

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5313249号
(P5313249)

(45) 発行日 平成25年10月9日(2013.10.9)

(24) 登録日 平成25年7月12日(2013.7.12)

(51) Int.Cl.

G01N 21/64 (2006.01)

F 1

G01N 21/64

F

請求項の数 3 (全 27 頁)

(21) 出願番号 特願2010-524002 (P2010-524002)
 (86) (22) 出願日 平成20年9月2日 (2008.9.2)
 (65) 公表番号 特表2010-538298 (P2010-538298A)
 (43) 公表日 平成22年12月9日 (2010.12.9)
 (86) 國際出願番号 PCT/US2008/010305
 (87) 國際公開番号 WO2009/032236
 (87) 國際公開日 平成21年3月12日 (2009.3.12)
 審査請求日 平成23年2月16日 (2011.2.16)
 (31) 優先権主張番号 60/970,617
 (32) 優先日 平成19年9月7日 (2007.9.7)
 (33) 優先権主張国 米国(US)
 (31) 優先権主張番号 12/201,190
 (32) 優先日 平成20年8月29日 (2008.8.29)
 (33) 優先権主張国 米国(US)

(73) 特許権者 507224587
 ケアストリーム ヘルス インク
 アメリカ合衆国 ニューヨーク ロヂエス
 ター ペローナ ストリート 150
 (74) 代理人 100075258
 弁理士 吉田 研二
 (74) 代理人 100096976
 弁理士 石田 純
 (72) 発明者 パピネニ ラオ
 アメリカ合衆国 コネチカット ブランフ
 オード モントヤ サークル 22 アパ
 ートメント 22エムシー
 (72) 発明者 ハーダー ジョン ダブリュ
 アメリカ合衆国 ニューヨーク ロヂエス
 ター タリークレスト レーン 6
 最終頁に続く

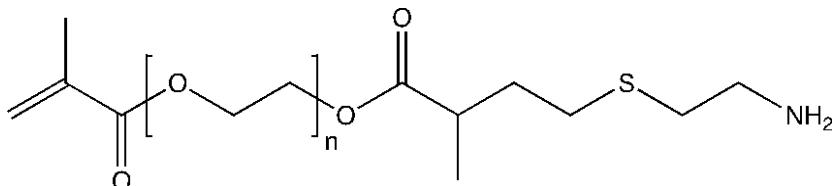
(54) 【発明の名称】ナノ粒子を用いた蛍光共鳴エネルギー移動検出

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

試料中の生体分子の近接性を可視化するための方法であって、
 前記試料を、FRET粒子ペアで処理する工程であって、
 これにおいて、前記FRET粒子ペアは、各々が、式I：

【化1】



式I

[式中、nは、10～200である]

のモノマーを含んでなる、30～50重量パーセントの架橋ポリマを包含する、2つ以上の蛍光粒子を包含し、

前記蛍光粒子の少なくとも一方は、エネルギードナー色素を包含し、かつ、前記蛍光粒子の少なくとも1つの別の蛍光粒子がエネルギーアクセプタ色素を包含し、

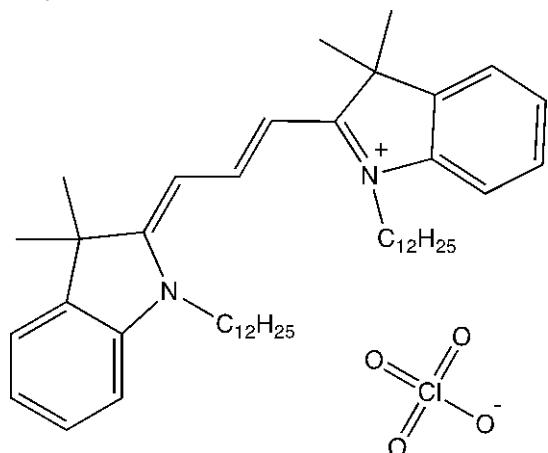
各蛍光粒子は、外表面に共有結合された1つ以上の標的化成分を包含している工程と、
 前記試料を、光源に暴露し、放出される光を、検出器を用いてレコードする工程と、

を含んでなる方法。

【請求項 2】

前記粒子が、

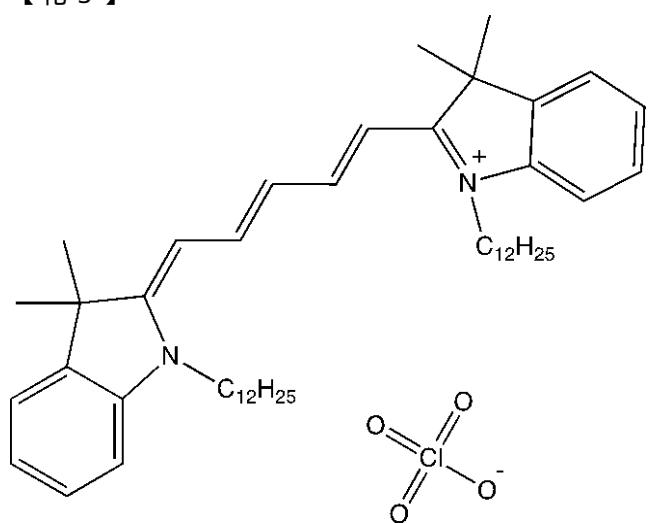
【化 2】



10

色素 1

【化 3】

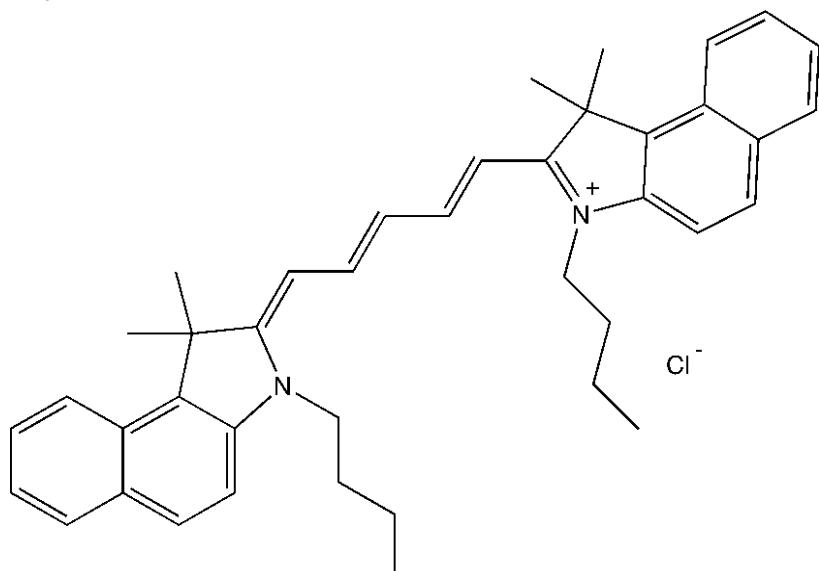


20

30

色素 2

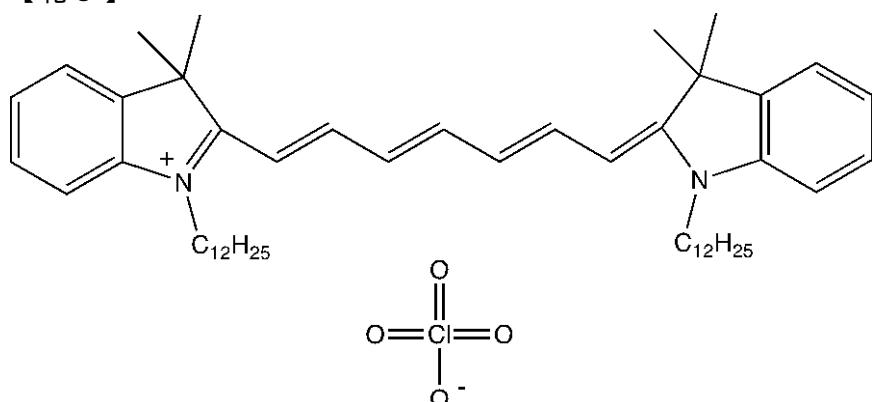
【化4】



10

色素3

【化5】



20

30

色素4

からなる群より選択される少なくとも1つの色素を包含する、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

前記FRET粒子ペアが、約550nmと650nm、650nmと690nm、690nmと760nm、又は650nmと760nmの最大吸収を包含する、請求項1に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

40

本発明は、全般的に、FRET検出、特に近赤外FRET(NIRF)検出において使用するための、適当な励起及び発光スペクトルを有する色素を担持された、異なるナノ粒子間の蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)に関する。さらに具体的には、本発明は、新規な粒子の調製と、かかる粒子間のFRETによる生物学的相互作用の検出法又は可視化法、及び生体分子の近接性を測定するための生体分子標的化成分(biomolecule targeting moieties)の使用に関する。

【背景技術】

【0002】

光学的なマイクロタイプレートの読み取り及び光学的分子イメージングといった、光学をベースとする生体分子アッセイ技術は、特定の生体分子の時間的及び空間的動態、

50

及びそれらの相互作用を、インビトロ及びインビボでリアルタイムに研究するための、非常に強力な道具である。これらの技術は、タンパク質機能及び遺伝子発現を探求するために、ますます使用されるようになってきた。光学をベースとする技術は、機能イメージング、サブミクロン空間分解能における重要事項として、インビボ顕微鏡、単一分子感度、及び最小限の侵襲のための重要事項として、ピコ秒の時間分解能という大きな利点を示す。これらの技術はまた、分子イメージングにおける重要事項として、多数の、かつ識別可能なプローブを同時に使用する可能性を提供する。それらはまた、電離放射線を不要化するという点において、安全性も提供する。これらの技術は、レーザ技術、高性能再構築アルゴリズム、及びイメージングソフトウェア（元来は非光学的なCT及びMRIといった断層イメージングモード用に開発された）における迅速な開発により、過去10年間にわたり進歩してきた。

【0003】

今日までに開発された様々な光学イメージング技術のうち、近赤外蛍光（NIRF）イメージングが非侵襲性のインビボイメージングとして特に興味を持たれているのは、比較的低い組織吸収、比較的低い組織吸収による最小限の侵襲性のインビボイメージング、最小限の近赤外（NIR）光の自己蛍光、及び6~8センチメートルまでの深い組織透過性の故である。近赤外蛍光イメージングでは、蛍光励起光源として、レーザ又は適切にフィルタされた光が使用される。励起光は、身体の組織を通して進行する。それが近赤外蛍光分子（「コントラスト剤」又は「プローブ」）に出会うと、励起光が吸収される。蛍光分子は次に、光を、より波長の長い、かつそれ故に励起光からスペクトル的に識別可能な蛍光として放出する。近赤外光による生体組織の良好な透過にもかかわらず、従来の近赤外蛍光プローブは、低いシグナル対ノイズ比を含め、他のコントラスト剤が直面するのと同様の多くの制限下にある。

【0004】

数多くのNIRコントラスト増強光学イメージングプローブが開発され、かつ小動物において評価してきた。これらの研究は、診断、分子キャラクタリゼーション、及び多くの疾患モデルの治療応答のモニタリングにおける、近赤外光学イメージングの使用を確立してきた。ナノ粒子は、薬剤担体及びイメージング剤といった、広範囲の生物医学的応用において、ますます使用されるようになった。それらは、典型的には100nm未満の大きさの工学された物質であり、身体中の殆どどこへでも到達するのに充分に小さく、様々な標的化リガンド、多様な様相のイメージングのための多様なイメージング成分と共に、容易に送達可能であり、或いは、コントラスト剤の多様な分子を担持されて、様々な画像装置のためのシグナル強度に有意なブーストを提供することができる。ナノ粒子イメージングプローブをベースとするNIRイメージングは、非侵襲性の癌検出、診断、及び治療応用のための先進技術として、急速に新興しつつある。インビボでは小さいプローブが、低分子の内部クリアランスと、免疫学的に遮蔽されていない化合物の網内系クリアランスとを受けて、急速に排出されることから、ナノ粒子ベースのイメージングプローブは、低分子又は低分子量ポリマベースのプローブに、有効な腫瘍送達のための長い循環時間のような、潜在的な利点を与える。いくつかの報告は、動物の癌イメージングにおけるNIR光学イメージング用の、新規ポリマ又は脂質ベースの層内に被包された、半導体コアからなる量子ドット（QD）を特徴してきた（非特許文献1）。しかしながら、殆どのQDは、カドミウムのような毒性の物質から製造されており、QDが体内で毒性化するのを回避するために充分に安定であることはまだ確立されていない。スマートなナノプローブの設計及び合成は、NIRイメージングを成功させることを可能とするものである。

【0005】

蛍光共鳴エネルギー移動（FRET）検出の原理は、空間的に近接して置かれている、励起されたドナー色素分子からアクセプタ色素分子への、エネルギーの移動に基づいている。エネルギー移動の効率Eは、ドナーとアクセプタとの間の距離Rに非常に影響され、かつ、 $R_0^{-6} / (R_0^{-6} + R^{-6})$ [式中、 R_0 は、効率が50%である距離として定義される、

10

20

30

40

50

物質固有のフェルスター半径であり、かつ典型的には数ナノメートル(10 nm未満)の範囲内にある]に比例して減少することから、FRETを使用して、約1~8 nmの範囲の分子レベルで、距離を測定することができる。アクセプタ分子の蛍光量子効率に依存して、ドナー分子からアクセプタ分子へ移動したエネルギーは、内部変換により非放射緩和を受けることができ、それによりドナーエネルギーのクエンチングをもたらすか、又は、アクセプタ分子の蛍光によって発光することができる。本明細書の以下の部分では、(a) FRETのためのドナー及びアクセプタとして作用し得る、異なる分子のペアは、「FRET色素ペア」と呼ばれ、また(b)異なるナノ粒子のペアは、FRET可能なドナー分子を包含する1つのナノ粒子と、第2の、別の、FRET可能なアクセプタ分子を包含する別のナノ粒子とを含んでなり、異なるナノ粒子のペアは、「FRET-粒子ペア」と呼ばれる。

【0006】

生体系では、FRETを使用して、適当に標識された生体分子の、相互の空間的近接性が検出される。FRETは、タンパク質-タンパク質相互作用を検出するための方法として、例えば、抗原-抗体反応、受容体-リガンド相互作用、核酸ハイブリダイゼーション、ホルモン-受容体相互作用、又は核酸へのタンパク質の結合作用を検出するための方法として、使用することができる。検出自体は、ドナーの蛍光又はアクセプタの蛍光における、強度の変化又はスペクトル変化を測定することによるか、或いはドナー蛍光の減衰時間の変化を測定することによって行われる。この点に関しては、免役蛍光アッセイにおける特異抗原の検出のような数多くの応用が、文献に記載されている(特許文献1~4)。

【0007】

例えば、フルオレセイン、水溶性シアニン、又はローダミンといった、標識として用いられかつ生体分子に結合する有機色素分子は、FRET色素ペアを作製するための古典的な市販物質である。これらの有機蛍光色素の一般的な短所は、多くの適用にとって不適切な光安定性をしばしば示すことである。特に、酸素又はフリーラジカルの存在下では、これらの色素のあるものは、わずか数ミリオンの光吸收/光放出サイクルの後に、不可逆的に損傷又は破壊され得る。また、ある蛍光色素は、生体物質に対し、その近傍において毒性作用をもつ可能性がある。さらに、標識として使用される蛍光色素は、しばしば血中循環時間が非常に短く、そのことにより、時間をかけて起こる生物学的相互作用の研究用には不向きとされている。

【0008】

特許文献5~7は、同じナノ粒子中にFRET色素ペアをもつ、ナノ粒子の使用法を記載している。これらの方法の目的は、励起波長と発光波長との間の、大きい正味の差(すなわち、ストークシフト)をもつ粒子を提供して、蛍光測定の利点であるシグナル対バックグラウンド値を改善することであり、ここでバックグラウンドは、典型的には比較的小さいストークシフトをもつ自己蛍光に起因する。しかしながら、FRETは、同一の粒子内では一定であり、例えば、一方の粒子が1つの生体分子に結合し、他方の粒子が別の生体分子に結合している、2つの異なる粒子間の近接性には何らの指標も提供しない。それ故、これらの参考文献は、FRET色素ペアを含むが、FRET粒子ペアを含まない粒子を記載している。

【0009】

かかる方法は、その特定の適用においてある程度の成功を遂げているが、FRET粒子ペアを含んでなる、離れた異なる高輝度蛍光ナノ粒子が、生体分子を標的化することにより近接して集められ、かつ検出される方法が必要とされたままである。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0010】

【特許文献1】米国特許第3,996,345号明細書

【特許文献2】米国特許第4,160,016号明細書

【特許文献3】米国特許第4,174,384号明細書

10

20

30

40

50

【特許文献4】米国特許第4,199,559号明細書

【特許文献5】米国特許第5,236,692号明細書

【特許文献6】米国特許第6,238,931号明細書

【特許文献7】米国特許第6,251,687号明細書

【非特許文献】

【0011】

【非特許文献1】ワレン(Warren, C. W.)ら、Science、1998年、
第281巻、p. 2016-2018

【発明の概要】

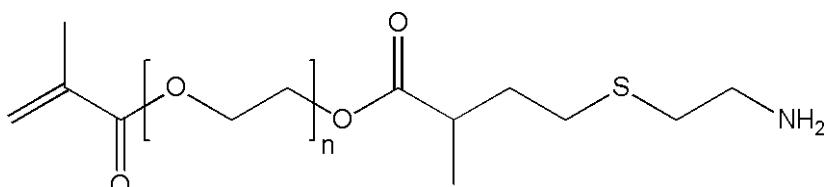
【課題を解決するための手段】

10

【0012】

本発明は、添付のクレームによって定義される。本発明の1つの態様によれば、試料中の生体分子の近接性を可視化するための方法が提供される。試料は、各々が、式I：

【化1】



20

式I

[式中、nは、10～200である]のモノマを含んでなる、30～50重量パーセントの架橋ポリマを包含する、2つ以上の蛍光粒子を包含するタイプのFRET粒子ペアで処理される。一方の蛍光粒子は、エネルギードナー分子を包含し、別の蛍光粒子がエネルギーアクセプタ分子を包含する。各蛍光粒子は、外表面に共有結合された1つ以上の標的化成分(targeting moieties)を包含する。試料を、光源に暴露し、FRET粒子ペアから放出される光を、例えば光半導体、光電子増倍管、又はデジタルカメラにより検出する。

【0013】

本発明の上記の、及び他の目的、特徴、及び利益は、添付の図に例示される、本発明の実施態様についての以下のさらに詳細な記載から明らかであろう。図の要素は、互いの相対スケールを必ずしも表さない。

30

【図面の簡単な説明】

【0014】

【図1】色素を担持されたナノ粒子の吸収曲線を示す図であり、これらの粒子のペアを用いて、粒子Aと粒子B、粒子Bと粒子C、粒子Bと粒子D、粒子Cと粒子Dから、FRET粒子ペアを形成した場合の、吸収におけるオーバーラップを例示する図である。

【発明を実施するための形態】

【0015】

以下は、発明の好ましい実施態様についての詳細な記載であり、同じ参照数字がいくつかの図の各々における同じ構造のエレメントを特定している図を参照している。

40

【0016】

本発明は、同じ場所に位置してFRETを受けることができる、高輝度蛍光ナノ粒子を用いて、近接した生体分子を可視化する新規な方法と、それを用いるための診断及び薬剤スクリーニング法に関する。アッセイは、生検材料、体液、血液分析、及び組織試料の医学的診断、及び、低分子、ペプチド、タンパク質、及びsiRNAの薬剤スクリーニングにとり、非常に重要である。FRET粒子ペアを本発明に従って使用して、結合アッセイ、阻害剤アッセイ、受容体-リガンド分析、細胞-相互作用物質アッセイ、ホルモン相互作用アッセイ、タンパク質-タンパク質相互作用アッセイ、脂質-相互作用アッセイ、糖タンパク質相互作用アッセイ、酵素-基質相互作用アッセイ、プロテオーム分析、ゲノム

50

分析、プロテアーゼ作用アッセイ、ユビキチンアッセイ、細胞オルガネラ分析、s i R N A分析、R N A分析、D N A分析を行うこと、及び、上記のいずれかの動態を分析することができる。

【0017】

本発明に従って使用されるナノ粒子は、本願と同一譲受人に譲渡された、レオン(Leon)らによる、2007年4月3日出願の、「LOADED LATEX OPTICAL MOLECULAR IMAGING PROBES」と題する米国特許出願第11/732,424号(この開示は、参考として本明細書に含まれる)；及び、上記記載のHarderらによる、出願番号第11/400,935号において既に記載されたような、生物学的カーゴ負荷ナノ粒子(1つ又は複数)の形態にあってもよい。かかるナノ粒子では、蛍光クエンチングは、近赤外蛍光体の自己クエンチングによるか、又は近赤外蛍光体からのクエンチャへのエネルギー移動によって引き起こされてもよく；蛍光活性化を、蛍光活性化部位における酵素的切断により誘導してもよい。

【0018】

F R E Tの検出又は測定は、イメージングシステムを必ず必要とし、これをチューニングして、精製又は構築された試料物質の単純なアッセイに対応するか、或いは複合混合物又はその両方の蛍光成分を解明するようにしてもよい。蛍光検出システムは、充分な又は最大の能力までチューニングしてもよいが、検出又は測定を支援することができる特定のF R E T粒子ペアの選択には、本発明者らにより教示される一定基準の考慮を要する。当業者は、あるF R E T分子が、もしそのペアが適切なスペクトルをもち、高輝度蛍光色素であり、かつ生産性のF R E T測定に必須の、溶液中での動的平衡を支持するものであるなら、あるレベルの検出及び測定を支援してもよいことを理解するであろう。限界まで成果をあげるF R E T測定は、蛍光シグナル/バックグラウンドの固有の制限を超えるものである。しかしながら、蛍光粒子は可溶性分子ではなく、そのサイズ、構成成分、及び溶液動態が、そのF R E T能力にとって重要である。本発明者らは、F R E T粒子ペアのための認定基準が、以下を包含することを見出した。

1. 蛍光色素励起スペクトルは、充分に非オーバーラップしていなければならない。
2. 蛍光色素共鳴スペクトルは、充分にオーバーラップしていなければならない。
3. 蛍光は、充分に強くなければならない。
4. 粒子内の蛍光色素濃度は、自己クエンチングを避けるべく充分に低くなければならない。
5. 粒子を充分に小さくして、粒子が最も近接している状態で、蛍光分子の充分な部分が近接するようにしなければならない。
6. 粒子による蛍光分子の分布は、蛍光色素の近接を充分に支持しなければならない。
7. 蛍光色素の分子の配向性は、偏光の充分な共鳴吸収を確保するべく、整列されるか、又はランダムでなければならない。
8. 粒子は、溶液中に懸濁されるべく充分に小さく、溶液動態に関与するべく充分に分散されており、「分子」近接の測定を確立するのに必要な、衝突、結合、及び解離の動的平衡の本質的な要素を支持しなければならない。
9. 粒子は、溶液動態における量的関与を支持するべく、溶液中で充分に独立していかなければならない(「可溶性」かつ非凝集性)。

【0019】

別の認定基準は、当業者により見出されてもよい。しかしながら、上記にリストされた認定基準のいずれか1つがないか、未知であるか、又は限界である場合、F R E T粒子ペアの生産能力は、粒子近接性を検出又は測定するのに必要な、シグナル/バックグラウンド閾値に合致しないことがある。それ故、F R E T粒子ペアの認定は、候補粒子ペアのための、ここに開示された発明のF R E T測定プロセスを包含する。

【0020】

F R E T粒子ペアについて、それで処理された標本又は試料にそれが関与するときの、いくつかの基準、及びそれらを検出するための測定装置が、以下に記載される。第1に、

10

20

30

40

50

FRET粒子ペアの励起及び発光波長は、標本又は試料の吸収又は蛍光に非常に密接して一致させるべきではなく、標本又は試料が実質的にFRET測定を混乱させることができないようにする。第2に、粒子は、充分な輝度をもち、かつドナー粒子の蛍光とアクセプタ粒子の吸収との、良好なオーバーラップをもつべきであり、効果的なFRETを達成して、FRET粒子を作製するようにする。第3に、粒子中に取り込まれた色素は、粒子内で分散され、粒子サイズがFRETに対する実質的な距離障壁を粒子間に生じないようにする。すなわち、粒子内の色素は、粒子内でランダムに分散されて、FRETペアにとり、いくつかの色素が、別の粒子中の色素からフェルスター距離内に位置して、効率的なFRETを達成するようにする。故に、FRETペアの第1の粒子内の色素は、少なくとも部分的に、充分に近いか、又は粒子の表面にあって、FRET粒子ペアの該粒子の色素と第2の粒子の色素との間に、効率的なFRETを達成するべく充分に小さい分離が生じるようにする。第4に、粒子は、その表面上に、同じか又は異なる生体分子標的化成分を運ぶ能力をもち、FRET粒子ペアが生体分子に近接して結合できるようにしなければならない。第5に、蛍光シグナルを検出するべく使用される装置は、一般に、色素の規格及び、可視化される標本又は試料に従って設計される。

【0021】

これらのポイントは、さらに詳細に議論されるが、FRET粒子ペアを使用した可視化技術の開発における複雑さのいくらかを例示するものである。既存の方法を用いて、FRETが個別の色素間において達成されてきているが、これによれば、生体分子標的化成分当たり1つの色素が典型的に使用される。こうした個別の色素は、酸素、フリーラジカル、及びpH変化に対する不安定性に起因する色素退色に対し、より敏感であり、しばしば種々の生物学的プロセスによって血液から迅速に除去される。色素を粒子中に取りこむことにより、多数の色素分子を使用して、輝度及び安定性を改善することができる。ナノ粒子の使用により、多数の生体分子標的化成分をナノ粒子表面に結合させて、標的部位への結合及び、標本の様々な組織内のバイオディストリビューションを改善することができる。

【0022】

本発明に有用な色素は、蛍光性、疎水性の色素であり、その蛍光は400～1000nmの範囲にある。色素のクラスは、必ずしもこれに制限されないが、オキソノール、ピリリウム、スクアリック(Squareic)、クロコニック、ロジゾニック、ポリアザインダゼン又はクマリン、シンチレーション色素(通常は、オキサゾール及びオキサジアゾール)、アリール-及びヘテロアリール置換ポリオレフィン(C₂-C₈オレフィン部分)、メロシアニン、カルボシアニン、フタロシアニン、オキサジン、カルボスチリル、ポルフィリン色素、ジピロメセンボロンジフルオリド色素、アザ-ジピロメセンボロンジフルオリド色素、及びオキサジン色素を包含する。本発明において有用な市販の蛍光色素は、表Iにリストされており、具体的な色素構造は、後続の、色素1、色素2、色素3、及び色素4についての式に示されている。好ましい色素は、カルボシアニン、フタロシアニン、又はアザ-ジピロメセンボロンジフルオリドである。

【0023】

【表1】

表I. 市販の蛍光色素

5-アミノ-9-ジエチルイミノベンゾ(a)フェノキサゾニウム過塩素酸塩	
7-アミノ-4-メチルカルボスチリル	
7-アミノ-4-メチルクマリン	
7-アミノ-4-トリフルオロメチルクマリン	
3-(2'-ベンゾイミダゾリル)-7-N,N-ジエチルアミノクマリン	10
3-(2'-ベンゾチアゾリル)-7-ジエチルアミノクマリン	
2-(4-ビフェニリル)-5-(4-t-ブチルフェニル)-1,3,4-オキサジアゾール	
2-(4-ビフェニリル)-5-フェニル-1,3,4-オキサジアゾール	
2-(4-ビフェニル)-6-フェニルベンゾオキサゾール-1,3	
2,5-ビス-(4-ビフェニリル)-1,3,4-オキサジアゾール	
2,5-ビス-(4-ビフェニリル)-オキサゾール	
4,4'''-ビス-(2-ブチルオクチルオキシ)-p-クオーターフェニル	20
p-ビス(o-メチルスチリル)-ベンゼン	
5,9-ジアミノベンゾ(a)フェノキサゾニウム過塩素酸塩	
4-ジシアノメチレン-2-メチル-6-(p-ジメチルアミノスチリル)-4H-ピラン	
1,1'-ジエチル-2,2'-カルボシアニンヨウ化物	
1,1'-ジエチル-4,4'-カルボシアニンヨウ化物	
3,3'-ジエチル-4,4'-5,5'-ジベンゾチアトリカルボシアニンヨウ化物	
1,1'-ジエチル-4,4'-ジカルボシアニンヨウ化物	30
1,1'-ジエチル-2,2'-ジカルボシアニンヨウ化物	
3,3'-ジエチル-9,11-ネオペンチレンチアトリカルボシアニンヨウ化物	
1,3'-ジエチル-4,2'-キノリルオキサカルボシアニンヨウ化物	
1,3'-ジエチル-4,2'-キノリルチアカルボシアニンヨウ化物	
3-ジエチルアミノ-7-ジエチルイミノフェノキサゾニウム過塩素酸塩	
7-ジエチルアミノ-4-メチルクマリン	
7-ジエチルアミノ-4-トリフルオロメチルクマリン	

【0024】

【表2】

7-ジエチルアミノクマリン	
3, 3'-ジエチルオキサジカルボシアニンヨウ化物	
3, 3'-ジエチルチアカルボシアニンヨウ化物	
3, 3'-ジエチルチアジカルボシアニンヨウ化物	
3, 3'-ジエチルチアトリカルボシアニンヨウ化物	10
4, 6-ジメチル-7-エチルアミノクマリン	
2, 2'''-ジメチル-p-クオーターフェニル	
2, 2''-ジメチル-p-ターフェニル	
7-ジメチルアミノ-1-メチル-4-メトキシ-8-アザキノロン-2	
7-ジメチルアミノ-4-メチルキノロン-2	
7-ジメチルアミノ-4-トリフルオロメチルクマリン	
2-(4-(4-ジメチルアミノフェニル)-1, 3-ブタジエニル)-3-エチルベンゾチアゾリウム過塩素酸塩	20
2-(6-(p-ジメチルアミノフェニル)-2, 4-ネオペンチレン-1, 3, 5-ヘキサトリエニル)-3-メチルベンゾチアゾ過塩素酸塩	
2-(4-(p-ジメチルアミノフェニル)-1, 3-ブタジエニル)-1, 3, 3-トリメチル-3H-インドリウム過塩素酸塩	
3, 3-ジメチルオキサトリカルボシアニンヨウ化物	
2, 5-ジフェニルフラン	
2, 5-ジフェニルオキサゾール	
4, 4'-ジフェニルスチルベン	30
1-エチル-4-(4-(p-ジメチルアミノフェニル)-1, 3-ブタジエニル)-ピリジニウム過塩素酸塩	
1-エチル-2-(4-(p-ジメチルアミノフェニル)-1, 3-ブタジエニル)-ピリジニウム過塩素酸塩	
1-エチル-4-(4-(p-ジメチルアミノフェニル)-1, 3-ブタジエニル)-キノリウム過塩素酸塩	
3-エチルアミノ-7-エチルイミノ-2, 8-ジメチルフェノキサジン-5-イウム過塩素酸塩	40
9-エチルアミノ-5-エチルアミノ-10-メチル-5H-ベンゾ(a)フェノキサゾニウム過塩素酸塩	
7-エチルアミノ-6-メチル-4-トリフルオロメチルクマリン	

【表3】

7-エチルアミノ-4-トリフルオロメチルクマリン	
1, 1', 3, 3, 3', 3'-ヘキサメチル-4, 4', 5, 5'-ジベンゾ-2, 2'-インドト リカルボシアニンヨウ化物	
1, 1', 3, 3, 3', 3'-ヘキサメチルインドジカルボシアニンヨウ化物	10
1, 1', 3, 3, 3', 3'-ヘキサメチルインドトリカルボシアニンヨウ化物	
2-メチル-5-t-ブチル-p-クオーターフェニル	
3-(2'-N-メチルベンゾイミダゾリル)-7-N, N-ジエチルアミノクマリン	
2-(1-ナフチル)-5-フェニルオキサゾール	
2, 2'-p-フェニレンビス(5-フェニルオキサゾール)	
3, 5, 3''', 5''''-テトラ-t-ブチル-p-セキシフェニル	
3, 5, 3''', 5''''-テトラ-t-ブチル-p-キンケフェニル	
2, 3, 5, 6-1H, 4H-テトラヒドロ-9-アセチルキノリジノ- <9, 9a, 1-gh> クマリン	
2, 3, 5, 6-1H, 4H-テトラヒドロ-9-カルボエトキシキノリジノ- <9, 9a, 1- -gh> クマリン	20
2, 3, 5, 6-1H, 4H-テトラヒドロ-8-メチルキノリジノ- <9, 9a, 1-> クマ リン	
2, 3, 5, 6-1H, 4H-テトラヒドロ-9-(3-ピリジル)-キノリジノ- <9, 9a, 1-gh> クマリン	
2, 3, 5, 6-1H, 4H-テトラヒドロ-8-トリフルオロメチルキノリジノ- <9, 9a, 1-gh> クマリン	30
2, 3, 5, 6-1H, 4H-テトラヒドロキノリジノ- <9, 9a, 1-gh> クマリン	
3, 3', 2'', 3'''-テトラメチル-p-クオーターフェニル	
2, 5, 2''', 5''''-テトラメチル-キンケフェニル	
P-ターフェニル	
P-クオーターフェニル	
ナイルレッド	
ローダミン700	40
オキサジン750	
ローダミン800	
IR 125	
IR 144	

【0026】

【表4】

IR 140	
IR 132	
IR 26	
IR 5	
ジフェニルヘキサトリエン	10
ジフェニルブタジエン	
テトラフェニルブタジエン	
ナフタレン	
アントラセン	
ピレン	
クリセン	
ルブレン	
コロネン	20
フェナントレン	
フルオレン	
アルミニウムフタロシアニン	
白金オクタエチルポルフィリン	

【0027】

粒子内に取り込まれた色素の励起及び発光波長は、F R E T 測定が、可視化されている標本又は試料のために混乱されぬよう選択するべきである。例えば、試料がヒトの血清である場合、ドナー粒子は、その最大吸収が、ヒト血清が高い吸収及びいくらかの蛍光放出をもつ、500 nmよりも低い色素を含有するべきではない。蛍光色素の輝度は、該色素の吸光係数及び蛍光量子収率の積である。それ故色素は、高い吸光係数及び高い蛍光量子収率をもつものを選ぶべきである。高い吸光係数及び蛍光量子収率についての同様の要望が、多数の同じか又は類似した色素分子を含有する高輝度粒子においても見られる。有機蛍光色素では、吸収最大と発光最大との間の距離は、「ストークシフト (S t o k e s s h i f t)」と呼ばれる。シアニン色素は、典型的には、20~40 nmの、さらに典型的には約20 nmのストークシフトをもち、赤又は近赤外に吸収及び発光最大をもつ有機色素の例であり、高い吸光係数を有する。効率的なF R E T 粒子ペアを得るために、ドナー粒子色素及びアクセプタ粒子色素の、色素吸収及び発光特性を慎重に選ぶべきである。ドナー粒子色素の発光スペクトルは、アクセプタ粒子色素の吸収スペクトルとオーバーラップするべきであり、結果として、アクセプタ粒子色素の吸収最大は、ドナー粒子色素の吸収最大よりも、常にエネルギーが低い、すなわち高波長となる。また、ドナー粒子色素の吸収スペクトルとアクセプタ粒子色素の吸収スペクトルは、殆どオーバーラップを示さず、F R E T 粒子ペアが近接していない領域でも、粒子が別々に検出され、標本を可視化できるようにすることが望ましい。

【0028】

F R E T 粒子ペアの所望のスペクトル特性の例を、図1に示す。特に、図1は、K O D A K X - S I G H T 549、650、691、及び761イメージング剤又はナノ粒子の吸収特性を示す。これらのイメージング剤は、2007年2月28日から3月2日までカリフォルニア州サンフランシスコで開催された分子診断学会 (M o l e c u l a r

30

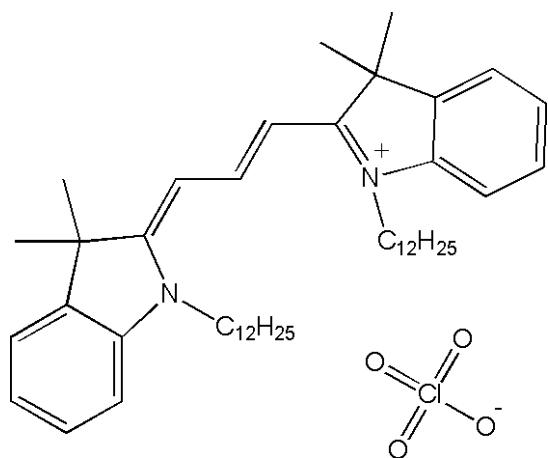
40

50

Medicine Tri-Conference)において、イーストマンコダック社 (Eastman Kodak Company) により紹介された。しかしながら当業者には、類似したスペクトル特性をもつ他のそのようなナノ粒子を、本発明に従って使用し得ることが理解されよう。FRET粒子ペアを作製するために使用される好適な色素の例を、以下に示す。

【0029】

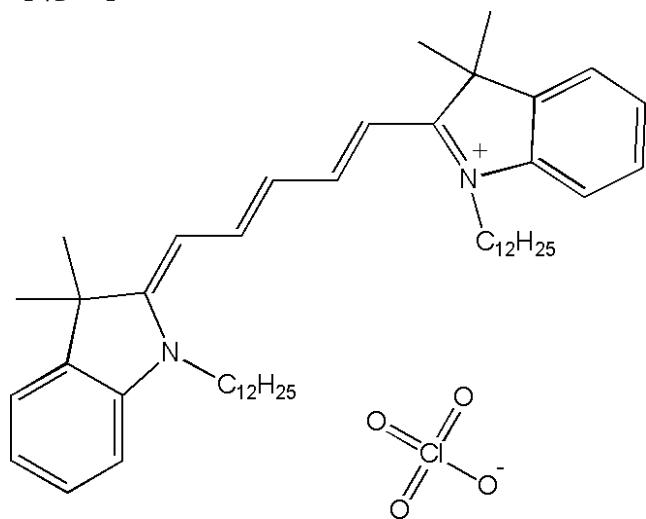
【化2】



10

色素 1

【化3】

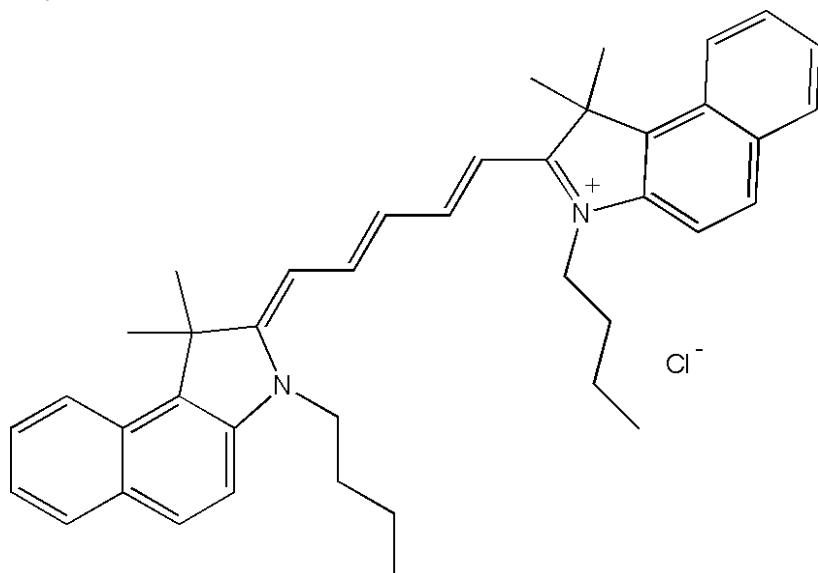


20

30

色素 2

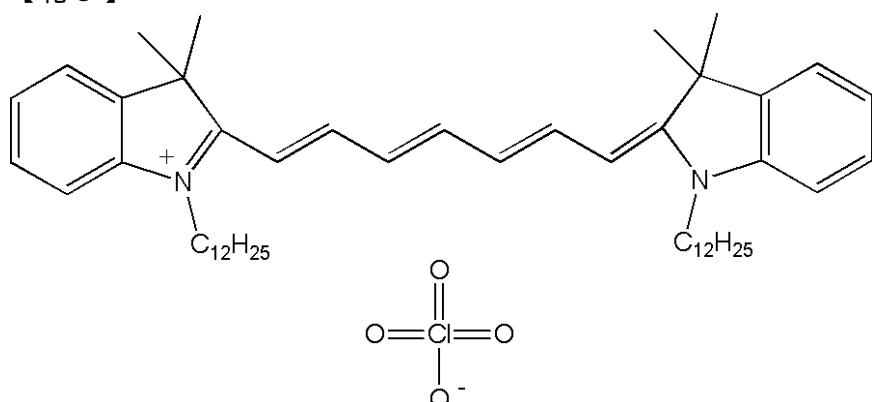
【化4】



10

色素3

【化5】



20

30

色素4

【0030】

次に、これらの色素の適当な組合せから、表IIに示したような4つのFRET粒子ペアを調製することができる。

【0031】

【表5】

表II. FRET粒子担持用の色素の例

色素	FRETドナー粒子	FRETアクセプタ粒子
色素1	A	なし
色素2	B	B
色素3	C	C
色素4	なし	D

40

【0032】

FRET粒子ドナー-アクセプタペアの例を、表IIIに示す。

【0033】

50

【表6】

表III. FRET粒子ドナーーアクセプタペアの例

FRET粒子ペア	FRET粒子
1	A及びB
2	B及びC
3	B及びD
4	C及びD

10

【0034】

このように、FRET粒子ペアを使用することにより、3つの異なるスペクトル選択性の検出事象によって、可視化を行うことができる。すなわち、3つの異なるスペクトル選択性のバイオディストリビューションイメージ、言い換えれば、ドナー粒子をスペクトル選択する検出事象（これはFRETに関与しない）、アクセプタ粒子をスペクトル選択する検出事象（これはFRETに関与しない）、及び、FRET粒子ペアが近接している場合のFRETの可視化、を使用してもよい。

【0035】

ナノ粒子集合体のサイズは、生物学的組成物におけるその有用性を決定する上で、別の重要なパラメータである。体内投与の後、大きい粒子は、網内系によって除去され、容易に疾患部位へ輸送することはできない。例えば、フォルクハイマー（Volkheimer）、Pathologe 14:247 (1993)；クォン（Kwon）及びカタオカ（Kataoka）、Adv. Drug. Del. Rev. 16:295 (1995)；モーギミ（Moghimi）ら、「Nanomedicine: Current Status and Future Prospects」FASEB Journal 2005, 19, 311-330参照。100 nmより大きい粒子は、間質マクロファージによるクリアランスを受けるが、150 nm以上の粒子は、肝臓での蓄積を受ける。また、細胞及び細胞内送達においては、大きい粒子の輸送は制限されるか、又はわずかである。例えば、ラブハセツワ（Labhasetwar）ら、Adv. Drug Del. Res. 24:63 (1997) 参照。サイズ 500 nm ~ 1ミクロン以上の凝集した力チオン性化学種は、細胞トランスフェクションには無効であることが示された。大きい粒子、特に、ポジティブにチャージしたものは、一部は肝臓に対する副作用及び塞栓症のため、体内で高い毒性を示す。例えば、フォルクハイマー（Volkheimer）、Pathologe 14:247 (1993)；コパー（Khopade）ら、Pharmazie 51:558 (1996)；ヤマシタ（Yamashita）ら、Vet. Hum. Toxicol. 39:71 (1997) 参照。

20

30

【0036】

疎水性成分をもつ粒子は、色素の光安定性及び輝度を改善することができる。親水性成分をもつ粒子は、バイオディストリビューション及び血中循環時間を改善することができる。中心コアが水不溶性であり、周囲のシェルが水溶性であり、かつ蛍光分子がコア内に収容されている、コア / シェル構造をもつ粒子の、水溶性及び水不溶性特性の双方に対する要望を解決するため、別の方法が試してきた。今日知られている多くの蛍光ナノ粒子は、ランタニド及びカドミウム / セレニウムといった蛍光性金属から製造されており、これらは水不溶性であり、また毒性及び不充分なバイオディストリビューションも示す。これらの欠点を克服するべく、金属ナノ粒子又は不溶性コアの周辺に、水溶性のポリマシェルを作製する方法が採られてきた。これらのポリマシェルは、ナノ粒子の直径を増し、ドナー粒子とアクセプタ粒子との間の分離距離が、効率的なFRETを起こすには大きすぎるようになる。

40

【0037】

50

F R E T 粒子ペアは、表面上にアミンのような官能基をもち、これらが生体分子標的化成分の結合に用いられる。本発明の F R E T 粒子は、生物学的又は薬学的成分を運ぶための担体として有用であることができる。具体的には、担体として使用される F R E T 粒子ペアは、必ずしも特定の治療用又はイメージング成分を被包する必要はないが、むしろ生物学的又は薬学的成分の担体としての役割を果たす。生物学的又は薬学的成分は、治療剤、診断剤、色素、又は X 線写真コントラスト剤を包含する。用語「診断剤」は、コントラスト剤として作用することができ、それにより検出可能な指示シグナルを宿主において発生させる成分を包含する。検出可能な指示シグナルは、ガンマ放出性、放射性、エコー源性、蛍光透視性、又は生理学的シグナルなどでよい。用語、生物医学剤は、本明細書で用いる場合、生理学的疾患の治療において有用である、生物学的に活性のある物質、医薬、酵素、ホルモン、ステロイド、組換え生成物などを包含する。例示的な治療剤は、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、化学治療剤、例えばアドリアマイシン、及び抗ウイルス剤、例えばインターフェロン及びアシクロビルを包含する。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により、治療剤を一定時間にわたって放出することができる。

【 0 0 3 8 】

本発明の範囲内に包含されるのは、本発明に従って使用されるナノ粒子の架橋ポリマと、適当な標的化分子と、ドナー及びアクセプタ色素のペアとを含んでなる、2つ以上の組成物である。本明細書で用いる場合、用語「標的化成分」は、本発明のポリマネットワークに架橋された、任意の分子、原子、又はイオンを指し、これらは、体内又は細胞内で、本発明のポリマネットワーク又は生物活性組成物の、結合、輸送、蓄積、滞留時間、バイオアベイラビリティを増強するか、或いは生物活性を修飾するものである。標的化成分は、しばしば、抗体、抗体のフラグメント、又はキメラ抗体分子を含んでなり、典型的には、ある細胞表面抗原に対し特異性をもつ。標的化成分はまた、例えば、細胞表面受容体と特異相互作用をもつホルモンか、又は細胞表面受容体をもつ薬剤であることも可能である。例えば、糖脂質は、多糖類受容体を標的化するために役立てることもできる。標的化成分はまた、例えば、酵素、レクチン又は多糖類であることも可能である。分子質量の低い標的化成分、例えば葉酸及びその誘導体はまた、本発明の文脈において有用である。標的化成分はまた、ポリヌクレオチド、ポリペプチド、ペプチドミメティック、多糖類を含む炭水化物、その誘導体、又は、コンビナトリアル化学又は生物学によって得られる他の化学物質であることができる。標的化成分を用いて、本発明の F R E T 粒子ペアの細胞内輸送、例えば核への輸送を促進することができ、これは例えば、スクシャレウン (S o u k c h a r e u n) ら、 B i o c o n j u g a t e C h e m . , 6 , 4 3 , (1 9 9 5) ; 又はエイラー (A r a r) ら、 B i o c o n j u g a t e C h e m . , 6 , 4 3 , (1 9 9 5) によって記載された、標的化分子としての融合誘導性 (f u s o g e n i c) ペプチド；核型 (c a r y o t y p i c) ペプチド；又は、細胞内への位置指定輸送（特に、エンドソーム区画から出て細胞質内へ、又は核への送達）を提供する他の生体特異な群を使用することによる。

【 0 0 3 9 】

記載された組成物はさらに、特定の標的細胞を認識する標的化成分を包含する、生物学又は薬学的成分を含んでなることができる。担体として用いられる記載された F R E T 粒子ペアの F R E T 粒子に結合された標的化成分を介した、細胞表面受容体の認識及び結合は、記載された組成物の特徴であることができる。本発明では、F R E T 粒子ペアの F R E T 粒子によって運ばれる化合物を、「保持された (c a r r i e d) 」化合物と呼んでもよい。例えば、上記記載の特定の標的細胞を認識する、標的化成分を包含する生物学又は薬学的成分は、「保持された」化合物である。この特徴は、細胞表面結合事象が、しばしば、一連の事象、特に受容体媒介性エンドサイトーシスをもたらす、細胞カスケードの開始段階であるとの理解を利用している。用語「受容体媒介性エンドサイトーシス (R e c e p t o r - m e d i a t e d e n d o c y t o s i s) 」(「 R M E 」) は、一般に、これによって、細胞表面に暴露された受容体への標的化成分の結合に触媒されて、受

10

20

30

40

50

容体に結合した標的化成分が細胞内へインナライズされるメカニズムを言う。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、及び他の多くのものを含め、多くのタンパク質及び他の構造物が、受容体媒介性エンドサイトーシスによって細胞内へ侵入する。

【0040】

受容体媒介性エンドサイトーシスは、おそらくは、他の生物学又は薬学的成分を含有している、記載されたFRET粒子ペアのFRET粒子を、細胞の内部へ輸送するための、便利なメカニズムを提供する。RMEでは、細胞表面に暴露された受容体による標的化成分の結合が、細胞内シグナルを開始することができ、このことはエンドサイトーシス応答を包含することができる。したがって、結合された標的化成分と共に、担体として使用されるFRET粒子ペアのFRET粒子は、細胞表面に結合することができ、それに続き陥入し、そして細胞内にインナライズされる。本組成物と共に有用な標的化剤として使用することができる、例示的な、しかし制限しない成分のリストは、タンパク質、ペプチド、アプタマ、有機低分子、毒素、ジフテリア毒素、シュードモナス毒素、コレラ毒素、リシン、コンカナバリンA、ラウス肉腫ウイルス、セムリキ森林ウイルス、水泡性口内炎ウイルス、アデノウイルス、トランスフェリン、低密度リポタンパク質、トランスクバラミン、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、黄体ホルモン、甲状腺ホルモン、血小板由来成長因子、インターフェロン、カテコールアミン、ペプチドミメティクス、糖脂質、糖タンパク質、及び多糖類を包含する。提示された成分の同族体又はフラグメントもまた、使用可能である。これらの標的化成分は、FRET粒子ペアのFRET粒子に結合することができ、かつこれを用いてFRET粒子ペアのFRET粒子を標的細胞に向けることができ、次にそこでインナライズされることが可能である。全成分が標的化成分としてインターナライズされる必要性はない。特定の受容体又は他の構造と相互作用することが知られている、これらの成分の小さいフラグメントもまた、標的化成分として使用することができる。

【0041】

抗体又は抗体フラグメントは、細胞内へのFRET粒子ペアの取込みを増強するための利用し得る、最も普遍的に使用される標的化成分のクラスを代表するものである。抗体は、当業者に周知の多様な技術のいずれかにより調製してもよい。例えば、ハーロウ (Harrow) 及びレイン (Lane)、Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988 参照。抗体は、モノクローナル抗体の生成を含む、細胞培養技術によるか、或いは、組換え抗体を産生させるための、適当な細菌又は哺乳類細胞宿主内への、抗体遺伝子のトランスフェクションにより産生することができる。1つの技術においては、ポリペプチドを含んでなる免役源が、最初に、広く多様な哺乳類（例えば、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、又はヤギ）のいずれかに注射される。該ポリペプチドが担体タンパク質、例えば、ウシ血清アルブミン又はキーホルリンペットヘモシアニン、に結合されている場合、優れた免役応答が誘起されてよい。免役源は、好ましくは所定のスケジュールに従い、1回以上の追加免役を取り入れて、動物に注入し、この動物を定期的に採血した。該ポリペプチドに特異的なポリクローナル抗体は、次に、例えば、適当な固体支持体に結合されたポリペプチドを用いたアフィニティーコロマトグラフィにより、かかる血清から精製されてよい。

【0042】

興味の抗原ポリペプチドに特異的なモノクローナル抗体は、例えば、コウラー (Kohler) 及びミルステイン (Milstein)、Eur. J. Immunol. 6: 511-519, 1976 の技術、及びその改良を用いて調製してもよい。モノクローナル抗体は、増殖中のハイブリドーマ細胞の上清から単離してもよい。さらに、マウスのような適当な宿主哺乳類の腹腔内への、ハイブリドーマ細胞系の注射といった、種々の技術を用いて、収率を向上させてもよい。モノクローナル抗体は、さらにまた腹水又は血液

10

20

30

40

50

から取り入れられてもよい。不純物は、クロマトグラフィ、ゲルfiltration、沈降、及び抽出といった、通常の技術により、抗体から除去してもよい。本発明のポリペプチドは、例えば、アフィニティーコロマトグラフィの工程における、精製プロセスにおいて使用してもよい。非ヒト免疫グロブリンから由来する抗原結合部位を含んでなる、いくつかの「ヒト化」された抗体分子が記載されてきた（Winterら、（1991）Nature 349: 293-299；ロブグリオ（Lobuglio）ら、（1989）Proc. Nat. Acad. Sci. USA 86: 4220-4224）。これらの「ヒト化」分子は、ヒト受容者におけるこれらの成分の持続時間及び効率を制限する、げつ歯類の抗ヒト抗体分子に対する有害な免疫学的応答を最小化するべく設計される。

【0043】

10

アフィボディ（Affibody（登録商標））アフィニティリガンドは、タンパク質エンジニアリング技術を用いて産生された、研究用試薬である。それらは低分子であり、プロテインAのIgG-結合ドメインの1つの骨格をベースとする、3-ヘリックスバンドルを含んでなる単純タンパク質である。プロテインAは、細菌 Staphylococcus aureus からの表面タンパク質である。この骨格は、アフィニティリガンドとして、優れた特徴をもち、任意の所与の標的タンパク質に、高い親和性をもって結合するべく設計することができる。該ドメインは、58個のアミノ酸を含み、そのうち13個は、多数のリガンド変異体をもつAffibody（登録商標）ライプラリを生成するべくランダム化されている。したがって該ライプラリは、同一の主鎖と、変異性の表面結合特性とをもつ数多くのタンパク質リガンドを含む。機能においては、Affibody（登録商標）分子は、モノクローナル抗体を模倣している。抗体に比較して、Affibody（登録商標）分子の最大の相違点は、小さいサイズである。Affibody（登録商標）分子は、150kDaの抗体の分子量に比較して、6kDaの分子量をもつ。その小さいサイズにもかかわらず、Affibody（登録商標）分子の結合部位は、抗体のそれに類似している。抗体に対するAffibody（登録商標）分子の利点は、その小さいサイズ、分子の単純な構造、極端なpH及び高い温度を含む広範囲の分析条件に耐え得るその強い物理的性質、及び細胞内で正しく折り畳まるその能力を包含する。本発明に従って使用するための、FRET粒子へのコンjugation又は定方向のカップリングは、C-末端システインにより促進される。Affibody（登録商標）分子は、アフィニティ精製、試料調製、及びタンパク質検出の中での適用のための、高度に競合的な特性をもつ。

20

【0044】

30

ビタミン及び他の必須のミネラル及び複数のミネラルを、標的化成分として利用して、細胞によるFRET粒子ペアの取込みを増強することができる。特に、ビタミン標的化成分は、フォレート、フォレート受容体結合性のフォレート類似体、及び他のフォレート受容体結合性の標的化成分、ビオチン、ビオチン受容体結合性のビオチン類似体、及び他のビオチン受容体結合性の標的化成分、リボフラビン、リボフラビン受容体結合性のリボフラビン類似体、及び他のリボフラビン受容体結合性のリガンド、チアミン、チアミン受容体結合性のチアミン類似体、及び他のチアミン受容体結合性の標的化成分、からなる群より選択することができる。受容体媒介性エンドサイトーシスをトリガーすると考えられ、それ故ここに開示された方法に従って用途をもつ追加の栄養は、カルニチン、イノシトール、リポ酸、ナイアシン、パントテン酸、ピリドキサール、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、先行技術において記載された「イムノリポソーム」（リポソームの表面に結合された抗体をもつリポソーム）のいずれもが、記載された組成物との使用に適している。

40

【0045】

全ての天然の細胞膜が生物学的に活性のあるビオチン又はフォレート受容体をもつのではないことから、記載された組成物のインビトロでの特定の細胞系に対する使用は、その細胞系をまず改変するか、さもなければ修飾して、生物学的に活性のあるビオチン又はフォレート受容体の存在を確認することを含むことができる。したがって、細胞膜上のビオ

50

チン又はフォレート受容体の数は、細胞系をビオチン又はフォレート欠損性の基質上で増殖させて、ビオチン及びフォレート受容体の産生を促進することによるか、或いは、ビオチン又はフォレート受容体に対応するタンパク質又はアボタンパク質用の挿入された外来遺伝子を発現させることにより、増大することができる。

【0046】

RMEは、記載されたFRET粒子ペアがそれによって細胞内へ移動され得る唯一の方法ではない。適当な物質をFRET粒子ペアのFRET粒子に結合させることによって開発し得る別のある方法は、膜孔の有利な使用を包含する。食細胞又は飲細胞のメカニズムもまた、それによりFRET粒子ペアのFRET粒子が細胞の内部へインターナライズされ得る有利なメカニズムを示す。

10

【0047】

認識成分は、酵素又は電気化学的切断を受ける配列を、さらに含んでなることができる。認識成分は、したがって、プロテアーゼ又は制限エンドヌクレアーゼ（例えば、DNアーゼ又はRNアーゼ）といった、細胞内の様々な場所に存在する酵素による切断を受ける配列を含んでなることができる。

【0048】

細胞表面認識配列は、必要条件ではない。したがって、細胞表面受容体標的化成分は、所与の細胞タイプを標的化するため、又は記載されたFRET粒子ペアのFRET粒子の、細胞表面との結合を誘導するために有用であり得るが、細胞表面受容体標的化成分が、FRET粒子ペアのFRET粒子の表面上に存在する必要はない。

20

【0049】

生物学又は薬学的成分を、担体として使用される記載されたFRET粒子ペアのFRET粒子に集合させるため、該成分を、結合を介してFRET粒子担体とアソシエートさせることができる。「～とアソシエートさせる（associated with）」ことにより、該成分がFRET粒子ペアのFRET粒子によって保持されることを意味する。該成分は溶解可能であり、かつFRET粒子ペアのFRET粒子に非共有結合的に取り込まれる。

【0050】

一般に、興味の生物学又は薬学的成分と、担体として使用されるFRET粒子ペアのFRET粒子との間に結合を形成する、いかなる方法も利用することができる。このことは、標的化成分の外来分子に対する、直接的又は結合基（linking group）を介した間接的な、共有結合、イオン結合、又は水素結合を包含し得る。結合は典型的には、生物学又は薬学的成分の、担体として使用されるFRET粒子ペアのFRET粒子に対する共有結合によって形成され、これは、複合体の個々の成分上の、酸、アルデヒド、ヒドロキシ、アミノ、又はヒドロゾ基間の、アミド、エステル、又はイミノ結合の形成を介する。当分野で技術上認められている生物学的に不安定な共有結合、例えばイミノ結合、及び、-COOCH、-O-O-、又は-COOCH結合を有するいわゆる「活性のある」エステルが好適である。興味の生物学又は薬学的成分は、あらかじめ形成されたFRET粒子に結合してもよく、又は代替えとして、興味の成分を重合可能な単位にあらかじめ結合し、そしてFRET粒子の調製の間に、FRET粒子ペアのFRET粒子内へ直接重合させてもよい。水素結合、例えば核酸の相補鎖の間に生じるもの、もまた結合形成に使用することができる。

30

【0051】

本発明の1つの好ましい実施態様においては、興味の生物学又は薬学的成分は、高度に親水性のマクロモノマ単位の末端の、反応性の化学的単位との反応によって、FRET粒子ペアのFRET粒子に結合される。好ましくは、この反応性の化学的単位は、アミンである。最も好ましくは、この結合は、結合性ポリマを介して生じる。この興味の生物学又は薬学的成分は、FRET粒子ペアを生体分子に結合させて、その近接性を可視化できるようにする。

40

【0052】

50

FRET粒子ペアを用いて標本を可視化するべく使用される装置は、ドナー粒子、アクセプタ粒子、及びFRET粒子ペアのスペクトル選択的検出によって、少なくとも3つの検出事象を生じ得るものでなければならない。このことは、FERT粒子ドナー色素、及びFERT粒子アクセプタ色素を、それぞれ選択的に励起することができる光源をもつ装置を必要とする。好適なFRET粒子色素としては、各々550nm、650nm、691nm、及び761nmに最大吸収があり、所与のFRET粒子ペアの双方のFRET粒子が常に存在する場合、当該所与のFRET粒子ペアの各FRET粒子を、選択的に励起する装置が必要である。イメージングによるFRET検出、すなわち、多数の、空間的に分布した点の検出、に適したシステムは、ニューヨーク州ロチェスターのケアストリーム・ヘルス社(Carestream Health, Inc.)から市販されている、Kodak Image Station 4000MM Proである。4000MM Proシステムは、広いスペクトル、すなわち、白色光源、例えばキセノン光源を、励起フィルタのセットと共に具備する。好適な励起フィルタは、バンドパス干渉フィルタであり、これは、選択されたスペクトルバンドの光を透過させることができ、例えば、中心波長520nmのフィルタは、510nm~530nmのスペクトルバンドの内側の光を透過するが、このスペクトルバンドの外側の光は全て、標本又は試料に達するのをブロックする。発光の測定には、好適な装置は、第2のバンドパス干渉フィルタのセットを利用し、これは、所与のFRET粒子ペアの選択されたFRET粒子からの放出光を透過させるが、励起光及び他の蛍光シグナルはブロックする。好適な装置は、好ましくは、冷却されたCCD検出器を含んでなる、デジタルカメラ(これは、500nm~900nmに高い感度を有する)、コンピュータ、及び取り込んだイメージをディスプレイするためのソフトウェアを具備する。好適なシステムは、マイクロタイタープレート中で暴露された標本を受け入れることができる。したがって、記載された好適なシステムを使用して、FRET粒子ペアを構成してもよい少なくとも2つのFRET粒子で処理された標本を可視化することができる。好適なシステムは、適当なフィルタ(励起及び発光)を使用して、FRETドナー粒子を1つのイメージに可視化し、そして適当なバンドフィルタ(励起及び発光)を使用して、FRETアクセプタ粒子を第2のイメージに可視化し、そして次に、FRETドナー粒子用に用いた励起フィルタを、FRETアクセプタ粒子用の発光フィルタと共に使用して、近接している粒子を第3のイメージに可視化する。好ましい装置は、3つのイメージを比較して、コレジストレーションされたオーバーレイを作成することができる。別法として、ただ一つのイメージを取り込んでもよく、すなわち、FRETドナー粒子用に用いた励起フィルタを、FRETアクセプタ粒子用に用いた発光フィルタと共に使用して、近接している粒子を可視化してもよい。

【0053】

これもまたケアストリーム・ヘルス社から市販されている、Kodak In-Vivo Imaging System FX Proのような、別の適当なシステムは、マウスのような小型の生きた動物をイメージングすることにより、FRET検出を行うことができる。さらに別のFRET検出用の適当なシステムは、マイクロタイタープレートリーダ、例えば、カリフォルニア州サンベールのモレキュラーデバイス(Molecular Devices)から市販されている、SpectraMax M5であり、これは、個々のウェルからの連続した蛍光検出用に、光電子増倍管を使用する。当業者は、マイクロタイタープレートリーダを用いる連続FRET検出と、デジタルカメラを用いるイメージングによるFRET検出とが、等価であることを認識するであろう。SpectraMax M5はまた、励起光源及び検出器の双方に、モノクロメータを使用する。当業者は、モノクロメータが干渉フィルタと同様のスペクトル選択能をもつことを認識するであろう。FRET検出用の別の適当なシステムは、マサチューセッツ州レキシントンのレインダンス・テクノロジーズ社(RainDance Technologies, Inc.)から市販されている、RainStorm(商標)ドロップレットベースのマイクロフルイディクス(microfluidic)技術によって達成されるような、マイクロフルイディクスシステムである。当業者は、マイクロフルイディックドロップレット中

で暴露された標本からのF R E T 検出と、マイクロタイタープレート中で暴露された標本におけるF R E T 検出とが、等価であることを認識するであろう。

【実施例】

【0054】

<実施例1：アミン末端化ポリエチレングリコールメタクリラート塩酸塩の調製>

【化6】



【0055】

ポリエチレングリコールジメタクリラート (Aldrich (アルドリッヂ)、Mn = 875、335 g) を、100 ml のメタノールと混合し、システアミン (Aldrich、5.8 g) 及びジイソプロピルエチルアミン (ヒューニッヒ塩基) で処理し、室温で2日間攪拌し、そしてロータリエバボレータを用いて濃縮した。残渣を、1 L の酢酸エチル中に取り、そして 10% HCl 水溶液で抽出した。水性層を収集し、50% 水酸化ナトリウム水溶液の添加により塩基化し、続いて酢酸エチルで抽出した。有機層を MgSO₄ 上で脱水し、濾過し、そして濃縮した。残渣を取り上げた。この物質は、新しいジエチルエーテルで、デカンテーションで洗浄された。この残渣を、ロータリエバボレータを用いて濃縮して、37 g の所望の生成物を塩酸塩として得た。この物質を、NMR 分光法により、以下のようにキャラクタライズした：H-NMR (300 MHz, CDCl₃) : δ 1.18 (d, 3H)、1.93 (bs, SH)、2.04 (bs, 2H)、2.43 - 2.77 (bm, 7H)、3.6 - 3.7 (vbs, -CH₂CH₂O-)、3.73 (bt, 2H)、3.29 (bt, 2H)、5.56 (bs, 1H)、6.12 (bs, 1H)。

【0056】

<実施例2：メトキシエチルメタクリラート (45% w/w)、ジビニルベンゼン (4%)、エチルスチレン (1%)、及び、実施例1のアミン末端化ポリエチレングリコールメタクリラート塩酸塩 (50%) を含んでなる粒子の調製>

500 ml の3口丸底フラスコを、Ace #15 ガラススレッドと、一連のアダプターとを用いて底部を改造して、1/16インチのIDテフロン (登録商標) チューピングを接続させた。このフラスコ (以降「ヘッダ」フラスコと呼ぶ) に、メカニカルスタラ、シリングニードルの窒素入口を備えたラバーセプタムを装着した。ヘッダは、メトキシエチルメタクリラート (5.63 g)、ジビニルベンゼン (0.63 g、異性体の混合物、80% 純粋、残りはエチルスチレン異性体)、アミン末端化ポリエチレングリコールエーテルメタクリラート塩酸塩 (6.25 g、Mn = 940) を収容していた。メカニカルスタラ、還流冷却器、窒素入口、及びラバーセプタムを装着した1 L の3口丸底フラスコ (以降「リアクタ」と呼ぶ) に、2,2'-アゾビス (N,N'-ジメチレンイソブチルアミジン) 二塩酸塩 (0.06 g)、塩化セチルピリジニウム (0.31 g)、炭酸水素ナトリウム (0.06 g)、及び蒸留水 (78.38 g) を装入した。リアクタ内容物は、蒸留水 (159.13 g)、2,2'-アゾビス (N,N'-ジメチレンイソブチルアミジン) 二塩酸塩 (0.06 g)、炭酸水素ナトリウム (0.06 g)、及び塩化セチルピリジニウム (0.94 g) を含んでいた。ヘッダ及びリアクタの双方の内容物を、均一になるまで攪拌し、窒素を用いた20分間のバーピングにより脱気した。リアクタフラスコを 60 °C のサーモスタット付き水浴中に置き、モデル QG6-1ab ポンプ (フルイド・メーテリング社 (Fluid Metering Inc.))、ニューヨーク州ショセット) を用いて、ヘッダ内容物を2時間にわたりリアクタに添加した。反応混合物を、次に 60 °C で 16 時間攪拌した。ラテックスを、100 cc のDowex 88 イオン交換樹脂で2回処理し、そして 14 K のカットオフ膜を用いて 48 時間透析して、312 g の透明なラテックス (固体 3.26%) を得た。体積平均直径は、20.89 nm であり、準弾性光散乱により 0.24 の変動係数をもつことが判明した。

10

20

30

40

50

【0057】

<実施例3：色素4の調製>

この色素は、2,3,3-トリメチル-1-ドデシル-3H-インドリウム過塩素酸塩(4.28g、10mmol)及びジアニル(1.4g、5mmol)を、トリエチルアミン(1.5g、15mmol)を含有する40mLの無水酢酸中で使用して調製した。反応時間は、5分間であった。反応を25℃に冷却し、そして激しく攪拌しながら、2リットルの氷水に注入した。水をデカンテーションし、そして油を、100mLの80/20ジクロロメタン-メタノール中に溶解した。この物質を、シリカゲルカラム上で、80/20ジクロロメタン-メタノールで溶出してクロマトグラフィを行った。無水硫酸マグネシウムによる脱水の後、溶媒を除去して、メタノール中での吸収最大747nm、吸光係数220,020をもつ、純粋な色素(4g、収率32%)を得た。10

【0058】

<実施例4：色素2の調製>

この色素は、2,3,3-トリメチル-1-ブチル-3H-インドリウム過塩素酸塩(12g、38mmol)及びジアニル(5.4g、19mmol)を、トリブチルアミン(10.5g、57mmol)を含有する100mLの無水酢酸中で使用して調製した。反応を15分間行い、25℃に冷却し、そして激しく攪拌しながら、2000mLの氷水に注入した。油性生成物から水をデカンテーションし、次いで、シリカゲルカラム上で、90/10塩化メチレン-メタノールで溶出してクロマトグラフィを行った。無水硫酸マグネシウムによる脱水の後、溶媒を除去して、メタノール中での吸収最大637nm、吸光係数259,500をもつ、純粋な色素(8g、収率71%)を得た。20

【0059】

<実施例5：色素4を用いた粒子の担持>

薄暗い照明下で、0.0296gの色素4を、充分量のテトラヒドロフラン中に溶解して、最終溶液重量を29.8012gとすることにより、0.0903%w/wの色素ストック溶液を調製した。この色素溶液の一部、1.9627gを、ガラスバイアルに添加し、そしてテトラヒドロフランを用いて最終重量10.0gまで希釈した。実施例2からの粒子溶液10.0185gを、このバイアルに添加し、そして溶液をロータリエバボレータ上で、約40-50%の体積まで除去した。残留するテトラヒドロフランを、3-5mLの蒸留水を2回添加することによりさらに除去し、そして再度、~1/4から1/3の体積まで除去した。9.4467gの担持された粒子(LP-4)(固体3.45%)は、1グラムの固体ラテックス当たり、 4.97×10^{-3} molの色素を含有する。30

【0060】

<実施例6：色素2を用いた粒子の担持>

薄暗い照明下で、0.0101gの色素2を、充分量のテトラヒドロフラン中に溶解して、最終溶液重量を25.1201gとすることにより、色素ストック溶液(0.0402%w/w)を調製した。この色素溶液の一部、3.9146gを、ガラスバイアルに添加し、そしてテトラヒドロフランを用いて最終重量10.0gまで希釈した。実施例2からの粒子溶液10.0451gを、このバイアルに添加し、そして溶液をロータリエバボレータ上で、約40-50%の体積まで除去した。残留するテトラヒドロフランを、3-5mLの蒸留水を2回添加することによりさらに除去し、そして再度、~1/4から1/3の体積まで除去した。10.9030gの担持された粒子(LP-2)(固体3.56%)は、1グラムの固体ラテックス当たり、 4.99×10^{-3} molの色素を含有する。40

【0061】

<実施例7：ヤギ抗ウサギIgG標識されたFRET粒子ドナーDの調製>

(担持されたラテックス(LP-2)の活性化)

1.5mLの着色されたバイアルに収容された、EDTAを含有する500uLのPBS(0.1Mリン酸ナトリウム、0.15MNaCl、pH7.5(NaOHでpHを調整))緩衝液に、400μLの担持された粒子(LP-2)を添加する。50

2. 2 mg のスルホ - S M C C (P i e r c e B i o t e c h o l o g y (ピアース・バイオテクノロジー)) を、 152.7 μ L の無水 D M S O 中に溶解する。

3. X - S I G H T 溶液を、 60.4 μ L のスルホ - S M C C 溶液と合わせる。

4. 反応混合物を、 搅拌子を用いて、 回転速度 340 で、 室温で 1 時間搅拌する。 その間に、 カラムを用意する。

5. 2 つの N A P 10 カラムを使用する。 カラムから緩衝液を、 ピペットを用いて除去し、 そしてカラムに、 3 倍体積の、 2 mM E D T A を含有する 10 mM 緩衝液を流して条件づけする。 工程 4 からの、 担持されたラテックス反応混合物約 0.5 mL を、 それぞれのカラム上に添加し、 そして 10 mM 緩衝液で溶出して、 過剰のリンカを除去する。 着色されたバンドを風袋引きしたシンチレーションバイアルに収集する。 最終的な溶液体積は、 約 1 mL となるはずである。 10

【 0 0 6 2 】

(抗体の活性化)

1 2.4 mg / mL のウサギ抗マウス (J a c k s o n (ジャクソン)) 2.08 mL を、 ピペッティングにより、 20 mL のガラスバイアル内に移す。 取っておく。

2 9.6 の D T T を、 10 mM E D T A を加えた P B S 62 μ L 中に溶解する。

3 2.08 mL の抗体溶液を、 50 μ L の D T T 溶液と合わせる。

4 搅拌子を用いて、 室温で 1 時間搅拌する。

5 工程 4 からの溶液を、 2 つの A m i c o n 30 カラムに添加する。 2 本のバランスチューブを秤量し、 それらが互いに 1 グラム以内になるまで、 水で重さを調整する。 遠心分離機を用いて、 3000 r p m で 15 分間回転し、 それぞれの中の体積を約 500 μ L まで減らす。 20

6 工程 5 からの A b 溶液を収容しているチューブの各々に、 2 mM E D T A を含有する p H 7.2 の P B S 緩衝液 4.5 (9) mL を添加する。 3000 r p m で回転して、 体積を 500 μ L まで減らす。

7 工程を 6 ~ 10 回繰り返す。

【 0 0 6 3 】

(活性化された担持ラテックスへの活性化抗体の共有結合)

A b 対ナノ粒子 = 4 : 1 の比率に従って、 コンジュゲーションを準備する。 A b のロスが 30 % であるとすれば、 これにより、 24.1×10^{-9} mol の A b を生じる結果となる。 それ故、 A b / 粒子 = 4 : 1 を得るべく、 全ての精製された A b 溶液を、 56 % の精製された粒子溶液と合わせる。 混合物の体積を測定し、 10 mM E D T A を含有する 0.1 M P B S 緩衝液を添加して、 最終体積 4.5 - 7.5 mL を達成する。 搅拌子を用いて、 室温で 2 時間搅拌する。 30

【 0 0 6 4 】

コンジュゲート溶液 (7.5 mL) を、 A m i c o n チューブに装填し、 3000 r p m で回転して、 体積を約 500 μ L に減らす。

5 本の 10 mL カラムに、 S u p e r d e x 200 (9 - 10 mL 懸濁液) を詰め、 最終ゲルベッド 4 cm を得る。 いずれのカラムも、 1 x P B S で 3 回平衡化させる。

1 100 μ L ずつのコンジュゲート溶液を、 1 つの S u p e r d e x カラムに負荷する。 40

2 1 x P B S (10 mM リン酸ナトリウム、 0.15 M N a C l 、 p H 7.2) で溶出する。

3 各カラムにつき、 約 1 mL の I g G 標識 F R E T 粒子ドナー B 試料を収集する。

【 0 0 6 5 】

< 実施例 8 : ヤギ抗ウサギ I g G 標識 F R E T 粒子アクセプタ D の調製 >

(担持されたラテックス (L P - 4) の活性化)

1. 5 mL の着色されたバイアルに収容された、 E D T A を含有する 500 μ L の P B S (0.1 M リン酸ナトリウム、 0.15 M N a C l 、 p H 7.5 (N a O H で p H を調整)) 緩衝液に、 400 μ L の担持された粒子 (L P - 4) を添加する。 50

2. 2 mg のスルホ - S M C C (P i e r c e B i o t e c h o l o g y (ピアース・バイオテクノロジー)) を、 152.7 μ L の無水 D M S O 中に溶解する。

3. X - S I G H T 溶液を、 60.4 μ L のスルホ - S M C C 溶液と合わせる。

4. 反応混合物を、 搅拌子を用いて、 回転速度 340 で、 室温で 1 時間搅拌する。 その間に、 カラムを用意する。

5. 2 つの N A P 10 カラムを使用する。 カラムから緩衝液を、 ピペットを用いて除去し、 そしてカラムに、 3 倍体積の、 2 mM E D T A を含有する 10 mM 緩衝液を流して条件づけする。 工程 4 からの、 担持されたラテックス反応混合物約 0.5 mL を、 それぞれのカラム上に添加し、 そして 10 mM 緩衝液で溶出して、 過剰のリンカを除去する。 着色されたバンドを風袋引きしたシンチレーションバイアルに収集する。 最終的な溶液体積は、 約 1 mL となるはずである。 10

【 0 0 6 6 】

(抗体の活性化)

1 2.4 mg / mL のヤギ抗ウサギ (J a c k s o n) 2.08 mL を、 ピペッティングにより、 20 mL のガラスバイアル内に移す。 取っておく。

2 9.6 の D T T を、 10 mM E D T A を加えた P B S 62 μ L 中に溶解する。

3 2.08 mL の抗体溶液を、 50 μ L の D T T 溶液と合わせる。

4 搅拌子を用いて、 室温で 1 時間搅拌する。

5 工程 4 からの溶液を、 2 つの A m i c o n 30 カラムに添加する。 2 本のバランスチューブを秤量し、 それらが互いに 1 グラム以内になるまで、 水で重さを調整する。 遠心分離機を用いて、 3000 r p m で 15 分間回転し、 それぞれの中の体積を約 500 μ L まで減らす。 20

6 工程 5 からの A b 溶液を収容しているチューブの各々に、 2 mM E D T A を含有する p H 7.2 の P B S 緩衝液 4.5 (9) mL を添加する。 3000 r p m で回転して、 体積を 500 μ L まで減らす。

7 工程を 6 ~ 10 回繰り返す。

【 0 0 6 7 】

(活性化された担持粒子への活性化抗体の共有結合)

1. A b 対ナノ粒子 = 4 : 1 の比率に従って、 コンジュゲーションを準備する。 A b のロスが 30 % であるとすれば、 これにより、 24.1×10^{-9} mol の A b を生じる結果となる。 それ故、 A b / 粒子 = 4 : 1 を得るべく、 全ての精製された A b 溶液を、 56 % の精製された粒子溶液と合わせる。 混合物の体積を測定し、 10 mM E D T A を含有する 0.1 M P B S 緩衝液を添加して、 最終体積 4.5 - 7.5 mL を達成する。 搅拌子を用いて、 室温で 2 時間搅拌する。 30

2. コンジュゲート溶液 (7.5 mL) を、 A m i c o n チューブに装填し、 3000 r p m で回転して、 体積を約 500 μ L に減らす。

3. 5 本の 10 mL カラムに、 S u p e r d e x 2 0 0 (9 - 10 mL 懸濁液) を詰め、 最終ゲルベッド 4 cm を得る。

4. いずれのカラムも、 1 x P B S で 3 回平衡化させる。

5. 100 μ L ずつのコンジュゲート溶液を、 1 つの S u p e r d e x カラムに負荷する。 40

6. 1 x P B S (10 mM リン酸ナトリウム、 0.15 M N a C l 、 p H 7.2) で溶出する。

7. 各カラムにつき、 約 1000 μ L の F R E T 粒子アクセプタ試料を収集する。

【 0 0 6 8 】

< 実施例 9 : F R E T 粒子ペアを用いたウサギタンパク質の可視化 >

96 ウェルプレート (底が透明な黒色) において、 5 n M のウサギ抗マウス I g G 標識 F R E T 粒子ドナー B を、 1 つのウェルに、 5 n M のヤギ抗ウサギ I g G 標識 F R T E 粒子アクセプタ D を、 第 2 のウェルに、 そして 5 n M のウサギ抗マウス I g G 標識 F R E T 粒子ドナー B と、 5 n M のヤギ抗ウサギ I g G 標識 F R T E 粒子アクセプタ D とを含んで 50

なる、FRET粒子ペアB-Dを、第3のウェルに添加する。標本は、96ウェルプレートを、Kodak Image Station 4000MM Proに設置すること、20nmのバンド幅を有する650nmの中心波長励起フィルタによって暴露すること、そして40nmのバンド幅をもつ790nmの発光フィルタを用いて、蛍光イメージをレコードすることにより可視化した。FRET粒子ドナーBのみでは、670nmに発光ピークがあり、したがってFRET粒子ドナーBからの蛍光は、790nmを中心とする40nmの発光スペクトルバンドにおいてはごくわずかしか観察されない。FRET粒子アクセプタDのみでは、650nmを中心とする20nmの励起スペクトルバンドにおいては殆ど吸収がなく、したがってFRET粒子アクセプタDからの蛍光は、790nmにおいてはごくわずかしか観察されない。しかし、FRET粒子ペアB-Dは、抗体の標的化によって近接状態となり、それ故、ドナー粒子により吸収された励起エネルギーは、受容体粒子に転移され、結果として、FRET粒子ドナーB及びFRET粒子アクセプタAに比較して、FRET粒子ペアB-Dから検出される蛍光に、それぞれ54倍及び142倍の増大を生じる。

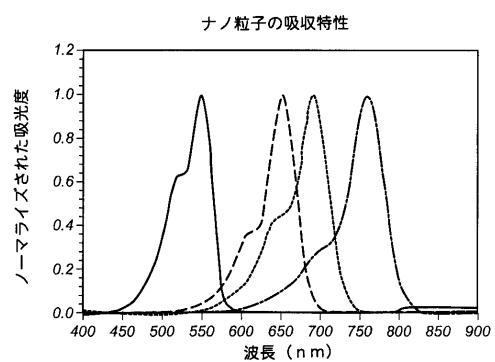
【0069】

【表7】

表IV. ヤギ抗ウサギIgGに対するウサギ抗マウスIgGの近接を示す、FRET粒子ペアB-Dの例

	FRETドナー粒子B	FRETアクセプタ粒子D	FRET粒子ペアB-D
検出された蛍光 (任意単位)	6.8×10^4	2.6×10^4	370×10^4

【図1】



フロントページの続き

(72)発明者 マクローリン ウィリアム イー

アメリカ合衆国 コネチカット ギルフォード メドウ リッジ レーン 132

(72)発明者 ヴィザード ダグラス エル

アメリカ合衆国 コネチカット ダラム ヘムロック コート 30

(72)発明者 ジー タオ

アメリカ合衆国 コネチカット ハムデン アスペン グレン ドライブ 1413

審査官 横井 亜矢子

(56)参考文献 特開2005-341865(JP, A)

特開昭51-044628(JP, A)

特表2007-523635(JP, A)

特開平07-151756(JP, A)

米国特許第06238931(US, B1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 21/62 - 21/83

G01N 33/48 - 33/98

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)