N	21/64	(2006.01)	C 0 9 K	11/06
			G 0 1 N	21/64
				6 8 0
				F

	英国(GB)
(74)代理人	100183519
	弁理士 櫻田 芳恵
(74)代理人	100196483
	弁理士 川崎 洋祐
(74)代理人	100160749
	弁理士 飯野 陽一
(74)代理人	100160255
	弁理士 市川 祐輔
(74)代理人	100182132
	弁理士 河野 隆
(74)代理人	100146318
	弁理士 岩瀬 吉和
(74)代理人	100127812
	弁理士 城山 康文
(72)発明者	ベアレント, ジョナサン
	イギリス国、ピーイー 2 9 ・ 2 エックスジー・ケンブリッジシャー・ゴッドマンチェスター、カー ディナル・ウェイ、カーディナル・パーク・ユニット・ 1 2、ケンブリッジ ディスプレイ テクノ ロジー リミテッド気付
(72)発明者	ブルセット, フローレンス
	イギリス国、ピーイー 2 9 ・ 2 エックスジー・ケンブリッジシャー・ゴッドマンチェスター、カー ディナル・ウェイ、カーディナル・パーク・ユニット・ 1 2、ケンブリッジ ディスプレイ テクノ ロジー リミテッド気付
合議体	
審判長	藤原 浩子
審判官	松本 直子
審判官	小出 直也
(56)参考文献	韓国公開特許第 1 0 - 2 0 1 2 - 0 0 7 2 6 7 1 (K R , A)
	特表 2 0 1 2 - 5 2 4 0 1 4 (J P , A)
	特表 2 0 0 8 - 5 1 6 0 4 0 (J P , A)
	国際公開第 2 0 1 2 / 1 3 3 2 2 9 (W O , A 1)
(58)調査した分野	(Int.Cl. , D B 名)
	C08L 1/00-101/14
	C08K 3/00- 13/08
	C08G 77/00- 77/62