

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2008-526995

(P2008-526995A)

(43) 公表日 平成20年7月24日(2008.7.24)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>A 6 1 K 9/51 (2006.01)</b>	A 6 1 K 9/51	2 G 0 5 4
<b>B 8 2 B 1/00 (2006.01)</b>	B 8 2 B 1/00	4 C 0 7 6
<b>G 0 1 N 21/78 (2006.01)</b>	G 0 1 N 21/78	4 J 0 0 2
<b>A 6 1 K 47/02 (2006.01)</b>	A 6 1 K 47/02	4 J 0 3 7
<b>A 6 1 K 47/32 (2006.01)</b>	A 6 1 K 47/32	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 26 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2007-551426 (P2007-551426)	(71) 出願人	507177331
(86) (22) 出願日	平成18年1月13日 (2006. 1. 13)		ケアストリーム ヘルス、インコーポレイ
(85) 翻訳文提出日	平成19年9月12日 (2007. 9. 12)		ティド
(86) 国際出願番号	PCT/US2006/001332		アメリカ合衆国、ニューヨーク 1 4 6 0
(87) 国際公開番号	W02006/076636		8, ロチェスター、ペロナ ストリート
(87) 国際公開日	平成18年7月20日 (2006. 7. 20)		1 5 0
(31) 優先権主張番号	11/036, 814	(74) 代理人	100099759
(32) 優先日	平成17年1月14日 (2005. 1. 14)		弁理士 青木 篤
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100077517
(31) 優先権主張番号	11/165, 849		弁理士 石田 敬
(32) 優先日	平成17年6月24日 (2005. 6. 24)	(74) 代理人	100087413
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 古賀 哲次
		(74) 代理人	100102990
			弁理士 小林 良博
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 アミン・ポリマーで改質されたナノ粒子状キャリア

## (57) 【要約】

ポリマーで改質されたコア・シェル型粒子キャリアを含有するコロイドを開示する。コア・シェル型ナノ粒子状キャリア粒子を含有するコロイドであって、シェルがアミン官能基を有するポリマーを含有するものを記載する。記載されるキャリア粒子は、生理学的条件下で安定である。キャリアは生物学的成分、薬学的成分、又は診断用成分と結合することができる。

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

生理学的pH及びイオン強度のもとで安定なコロイドを含む組成物。

前記コロイドは、コア及びシェルを有する粒子を含み、

- a) 前記シェルは、アミン官能基を有するポリマーを含み、
- b) 該粒子の体積加重平均粒子サイズ直径は、200 nm未満であり、そして
- c) 該コロイド中の前記ポリマーの50%超は、該コアの表面に結合されている。

**【請求項 2】**

該コアが、カプセル封入された色素又は顔料を有する粒子を含む請求項1に記載の組成物。

10

**【請求項 3】**

前記コア粒子の体積加重平均粒子サイズ直径が、100 nm未満である請求項1に記載の組成物。

**【請求項 4】**

前記体積加重平均粒子サイズ直径の標準偏差が、該平均粒子サイズ直径よりも小さい請求項3に記載の組成物。

**【請求項 5】**

アミン官能基を有する前記ポリマーが架橋されている請求項1に記載の組成物。

**【請求項 6】**

前記コアが、シリカである請求項1に記載の組成物。

20

**【請求項 7】**

アミン官能基を有する前記ポリマーが、ポリエチレンジアミン、ポリアリルアミン、ポリリシン、アミノデキストラン、又はキトサンである請求項1に記載の組成物。

**【請求項 8】**

前記コアが、負電荷を有する請求項1に記載の組成物。

**【請求項 9】**

該コロイド中の前記ポリマーの70%超が、該コアの表面に結合されている請求項1に記載の組成物。

**【請求項 10】**

前記粒子の表面上に保護鎖がある請求項1に記載の組成物。

30

**【請求項 11】**

前記粒子が、生物学的成分、薬学的成分、又は診断用成分をさらに含む請求項1に記載の組成物。

**【請求項 12】**

前記コロイドの固形分含有率が、1～30重量%である請求項1に記載の組成物。

**【請求項 13】**

該コロイドが、コア粒子表面積1 m<sup>2</sup>当たり10 μモルよりも多いアミン・モノマーを含有する請求項1に記載の組成物。

**【請求項 14】**

該コロイドが、コア粒子1 g当たり300～6000 μモルのアミン・モノマーを含有する請求項1に記載の組成物。

40

**【請求項 15】**

該体積加重平均粒子サイズ直径が、50 nm未満である請求項1に記載の組成物。

**【請求項 16】**

アミン官能基を有する該ポリマーの平均分子量が、100,000 g/モル未満である請求項1に記載の組成物。

**【請求項 17】**

該コア粒子が、SiO<sub>2</sub>、TiO<sub>2</sub>、Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>、AlOOH、ZrO<sub>2</sub>、Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>、及びラテックスポリマー粒子のコロイドから選択される請求項1に記載の組成物。

**【請求項 18】**

50

該色素が、蛍光材料である請求項2に記載の組成物。

【請求項 19】

該色素が、近赤外蛍光材料である請求項2に記載の組成物。

【請求項 20】

該色素が、cy7、cy5、cy5.5、インドシアニン・グリーン、ラホーヤ・ブルー、IRD41、IRD700、NIR-1、及びアレクサフルオル色素から選択された近赤外蛍光材料である請求項2に記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

10

本発明は、ポリマーで改質されたコア・シェル型粒子キャリアを含有するコロイドに関する。より具体的には、コア・シェル型ナノ粒子状キャリア粒子を含有するコロイドであって、シェルがアミン官能基を有するポリマーを含有するものが記載されている。記載されるキャリア粒子は、生理学的条件下で安定である。

【背景技術】

【0002】

ナノスケール成分及び分子成分の秩序正しい集成体(assembly)は、生物学的機能を模倣することができ、また、生きている細胞及び細胞成分と相互作用することができる分子集成体を形成するのに有望である。ナノスケール集成体を形成する多くの技法が開発されており、これらの技法には、小分子集成技法、高分子電解質集成技法、ナノスケール析出技法、コア・シェル集成技法、異種析出技法、及び多くのその他の技法が含まれる。しかし、ナノ粒子又は分子を集成又は成形して、自立式の安定な作業「デバイス」に加工することができる材料にする方法を生み出す上で、重大な難題が横たわっている。ナノスケール集成体はしばしば不安定になり、また作業系内への一体化に抵抗する。単純な例としては、生体内へのナノスケール集成体の一体化に伴って生じる。一体化を成功させるためには、高特異的な条件下(生理学的pH及びイオン強度)でコロイド安定であり、血液成分と適合可能であり、免疫系による検出を回避することができ、そして生体に固有の多重濾過系及び老廃物除去系を切り抜けて生き延びることができる集成体が必要である。厳しい条件下で性能を発揮することができる秩序正しいナノスケール集成体を形成するためには、高精度の集成方法が必要である。

20

30

【0003】

最近では、生物学的成分、薬学的成分、又は診断用成分を担持することができる表面改質型ナノ粒子状材料を開発するのに、強い関心が集められている。この場合、薬物、治療薬、診断薬、及びターゲット部分を含むことができる成分を、疾患組織又は骨に直接に送達し、また、患部に近接して放出することができ、患者に対する副作用のリスクを軽減することができる。このアプローチは、癌及び生命を脅かすその他の病気の治療を有意に改善するのに有望であり、これらの疾患の臨床診断及び治療を大改革することができる。ナノ粒子によって担持し得る成分は、よく知られた生体結合技法によってナノ粒子に取り付けることができる。これらの技法は、「Bioconjugate Techniques(生体結合技法)」、G. T. Hermanson, Academic Press, San Diego, Ca. (1996)に詳細に論じられている。最も一般的な生体結合技法は、アミン官能基に対する結合又は連結を伴う。

40

【0004】

Siiman他の米国特許第5,248,772号明細書には、ペンダント・アミン基が結合された架橋型アミノデキストラン塗膜を有するコロイド金属粒子の調製が記載されている。コロイドは、極めて低い固形分濃度0.24重量%で調製され、最終粒子サイズは示されておらず、またコロイド表面に直接に結合されるアミノデキストランの比率も示されていない。例2におけるシェル材料の重量(0.463 g)とコア材料の重量(0.021 g)との比はほぼ21:1なので、おそらく、極めて小さな比率のアミノデキストランしかコロイド表面に結合されておらず、ほとんど溶液中に遊離したままであると思われる。これにより粒子表面上の活性アミン基は極めて少量となり、また、コロイド中の上記キャリア粒子のための生物学的成分、

50

薬学的成分、又は診断用成分の有用なキャパシティが極めて低いものになるという点で問題が存在する。粒子表面に吸着されないポリマーが、生物学的成分、薬学的成分、又は診断用成分のこれに続いて行われる結合又は結合を妨害するおそれがあるという点でも更なる問題が存在する。

#### 【0005】

米国特許第6,207,134号明細書には、磁気又は超磁気金属酸化物及びポリイオン性塗布剤を含む粒子状診断用造影剤が記載されている。塗布剤は、アミン含有ポリマーを含む「生理学的に許容可能なポリマー」を含むことができる。造影剤は、「コンベンショナルな粒子と比較して改善された安定性及び毒性」を有すると述べられている(第6欄、第11～13行)。著者は、塗布剤全てが付着されるのではなく、1.5～7倍、一般には約2倍過剰の塗布剤を使用することが必要な場合があると述べている(第6欄、第15～16行)。著者はさらに、僅かな比率のポリマーだけしか粒子に吸着しないことを示している。例えばこの'134号明細書の図1から明らかなように、0.5 mg/mLのポリマーが添加されると、約0.15 mg/mL又は30%しか吸着しない。'134号明細書の表面改質粒子は、単純な混合、超音波処理、遠心分離、及び濾過を伴うコンベンショナルな方法によって形成される。

10

#### 【0006】

「リポーター」分子、材料、又は部分の結合によって、ナノスケール集成体に診断特性を付与することができる。リポーターエンティティは、信号を供給すること、又は刺激に対して応答することにより機能する。このようなエンティティの例は、蛍光分子、又は特定の波長の電磁線で刺激されると第2の波長の電磁線を発することにより応答する材料を含む。他の例は、磁気材料、放射能材料、及び光吸収材料を含む。「リポーター」エンティティを担持し、そして生物学的又は化学的な官能分子を担持することができるナノスケール集成体を設計することが重要である。

20

#### 【0007】

米国特許出願公開第2004/0101822号明細書(Wiesner他)には、蛍光シラン化合物を含むコアと、コア上のシリカ・シェルとを含むナノ粒子組成物が記載されている。また、ライゲートされたナノ粒子蛍光組成物の製造方法も提供されている。

#### 【0008】

米国特許第6,548,264号明細書(Tan他)には、シリカを塗布されたナノ粒子が開示されている。ナノ粒子のコアは磁気材料、蛍光化合物、顔料、又は色素を含むことができる。種々の用途で使用するためのシリカ塗布型ナノ粒子の官能化法も開示されている。官能基は生体材料、例えばタンパク質、抗体、又は核酸であってよい。

30

#### 【0009】

生体内、特に血管内に注入することができるように、安定なコロイドである、生体結合及びターゲット送達のためのナノ粒子キャリアを製造することが望ましい。さらに、ナノ粒子キャリアが生物学的条件下(pH 7.4及び137 mM NaCl)で安定であることが望ましい。さらに、粒子が免疫系による検出を回避することが望ましい。ナノ粒子に吸着されないアミン基の数を最小化し、そして溶液中の「遊離」アミン官能基を制限することが望ましい。それというのも、遊離アミンはナノ粒子集成体の機能を妨害するおそれがあるからである。

40

#### 【発明の開示】

#### 【発明が解決しようとする課題】

#### 【0010】

有効期間にわたって安定であり、生物学的条件下において安定であり、そして生物学的成分、薬学的成分、又は診断用成分の生体結合を生じさせるようにpH調節することができるコア・シェル型キャリア粒子、好ましくは近赤外コア・シェル型キャリア粒子を含むコロイドが依然として必要である。生理学的条件下におけるコロイド安定性を維持しつつ、溶液中の「遊離」アミン官能基の数を制限又は最小化し、そして好ましくはアミン官能基を有するポリマーから成るただ1層の又は数層の分子層をシェル内に使用するコア・シェル型キャリア粒子を含むコロイドが依然として必要である。高濃度(5～50 %固形分)を有

50

する安定なコロイドを提供するコア・シェル型キャリア粒子を含むコロイドの製造方法が依然として必要である。高い生産速度及び低いコストで形成することができるとコロイドがさらに必要である。コロイド中の実質的に全てのキャリア粒子がアミン含有ポリマー・シェルで表面改質されており、そしてコロイドには無改質コロイド粒子が実質的になく、またコロイドに結合されていないアミン官能基も実質的にないようなコア・シェル型キャリア粒子を含む秩序正しい均質コロイドを得るための改善された方法がさらに必要である。シェル内のアミン官能基の脱離なしに、約pH 5～pH 9でpHを自由に調節することができるコロイドも望ましい。

【課題を解決するための手段】

【0011】

本発明は、生理学的pH及びイオン強度のもとで安定なコロイドを含む組成物であって、前記コロイドがコア及びシェルを有する粒子を含み：

- a) 前記シェルが、アミン官能基を有するポリマーを含み、
- b) 該粒子の体積加重平均粒子サイズ直径が、200 nm未満であり、そして
- c) 該コロイド中の前記ポリマーの50%超が、該コアの表面に結合されている、組成物を提供する。

【発明を実施するための最良の形態】

【0012】

好ましい態様の場合、粒子のコアは、カプセル封入された色素又は顔料、例えば近赤外色素又は顔料を有する粒子を含む。好ましくは、粒子は金属酸化物粒子である。

【0013】

上記組成物は安定なコロイドである(懸濁液又は分散体と呼ばれることもある)。コロイドは、液体、例えば水中の小さな固形粒子状物質の混合物から成る。コロイドは、通常、数時間、好ましくは数週間～数カ月にかけて、固形粒子状物質が凝集せず(粒子サイズ測定によって見極められる)、またコロイドから沈降しない場合に、安定していると言われる。コロイド不安定性を表す用語は、凝集、凝塊形成、フロキュレーション、ゲル化、及び沈降を含む。コア直径の約3倍を上回る直径まで平均粒子サイズが著しく増大すること、そして調製から1日以内にコロイドの目に見える沈降が生じることは、コロイドが不安定であることを示す。

【0014】

コロイド中の粒子の表面特性、例えば粒子の静電電荷がしばしば、コロイドの安定性に関与する。典型的には、さもなければコロイドからの粒子の凝集及び沈降を招くような力を克服するための静電反発力を提供するように、表面は正又は負に有意に荷電される。特定の特性を得るために、粒子を表面改質すること、又は対電荷を有するコロイド粒子を「集成」することが重要性を有している。しかしこのことはしばしば困難である。それというのも、表面改質又は集成が、コロイド安定性に必要な静電力及び立体力を崩壊し、そして安定なコロイドが容易には得られないからである。組成物は安定なコロイドであり、従って数時間よりも長い時間、より好ましくは数日間よりも長い時間、そして最も好ましくは数週間よりも長い時間にわたって懸濁液のままであるべきである。コロイドのゼータ電位の最大値は、 $\pm 20$  mVを上回り、より好ましくは $\pm 30$  mVを上回ることができる。ゼータ電位は高いことが好ましい。なぜならば、高いゼータ電位はコロイドのコロイド安定性を高めるからである。最終組成物を生成するのに必要なプロセス工程中に安定なコロイドを得るために、分散体のpHを必要に応じて調節することができる。コロイドのpHは、これらのプロセス工程中、pH 4～pH 10、より好ましくはpH 5～pH 9であることが可能である。最終形態において、コロイドは、生理学的条件(例えばpH 7.4、137 mM NaCl)下、又は生体内用途において典型的に使用される緩衝剤又は生理食塩水中、特に、血管内注射のために使用される組成物中で安定である。このように、コロイドは、このような溶液中に導入されるか又は溶液によって希釈されたときに安定のままであることができる。生理学的pH及びイオン強度は、pH 6～pH 8、及び塩濃度30 mM～600 mMで変化することがあり、また、上記組成物は、これらの範囲内での任意の組み合わせにおいて安定である。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 1 5 】

上記組成物は、キャリア粒子として役立つことができるコア・シェル型粒子を含むコロイドを含む。これらのコア・シェル型粒子の平均粒子サイズ直径は、200 nm未満である。(便宜上、これらの粒子は「ナノ粒子」又は「ナノ粒子状物質」又は類似の用語で呼ぶことになる。)「キャリア粒子」は、コア及びポリマー・シェルを含む粒子である。このコア・シェル型サブ集成体は、追加の成分、例えば生物学的成分、薬学的成分、又は診断用成分、並びに例えば生体適合性及びターゲット性を改善するための成分を含む他の集成粒子のための出発点であることができる。これらの追加の成分は、結果として生じる粒子を大きくすることができる。

## 【 0 0 1 6 】

コロイド中のコア・シェル型粒子の粒子サイズは、コールター法、光散乱法、沈澱法、光学顕微鏡法、及び電子顕微鏡法を含む多数の方法、又は方法の組み合わせによって特徴付けすることができる。例における粒子は、光散乱法によって特徴付けされた。光散乱法は、 $10^9$ 以上の粒子をサンプリングすることができ、そして、優れたコロイド粒子統計値を提供することができる。光散乱法は、直径又はサイズの所与のインターバル内に存在する粒子のパーセンテージを提供するために用いることができ、例えば粒子の90 %が所与の値を下回る。光散乱法は、平均粒子サイズ直径、粒子の平均数分布、粒子の平均体積分布、分布の標準偏差、及びナノ粒子の分布幅に関する情報を得るために用いることができる。キャリア粒子として使用することができる本発明のコア・シェル型粒子の場合、粒子の少なくとも90%が、平均粒子サイズ直径の4倍未満であることが好ましく、そして、粒子の少なくとも90%が、平均粒子サイズ直径の3倍未満であることがより好ましい。平均粒子サイズ直径は、数加重平均(粒子総数の平均サイズ)として、又は面積、体積又は質量で加重された平均として測定することができる。体積又は質量で加重された平均粒子サイズ直径が測定されるのが好ましい。それというのも、著しく大きい質量を有する、より大きい粒子であればあるほど、この技法を用いてより傑出してカウントされるからである。加えて、粒子の狭いサイズ度数分布を得ることができる。体積加重サイズ度数分布の尺度は、測定された粒子サイズの標準偏差(シグマ)によって与えられる。体積加重平均粒子サイズ直径分布の標準偏差が、平均粒子サイズ直径よりも小さいことが好ましく、そして、平均粒子サイズ直径の2分の1未満であることがより好ましい。このことは注入可能な組成物によって望ましい粒子サイズ分布を表す。

## 【 0 0 1 7 】

コア粒子は、負の表面電荷を有することができる。コロイドの表面電荷は、電気泳動移動度から計算することができ、ゼータ電位によって表される。負の表面電荷を有するコロイドは、負のゼータ電位を有し、これに対して、正の表面電荷を有するコロイドは、正のゼータ電位を有する。コア粒子のゼータ電位の絶対値は好ましくは10 mVよりも大きく、より好ましくは20 mVよりも大きい。コア粒子が負のゼータ電位を有することがさらに好ましい。電気泳動移動度及びゼータ電位の測定は、「The Chemistry of Silica(シリカの化学)」、R.K. Iler, John Wiley and Sons (1979)に記載されている。

## 【 0 0 1 8 】

コア粒子材料は、無機材料、例えば金属酸化物、金属オキシ水酸化物、及び不溶性塩から選択することができる。好ましいコア粒子材料は、無機コロイド粒子、例えばアルミナ、シリカ、ペーマイト、酸化亜鉛、炭酸カルシウム、二酸化チタン、及びジルコニアである。特に好ましい態様の場合、コア粒子はシリカ粒子である。特に好ましい態様の場合、コア粒子は、直径約4~50 nmのシリカ粒子である。

## 【 0 0 1 9 】

コア粒子は、カプセル封入された近赤外発光色素又は顔料を有することができる。近赤外発光色素又は顔料は、生きている組織の光学画像形成の際に使用されている。なぜならば、近赤外線波長の光透過率は、紫外線、可視線、又は赤外線波長よりも高いからである。近赤外発光色素又は顔料は一般に、波長範囲600~1500 nmにおいて発光を示す。近赤外発光色素又は顔料は、一例として近赤外フルオロフォア、例えばcy7、cy5、cy5.5、イン

10

20

30

40

50

ドシアニン・グリーン、ラホーヤ・ブルー、IRD41、IRD700、NIR-1、及びアレクサフルオル色素から選択することができる。これらの色素及びその他は、米国特許出願公開第2003/0044353号明細書に詳しく論じられている。

#### 【0020】

上記組成物は、アミン官能基を有するシェル・ポリマーを含む。アミン官能基は少なくとも2つの目的に適う。第1に、アミン官能基は、ポリマーをコア表面に「連結」するための結合部位を提供する。連結は、負荷電表面に対するポリアミンの静電求引力を介して発生することができる。それというのも、アミンはアミン官能基のプロトン化によって正荷電することができるからである。連結は、ポリアミンと粒子表面との水素結合によって発生することもできる。ポリマーが表面に永久に結合され、そしてpHが変化するか又はイオン強度(塩濃度)が変化するときには脱離することがないことが好ましい。アミン官能基を有するポリマーが架橋されていることがさらに好ましい。架橋は、粒子表面からアミン官能基を有するポリマーが脱離するのを防止するのを助ける。架橋試薬の量は最小化されるべきであり、脱離を防止するのに必要なだけの量が使用されることが好ましい。架橋試薬とポリマーとのモル比は、1:1~25:1であるのがよい。使用可能な架橋試薬については、M. Brinkley, Bioconjugate Chem. 3,2(1992)に記載されている。

10

#### 【0021】

アミン官能基を有するポリマー(ポリアミン)とコア粒子との比は、コア粒子表面を覆うのに必要な量と少なくとも等しいポリアミンの量が存在するようになっていないことが望ましい。不十分な被覆の場合、安定なコア・シェル・コロイドは得られない。ポリアミンは、前記コア粒子の表面全てを実質的に覆うのに必要な量を著しく上回る量で供給されないことがさらに望ましい。この場合、過剰のポリアミンはコア粒子によって強く結合されずに溶液中に残る場合がある。結合されていないポリアミンは、これがコア・シェル型粒子とは区別される特性を有することがあるため、そして、コア・シェル・コロイドからの遊離ポリアミンの精製及び分離は難しい場合があるため、望ましくない。一般に、コア粒子表面を覆うのに必要なポリアミン量と少なくとも等しい量は、約4  $\mu$ モル超のアミン-モノマー/コア表面積  $m^2$ というポリアミン濃度によって提供される。この量は、当業者によって容易に計算することができ、下式によって提供される。

20

#### 【0022】

$$[(g \text{ ポリアミン} \times 10^6) / ((M_w \text{ ポリマー} \times (M_w \text{ モノマー} / M_w \text{ ポリマー})) / [g \text{ コア粒子} \times \text{比表面積}] > 4$$

30

#### 【0023】

上記式中、 $M_w$ は分子量であり、gは重量(グラム)であり、コア粒子の比表面積は $g/m^2$ である。コア・シェル・コロイドは、10~30  $\mu$ モルのアミン-モノマー/コア表面積  $m^2$ を含有することができる。コア・シェル・コロイドは300~6000  $\mu$ モルのアミン-モノマー/コア粒子 gを含有することが、さらに望ましい。これが望ましい理由は、このようにすると、上記キャリア粒子用途のための生物学的成分、薬学的成分、又は診断用成分の有効なキャパシティを有するコア・シェル・コロイドが提供され得るからであり、また、このようにすると、コロイド安定性を維持しつつ、広範囲にわたってpHを調節できるようなコア・シェル・コロイドが提供されるからである。

40

#### 【0024】

溶液中に存在するアミン官能基を有するポリマーの50 %超、より好ましくは70 %超、そして最も好ましくは90 %超が、コア粒子表面に直接に吸着することができる。このパーセンテージは、コア粒子に直接に結合されたポリマーの量を、コロイド中のポリマー総量で割り算した重量パーセンテージである。ナノ粒子に吸着されないアミン基の数を最小化し、そして溶液中の「遊離」アミン官能基を制限することが望ましい。それというのも、遊離アミンが、特に後続の結合工程に、ナノ粒子集成体の機能を妨害するおそれがあるからである。コア粒子表面に吸着された表面の量は、試験の項で説明する溶液状態NMRによって測定することができる。

#### 【0025】

50

シェル・ポリマーは、アミン官能基を含有するいかなるポリマーをも含んでよく、ポリアミン、ポリアミンのコポリマー、アミノ官能基で誘導体化されたポリマー、及びアミン官能基を含有するバイオポリマーを含む。有用なシェル・ポリマーは、(一例として)ポリエチレンイミン、ポリアリルアミン、ポリビニルアミン、ポリビニルピリジン、アミンで誘導体化されたポリビニルアルコール、及びバイオポリマー、例えばポリリシン、アミノ-デキストラン、キトサン、ゼラチン、アラビアゴム、ペクチン、タンパク質、多糖、ポリペプチド、及びこれらのコポリマーを含む。好ましいポリマーは、ポリエチレンイミン、ポリアリルアミン、ポリリシン及びアミン含有バイオポリマーを含む。アミン基は好ましくは、第一級アミン(-NH<sub>2</sub>)、又は第二級アミン(-NHR)である。Rは有機基である。

【0026】

ナノ粒子状のコア・シェル型粒子が細胞毒性成分、例えば金属、金属酸化物、又は有機化合物を含む場合、ナノ粒子と、ナノ粒子を投与可能な患者との間の生体適合性を保証することが望ましい。いくつかの成分は比較的不活性であり、そして他の成分よりも生理学的に侵入性ではない。コア・シェル型ナノ粒子キャリアに生体適合性物質を塗布するか、又はその他の形式で全体的又は部分的にこれを覆うことにより、金属有機材料又は高分子材料の有害な影響を最小限に抑えることができる。

【0027】

生体適合性とは、組成物が、これが導入される生体系の通常の機能を妨げないことを意味する。典型的には、生体適合性組成物は、血液と適合可能であり、また、他の形式で体内の不都合な反応を引き起こすことはない。例えば、生体適合性であるために、材料は、毒性、免疫原性、又は血栓形成性であるべきではない。生体分解性とは、材料が生理学的条件下で酵素的又は加水分解的に分解して、通常のプロセスを介して身体から排除することができる、より小さな分子になることができることを意味する。

【0028】

コロイドが好適に長い生体内持続時間(半減期)を有するような、上記コア・シェル型ナノ粒子コロイドの生体適合性を提供するために、アミン官能基のうちの少なくともいくつかと組み合わせることにより、いくつかの態様においてナノ粒子表面に保護鎖を付加することができる。保護鎖はシェルの一部であるか、又は上記シェルに結合して第2のシェルを形成することができる。有用な保護鎖の例は、ポリエチレングリコール(PEG)、メトキシポリエチレングリコール(MPEG)、メトキシポリプロピレングリコール、ポリエチレングリコール-二酸、ポリエチレングリコールモノアミン、MPEGモノアミン、MPEGヒドラジド、及びMPEGイミダゾールを含む。保護鎖は、PEGと、異なるポリマー、例えばポリペプチド、多糖、ポリアミドアミン、ポリエチレンアミン、ポリヌクレオチド、タンパク質(例えばBSA)、脂質(膜エンベロープを含む)、及び炭水化物とのブロックコポリマーであってもよい。合成生体適合性ポリマーについては、全般的にHolland他、1992年、「Biodegradable Polymers(生体分解性ポリマー)」、Advances in Pharmaceutical Sciences 6: 101-164において論じられている。

【0029】

これらの生体適合性化合物の添加は、他の生物学的成分、薬学的成分、又は診断用成分の添加に続いて行うことができ、そして患者又は系に集成体を導入する前の最終合成工程として役立つことができる。

【0030】

これらの材料は、ナノ粒子キャリア、及びこれに結合された生物学的成分、薬学的成分、又は診断用成分のための保護剤又はマスキング剤であってもよく、これにより、免疫系又は他の生体系(例えばプロテアーゼ、ヌクレアーゼ(例えばDNase又はRNase)、又は望ましくない分解と関連する他の酵素又は生物学的エンティティによる認識を防止する。このように、ポリマー・シェルに保護剤を添加することにより、生物学的成分、薬学的成分、又は診断用成分が無傷のままの状態、集成体が所望の細胞又は組織に達するのを容易にするための隠ぺい構成要件又は隠密構成要件が提供される。

【0031】



本発明のコア・シェル型ナノ粒子組成物は、生物学的成分、薬学的成分、又は診断用成分を担持するためのキャリアとして有用であり得る。具体的には、ナノ粒子状キャリア粒子は、特定の治療成分又は画像形成成分を必ずしもカプセル封入するわけではなく、生物学的成分、薬学的成分、又は診断用成分のためのキャリアとして役立つ。生物学的成分、薬学的成分、又は診断用成分、例えば治療薬、診断薬、色素、又はX線撮影造影剤を、シェル又はコアと組み合わせることができる。「診断薬」という用語は、造影剤として作用することができ、これにより宿主哺乳動物内で検出可能な指示信号を生成することができる成分を含む。検出可能な指示信号は、ガンマ線放射信号、放射性信号、エコー発生信号、蛍光透視信号、又は生理学的信号などであってよい。本明細書中で使用される生物医学的物質は、生理学的障害の治療に効果的な生体活性物質、医薬品、酵素、ホルモン、ステロイド、及び組換え生成物などを含む。治療薬の例は、抗生物質、血栓溶解酵素、例えばウロキナーゼ又はストレプトキナーゼ、インスリン、成長ホルモン、化学治療薬、例えばアドリマイシン、及び抗ウィルス薬、例えばインターフェロン及びアシクロビルを含む。これらの治療薬は、例えばプロテアーゼ又はヒドロラーゼによる酵素的分解時に、治療薬を所定の時間にわたって放出することができるように、ナノ粒子のシェル又はコアと組み合わせることができる。

10

20

30

40

50

#### 【0032】

上記組成物はさらに、特定のターゲット細胞を認識するターゲット用部分を含む生物学的成分、薬学的成分、又は診断用成分を含むことができる。上記ナノ粒子状コア・シェル型キャリアと組み合わされたターゲット用部分を介して、細胞表面受容体を認識して結合することは、上記組成物の構成要件であり得る。この構成要件は、細胞表面結合事象がしばしば、一連の事象、特に受容体媒介型エンドサイトーシスをもたらし細胞カスケードにおける開始ステップであるという理解を活用する。「受容体媒介型エンドサイトーシス」(「RME」)という用語は一般に、細胞表面上に配置された受容体にリガンドが結合することにより触媒されて、受容体結合リガンドが細胞内部に内在化させられるメカニズムを表す。インスリン、上皮成長因子、成長ホルモン、甲状腺刺激ホルモン、神経成長因子、カルシトニン、グルカゴン、及び多くのその他のものを含む多くのタンパク質及びその他の構造が、受容体媒介型エンドサイトーシスを介して細胞に侵入する。

#### 【0033】

「受容体媒介型エンドサイトーシス」(以後「RME」)は、場合によっては他の生物学的成分、薬学的成分、又は診断用成分を含有する上記ナノ粒子を、細胞の内部に輸送するための便利なメカニズムを提供する。

#### 【0034】

RMEの場合、細胞の表面上に配置された受容体によってリガンドが結合すると、細胞内信号を始動させることができ、細胞内信号はエンドサイトーシス応答を含むことができる。こうして、ターゲット用部分が組み合わされたナノ粒子状コア・シェル型キャリアは、細胞の表面上に結合し、続いて細胞内部に陥入して内在化することができる。本発明の組成物とともに有用なターゲット薬として採用することができる部分の代表的な一例としてのリストは、タンパク質、ペプチド、アプトマー、小有機分子、毒素、ジフテリア毒素、緑膿菌毒素、コレラ毒素、リシン、コンカナバリンA、ラウス肉腫ウィルス、セムリキ森林熱ウィルス、水疱性口内炎ウィルス、アデノウィルス、トランスフェリン、低密度リボタンパク質、トランスコパラミン、卵黄タンパク質、上皮成長因子、成長ホルモン、甲状腺刺激ホルモン、神経成長因子、カルシトニン、グルカゴン、プロラクチン、黄体形成ホルモン、甲状腺ホルモン、血小板由来増殖因子、インターフェロン、カテコールアミン、ペプチド疑似体、糖脂質、糖タンパク質及び多糖から成る群から選択される。上記部分の同族体又は断片を採用することもできる。これらのターゲット用部分はナノ粒子状コア・シェルと組み合わせ、そしてターゲット細胞にナノ粒子を導くために使用することができる。ターゲット細胞内では、続いてナノ粒子を内在化させることができる。部分全体をターゲット用部分として使用する必要はない。特定の受容体又はその他の構造と相互作用することが知られているこれらの部分のより小さな断片を、ターゲット用部分として使用する

こともできる。

【0035】

抗体又は抗体断片は、細胞内へのナノ粒子の取込みを増強するために利用することができる、最も広く使用されるターゲット用部分のクラスである。抗体は、当業者に知られている種々の技法のいずれかによって調製することができる。例えば、Harlow及びLane、「Antibodies: A Laboratory Manual(抗体：研究室マニュアル)」、Cold Spring Harbor Laboratory, 1988を参照されたい。抗体は、モノクローナル抗体の生成を含む細胞培養技法によって、又は組換え抗体の生成を可能にするために抗体遺伝子を好適な細菌細胞宿主又は哺乳動物細胞宿主内にトランスフェクトすることを介して、生成することができる。1つの技法の場合、ポリペプチドを含む免疫原を、種々様々な哺乳動物(例えばマウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、又はヤギ)のいずれかに最初に注入する。ポリペプチドがキャリア・タンパク質、例えばウシ血清アルブミン又はキーホール・リンペット・ヘモシアニンに結合されると、優れた免疫応答を発生させることができる。免疫原は、好ましくは、1回又は2回以上のブースター免疫付与を組み入れた所定のスケジュールに従って、動物宿主内に注入し、そして動物から定期的に採血する。次いで、例えば好適な固体支持体にカップリングされたポリペプチドを使用するアフィニティ・クロマトグラフィによって、ポリペプチドに対して特異的なポリクローナル抗体を、このような抗血清から精製することができる。

10

【0036】

当該抗原ポリペプチドに対して特異的なモノクローナル抗体は、例えばKohler及びMilstein, Eur. J. Immunol. 6:511-519、1976年の技法及びその改善手段を用いて調製することができる。

20

【0037】

モノクローナル抗体は、成長中のハイブリドーマ・コロニーの上澄みから単離することができる。加えて、種々の技法、例えば好適な脊椎動物宿主、例えばマウスの腹腔内にハイブリドーマ細胞系を注入する技法を、収率を高めるために採用することができる。次いで、腹水又は血液からモノクローナル抗体を捕集することができる。コンベンショナルな技法、例えばクロマトグラフィ、ゲル濾過、析出、及び抽出によって抗体から汚染物質を除去することができる。本発明のポリペプチドは、例えばアフィニティ・クロマトグラフィ工程における精製プロセスに使用することができる。

30

【0038】

ヒト以外の免疫グロブリンに由来する抗原結合部位を含む数多くの「ヒト化」抗体分子が記述されている(Winter他(1991) Nature 349:293-299; Lobuglio他(1989) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 86:4220-4224)。これらの「ヒト化」分子は、ヒト受容体におけるこれらの部分の治療用途の継続時間及び効力を制限する、齧歯動物の抗ヒト抗体分子に対する望ましくない免疫応答を最小限に抑えるように設計される。

【0039】

ビタミン、及びその他の必須ミネラル及び栄養素をターゲット用部分として利用して、細胞によるナノ粒子の取込みを増強することができる。具体的には、葉酸塩、葉酸塩の葉酸塩受容体結合類似体、及びその他の葉酸塩受容体結合リガンド、ビオチン、ビオチンのビオチン受容体結合類似体、及びその他のビオチン受容体結合リガンド、リボフラビン、リボフラビンのリボフラビン受容体結合類似体、及びその他のリボフラビン受容体結合リガンド、及びチアミン、チアミンのチアミン受容体結合類似体、及びその他のチアミン受容体結合リガンドからビタミン・リガンドを選択することができる。受容体媒介型エンドサイトーシスを引き起こすと考えられ、ひいては本明細書中に開示された方法に基づく用途をも有する追加の栄養素は、カルニチン、イノシトール、リボ酸、ナイアシン、パントテン酸、ピリドキサル、及びアスコルビン酸、及び脂溶性ビタミンA、D、E及びKである。さらに、従来技法において記載された「免疫リボソーム」(リボソームの表面に連結された抗体を有するリボソーム)が、上記組成物と一緒に使用するのに適している。

40

【0040】

50

全ての天然細胞膜が生体活性のビオチン又は葉酸塩の受容体を有するわけではないので、特定の細胞系における上記組成物の生体外での使用は、生物的に活性のビオチン又は葉酸塩受容体の存在を先ず保証するように、その細胞系を変更又はその他の形式で改質することを伴うことができる。こうして、ビオチン受容体及び葉酸塩受容体の生成を促進するように、ビオチン又は葉酸塩が欠乏している基質上で細胞系を成長させることにより、或いは、ビオチン受容体又は葉酸塩受容体に対応するタンパク質又はアポタンパク質のための挿入された外来遺伝子を発現させることにより、細胞膜上のビオチン受容体又は葉酸塩受容体の数を増大させることができる。

#### 【0041】

RMEは、上記コア・シェル型ナノ粒子を細胞中に転位することができる排他的な方法ではない。ナノ粒子に好適なエンティティを結合することにより利用することができる他の取込み方法は、膜の孔を有利に使用することを含む。食細胞及び飲細胞のメカニズムはまた、ナノ粒子を細胞内部に内在化させることができる有利なメカニズムを提供する。

#### 【0042】

認識部分はさらに、酵素的又は電気化学的な切断を被りやすい配列を含むことができる。認識部分は従って、細胞内部の種々の位置に存在する酵素、例えばプロテアーゼ又は制限エンドヌクレアーゼ(例えばDNAse又はRNAse)によって切断されやすい配列を含むことができる。

#### 【0043】

細胞表面認識配列は必要条件ではない。このように、細胞表面受容体ターゲット用部分は、所与の細胞タイプをターゲットにするのに有用であり、又は上記ナノ粒子と細胞表面との組み合わせを引き起こすのに有用ではあり得るものの、細胞表面受容体ターゲット用部分がナノ粒子表面上に存在するという必要条件はない。

#### 【0044】

生物学的成分、薬学的成分、又は診断用成分を上記コア・シェル型ナノ粒子状キャリアに集成するために、成分は、連結によりナノ粒子キャリアと組み合わせることができる。「組み合わせる」とは、成分が、ナノ粒子、例えばコア・シェル型ナノ粒子のシェルによって担持されることを意味する。成分は粒子内に溶解し、そして非共有的に内蔵することができる。成分の好ましい組み合わせ方法は、シェルのアミン官能を介した共有結合による。

#### 【0045】

一般に、当該生物学的成分、薬学的成分、又は診断用成分と、コア・シェル型ナノ粒子状キャリアとの間に連結状態を形成するいかなる形式をも利用することができる。このことは、直接的な又は結合基を介した間接的な、リガンドと外来分子との共有結合、イオン結合、又は水素結合を含むことができる。連結状態は典型的には、複合体のそれぞれの成分上に位置する酸、アルデヒド、ヒドロキシ、アミノ、又はヒドラゾ基の間にアミド、エステル又はイミノ結合を形成することにより、コア・シェル型ナノ粒子キャリアに生物学的成分、薬学的成分、又は診断用成分を共有結合することにより形成される。当業者に認識されている、生物学的に変化しやすい共有結合、例えばイミノ結合、及び結合基-COOCH<sub>3</sub>、-O-O-、又は-COOCH<sub>3</sub>を有するいわゆる「活性」エステルが好ましい。例えば核酸の相補鎖間に発生する水素結合を、連結形成のために使用することもできる。

#### 【0046】

十分に純粋なコロイド(好ましくは、生物学的成分、薬学的成分、又は診断用成分を有するコア・シェル型ナノ粒子キャリアを含む)が調製されたあと、患者又は試料に投与することができる製薬組成物中にナノ粒子を調製することが好ましいことがある。好ましい投与技法は、非経口投与、静脈内投与、及び、例えば充実性腫瘍又は他の新生物組織を含む任意の所期ターゲット組織内への直接的な輸液を含む。好適な製薬組成物を含む媒質中にナノ粒子組成物を配置する最終精製工程を採用することにより、精製を達成することができる。好適な製薬組成物は一般に、投薬情報に基づいた活性物質と一緒に、所定量の所期ナノ粒子を含む(ケースバイケースで決定される)。上記粒子は、適切な最終濃度をもた

10

20

30

40

50

らすために、許容可能な製薬用希釈剤又は賦形剤、例えば滅菌水溶液と混和される。このような製剤は典型的には、緩衝剤、例えばリン酸緩衝生理食塩水(PBS)、又は追加の添加剤、例えば製薬用賦形剤、安定剤、例えばBSA又はHSA、又は塩、例えば塩化ナトリウムを含む。

#### 【0047】

非経口投与の場合、このような組成物を、これらの滅菌性、非免疫原性、及び非発熱性を保証することにより薬学的に許容可能なものにすることが一般に望ましい。このような技法は概ね当業者に知られている。さらに、ヒトに投与する場合、製剤は、FDA生物学的基準事務局によって必要とされる滅菌性、発熱性、全般的な安全性、及び純度の基準を満たすべきである。上記ナノ粒子組成物が細胞培養液中に懸濁された細胞中に導入される場合には、適切な成長培地、例えばLuria培養液(LB)又は好適な細胞培地内に細胞をナノ粒子と一緒にインキュベートするので十分である。他の導入方法も可能ではあるが、これらの導入処理が好ましく、そしてこれらの導入処理は、ナノ粒子キャリアの表面上に存在するエンティティとは関係なしに実施することができる。

#### 【0048】

本明細書中に記載された組成物を調製するために、コア粒子とアミン官能化ポリマーとは、分散水性媒質内部の高剪断混合ゾーン内に一緒に同時に入れることができる。高剪断混合ゾーンは、プロペラ様混合器、静的混合器、インライン混合器、分散器、又は他の高剪断混合装置によって提供することができる。装置の混合効率は、選択された混合方法のタイプ、並びに混合器の正確なジオメトリー及びデザインに依存する。プロペラ様混合器の場合、混合効率はターンオーバー率によって概算することができる。ターンオーバー率は、攪拌速度(回転数/秒)とターンオーバー容積(mL/回転)とを掛け算したものを水容積で割り算した値である。インライン混合器又は静的混合器の場合、コロイド分散体の添加速度の和を混合器のターンオーバー容積によって掛け算することにより、混合効率を概算することができる。いずれの事例においても、混合効率は、ターンオーバー数/秒の単位を有する。混合効率は約0.10ターンオーバー/秒を上回ることが好ましく、そしてより好ましくは0.5ターンオーバー/秒を上回り、また最も好ましくは1ターンオーバー/秒を上回る。2つの粒子分散流の完全な混合は好ましくは、約10秒未満で達成することができ、より好ましくはほぼ瞬時に達成される。

#### 【実施例】

#### 【0049】

Nalco Chemical Companyからシリカ・コロイドを購入し、これらは、Nalco 1130、平均粒子直径8 nm、30 %固形分、pH = 10.0、比表面積 = 375 g/m<sup>2</sup> ; Nalco 1140、平均粒子直径15 nm、40 %固形分、pH = 9.7、比表面積 = 200 g/m<sup>2</sup> ; Nalco 1050、平均粒子直径20 nm、50 %固形分、pH = 9.0、比表面積 = 150 g/m<sup>2</sup> ; Nalco 2329、平均粒子直径90 nm、40 %固形分、pH = 10.0、比表面積 = 40 g/m<sup>2</sup>である。全てのコア粒子は負のゼータ電位を有する。Aldrich Chemicals社からポリエチレンイミンを購入し、これらは平均MW = 2000 g/モル、ポリマー1モル当たり46.5のモノマー ; 平均MW = 10,000 g/モル、ポリマー1モル当たり233のモノマー ; 及び平均MW = 60,000 g/モル、ポリマー1モル当たり1,395のモノマーである。ポリエチレンイミン(以後「PEI」)のモノマー分子量は、43.0 g/モルであるものとみなした。BVSMは、Eastman Kodak 社から得られたビス-エテン,1,1'-[メチレンビス(スルホン)]であった。137 mMのNaCl(8 g)、2.7 mMのKCl(0.2 g)、10 mMのNa<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>(1.44 g)、2 mMのKH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>(0.24 g)を1.0 L蒸留水中に溶解することにより、PBS(リン酸緩衝剤システム)緩衝剤を調製した。

#### 【0050】

コア及びシェルのコロイド分散体を高効率混合装置内に同時に添加することにより、コア・シェル型コロイド分散体を調製した。コロイド分散体を、既知の流量で、較正された蠕動ポンプを介して導入した。安定なコア/シェル・コロイド分散体を得るために、混合効率及び流量を変化させた。分散体の調製及び特徴の詳細を下に示す。装置の混合効率はターンオーバー率によって表される。ターンオーバー率は、(攪拌速度(回転数/分) × ター

ンオーバー容積(mL/回転)を、水容積で割り算した値である。混合効率は典型的には、それぞれの例に対して一定に保たれ、約25ターンオーバー/分、又は0.4ターンオーバー/秒であった。

#### 【0051】

粒子サイズ測定。下記例において得られたコア・シェル型ナノ粒子状キャリアの体積加重平均粒子サイズ直径を、Leeds & Northrop製のMICROTRAC(商標) Ultrafine Particle Analyzer (UPA) Model 150を使用して、動的光散乱法によって測定した。分析は、示されたサイズよりも小さな粒子の体積のパーセンテージを示すパーセンタイル・データを提供する。50パーセンタイルはメディアン直径として認識され、これは、本明細書中では「メディアン粒子サイズ直径」と呼ばれる。「体積加重平均粒子サイズ直径」は、MICROTRAC(商標) Ultrafine Particle Analyzer (UPA) Model 150のマニュアルに記載されているように、粒子サイズの面積分布から計算される。標準偏差は、粒子サイズ分布幅を表す。標準偏差が小さければ小さいほど、粒子サイズ分布幅は狭くなる。

10

#### 【0052】

ポリマー吸着の定量。コロイドナノ粒子上に吸着されたPEIの量を測定するために、溶液状態NMR分光法を定量法として用いた。このことは、粒子表面に吸着されたポリマーが移動度の低減を示し、また磁化率の変化を被りやすいことが知られているという理由から、可能である。これらの要因は両方とも、粒子表面と組み合わされた高分子材料から生じるNMR共鳴の線幅を実質的に増大させる。線幅の劇的な増大の結果、粒子表面と組み合わされた高分子材料の共鳴を観察することができなくなり、そして観察されるNMR共鳴は、溶液中に遊離するポリマーからのみ生じる。例のコア・シェル型コロイドのNMR共鳴を、既知量の溶解された(遊離)PEIを含有する外部基準と比較した。次いで、遊離PEIの濃度を測定するために共鳴の相対積分を利用し、そして粒子に吸着されたパーセントPEIを差によって測定した。ポリマー吸着を定量するためにNMR分光法を用いることは、Colloid Polymer Sci (2002) 280: 1053-1056, Journal of Applied Polymer Science, 第58巻、271-278 (1995)、及びJournal of Colloid and Interface Science 202, 554-557(1998)において論じられている。

20

#### 【0053】

##### 制御された同時集成：

比較例は符号「C」を有する。本発明の例は符号「T」を有する。

30

C-1：速度約2000 rpmのプロペラ状の攪拌器を用いて攪拌された蒸留水200 mlを含有する1.0 L容器内に、40 %(w/w)のシリカ・コロイド・コア粒子200 g(Nalco 2329-90 nm)を速度20.00 ml/分で、そして、ポリエチレンイミン(PEI, MW = 2000 g/モル)の10 %(w/w)溶液27.5 gを速度3.0 ml/分で、それぞれ約9分間にわたって同時に添加した。pH 10.0又はその近くに維持されたpHを保つのに必要な速度で、硝酸の1.0 N溶液も同時に添加した。較正された蠕動ポンプを使用して、添加速度を制御した。速度は、シリカの表面積に対するPEIの比を一定の20  $\mu$ モル・モノマー/ $m^2$ で維持するように設定した。結果として生じるナノ粒子基質「キャリア」の最終濃度は、19 %固形分と計算された。平均粒子サイズ直径及び物理的特徴を表1に示す。

40

#### 【0054】

C-2：pH 9.0又はその近くに維持されたpHを保つのに必要な速度で、硝酸の1.0 N溶液を同時に添加したこと以外は、C-1と同様に実施した。平均粒子サイズ直径及び物理的特徴を表1に示す。

#### 【0055】

C-3：pH 8.0又はその近くに維持されたpHを保つのに必要な速度で、硝酸の1.0 N溶液を同時に添加したこと以外は、C-1と同様に実施した。平均粒子サイズ直径及び物理的特徴を表1に示す。

#### 【0056】

C-4：pH 7.0又はその近くに維持されたpHを保つのに必要な速度で、硝酸の1.0 N溶液を同時に添加したこと以外は、C-1と同様に実施した。平均粒子サイズ直径及び物理的特徴

50

を表1に示す。

【 0 0 5 7 】

I-1: pH 6.0又はその近くに維持されたpHを保つのに必要な速度で、硝酸の1.0 N溶液を同時に添加したこと以外は、C-1と同様に実施した。平均粒子サイズ直径及び物理的特徴を表1及び図1に示す。

【 0 0 5 8 】

I-2: pH 5.0又はその近くに維持されたpHを保つのに必要な速度で、硝酸の1.0 N溶液を同時に添加したこと以外は、C-1と同様に実施した。平均粒子サイズ直径及び物理的特徴を表1及び図1に示す。

【 0 0 5 9 】

I-3: 速度約2000 rpmのプロペラ状の攪拌器を用いて攪拌された蒸留水200 mlを含有する3.0 L容器内に、40 %(w/w)のシリカ・コロイド・コア粒子1,548.0 g(Nalco 2329-90 nm)を速度40.00 ml/分で、そして、硝酸でpH 5に調節されたポリエチレンイミン(PEI, MW = 2000 g/モル)の10 %(w/w)溶液213.0 gを速度5.2 ml/分で、それぞれ約30分間にわたって同時に添加した。pH 5.0又はその近くに維持されたpHを保つのに必要な速度で、硝酸の1.0 N溶液も同時に添加した。較正された蠕動ポンプを使用して、添加速度を制御した。速度は、シリカの表面積に対するPEIの比を一定の20  $\mu$ モル・モノマー/m<sup>2</sup>で維持するように設定した。結果として生じるコア・シェル型コロイドの最終濃度は、33.1 %固形分と計算され、数カ月の期間にわたって目に見える凝集の徴候を示すことはなかった。

【 0 0 6 0 】

【表 1】

表 1

例又は比較例	pH	固形分%	平均粒子サイズ直径 (nm)	標準偏差 (nm)	安定コロイド
C-1	10.0	19.1	1060	450	No
C-2	9.0	18.8	240	500	No
C-3	8.0	18.5	220	380	No
C-4	7.0	18.4	220	380	No
I-1	6.0	18.4	180	220	Yes
I-2	5.0	17.8	130	70	Yes
I-3	5.0	33.1	90	20	Yes

【 0 0 6 1 】

表1のデータは、制御された同時集成がpH条件に依存することを示す。集成体のpHが約6.0を実質的に上回る場合、コア・シェル型ナノ粒子状キャリアの相当の凝集が観察され、安定なコロイドが生じることはない。なお、pH 7.0で形成された集成体(C-4)は安定ではないのに対して、pH 6.0の集成体(I-1)は安定である。観察された大きい平均粒子サイズ直径、及び高い標準偏差は凝集を示す。これと比較して、本発明の例は、より小さな平均粒子サイズ直径、及びより小さな標準偏差を有し、また安定なコロイドである。本発明の例はまた、極めて高い固形分パーセンテージでコア・シェル型ナノ粒子状キャリアを含有し、ひいては、制御された同時集成は、コア・シェル型ナノ粒子状キャリアへの効率的で低コストの合成ルートである。

【 0 0 6 2 】

架橋の効果: 50 nm未満のコア・シェル型ナノ粒子状キャリアの改善された安定化

I-4: 速度約2000 rpmのプロペラ状の攪拌器を用いて攪拌された蒸留水200 mlを含有す

る1.0 L容器内に、10 %(w/w)のシリカ・コロイド・コア粒子200 g(Nalco 1140-15 nm)を速度20.00 ml/分で、そして、硝酸でpH 5に調節されたポリエチレンイミン(PEI, MW = 2000 g/モル)の10 %(w/w)溶液19.5 gを速度1.9 ml/分で同時に添加した。各成分を10分間にわたって添加した。pH 5.0又はその近くに維持されたpHを保つのに十分な速度で、硝酸の1.0 N溶液も同時に添加した。較正された蠕動ポンプを使用して、添加速度を制御した。速度は、シリカの表面積に対するPEIの比を一定の20  $\mu$ モル・モノマー/ $m^2$ で維持するように設定した。シリカ粒子の表面積は、約200  $m^2/g$ であるものとみなした。経時的に測定された平均粒子サイズ直径及び物理的特徴を表2に示す。

#### 【0063】

I-5：速度約2000 rpmのプロペラ状の攪拌器を用いて攪拌された蒸留水200 mlを含有する1.0 L容器内に、例I-4において調製されたナノ粒子基質200 gを速度20.00 ml/分で、そして、粒子上に形成されたPEIを架橋するために、BVSM架橋試薬の0.45 %溶液59.7 gを6 ml/分で、それぞれ10分間にわたって同時に添加した。較正された蠕動ポンプを使用して、添加速度を制御した。速度は、PEIポリマー1モル当たりのBVSMの比を一定の比3:1(モル:モル)に維持するように設定した。経時的に測定された平均粒子サイズ直径及び物理的特徴を表2に示す。

#### 【0064】

#### 【表2】

表2

例又は比較例	架橋	平均粒子サイズ直径(nm)	標準偏差(nm)	安定性(観察)
I-4	なし	1日目=24 4日目=34	1日目=8 4日目=19	数週間後に曇ってきた
I-5	あり	1日目=20 4日目=21	1日目=9 4日目=9	数週間後にわたって安定なコロイド

#### 【0065】

表2のデータは、極めて小さなサイズ(約50 nm未満)のコア・シェル型ナノ粒子状キャリアの場合、結果として生じるコロイドは、最初は安定しているが、数週間後には不安定になる場合があることを示す。曇った溶液の外観は、コロイドの不安定性をしばしば示す。これと比較して、架橋されたコロイドは改善され、何週間にもわたって安定性を示す。これらの結果は、2つの例の平均粒子サイズ直径及び粒子サイズ分布の標準偏差(経時的に測定)をそれぞれ比較すると、より明らかになる。架橋されていないポリマー・シェルを含む粒子を有するコロイドは、時間とともにより大きい粒子直径及びより大きい標準偏差に向かって推移を示す。より大きい標準偏差は、より広い粒子サイズ分布を示し、この試料に対して観察される凝集(曇り)と一致する。架橋されたポリマー・シェルを含む粒子を有するコロイドは、粒子直径及びサイズ分布の経時的な変化を示さない。このことは、コロイド安定性が改善されることを示す。

#### 【0066】

##### 生理学的条件における安定化

比較例(C-5)：速度約2000 rpmのプロペラ状の攪拌器を用いて攪拌された蒸留水200 mlを含有する1.0 L容器内に、10 %(w/w)のシリカ・コロイド・コア粒子200 g(Nalco (商標) 1140-15 nm)を速度20.00 ml/分で、そして、ポリエチレンイミン(PEI, MW = 10,000 g/モル)の10 %(w/w)溶液17.2 gを速度1.7 ml/分で、それぞれ約10分間にわたって同時に添加した。pH 5.0又はその近くに維持されたpHを保つのに必要な速度で、硝酸の1.0 N溶液も

同時に添加した。較正された蠕動ポンプを使用して、添加速度を制御した。速度は、シリカの表面積に対するPEIの比を一定の10  $\mu$  モル・モノマー/ $\text{m}^2$ で維持するように設定した。シリカ粒子の表面積は200  $\text{m}^2/\text{g}$ であるものとみなした。添加終了時に、速度1.25 ml/分で1.8 % BVSM溶液3.75 gを添加することにより、PEI表面改質部分を架橋した。PEIポリマー1モル当たりのBVSMの比は2:1(モル:モル)であった。架橋後、試料を数日間にわたって放置しておき、上記試料のアリコートにpH 7.4に調節し、次いで塩濃度を0.135 Mにするために固形NaClを添加した。試料はすぐに曇ってきて、安定なコロイドではなかった。平均粒子サイズ直径及び物理的特徴を表3に示す。これは生理的条件下で安定なコロイドではないので、本発明の範囲には含まれない。

#### 【0067】

I-6：シリカの表面積に対するPEIの比を一定の20  $\mu$  モル・モノマー/ $\text{m}^2$ で維持するように速度を設定したこと以外は、C-5と同様に実施した。コア・シェル型ナノ粒子状キャリアの最終濃度は、約5.0 %固形分であった。平均粒子サイズ直径及び物理的特徴を表3に示す。C-5と比較して、これらの粒子は、表面上により多くの量のPEIを有し、ひいては、生理的条件下で安定であり、従って本発明の範囲内に含まれる。

#### 【0068】

I-6：シリカの表面積に対するPEIの比を一定の30  $\mu$  モル・モノマー/ $\text{m}^2$ で維持するように速度を設定したこと以外は、C-5[「C-7」]と同様に実施した。コア・シェル型ナノ粒子状キャリアの最終濃度は、約5.0 %固形分であった。平均粒子サイズ直径及び物理的特徴を表3に示す。

#### 【0069】

#### 【表3】

表3

例又は比較例	PEI/コロイド表面積の比( $\mu\text{mol}/\text{m}^2$ )	pH5、塩なしにおける平均粒子サイズ直径(nm)	pH5、塩なしにおける標準偏差(nm)	pH7. 4、0. 135M NaClにおける平均粒子サイズ直径(nm)	pH7. 4、0. 135M NaClにおける標準偏差(nm)	pH7. 4、0. 135M NaClにおける安定コロイド
C-5	10	26	14	2300	1640	No
I-6	20	23	10	29	12	Yes
I-7	30	26	9	22	12	Yes

#### 【0070】

表3のデータが示すように、生理的条件下における本発明のコア・シェル型ナノ粒子状キャリアの安定化は、これらのシェル粒子に関して、生理的条件下で安定なコア・シェル型粒子を製造するためには、シリカ表面積1 $\text{m}^2$ 当たり10  $\mu$  モルを上回るシェル形成率が望ましいことを明らかにする。

#### 【0071】

比較例(C-6)：速度約2000 rpmのプロペラ状の攪拌器を用いて攪拌された蒸留水200 mlを含有する1.0 L容器内に、10 %(w/w)のシリカ・コロイド・コア粒子200 g(Nalco (商標) 1140-15 nm)を速度20.00 ml/分で、そして、ポリエチレンイミン(PEI, MW = 10,000 g/モル)の10 %(w/w)溶液17.2 gを速度3.1 ml/分で、それぞれ約10分間にわたって同時に添加した。pH 5.0又はその近くに維持されたpHを保つのに十分な速度で、硝酸の1.0 N溶液も同時に添加した。較正された蠕動ポンプを使用して、添加速度を制御した。速度は、シリカの表面積に対するPEIの比を一定の18  $\mu$  モル・モノマー/ $\text{m}^2$ で維持するように設定した。シリカ粒子の表面積は200  $\text{m}^2/\text{g}$ であるものとみなした。結果として生じたコロイドは、



24 nmの粒子サイズ、狭い分布幅を有し、そして数カ月にはわたってコロイド安定であった。

【 0 0 7 2 】

発明例(I-8)：例I-8のポリアミン改質粒子を、1.0N NaOHを添加することにより、pH 7.0に調節した。

【 0 0 7 3 】

発明例(I-9)：例I-8のポリアミン改質粒子を、1.0N NaOHを添加することにより、pH 9.0に調節した。

【 0 0 7 4 】

発明例(C-7)：例I-10のポリアミン改質粒子を、1.0N HNO<sub>3</sub>を添加することにより調節して、pH 5.0に戻した。

【 0 0 7 5 】

発明例(I-10)：例C-7のポリアミン改質粒子を、1.0N HNO<sub>3</sub>を添加することにより調節して、pH 7.0に戻した。

【 0 0 7 6 】

発明例(I-11)：例C-7のポリアミン改質粒子を、1.8 % BVSM溶液を速度1.25 ml / 分で添加することによりpH 9.0で架橋した。PEIポリマー1モル当たりのBVSMの比は、8:1(モル:モル)であった。

【 0 0 7 7 】

発明例(I-12)：例I-11のポリアミン改質粒子を、1.0N HNO<sub>3</sub>を添加することにより、pH 7.0に調節した。

【 0 0 7 8 】

発明例(I-13)：例I-11のポリアミン改質粒子をpH 7.4に調節した。NaClを添加することにより、濃度を137 mMにし、そして試料をPBS緩衝剤で1:1に希釈した。

【 0 0 7 9 】

これらの例において吸着されたポリマーのパーセンテージを上記のように測定し、これを表4に報告する。

【 0 0 8 0 】

【 表 4 】

表 4

例又は比較例	測定pH	ポリアミン吸着率%	所見
C-6	5.0	33	33%のみ吸着
I-8	7.0	56	
I-9	9.0	78	
C-7	5.0	40	試料I-9を再調節してpH 5に戻す
I-10	7.0	56	試料C-7を再調節してpH 7に戻す
I-11	9.0	78	pH9.0で架橋
I-12	7.0	70	試料I-11を再調節してpH 7に戻す
I-13	7.4	75	試料I-11をpH7.4に再調節し、PBS緩衝剤で1:1に希釈する

【 0 0 8 1 】

表4のデータは、pHが高くなるにつれて、吸着されたポリアミンの量が増大する(そしてpHが低くなるにつれて吸収されたポリアミンの量は減少する)ことを示す。C-6からI-9を参照されたい。しかし、表1に示されているように、狭い粒子サイズ分布を有する安定なコロイドは、高いpH値で直接に得ることはできず、約6.0又は7.0を下回るpHでだけ得るこ

とができる。このデータは、高いポリマー吸着率を有するとともに優れたコロイド安定性をも有するポリアミン改質型コア・シェル型コロイドを直接に同時に集成することの難しさを示している。さらに、コロイドのpHを集成後に調節すると、ポリアミン吸着率は高まるが、しかし、pHを調節してより低い値にもどすと、ポリアミンは脱離する。例C-7及びI-10を参照されたい。その代わりとして、我々は方法の最適化を示す。この最適化において、低pHで集成され、続いて高pHで架橋されたポリアミン改質型ナノ粒子は、生理学的pHに調節し戻されたときに吸着されたままとなるような高度のポリアミン吸着率を有し、そして生理学的条件I-12及びI-13において安定なコロイドである。

【0082】

#### ナノ粒子のペギル化

例5(I-5)から得られたコア・シェル型ナノ粒子状キャリアを、メトキシPEGプロピオン酸の種々の量のスクシニミジルエステル(mPEG-NHS、Nektar Molecule Engineering)を含有するPBS緩衝剤溶液に、表5に示すように総量10 mLで液滴状に添加した。ゼータ電位の絶対値も報告する。

【0083】

【表5】

表5

試料I. D.	mPEG-MHS (mg)	緩衝剤 (mL)	ナノ粒子I-5 (mL)	ゼータ電位
1	10	8.5	1.5	8.1
2	20	8.5	1.5	6.8
3	40	8.5	1.5	7.1
4	80	8.5	1.5	5.6
5	120	8.5	1.5	4.8
6	160	8.5	1.5	5.4
7	0	8.5	1.5	29.3

【0084】

各試料を3時間にわたって室温で攪拌し、次いで、pHを4.0までHCLで調節した。データは、コア・シェル型ナノ粒子状キャリア試料1-6が全て成功裡にペギル化されていることを示す。

【0085】

#### ペギル化ナノ粒子キャリア上への色素の結合

A. フルオレセイン-5-イソチオシアネート(分子プローブ)2.5 mgを計り分け、これをペギル化ナノ粒子10 mLに添加する(表4の試料ID 3)。溶液を3時間にわたって攪拌させておき、続いて、PBS緩衝剤中でYM30(Millipore)セントリプレップ・フィルターを通して粒子溶液を濃縮し、濾過溶液が透明になるまで繰り返す。結果として生じた粒子溶液を、PBS緩衝剤で10 mLにした。PBS緩衝剤中のフルオレセイン-5-イソチオシアネートと、ナノ粒子に結合されたフルオレセイン-5-イソチオシアネートとの吸収スペクトルを比較すると、フルオレセイン色素が本発明のキャリアに成功裡に結合されることが明らかである。

【0086】

B. cy7色素(Amersham)のスクシニミジルエステル1 mgを計り分け、これを上記表4の10 mLのペギル化ナノ粒子ID試料3に添加する(表4の試料ID 3)。溶液を3時間にわたって攪拌させておき、続いて、PBS緩衝剤中でYM30(Millipore)セントリプレップ・フィルターを通して粒子溶液を濃縮し、濾過溶液が透明になるまで繰り返す。結果として生じた粒子溶液を、PBS緩衝剤で10 mLにした。吸収スペクトルを比較すると、やはりこの場合も、色素と本発明のキャリアとの結合が明らかである。

## 【 0 0 8 7 】

ペギル化ナノ粒子キャリア上へのビオチンの結合

ビオチン-PEG-NHS、MW 5000 Da(Nektar Molecule Engineering) 10 mg、及びメトキシPEGプロピオン酸のスクシニミジルエステル、MW5000 Da(Nektar Molecule Engineering) 40 mgを計り分け、両化合物を総容積10 mLのPBS緩衝剤中に溶解する。発明例4 (I-4)の1.5 mLのナノ粒子基質を、上記溶液に液滴状に添加した。混合物を3時間にわたって室温で攪拌した。ナノ粒子基質に対するビオチンの結合を、フルオレセイン標識付きアビジンを用いた結合アッセイによって検証する。

## 【 0 0 8 8 】

カプセル封入された蛍光色素を有する粒子の調製

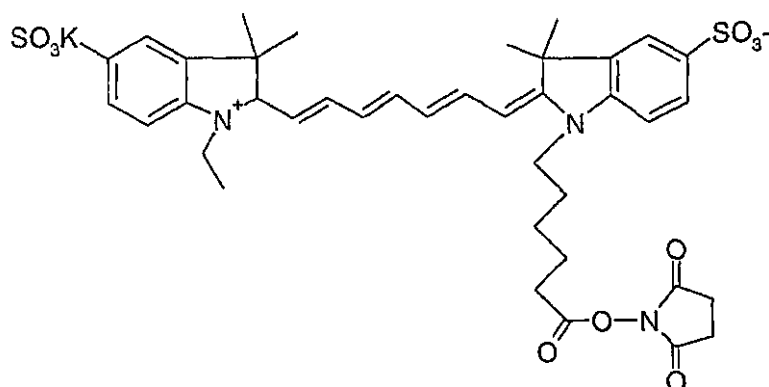
Stober(W. Stober, A. Fink、及びE. Bohn, J. Colloid Interface Sci. 26, 62 (1968)); N.A.M. Verhaegh及びA. van Blaaderen, Langmuir 10, 1427(1994))によって記載された方法を改変することにより、シリカ粒子を調製した。テトラエチルオルトシラン(TEOS)及び3-アミノプロピルトリエトキシシランを、Sigma Aldrichから購入した。ポリエチレンイミンをAldrich Chemicalsから購入し、これは平均MW = 10,000 g/モル、ポリマー1モル当たり233 モノマーである。ポリエチレンイミン(以後「PEI」)のモノマー分子量は、43.0 g/モルであるものとみなした。BVSMは、Eastman Kodak 社から得られたビス-エテン、1,1'-[メチレンビス(スルホニル)]であった。137 mMのNaCl(8 g)、2.7 mMのKCl(0.2 g)、10 mMのNa<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>(1.44 g)、2 mMのKH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>(0.24 g)を1.0 L蒸留水中に溶解することにより、PBS(リン酸緩衝剤システム)緩衝剤を調製した。メトキシポリ(エチレン)グリコールプロピオン酸のスクシニミジルエステル、MW = 5,000 g/モル(以後mPEG-NHSと呼ぶ)を、Nektar Molecule Engineering、カタログ番号m-spa-5000から購入した。蛍光色素、フルオレセイン5(6)-イソチオシアネート、及びテトラメチルローダミン-イソチオシアネートをSigma-Aldrich社から購入した。

## 【 0 0 8 9 】

近赤外フルオロフォアCY7(分子量 = 817 g/モル)をAmersham Inc.から購入した。これは次の化学構造を有した。

## 【 0 0 9 0 】

## 【 化 1 】



## 【 0 0 9 1 】

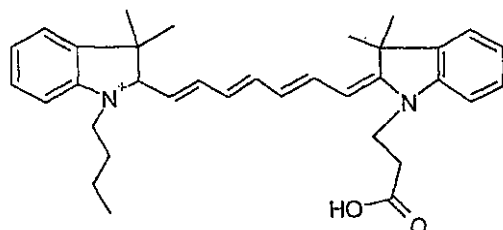
近赤外蛍光NIR-2の合成

室温の無水ピリジン(20 mL)中に前駆体-1(1.3g、2 ミリモル)のヨウ化物塩を含有する色素の溶液に、1-(3-ジメチルアミノプロピル)-3-エチルカルボジイミドヒドロクロリド(0.8 g、4.1 ミリモル)と、3-アミノプロピルトリエトキシシラン(1.32 g、6 ミリモル)とを添加した。結果として得られた混合物を、出発材料が消費されるまで(TLCによってモ

ニタリング)、窒素下で撹拌した。次いで、混合物を無水エーテル(100 ml)で希釈し、生成物を粘着性半固形材料として析出させた。これをさらに、溶離液として(10:1)酢酸エチル/メタノールを使用したシリカゲル・クロマトグラフによって精製した。

【 0 0 9 2 】

【化 2】

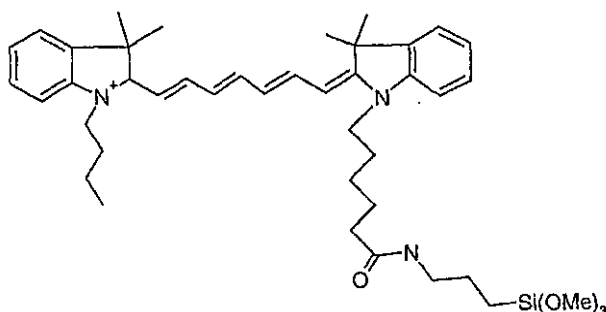


前駆体-1

10

【 0 0 9 3 】

【化 3】



NIR-2

20

30

【 0 0 9 4 】

#### 蛍光測定

Spex Fluorolog-2機器上の直角検出を用いて、全ての蛍光測定を同一の機器設定値及び励起波長683 nmで実施した。ピーク蛍光波長(ほぼ770 nm、ただし試料間で数nmだけ変化する)で蛍光強度値を測定し、そしてこの蛍光強度値は、同じ条件下で(1-cmのセル又は1-mmのセルを使用、セルは、励起光ビーム方向に対して-45度を成すように配向される)得られたCy7の4.9 クアドラチュア M水溶液から測定された値に対して記載される。また、基準溶液に対する種々異なる試料の分別吸収測定値の差に関して値を補正する。分別吸収は1-10-Aと定義される。Aは、励起波長における吸光度である。

40

【 0 0 9 5 】

#### 近赤外蛍光ナノ粒子：

カプセル封入された例1(E-1)。500.0 mLの無水エタノール中に3.1 mgのCY7を溶解することにより、A色素溶液(1)を調製した。次いで、この溶液の200.0 mLアリコートに、3-アミノプロピルトリエトキシシラン0.102 mLを添加し、そして混合物を一晩にわたって暗所で撹拌させておいた。次いで反応混合物を55 に加熱し、次いで、粒子の成長に影響を与えるために、7.62 mLのTEOS、6.40 mLのアンモニア(水中28%)、及び6.0 mLの蒸留水を添加した。反応混合物を4時間にわたってこの温度で撹拌し、そして20 まで冷却した。次

50

いで、冷却された反応混合物を100.0 gの蒸留水に添加し、そしてエタノールの一部を回転蒸発により除去した。シリカ粒子の体積加重平均粒子サイズ直径は、23 nmであり、標準偏差は6 nmであった。シリカ粒子中の色素(CY7)の内蔵範囲を測定するために、分子量カットオフ30,000 g/モルを有するセントリプレップ・フィルター膜を通して懸濁液を遠心分離し、そして上澄み(フィルターを通過する)の光吸着スペクトルを、懸濁液の光吸着と比較した。この分析は、公称CY7の46 %が、シリカ粒子内に内蔵されることを示した。次いでコロイド懸濁液を暗所内で3日間にわたって蒸留水に対して透析することにより、内蔵されていないCY7を除去した。

【0096】

E-2：粒子の成長に影響を与えるために12.0 mLの蒸留水を添加したこと以外は、E-1と同様に実施した。体積加重平均粒子サイズ直径、及び色素内蔵率を表6に示す。

10

【0097】

E-3：500.0 mLの無水エタノール中に6.0 mgのCY7を溶解することによりA色素溶液(I)を調製したこと以外は、E-1と同様に実施した。体積加重平均粒子サイズ直径、及び色素内蔵率パーセントを表6に示す。

【0098】

E-4：粒子の成長に影響を与えるために12.0 mLの蒸留水を添加したこと以外は、E-3と同様に実施した。体積加重平均粒子サイズ直径、及び色素内蔵率パーセントを表6に示す。

20

【0099】

E-5：500.0 mLの無水エタノール中に11.9 mgのCY7を溶解することによりA色素溶液(I)を調製したこと以外は、E-1と同様に実施した。体積加重平均粒子サイズ直径、及び色素内蔵率パーセントを表6に示す。

【0100】

E-6：粒子の成長に影響を与えるために12.0 mLの蒸留水を添加したこと以外は、E-5と同様に実施した。体積加重平均粒子サイズ直径、及び色素内蔵率パーセントを表6に示す。

【0101】

【表6】

30

表6

例	濃度CY7 ( $\mu$ M)	平均粒子 サイズ直径 (nm)	標準偏差 (nm)	CY7内蔵率 %	蛍光性
E-1	7.5	23	6	46	2.35
E-2	7.5	94	22	46	1.40
E-3	14.7	25	7	52	1.28
E-4	14.7	63	16	46	0.94
E-5	29.1	34	17	43	0.63
E-6	29.1	101	15	44	0.42
(CY7)	4.9				1.00

40

【0102】

表6のデータは、近赤外発光色素CY7をシリカ・ナノ粒子内にカプセル封入することができること、そして粒子が高ルミネッセンス性であり、770 nmを中心とした強い発光を伴うことを示す。データはまた、カプセル封入された色素がしばしば、水溶液中の遊離CY7である対照試料よりも高発光性であることを示す。

50

## 【 0 1 0 3 】

E-7: 500.0 mLの無水エタノール中に10.1 mgのNIR-2を溶解することにより、A色素溶液(II)を調製した。次いで、色素溶液(200.0 mL)を55℃に加熱し、そして粒子の成長に影響を与えるために、これに7.62 mLのTEOS、6.40 mLのアンモニア(水中28 %)、及び12.0 mLの蒸留水を添加した。反応混合物を4時間にわたってこの温度で攪拌し、そして20℃まで冷却した。次いで、冷却された反応混合物を100.0 gの蒸留水に添加し、そしてエタノールの一部を回転蒸発により除去した。シリカ粒子の体積加重平均粒子サイズ直径は、28 nmであり、標準偏差は8 nmであった。シリカ粒子中の色素(CY7)の内蔵範囲を測定するために、分子量カットオフ30,000 g/モルを有するセントリプレップ・フィルター膜を通して懸濁液を遠心分離し、そして上澄み(フィルターを通過する部分)の光吸着スペクトルを、元の懸濁液の光吸着と比較した。この分析は、公称NIR-2の100 %がシリカ粒子内に内蔵されることを示した。

10

## 【 0 1 0 4 】

蛍光ナノ粒子の調製:

使用される色素又はフルオロフォアがフルオロセイン5(6)-イソチオシアネートであること以外は、カプセル封入された蛍光色素を有するナノ粒子を、例E-1とそのまま類似した形式で調製した。

## 【 0 1 0 5 】

使用される色素又はフルオロフォアがテトラメチルローダミン-イソチオシアネートであること以外は、カプセル封入された蛍光色素を有するナノ粒子を、例E-1とそのまま類似した形式で調製した。

20

## 【 0 1 0 6 】

アミノ化近赤外蛍光ナノ粒子の調製

E-8: 固形分濃度2.0 重量%の、上記例E-7から得られた近赤外蛍光ナノ粒子の懸濁液(38.0 g)の一部を、pH 5.0に調節しておいたPEIの1.0 %溶液10.0 gにゆっくり添加した。添加後、0.25 N NaOH 4.66 gを添加することによってpHを8.90に調節し、続いて、粒子表面におけるPEIを架橋するために、BVSMの1.8 %溶液0.44 gを添加した。懸濁液を室温で4時間にわたって攪拌させておいた。その結果生じる懸濁液は、幾週間にもわたってコロイド安定であり、濁度が存在しないことは、微細に分散されたナノ粒子の懸濁液であることを示した。

30

## 【 0 1 0 7 】

アミノ化近赤外蛍光ナノ粒子のペギル化

E-9: 上記例E-8から得られたアミノ化近赤外蛍光ナノ粒子の4.0 g部分を、69 µLの0.25 N HNO<sub>3</sub>を添加することによりpH = 7.4に調節し、次いでPBS緩衝剤で希釈して総重量8.0 gにした。次いで、固形mPEG-NHS 0.454 gを懸濁液中に溶解し、そして混合物を室温で一晩にわたって攪拌させておいた。次いで、懸濁液を8500 rpmで2時間にわたって遠心分離し、そして上澄みを固形分から分離した。遠心分離を一度繰り返し、そして固形分を5.0 gのPBS緩衝剤中に再分散させた。再分散された粒子の体積加重平均粒子サイズ直径は、43 nmであり、標準偏差は12 nmであった。透過型電子顕微鏡分析は、微細に分散されたナノ粒子の懸濁液を示した。蛍光分光法は、683 nmにおける励起時に760 nmのピーク発光を伴う、250,000カウントの強い蛍光を示した。これらの結果は、カプセル封入された近赤外フルオロフォアを有し、しかも、保護ポリ(エチレン)グリコール鎖をさらに含有するポリアミン・シェルを有するコア粒子を明らかにする。分散体は生理学的条件下でコロイド安定であり、そして高蛍光性である。

40

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/US2006/001332

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>				
INV. C08K9/00	C08K9/08	C08K9/10	C08K9/12	B01J13/00
B01J13/02	B01J13/04	G01N33/58	A61K9/00	C08J7/00
C03C17/00				
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC				
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>				
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)				
C08K B01J G01N A61K C08J C03C				
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched				
Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used)				
EPO-Internal, WPI Data, PAJ				
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>				
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages			Relevant to claim No.
X	EP 1 013 605 A (TOKUYAMA CORPORATION) 28 June 2000 (2000-06-28) paragraphs [0001] - [0045]; claims 1-20; examples			1-20
X	US 2003/124194 A1 (GAW DEBRA A ET AL) 3 July 2003 (2003-07-03) paragraphs [0001] - [0078]; claims 1-21; examples 1-4			1-20
X	WO 02/087750 A (GUGGENBICHLER, PETER; HIRSCH, ANDREAS; GUENTHER, ERHARD; KAMIETH, MARK) 7 November 2002 (2002-11-07) page 1, line 9 - page 15, line 18; claims 1-37; examples 1-17			1-20
	----- -/-			
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.				
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the International filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the International filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the International filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "&" document member of the same patent family				
Date of the actual completion of the International search			Date of mailing of the International search report	
18 May 2006			26/05/2006	
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016			Authorized officer  Kiebooms, R	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/US2006/001332

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X,P	US 2005/192381 A1 (BRINGLEY JOSEPH F ET AL) 1 September 2005 (2005-09-01) the whole document	1-20



**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No

PCT/US2006/001332

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 1013605	A	28-06-2000	CA 2293087 A1	24-06-2000
			DE 69907382 D1	05-06-2003
			DE 69907382 T2	20-11-2003
			KR 2000048167 A	25-07-2000
			TW 458944 B	11-10-2001
			US 6417264 B1	09-07-2002
US 2003124194	A1	03-07-2003	NONE	
WO 02087750	A	07-11-2002	DE 10120802 A1	31-10-2002
			JP 2004526566 T	02-09-2004
US 2005192381	A1	01-09-2005	US 2005186337 A1	25-08-2005
			US 2005014851 A1	20-01-2005
			WO 2005009603 A1	03-02-2005

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 47/34	(2006.01)	A 6 1 K 47/34	
A 6 1 K 47/42	(2006.01)	A 6 1 K 47/42	
A 6 1 K 47/36	(2006.01)	A 6 1 K 47/36	
C 0 8 L 101/02	(2006.01)	C 0 8 L 101/02	
C 0 8 K 3/36	(2006.01)	C 0 8 K 3/36	
C 0 8 K 9/10	(2006.01)	C 0 8 K 9/10	
C 0 9 C 1/28	(2006.01)	C 0 9 C 1/28	
C 0 9 C 3/10	(2006.01)	C 0 9 C 3/10	

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(72)発明者 プリングリー, ジョセフ フランシス  
アメリカ合衆国, ニューヨーク 1 4 6 1 2, ロチェスター, ブロンズ リーフ トレイル 8 7  
(72)発明者 チャオ, ティエチェン アレックス  
アメリカ合衆国, ニューヨーク 1 4 5 8 0, ウェブスター, セージブルック ウェイ 1 2 4 0  
(72)発明者 ハーダー, ジョン ウィリアム  
アメリカ合衆国, ニューヨーク 1 4 6 0 6, ロチェスター, タリークレスト レーン 6  
(72)発明者 ウンダー, アンドリュー  
アメリカ合衆国, ニューヨーク 1 4 4 8 9, ライオンズ, ルート 1 4 3 2 0 0  
(72)発明者 ヒューイット, ジェイムズ エム.  
アメリカ合衆国, ニューヨーク 1 4 4 5 0, フェアポート, ブルム ロード 1 6 7

F ターム(参考) 2G054 CE02 EA03 GA04 GB02  
4C076 AA65 BB11 CC50 DD29A EE13H EE37H EE38H EE41H FF36  
4J002 AB051 AD001 AD011 BE021 BJ001 CL021 CM011 DJ016 EU027 EV237  
EX077 FB287 FD097  
4J037 AA08 AA10 AA11 AA18 AA22 AA25 CC11 CC15 CC29 DD05  
EE03 EE06 FF15 FF23