

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A) (11)特許出願公表番号

特表2002 - 540428

(P2002 - 540428A)

(43)公表日 平成14年11月26日(2002.11.26)

(51) Int. Cl ⁷	識別記号	F I	テ-マ-コード (参考)
G 0 1 N 33/58		G 0 1 N 33/58	Z 2 G 0 4 5
B 0 1 J 19/00		B 0 1 J 19/00	N 2 G 0 5 4
G 0 1 N 21/78		G 0 1 N 21/78	C 4 G 0 7 5
	33/483	33/483	C
	33/532	33/532	Z

審査請求 未請求 予備審査請求 (全 83数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2000 - 608178(P2000 - 608178)

(86) (22)出願日 平成12年3月15日(2000.3.15)

(85)翻訳文提出日 平成13年10月1日(2001.10.1)

(86)国際出願番号 PCT/US00/06864

(87)国際公開番号 W000/58731

(87)国際公開日 平成12年10月5日(2000.10.5)

(31)優先権主張番号 09/281,512

(32)優先日 平成11年3月30日(1999.3.30)

(33)優先権主張国 米国(US)

(81)指定国 E P (A T , B E , C H , C Y , D E , D K , E S , F I , F R , G B , G R , I E , I T , L U , M C , N L , P T , S E) , J P

(71)出願人 コールター インターナショナル コーポレーション
アメリカ合衆国,フロリダ 33196,マイアミ,32 - エ-02,サウスウエスト 147 アベニユ 11800

(72)発明者 シイマン,オラビ
アメリカ合衆国,フロリダ 33331,デイビー,コブルストーン コート 15920

(72)発明者 マティジェビック,エゴン
アメリカ合衆国,ニューヨーク 13676,ポツダム,マーケット ストリート 94

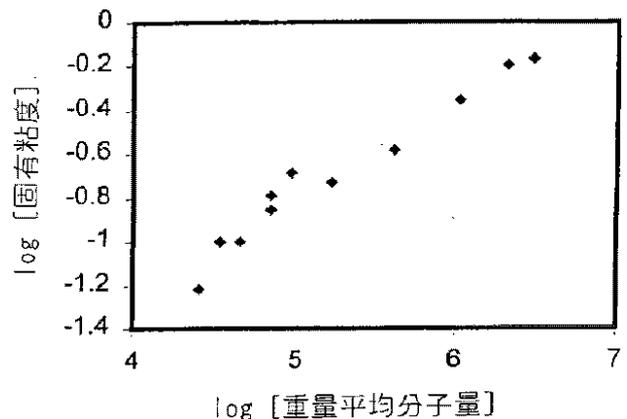
(74)代理人 弁理士 石田 敬 (外 4 名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 血球母集団の分析のための新規な半導体ナノ粒子

(57)【要約】

生物学的試料の分析に使用するための半導体ナノ粒子が記載される、この半導体ナノ粒子は式 $(XY)_n$ の少くとも1つのナノ粒子に結合されているアミノデキストランからなり、ここでXはCd²⁺、Hg²⁺およびZn²⁺ならびにそれらの組み合わせからなる群より選ばれ；そしてYはS²⁻、Se²⁻およびTe²⁻ならびにそれらの組み合わせからなる群より選ばれ；ならびにn = 約50 ~ 1000である。さらに、これらの半導体ナノ粒子の製造方法、ならびにリガンドに連結されたこれらの半導体ナノ粒子からなる接合体の製造方法を提供する、さらに種々の生物学的アッセイへのその接合体の使用を記載する。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 流体試料の分析のための半導体ナノ粒子であり、

a) 平均分子量約3,000~3,000,000Da、約150nmより小さい粒径を有し、そして多糖類分子における1級および2級アミノ基の合計数の置換度が1/150~4/1の範囲である、多糖類の水溶性アミノ誘導体；ならびに

b) 式： $(XY)_n$ の少なくとも1つのナノ粒子、

ここでXはCd²⁺、Hg²⁺およびZn²⁺ならびにそれらの組合わせからなる群より選ばれ；そしてYはS²⁻、Se²⁻およびTe²⁻ならびにそれらの組合わせからなる群より選ばれ；そしてn=約50~1000であり、該ナノ粒子は該アミノ多糖類に結合されている、

を含む半導体ナノ粒子。

【請求項2】 粒径が約1~10nmである請求項1記載の半導体ナノ粒子。

【請求項3】 多糖類がデキストランである請求項1記載の半導体ナノ粒子

。

【請求項4】 デキストランが5X-アミノデキストランおよび1X-アミノデキストランからなる群より選ばれる請求項3記載の半導体ナノ粒子。

【請求項5】 デキストランが1,3-ジアミノプロパンで置換されている請求項3記載の半導体ナノ粒子。

【請求項6】 少なくとも1つのナノ粒子がCdSである請求項1記載の半導体ナノ粒子。

【請求項7】 置換度が1/25~2/5の範囲である請求項1記載の半導体ナノ粒子。

【請求項8】 多糖類のアミノ誘導体が500,000より少ない分子量を有する請求項1記載の半導体ナノ粒子。

【請求項9】 1~3000のナノ粒子が多糖類の該アミノ酸誘導体に共有結合で結合されている請求項1記載の半導体ナノ粒子。

【請求項10】 半導体ナノ粒子の製造方法であり：

a) 分子量約3,000~3,000,000Daを有する多糖類のアミノ誘導体を、b) 周期律表II B族水溶性塩、およびc) VIA族塩と反応させて半導体ナ

ノ粒子を生成する、段階を含み；

多糖類の該アミノ誘導体は約150nmより小さい粒径を有し、ならびに多糖類分子における1級および2級アミノ基の合計数の置換度が1/150～4/1の範囲にあり；そして該IIB族塩は Cd^{2+} 、 Hg^{2+} および Zn^{2+} 、ならびにそれらの組合わせからなる群より選ばれるカチオン；さらには Cl^{-} 、 ClO_4^{-} 、 NO_3^{-} および SO_4^{2-} からなる群より選ばれるアニオンを有し；

該VIA族水溶性塩は、 Li^{+} 、 Na^{+} 、 K^{+} 、 Rb^{+} 、 Cs^{+} 、 Sr^{2+} および Ba^{2+} からなる群より選ばれるカチオン；さらには S^{2-} 、 Se^{2-} および Te^{2-} およびそれらの組合わせからなる群より選ばれるアニオンを有し；したがってIIB族塩について選ばれるアニオンはVIA族塩のカチオンとともに沈殿せず、

ここで多糖類は、形成された半導体ナノ粒子に含まれるナノ粒子の光酸化を妨げる還元糖を含有する、半導体ナノ粒子の製造方法。

【請求項11】 該周期律表IIB族水溶性塩が多糖類の該アミノ誘導体と混合されて第1生成物を生成し、その第1生成物は該VIA族塩と反応して半導体ナノ粒子を生成する請求項10記載の方法。

【請求項12】 該VIA族塩が多糖類の該アミノ誘導体と混合されて第1生成物を生成し、その第1生成物は該周期律表IIB族塩と反応して半導体ナノ粒子を生成する請求項10記載の方法。

【請求項13】 VIA族塩は多糖類の該アミノ誘導体と混合され第1生成物を生成し、該周期律表IIB族水溶性塩は多糖類の該アミノ誘導体と混合されて第2生成物を生成し、そして該第1生成物は該第2生成物と反応して半導体ナノ粒子を生成する請求項10記載の方法。

【請求項14】 該第1生成物および第2生成物が多糖類の付加的アミノ誘導体の存在下で反応される請求項13記載の方法。

【請求項15】 該周期律表IIB族水溶性塩および該VIA族塩が多糖類の該アミノ誘導体と同時に混合されて半導体ナノ粒子を生成する請求項10記載の方法。

【請求項16】 IIB族塩カチオンが Cd^{2+} である請求項10記載の方法。

【請求項17】 VIA族塩アニオンが S^{2-} である請求項10記載の方法。

【請求項18】 第1の塩が第2の塩よりも高濃度である請求項10記載の方法。

【請求項19】 多糖類のアミノ誘導体が約0.2～20mg/mlの量で存在する請求項10記載の方法。

【請求項20】 反応がpH約9～約12で生じる請求項10記載の方法。

【請求項21】 請求項10記載の方法により製造された半導体ナノ粒子。

【請求項22】 リガンドに接合された少なくとも1つの半導体ナノ粒子を有するリガンドを含むリガンド-半導体ナノ粒子であり、該半導体ナノ粒子は：

a) 平均分子量約3,000～3,000,000Da、約150nmより小さい粒径を有し、そして多糖類分子における1級および2級アミノ基の合計数の置換度が1/150～4/1の範囲である、多糖類の水溶性アミノ誘導体；ならびに

b) 式： $(XY)_n$ の少なくとも1つのナノ粒子、

ここでXは Cd^{2+} 、 Hg^{2+} および Zn^{2+} ならびにそれらの組合わせからなる群より選ばれ；そしてYは S^{2-} 、 Se^{2-} および Te^{2-} ならびにそれらの組合わせからなる群より選ばれ；そして $n = 約50 \sim 1000$ であり、該ナノ粒子は該アミノ多糖類に結合されている、

を含むリガンド-半導体ナノ粒子。

【請求項23】 該半導体ナノ粒子がアミノデキストラン-CdSを含む請求項22記載のリガンド-半導体ナノ粒子。

【請求項24】 半導体ナノ粒子に対するリガンドの比が約1:1～約1:5の範囲である請求項22記載のリガンド-半導体ナノ粒子。

【請求項25】 該リガンドが抗体もしくはその機能性断片である請求項22記載のリガンド-半導体ナノ粒子。

【請求項26】 該リガンドが抗-CD4抗体である請求項22記載のリガンド-半導体ナノ粒子。

【請求項27】 リガンド-半導体ナノ粒子の製造方法であり：

a) 半導体ナノ粒子を：

(i) 平均分子量約3,000～500,000Da、約50nmより小さい粒径を有し、そして多糖類分子における1級および2級アミノ基の合計数の置換度が

1 / 150 ~ 4 / 1である、多糖類のアミノ誘導体；

(ii) 水溶性第1塩、該第1塩は Cd^{2+} 、 Hg^{2+} および Zn^{2+} 、ならびにそれらの組合わせからなる群より選ばれるカチオン；ならびに Cl^{-} 、 ClO_4^{-} 、 NO_3^{-} および SO_4^{2-} からなる群より選ばれるアニオン、を有し、ならびに

(iii) 水溶性第2塩、該第2塩は、 Li^{+} 、 Na^{+} 、 K^{+} 、 Rb^{+} 、 Cs^{+} 、 Sr^{2+} および Ba^{2+} からなる群より選ばれるカチオン；ならびに S^{2-} 、 Se^{2-} および Te^{2-} ならびにそれらの組合わせからなる群より選ばれるアニオン、を有し；したがって第1塩について選ばれるアニオンは第2塩のカチオンとともに沈殿しない；

を反応させることにより生成すること；

b) 過剰な未反応試薬を除去するために多糖類半導体ナノ粒子を含む分散体を精製すること；

c) 半導体ナノ粒子を活性化および精製すること；

d) 選択されたりガンドを活性化および精製すること；ならびに

e) 活性化され、精製されたりガンドと活性化され、精製された半導体ナノ粒子を混合し、それによりリガンド - 半導体ナノ粒子を生成させること、

の段階を含むリガンド - 半導体ナノ粒子の製造方法。

【請求項28】 生物学的試料中のターゲットの検出方法であり；

(a) 選択されたりガンドのためのターゲットを含むと考えられる生物学的試料をリガンド - 半導体ナノ粒子と接触させ、結合したりガンド - 半導体ナノ粒子 - 生物学的試料を形成し、該リガンド - 半導体ナノ粒子は、リガンドに接合された少くとも1つの半導体ナノ粒子を有する、選択されたりガンドを含み、そこで該半導体ナノ粒子は；

(i) 平均分子量約3,000 ~ 3,000,000 Da、約150 nmより小さい粒径を有し、そして多糖類分子における1級および2級アミノ基の合計数の置換度が1 / 150 ~ 4 / 1の範囲である、多糖類の水溶性アミノ誘導体；ならびに

(ii) 式： $(XY)_n$ の少くとも1つのナノ粒子、

ここでXは Cd^{2+} 、 Hg^{2+} および Zn^{2+} ならびにそれらの組合わせからなる群

より選ばれ；そしてYは S^{2-} 、 Se^{2-} および Te^{2-} ならびにそれらの組合わせからなる群より選ばれ；そして $n = 約50 \sim 1000$ であり、該ナノ粒子は該アミノ多糖類に結合されている；

を含む；

(b) 該結合した半導体ナノ粒子 - 生物学的試料を赤外ないし紫外光で励起して、それにルミネセンスを生じさせること；ならびに

(c) ルミネセンス信号を検出し、それにより生物学的試料中において、選択リガンドのためのターゲットの存在を検出すること、の段階を含む検出方法。

【請求項29】 ルミネセンス信号が流動細胞計測法分析により測定される請求項28記載の方法。

【請求項30】 生物学的試料が白血球を含む請求項28記載の方法。

【請求項31】 リガンドが抗体もしくはその機能的断片である請求項28記載の方法。

【請求項32】 リガンドが抗 - CD4抗体である請求項31記載の方法。

【発明の詳細な説明】**【0001】****技術分野**

本発明は、一般的に、血球母集団の分析に有用な半導体ナノ粒子化合物を製造する方法に関し、そして特にアミノ誘導体化 (amino - derivatized) 多糖類を含む化合物に関する。

背景技術

生物学的試料、たとえば混合細胞母集団 (mixed cell populations) の分析のために細胞の多重標識化 (multiplex labeling) が記述されてきた。しかしながら、公知の方法は制約があり、公知の有機発蛍光団 (fluorophores) の限定された数の蛍光発光色により指示され、可視、近紫外、近赤外スペクトル領域に寄せ集められ得、そこで従来の測定がたとえば流動細胞計測法 (flow cytometry) によりなされる。これらの制約は発光バンドの幅、これらの発光バンド間のスペクトル重複、および励起波長要件を含む。

【0002】

細胞に対する標識の2つの例は、生物学的染色 (staining) および蛍光顕微鏡での観察のために使用されてきたCdSeコアナノ粒子である [Bruchez J. M. ら、Science 281, 2013 (1998)、ならびにChan, W. C. W およびNie, S の Science 281, 2016 (1998)]。

【0003】

使用できる色の数の上限に達したので、蛍光強度の差異にもとづく、他の方法が開発された。たとえば、細胞あたり幅広く異なる、固有数のレセプターを有するターゲット白血球母集団の相互に独占的なペアは単1色で標識化され、流動細胞計測法で分析されうる [米国特許第5,538,855号明細書]。

【0004】

試料DNAにハイブリダイズもしくは結合する蛍光染料を付着したいいくつかの非放射性遺伝子プローブ、オリゴ (oligo) が記述され [L. M. Smit

hらのNature, 321: 674~679 (1986)およびL. M. SmithらのNucl. Acids Res., 13: 2399~2412 (1985)]、そして生物学的試料の標識化に使用されている。自動DNAシーケンサーは重複しない発光バンドを有する4つの蛍光染料をヌクレオチド塩基あたり1つ使用する。しかし、蛍光染料-オリゴプライマー接合体(conjugates)の電気泳動移動度(electrophoretic mobilities)は4つのすべての接合体に対して類似であることを要求する。接合体の分子量はあまり高くはなりえず、そうでないとそれらは電気泳動に用いられるポリアクリルアミドもしくはアガロースにより利動しない。

【0005】

オリゴヌクレオチドプライマーあたり多くのマーカ分子を付着することにより自動化分析に用いられるプローブの感度を増加させる必要性が1986年のはやくから認識された[L. M. Smithらの上述の文献]。しかし、限られた程度の蛍光強調(enhancement)のみが、ゲル泳動による分離のためにやむを得ずに低分子量にされている染料-オリゴ接合体に対して可能であった。

【0006】

アミノデキストランは、磁性フェライト〔米国特許第5,240,640号明細書〕、金属〔米国特許第5,248,772号明細書〕、ポリスチレン〔米国特許第5,466,609;5,707,877;5,639,620;5,776,706号明細書〕、およびポリスチレン-金属〔米国特許第5,552,086;5,527,713号明細書〕粒子の単分散コロイド分散体の製造もしくは被覆における還元剤および/または保護剤として使用されてきた。十分に大きな分子量のアミノデキストランは多くのタンパク分子を供給しうる。リガンドおよび選択された蛍光マーカもしくは標識に接合された、このようなアミノデキストランを含む複合体が記述されている〔参照されたい。Smith, Cらの「Detection of Low-Density Surface Markers Using Novel Amplified Fluorochrome-Conjugated Antibodies」、Cytometry, Suppl. 9, 56頁、XIX Congress of International Society for Analytical cytology, March

3~7、1998で発表；R. Mylvaganamらの「Seven Markers, Four Colors, Single Laser Flow Cytometry Using Amplified Fluorochrome Conjugated Antibodies」*Cytometry, Suppl. 9*, 117頁(1998)、XIX Congress of International Society for Analytical Cytology, March 3~7、1998で発表された。]。しかし、比較的狭い蛍光バンド幅、強調強度、減少したプローブ大きさ、および増加したプローブ安定性を与えることにより、増加したアセイ感度を付与するプローブに対する要求はなお継続する。

発明の要約

本発明は、前述の標識化アミノデキストラン複合体よりも小さい大きさである粒子を有利に付与する。本発明のナノ粒子は高度に置換されたアミノデキストランでさらに被覆されて、単1の小粒子で従来可能であったよりも高いルミネセンス強度を付与する。

【0007】

このように、1つの態様において、本発明は流体試料の分析のための半導体ナノ粒子を提供する。その半導体ナノ粒子は、平均分子量約3,000~3,000,000 Da、約150 nmより小さい粒径を有し、そして多糖類分子における1級および2級アミノ基の合計数の置換度が1/150~4/1の範囲である、多糖類の水溶性アミノ誘導体を含む。その半導体ナノ粒子を生成するために、このアミノ多糖類は、式： $(XY)_n$ の少なくとも1つのナノ粒子に結合されている。

【0008】

ここでXは Cd^{2+} 、 Hg^{2+} および Zn^{2+} ならびにそれらの組合わせからなる群より選ばれ；そしてYは S^{2-} 、 Se^{2-} および Te^{2-} ならびにそれらの組合わせからなる群より選ばれ；そして $n = 約50 \sim 1000$ である。

【0009】

もう1つの態様において、本発明は生物学的試料の分析に有用な半導体ナノ粒子を提供し、平均分子量約3,000~500,000 Da、2~約10 nmの粒径を有し、そしてデキストラン分子における1級および2級アミノ基の合計数の置換度が1/150~4/1であるアミノデキストランに結合されている。アミノデキストランは上述のように、少なくとも1つのナノ粒子に共有結合で結合されて

いる。

【0010】

もう1つの態様において、本発明は半導体ナノ粒子を製造する方法を提供する。この方法は、分子量約3,000~3,000,000Daを有する多糖類のアミノ誘導体を、周期律表II B族水溶性塩およびVI族塩と反応させ、半導体ナノ粒子を生成することの段階を含む。この方法において、半導体ナノ粒子は、多糖類のアミノ誘導体とナノ粒子の複合体である。アミノ多糖類は約150nmより小さい径を有し、ならびに多糖類分子中の1級および2級アミノ基の合計数の置換度が1/150~4/1の範囲である。そのII B族塩はCd²⁺、Hg²⁺およびZn²⁺、ならびにそれらの組合わせからなる群より選ばれるカオチン、さらにはCl⁻、ClO₄⁻、NO₃⁻およびSO₄²⁻からなる群より選ばれるアニオンを有し；該VI A族水溶性塩は、Li⁺、Na⁺、K⁺、Rb⁺、Cs⁺、Sr²⁺およびBa²⁺からなる群より選ばれるカオチン、さらにはS²⁻、Se²⁻およびTe²⁻およびそれらの組合わせからなる群より選ばれるアニオンを有し；したがってII B族塩に選ばれるアニオンはVI A族塩のカオチンとともに沈澱しない。この方法において、多糖類中の還元糖の存在は、生成された多糖類半導体ナノ粒子の中ナノ粒子の光酸化を妨げる。

【0011】

なおさらなる態様において、本発明は生物学的試料の分析に有用な半導体ナノ粒子の製造方法を提供する。この方法は、平均分子量約3,000~3,000,000Da、約150nmより小さい粒径を有し、そして多糖類分子における1級および2級アミノ基の合計数の置換度が1/150~4/1の範囲である、多糖類のアミノ誘導体、Cd²⁺、Hg²⁺およびZn²⁺、ならびにそれらの組合わせからなる群より選ばれるカオチン；さらにはCl⁻、ClO₄⁻、NO₃⁻およびSO₄²⁻からなる群より選ばれるアニオンを有する水溶性第1塩、ならびにLi⁺、Na⁺、K⁺、Rb⁺、Cs⁺、Sr²⁺およびBa²⁺からなる群より選ばれるカオチンおよびS²⁻、Se²⁻およびTe²⁻およびそれらの組合わせからなる群より選ばれるアニオンを有する水溶性第2塩を混合することを含み、したがって第1塩について選ばれるアニオンは第2塩のカオチンとともに沈澱しない。この混合段階で、第1および第2塩ならびにアミノ多糖は反応して半導体ナノ粒子を生成する。

【0012】

もう一つの態様において本発明は少なくとも一つの半導体ナノ粒子に接合されるリガンドを含むリガンド-半導体ナノ粒子を提供する。

【0013】

なおもう一つの様態において、本発明はリガンド-半導体ナノ粒子の製造方法を提供する。その方法は多糖類のアミノ誘導体、水溶性第1塩および水溶性第2塩を混合して半導体ナノ粒子を含む分散体を生成することを含む。ついで、その分散体は精製して遊離塩を除去し、その後、半導体ナノ粒子は活性化され、精製される。リガンドは別々に活性化され、精製される。活性化され、精製されたりリガンドおよび半導体ナノ粒子は、ついで混合され、リガンド-半導体ナノ粒子を生成させる。リガンド-半導体ナノ粒子は選択されたりリガンドと半導体ナノ粒子の間の接合体である。

【0014】

さらにもう一つ別の態様において、本発明は生物学的試料中のターゲットを検出する方法を提供する。その方法は、選択されたりリガンドのためのターゲットを含むと考えられる生物学的試料を本発明のリガンド-半導体ナノ粒子と接触させること、結合した半導体ナノ粒子を励起して、それにルミネセンスを生じさせること；ならびにそのルミネセンス信号を検出し、それにより生物学的試料中において、そのターゲットの存在を検出することを含む。本発明の他の態様および利点は本発明の詳細な説明から容易に明らかであろう。

発明の詳細な説明

本発明は、種々の用途に有用であるが特に生物学的アセイによく適する半導体ナノ粒子を提供する。従来の試みは所望の生物学的ターゲット、たとえば白血球の亜母集団の検出のためのアミノ-誘導体多糖類粒子接合体を利用するためになされたが、これらの試薬の有用性は比較的大きい粒子を有する光散乱シフトの誘起に限定されてきた。本発明の半導体ナノ粒子は狭いルミネセンスバント幅、および少なくとも3つの異なる粒径を有し、各々は異なる、重複しない発光バンドを有する同一組成のナノ粒子を使用する可能性を提供する。

I 半導体ナノ粒子

本発明の半導体ナノ粒子は少なくとも1つのナノ粒子と関連する、多糖類の水溶性アミノ誘導体からなる。

【0015】

ここで定義されるように、本発明で有用な多糖類は、約3,000~3,000,000 Da、約5,000~約1,000,000、約10,000~500,000、もしくは20,000~約250,000の範囲の分子量を有する。この分子量は、光散乱、もしくは光散乱の3重組合わせ、粘度およびアミノデキストラに用いられる屈折率により容易に測定されうる(下記参照)。あるいは分子量を測定する他の適切な手段は、サイズ排除クルマトグラフィーもしくはゲル電気泳動でありうる。多糖類は、さらに約1~約150ナノメートル(nm)未満、もしくは約10~約100nmの粒径で特徴づけられる。現在、好適な粒径は約10~約100nmの範囲である。現在好適な態様において、多糖類はデキストランである。しかし、他の適切な多糖類は当業者により容易に選択されうる。たとえば、このような多糖類は天然もしくは合成、でんぷんもしくはでんぷん誘導体、セルロース誘導体、アミロースおよびペクチン、ならびにある天然ゴムおよびその誘導体、たとえばアラビアゴムおよびアルギン酸塩である。

【0016】

本発明において使用するために選ばれる多糖類は、多糖類分子中の1級および2級アミノ基の置換度を1/50~4/1もしくは1/25~2/5を含有するように調節されるが、少なくとも100mg/mlの水溶解度は維持する。もし他に指示がなければ、ここでは、置換度はアミノデキストランもしくは他のアミノ多糖類分子における単量体グルコース単位あたりアミノ基(1級および2級)の合計数である。現在の好適な態様において、本発明において使用される多糖類のアミノ誘導体は最も好ましくは1,3-ジアミノプロパンで置換されるアミノデキストランである。商業的源からもしくは公知の方法により製造されて、得られうる種々の他のアミノデキストランがある。アミノデキストランの製造法は、米国特許第5,466,609および5,527,713号明細書に記載されており、デキストランの過ヨウ素酸塩による酸化、ついで1,3-プロパンジアミンとの反応による。もちろん、本発明はこれらのアミノデキストランの製造方法に限定

されない。好ましくは、アミノデキストランは5 X - アミノデキストラン (3 5 0 , 0 0 0 D a まで、1 級アミンにもとづいて計算して置換度 1 / 5 ~ 1 / 8) もしくは1 X - アミノデキストラン (1 , 0 0 0 , 0 0 0 D a まで、1 級アミンにもとづいて計算して置換度 1 / 2 8 ~ 1 / 4 5) である。当業者は本発明における使用のために他の適したアミノデキストランおよび/または多糖類のアミノ誘導体を容易に選定しうる。アミノ多糖類は、さらにタンパクもしくは他のリガンドに結合するために活性化されうる遊離アミン基を有することにより特徴づけられる。

【0017】

選択されるアミノ多糖類は、その後、式 (X Y) n の少なくとも1つのナノ粒子に結合される：ここでXはC d ²⁺、H g ²⁺、およびZ n ²⁺並びにそれらの組合せからなる群より選ばれ；ならびにYはS ²⁻、S e ²⁻およびT e ²⁻ならびにそれらの組合せからなる群より選ばれ；そしてnは約50 ~ 1000である。現在の好的な態様において、ナノ粒子はC d Sである。

【0018】

本発明の半導体ナノ粒子において、各アミノ多糖類は1つもしくはそれより多いナノ粒子に共有結合で結合され、ある態様において数百ものナノ粒子（たとえば、約200）はアミノ多糖類に共有結合で結合されうる。得られる半導体ナノ粒子におけるルミネセンスの存在は共有結合の微候 (o u t s e t) であると考えられる。

II 半導体ナノ粒子の製造方法

もう1つの態様において、本発明は、本発明の半導体ナノ粒子製造方法を提供する。

【0019】

この方法はここで定義するアミノポリ多糖類、C d ²⁺、H g ²⁺およびZ n ²⁺の1つもしくはそれより多い中から選ばれる周期律表II B族のカチオン、ならびにS ²⁻、S e ²⁻およびT e ²⁻の1つもしくはそれより多い中から選ばれる周期律表VIA族のアニオンを反応させることを含む。適切には、カチオンドナーは室温で水溶性である。好適な態様において、カチオンドナーはII B族塩であり、カチオ

ンは Cd^{2+} 、 Hg^{2+} および Zn^{2+} ならびにそれらの組合せから選ばれる；そしてアニオンは Cl^- 、 ClO_4^- 、 NO_3^- および SO_4^{2-} の中から選ばれる。現在、好適なカチオンは Cd^{2+} である。このように、適切なIIB族塩の例は、 $CdCl_2$ 、 $Cd(ClO_4)_2$ 、 $Cd(NO_3)_2$ および $CdSO_4$ を含む。適切には、これらの塩は溶液であってもよく、乾燥形態であってもよい。適切には、アニオンドナーも室温で水溶性である。好適には、アニオンドナーはVIA族塩もしくは塩溶液であり、それは Li^+ 、 Na^+ 、 K^+ 、 Rb^+ 、 Cs^+ 、 Sr^{2+} および Ba^{2+} から選ばれるカチオン、ならびに S^{2-} 、 Se^{2-} および Te^{2-} ならびにそれらの組み合わせの中から選ばれるアニオンを有する。IIB族塩およびVIA族塩は、IIB族塩アニオンがVIA族塩のカチオンとともに沈澱せず、そしてVIA族塩のカチオンは水酸化イオンとともに沈澱しないように選択される。この決定は、当業者に良好になされる。現在好適なアニオンは S^{2-} である。このように、適切なVIA族塩の例は Li_2S 、 Na_2S 、 K_2S 、 Rb_2S 、 Cs_2S 、 SrS および BaS を含む。適切にはこれらの塩は溶液であっても、乾燥形態であってもよい。

【0020】

望ましくはアミノ多糖類は、最小限の水でカチオンドナーおよびアニオンドナーとともに含む水性媒体中で混合される。アミノ多糖類を含む混合物は、IIB族カチオンドナーおよびVIA族アニオンドナーは、ついで反応して多糖類半導体ナノ粒子を生成する。

【0021】

1つの態様において、カチオンドナー（たとえば、IIB族塩）はアミノ多糖類と混合され、第1生成物を生成し、そしてアニオンドナー（たとえば、VIA族塩）はアミノ多糖類と混合され、第2生成物を生成する。ついで第1生成物および第2生成物は反応して多糖類半導体複合体を生成する。適切には、これは高濃度のカチオンおよび/またはアニオンドナー（たとえば、塩）の添加前に高濃度で添加されうる。あるいは、アミノ多糖類は塩の添加と実質的に同時に、もしくは前に、混合プロセス中に添加されうる。ここで定義されるように、アミノ多糖類の「高濃度」は反応混合物m lあたり0.2～約50mgアミノ多糖類の範囲の量をいい、好ましくは約15mg/ml～約25mg/ml、およびもっと好ま

しくは約20mg/mlアミノ多糖類/反応混合剤である。

【0022】

II B族カチオンおよびVI A族アニオンは約当量(すなわち約1に対する約1のモル比で)で水に添加されうる。たとえば、II B族塩およびVI A族塩は、混合物が約 $1 \times 10^{-4} \text{ dm}^{-3} \times \sim 1 \times 10^{-1} \text{ モル dm}^{-3}$ を含むような量で添加されうる。しかし、ナノ粒子から最大のルミネセンス発光強度を得るために、優れた結果は、混合物がVI A族塩からのアニオン濃度と比較して、II族塩からの供与された過剰カチオンを含むとともに、得られる。この過剰の供与されたカチオンはタク50%より高濃度II B族塩である。しかし、これは本発明の最適化をもたらすと考えられ、本発明の半導体ナノ粒子の製造に本質的ではない。

【0023】

適切には本発明方法は、比較的高いpHで実施され、たとえば約9~約12の範囲、そして最も適切には約10~11の範囲である。必要であればpHは反応混合物に、水溶性塩基、たとえばNaOHの添加により調節されうる。当業者は、本発明方法に用いるためにKOH, NaOH, LiOH, RbOH, CsOH, Sr(OH)₂もしくはBa(OH)₂のような、他の適切な水溶性塩基を容易に選ぶうる。

【0024】

1つの望ましい態様において、本発明の半導体ナノ粒子は、反応溶液の急速混合により製造される。一般の、この手順はII B族塩溶液を、アミノデキストランを含むVI A族塩の攪拌された溶液に急速に添加することを含む。これらの溶液の混合はII b族カチオン/VI A族アニオンのゾルを生成する。ついでこれらのゾルはさらに攪拌される。そのpHはNaOHで約10~11に上昇される。この急速混合物の発明は他の方法により製造されるものよりも一貫して小さい粒径の半導体ナノ粒子を生じることがわかった。

【0025】

あるいは本発明の半導体ナノ粒子は制御されたダブルジェット沈澱法を用いて製造されうる。一般的に、この方法はII B族塩およびVI A族塩を含む溶液を攪拌された水性アミノ多糖類溶液を含む反応器に導入することを含む。反応器の外部

ジャケットは過熱（たとえば約25℃）を防止する温度に適切に維持される。混合はただちにゾルを生成し、さらに攪拌される。適切には製造された半導体ナノ粒子分散体のpHはpH10～11、そして最も好ましくは10.5に調節される。この制御されたダブルジェット沈澱法は急速混合法、特に高濃度で製造されるとき、本発明の半導体ナノ粒子のもっと安定な分散体を生成することがわかった。

【0026】

これらの混合プロセスもしくは他の混合プロセスが本発明方法で使用するために当業者に選ばれるかどうかにかかわらず、十分な量の還元糖がアミノ多糖類にあると、生成したアミノ多糖類半導体ナノ粒子の光酸化が妨げられ、さらなる段階は光酸化を妨げることが要求されないことがわかった。このように、上述の反応が得られる分散体は安定な蛍光の、半導体ナノ粒子を含む。

【0027】

適切には、発光半導体ナノ粒子の得られる分散体は発光スペクトルにより特徴づけられ、ナノ粒子を形成する元素、得られる半導体ナノ粒子の粒径、および分散体中の半導体ナノ粒子の濃度に依存する。適切にはたとえばCdS-アミノデキストランのような各種類の半導体ナノ粒子は、粒径が2～10nmの異なるナノ粒子の使用により、少なくとも3つの重複しない発光バンドを与えうる。たとえば、CdS分散体は低濃度のアミノデキストランに対して450nmから最高濃度で550nmまで、ルミネセンスバンドに最大値を与えうる。他の種類のII-VI半導体は、単一もしくは次の配列から一緒に、本発明方法で使用されうるために容易に選択されうる。

【0028】

II-VI半導体のマトリックス

	<u>Zn²⁺</u>	<u>Cd²⁺</u>	<u>Hg²⁺</u>
<u>S²⁻</u>	ZnS	CdS	HgS
<u>Se²⁻</u>	ZnSe	CdSe	HgSe
<u>Te²⁻</u>	ZnTe	CdTe	HgTe

一般的に、これらのナノ粒子を構成するII-VI半導体の発光スペクトルは、青

(~ 4 5 0 n m) から赤 (~ 9 0 0 n m) の範囲に及ぶ。これらのスペクトルは、従来の方法を用いて当業者により容易に測定されうる。適切には本発明の半導体ナノ粒子は、単独で、または青から赤までの発光バンドの連続的な同調性 (t u n a b i l i t y) を与えるために他の種類の半導体を有する混合ナノ粒子と一緒に使用されうる。所望のナノ粒子は、発光スペクトルを考慮に入れて、これらの半導体ナノ粒子のための所望の使用に依存しうる。望ましくは、これらの半導体ナノ粒子は下に詳述されるように、リガンドとの場合、もしくは種々の用途で使用される前に、精製される。

【0029】

精製はこの分解で公知の適切な方法により実施されうる。一般に特に望ましい方法はたとえば S e p h a d e x もしくは B i o - G e l カラムを用いるクルマトグラフィーである。しかし、ろ過膜のような、他の適切な精製も容易に選択されうる。

III リカンド - アミノ多糖 - 半導体ナノ粒子接合体

適切には、本発明の半導体ナノ粒子 - アミノ多糖類複合体は、生物学的アッセイ等におけるマーカーとして使用するためにタンパクもしくは他のリガンドに結合される。

【0030】

ここで定義されるように「リガンド」という用語は、ターゲットペプチドもしくはタンパクの全部もしくは1部に選択的に結合する成分を言う。好ましくはこのターゲットはウィルスもしくは細胞の表面レセプターもしくは他のタンパクであり、本発明で有用なリカンドはそのターゲットタンパクに特異的な抗体もしくはその機能的断片 (すなわち、抗体として同一ターゲットに結合する断片) である。このような抗体もしくは断片は天然源からのポリクローナル抗体およびクラス I g G , I g M , I g A , I g D および I g F の天然もしくは組換モノクローナル抗体、ハイブリッド誘導体および F a b , F a b ' および F (a b ') ₂ を含む抗体の断片、人体に適合させた、もしくはヒト抗体、抗体の相補性決定領域を含む組換えもしくは合成の構成物等を含む。最も好適には、本は地名で有用なリガンドは白血球 (W B C) の母集団における細胞表面レセプターに結合しうる

。WBC母集団を検出するために、好適なリガンドは抗CD4抗体である。このようなすべてのリガンドの構成に有用な方法は当業者に公知である。モノクローナル抗体の製造法および種類はそのような方法に限定されず、そのような抗体を製造するいかなる方法も本発明において実施しうる。同様にリガンドもしくはターゲットタンパクの選択は本発明を制約するファクタではない。

IV リガンド - アミノ多糖類 - 半導体ナノ粒子接合体の製造方法

このように、もう1つの態様において、本発明は、リガンド - アミノ多糖類半導体ナノ粒子接合体の製造方法を提供する。適切には、この方法は、従来法を用いて本発明の精製された半導体ナノ粒子 - アミノデキストラン複合体を活性化することを含む。たとえば活性化は精製された半導体ナノ粒子 - アミノデキストラン複合体を含む分散体にスルホサクシンイミジル4 - [N - マイレミドメチル]シクロヘキサン - 1 - カルボキシレート (スルホ - SMCC) の1×PBS溶液の添加によることができる。ついで活性化された半導体ナノ粒子 - アミノデキストラン複合体に精製される。適切な精製法は当業者により容易に選択されうる。1つの例において、スルホ - SMCCおよび半導体ナノ粒子 - アミノデキストラン複合体を含む混合物は攪拌され (たとえば室温で約1時間)、そして反応混合物は、たとえば1×PBSで平衡にされたG - 50 Sephadexカラムに混合物を適用することにより、クロマトグラフ分析される。ついで試料は1×PBSを用いて溶出され、捕集され、活性化を確認するため吸収を測定されうる。他の直接的な活性化および精製方法は上述の方法に代って容易に決定され、置換されうる。

【0031】

選択されたりガンド、すなわちモノクローナル抗体も活性化される。適切な活性化法は当業者により容易に選択される。このような方法の1例は抗体濃縮物への2 - イミノチオランの1×PBS溶液の添加を含む。得られる溶液は適切にはイミノチオラン対抗体モル活性比が約5 ~ 20、好ましくは10 ~ 15であり、雰囲気温度で約1 ~ 2時間混合される。ついで活性化抗体はたとえばクロマトグラフィーもしくは他の適切な方法で精製され、そして活性化および精製された多糖類 - 半導体ナノ粒子複合体に結合される。

【0032】

適切には、活性化、精製されたリガンドおよび活性化、精製された多糖類 - 半導体ナノ粒子複合体もしくはそれらの混合物は十分な時間攪拌されリガンド - 多糖類 - 半導体ナノ粒子接合体を生成される。

【0033】

得られる接合体において、多糖類 - 半導体ナノ粒子複合体に対するリガンドの比は、多糖類 - 半導体ナノ粒子複合体およびリガンドの相対的な大きさを含む、数多くのファクターに依存する。たとえば、抗体およびアミノデキストラン - CdS半導体粒子からなる発明の接合体は各アミノデキストラン - CdS半導体粒子に対して約5 ~ 約8の抗体を含みうる。しかし、他の接合体は各半導体ナノ粒子に対し1リガンドの比を含み得、あるいは各抗体に対し5もの多くの多糖類 - 半導体ナノ粒子を含みうる。適切には、リガンドに複合された多糖類 - 半導体ナノ粒子の数は、リガンドの活性が実質的に影響されないような数である。

【0034】

そのように生成され、接合体は幅広い方法で使用されうる。たとえば検出、診断、抗原および他のタンパクの測定および研究のための方法を向上させるために、それぞれは個々の分子として、もしくはウィルス、細胞、組織、細胞小器官 (organelles)、たとえばプラスミド、核等のようなもっと複雑な生物体中に存在する。接合体はイムノアセイもしくは競合タンパク結合アセイに使用され得、そこでは半導体粒子は蛍光標識として作用する。

V 生物学的試料中のターゲットの検出方法

本発明によれば、主題に接合体の特に望ましい使用は細胞の標識化すること (すなわち蛍光染色) である。これらの接合体は増強信号を与える単1マーカとして使用されうる。もう1つの態様において、接合体は組合わせて使用され得、好ましくはそこではリガンド - アミノ多糖類 - 半導体ナノ粒子接合体のルミネセンス発光最大値は少なくとも約50 nm、好ましくは少なくとも約70 nm、分離される。あるいは、接合体は他のタンパクもしくは非タンパク発蛍光団と一緒に使用され得、そこでは発光最大値は約100 nm、好ましくは約150 nm分離される。

【0035】

発蛍光団の組合わせを使用することにより、特定の種類の細胞、生物体の株、ウィルスの株、異なるタンパクもしくは抗原の天然複合もしくは相互作用のような集団 (aggregation) のサブセットの検出を用意しうる。ある態様において組合わせは同一のレーザー光源で励起されうる発蛍光団を含む。

【0036】

このように、本発明によれば、細胞母集団は、(a) 第1の細胞サブ母集団にリガンド (たとえば細胞表面抗原レセプターと結合する抗体) を含む本発明の半導体ナノ粒子接合体; および (b) 十分に異なるナノ粒子径もしくはナノ粒子組織により第1の接合体と異なるルミネセンス発生ならびに相互に独占的な第2細胞サブ母集団に対して特異的な抗原を有する、本発明の第2の半導体ナノ粒子接合体、の1つ以上を用いることにより、同定されうる。任意に、細胞母集団は本発明の半導体ナノ粒子接合体に加えて従来の標識化接合体を用いて同定されうる。これらの標識化された、レセプター結合接合体の組合せでは明確で重複しないルミネセンスバンド最大位置を有する全血との混合物である異なるルミネセンス標識化細胞母集団を生じる。ウィルスおよび他の生物学的ターゲットは同様の方法を用いて同定されうる。

【0037】

本発明の接合体は生物学的試料中のターゲットを検出するのに特によく適合する。通常これは選択されたりガンドのためのターゲットを含むと考えられる生物学的試料をリガンド - 半導体ナノ粒子接合体を接触させること、結合半導体ナノ粒子接合体を励起してそれにルミネセンスを生じさせること; ならびに試料中のターゲットの存在の 徴候であるルミネセンス信号を検出することを含む。この方法はとくに流動細胞計測法分析によく適合する。

【0038】

しかし、エライザ (ELISA) (enzyme immuno sor bent assay) を含む他の方法も容易に利用されうる。ELISAもしくは接合体は固定化され (immobilized) うる。このような場合、洗浄工程が、未結合半導体ナノ粒子接合体からターゲットに結合されている半導体ナノ

粒子接合体を分離するのに用いられうる。

【0039】

1つのとくに好適な態様において、本発明方法は白血球の多数のサブセットを検出するのに利用される。この用途において、WDC細胞母集団の多数セットに対する1つが与えられる。第1母集団について、本発明の第1のリガンド-半導体ナノ粒子接合体が与えられ、そこではリガンドは第1の母集団のレセプターと結合する。第2の母集団について、第2の標識化されたリガンドが与えられる。第2のリガンドは白血球の母集団内の第2のレセプターに結合し、第1のリガンドに接合された半導体ナノ粒子接合体から識別しうる（たとえば、視覚的にもしくは比色法で）標識を備える。この第2のリガンドは第2の半導体ナノ粒子接合体もしくは従来法の標識に接合されうる。細胞母集団は、ついでレセプター標識化リガンド複合体がその間に生成するのに十分な時間、第1および第2の標識化リガンドとともにインキュベートされる。半導体ナノ粒子が標識として利用されるとき、ルミネセンス発光強度が測定され、母集団は強度および色の変動により識別されうる。

【0040】

本発明の半導体ナノ粒子接合体のための他の適したアッセイおよび使用は、当業者にとって容易に決定されうる。

【0041】

次の例は例証を提供するのみであり、本発明の範囲を限定するものではない。当業者は、具体的な試薬および条件が次の実施例で略述されるが、変更はなされ得、それは本発明の精神および範囲により包含されると理解するであろう。

実施例1 - アミノデキストランの製造

アミノデキストラン - 3Mおよび - 3000がオレゴン州 Eugene の Molecular Probes, Inc. から入手された。デキストラン、アミノ、称呼分子量 2,000,000、Cat. No. D-7145がオレゴン州 Eugene の Molecular Probes, Inc. より購入された。ロット 6551-3 についての分析値：130 アミン/モル。Viscotek 三重検出システム（下記参照）によるこのロットのアミノデキストランの分子量

測定は、 $\sim 3 \text{ MDa}$ を与えた。したがって、 $3,000,000 \text{ g/mol} \div 162.1 \text{ g/mol}$ グルコースモノマー = $18,507$ グルコース単位/デキストラン分子または $130/18,507 = 0.00702$ 、すなわち反応グルコース単位当り1つのアミン基との置換度 $\sim 1/142$ である。他に表示がなければ、置換度はアミノデキストラン分子中のモノマーグルコース単位あたりのアミノ基(1級もしくは2級)の合計数として定義される。異なる平均分子量($20,000 \text{ Da}$ および $500,000 \text{ Da}$)のデキストランがFluka Companyから得られた。

【0042】

アミノデキストランの製造のためのデキストラン、T-2Mはこの製造に関する他の化学薬品と同様にSigmaから得られた。すべての無機化学薬品は試薬グレードあり、さらには精製されなかった。

1. 1x - アミノデキストランおよび5x - アミノデキストランの製造

1x - アミノデキストランおよび5x - アミノデキストランは次のように製造された。1X - Amdexの標準的な製造において、固体デキストラン80gがデキストランすべてを溶解するために蒸留水600mL中に混合された。蒸留水100mLによろかいたされたm - 過ヨウ素酸ナトリウム8.56gが強く攪拌しながら、約10分間にわたってデキストラン溶液に滴下して添加された。その後、混合物は室温でさらに3時間攪拌された。ついで得られる粘性のある反応混合物は蒸留水2Lで希釈され、チューブアダプターキットKA12-3Pを有する、中空系カートリッジ、A/G Technology Corp.モデルUFP-5-E-35, 5000分子量カットまたはモデルUFP-30-E-35, 30,000分子量カットを用いて脱塩された。蒸留水約18~22Lが最終pH6.0~6.5を有する溶液を得るために用いられた。最終的に、洗浄、酸化された。デキストラン溶液800mLに室温で約10分間にわたり、無色の液体1,3 - ジアミノプロパン(DAP)80mLがゆっくり添加された。ついで得られる混合物は室温でさらに3時間攪拌された。ついで、水酸化ナトリウム1mMを40mLに溶解された水素化ホウ素ナトリウム3.2gが、攪拌下に約5分間にわたって室温でアミノデキストラン反応混合物中に添加された。得られる混

合物はさらに1時間攪拌され、ついで中空系カートリッジを用いて脱塩された。蒸留水約20~25Lが比コンダクタンスを約3~4 $\mu\text{mho} \cdot \text{cm}^{-1}$ に、そしてpHを6.0~5.5に低下させるのに必要であった。アミノデキストランの最終的な容量は400mLであった。この溶液は0.2 μm 殺菌酢酸セルロースフィルターを通過され、ついでモデルTDS-00030-A, Dura-Dryマイクロプロセッサ制御凍結乾燥機(FTS Systems, Inc.)で48時間にわたって凍結乾燥され、フレーク状の、淡黄色結晶48gを収率52%で得た。元素分析はC、42.53; H、6.52; N、1.01; O(差引き)であった。 $\text{C}_{40}\text{H}_{84}\text{NO}_{40} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ について計算されると: C、42.61; H、6.57; N、1.01; O、49.81である。実験式 $\text{C}_{49}\text{H}_{90}\text{NO}_{43}$ はグルコース31単位、完全(2)DAP置換糖環1単位および水3単位にもとづく式に非常に類似する。DAPによるデキストランの置換度は1/32であった。他の実験は置換度1/28および1/45の間を変動した。同様の結果が、1X~5X-ジアミノプロパン置換を伴う10K~2MDaの称呼平均分子量を有するデキストランから製造されたアミノデキストランに対して得られた。すべてのアミノデキストランはデキストランの1X酸化で用いられた過ヨウ素酸ナトリウム量の2~5倍を用いて上述の方法により最初に製造された。シッフ塩基生成のために用いられるDAP量は一定に保持された。変更は過ヨウ素酸塩酸化、ジアミン添加およびホウ素水素化物還元反応についてなされた。第1の変更は咲に使用された化学量論的2:1ジアミン:過ヨウ素酸塩モル比をわずか10%過剰を用いることであった。第2にジアミン添加反応は5~10の範囲で実施された。第3に、ジアミン添加反応はシッフ塩基生成のために近紫外(UV)領域で分光学的にモニターされ、連続的なスペクトル分析がプラトーが到達したことを示すときに終了したと考えられた。ついで反応は停止された。これらの変更は解重合を減少させ、そしてもっと高収率の生成物を与えた。500gデキストランの規模で製造された5X-Andex, ロット-11の元素分析は、C=44.45%, H=7.20%, N=3.79%, O(差引き)44.56%であった。実験式は $\text{C}_{13.7}\text{H}_{26.4}\text{O}_{10.3}\text{N}$ 、であり1.5ジアミノプロパン置換糖環($\text{C}_{9.5}\text{H}_{21}\text{O}_2\text{N}_3$)の1単位あたりグルコース5単位にもとづく式 $\text{C}_{13}\text{H}_{24}\text{O}_9$

N · H₂Oに類似し、デキストランのDAP置換変1/6である。同様の結果が300gデキストラン規模で5X - Amdex、ロット - 69について得られた。

2. 架橋5X - Amdex - アミノデキストラン

架橋5X - Amdexが変更した手順で製造された。T - 2Mデキストラ500g、3.08モルは蒸留水5000mLを含む1ガロンWaringblenderモデルCB6の商業的なステンレス鋼ボウルに移された。混合物が、すべての白色固体のデキストランが溶解されるまで通常約5分間、2/1最大速度で混合された。蒸留水2000mL中のm - 過ヨウ素酸ナトリウム267.5g、1.25モルの溶液が5ガロン円筒タンク中で強く真上からの攪拌を用いて5~15分間にわたってデキストラン溶液に添加された。過ヨウ素酸塩添加が終了した後に、反応混合物がさらに約4時間室温で攪拌された。蒸留水約5000~6000mLがさらに反応混合物に4時間にわたって添加され、溶液の粘度を低下させた。4時間後に、反応量12Lは初期比伝導度7.40mmho · cm⁻¹および初期pH2.65を有していた。ついで反応混合物は中空系カートリッジを用いて脱塩された。洗浄は蒸留水約100Lを用いてなされ、比コンダクタンス約6~20umho · cm⁻¹およびpH6.5~7.0を有する洗浄、酸化デキストラン溶液6000~9000mLを得た。デキストランアルデヒド溶液は雰囲気温度でゲル化しやすいので、デキストラアルデヒドがDAP添加前に完全に溶解したことをまず確認した。ついで純液体であるDAPの第1部分70mLが約5分間にわたって脱塩、酸化デキストラン溶液に添加された。得られた溶液はすぐにゲル生成を示しはじめ、黄色溶液として再溶解するまでもう5~10分間持続した。ついで反応混合液は反応温度8~10℃をいじするために氷浴に付され、DAPの第2部分70mLが5分間かけて添加される前に強く攪拌された。さらに10分間の攪拌後に、DAPの第3の最部分70mLが反応混合液に添加された。合計DAP添加および反応時間は45分間であった。ついで1mM水性水酸化カリウム700mL中の水素化ホウ素ナトリウム70g、5.00モルが頭上攪拌下に約10~15分間にわたり8~10℃で反応混合物に添加された。ホウ素水素化ナトリウム添加が終了した後に反応混合物は黄色のシッフ塩基色が消失するまでさらに2時間攪拌された。ついで反応混合物は中空系カートリッジ

で脱塩された。1つの実験において、合計容積7500mLで、初期化コンダクタンスは約30.3mmho-cm⁻¹、初期pHは11.79であった。蒸留水約80Lが比コンダクタンス10~20umho-cm⁻¹およびpH7.0~8.0を有する架橋5X-アミノデキストラン溶液約1600mLを製造するのに使用された。アミノデキストラン溶液は1.6μmガラスフィルターでろ過され、最小72時間、凍結乾燥され、フレーク状、白~淡黄色結晶75~90g(15~18%収率)を生成した。5X-Amdex、ロット1~5の分析は良好な収率の接合体を与え、C=41.38%、H=7.81%、N=4.15%、O=45.64%、I=97ppm、B=590ppmであった。実験式はC_{11.6}H_{26.1}O_{9.6}Nであり、1.5ジアミノプロパン置換糖環1単位あたりグルコース4単位にもとづく式C_{11.2}H_{20.3}O_{7.3}N・2H₂Oに類似する。このようにデキストラン中のDAP置換度は1/5であった。同様の手続が5X-Amdex、ロット2-2の製造に用いられたが、ただし、1/3xDAPは2つの部分に分けて生成物に与えられ、分析値はC=40.44%、H=7.75%、N=3.48%、O=48.48%でDAP置換度は1/8であった。

【0043】

高ジアミン濃度は解重合を引起し、したがって原料デキストランより著しく低い分子量のアミノデキストランを与えた。 - 脱離およびそれによる解重合[basemer, A.Cらの「in Cellulose Derivatives: Modification, Characterization, and Nanostructures」, T.J. HeinzeおよびW.G. Glasserの、Eds. (ACSSymposium Series 688, American Chemical Society, Washington, DC, 1998), Chapt. 5, 73~82頁]はセルロースおよびでんぷんのようなグルカンの種々の酸化反応において以前から示されていた。enconostoc mesenteroides NRRLB-512により製造されるデキストラン中のグルコース単位の過ヨウ素酸塩酸化が示され[Jeanes, AおよびWilham, C.A.のJ. Amer. Chem. Soc. 72, 2655(1950), Van Cleve, J.W.らのJ. Amer

. Chem. Soc. 78, 4435 (1956)] , 無水グルコース残基の95%による反応グルコース単位モルあたり1モルのギ酸を放出した。このように2段階の過ヨウ素酸塩酸化反応についての全体レドックス式は、 $2 \text{IO}_4^- + \text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5 \rightarrow 2 \text{IO}_3^- + \text{C}_5\text{H}_6\text{O}_4 + \text{HCOOH} + \text{H}_2\text{O}$ であり。完全な反応のために1モルグルコース単位もしくは2モルアルデヒドあたり2モルの過ヨウ素酸塩を必要とする。しかし、5X - Amdex製造においては、2.5モルグルコース単位あたりわずか1モルの過ヨウ素酸塩または5モルグルコース単位あたり2モルの過ヨウ素酸塩が用いられ、理論置換度は1/5、すなわちデキストラン中の5単位から1グルコース単位が2つのアルデヒド基で置換される。このようにデキストランのDAPでの最大置換度も1/5、すなわちデキストラン中の5グルコース単位が2つのDAP基で置換され、DAPによるアルデヒド基の架橋はないと考えられる。

【0044】

いくつかの5X - Amdexロットはさらに説明を要する。とくに5X - Amdex、ロット11 - 6の反応混合物はDAPおよびホウ素水酸化ナトリウムの添加後に、水性塩酸でpH 8.5に調節された。ついでそれは脱塩、濃縮され、上述の方法で、凍結乾燥された。5X - Amdex、ロット11 - 6についての元素分析はC = 39.72%、H = 7.77%、N = 4.44%、Cl = 2.81%、O = 45.26%であった。実際の分析にもとづく実験式は $\text{C}_{10.4}\text{H}_{24.3}\text{O}_{8.9}\text{NCl}_{0.25}$ であった。塩素分析は4の全アミン(1級および2級)基のうち1つが塩素対イオンを有していた。1級アミン基のみが、反応混合物が凍結乾燥前に脱塩される中性pH近くでプロトン化されると仮定すると、これはアミノデキストランのジアミノプロパン基の50%がデキストラン鎖の間で架橋しているか、もしくは架橋基であることを意味する。これらの架橋DAP基は2級アミノ基のみを含む。このようにアミノデキストランの単独置換グルコース残基のための理想繰り返し単位は、次の配列を含む：(a) 1つの架橋DAP、2つの非架橋DAP；2つの架橋DAP；2つの非架橋DAP；1つの架橋DAP；(b) 2つの架橋DAP；2つの架橋DAP；4つの非架橋DAP；または(a)もしくは(b)配列のいずれかのいくつかの置換。凍結乾燥されたアミノデキスト

ラン塩酸塩の1部が蒸留水に溶解され、上清の比伝導度が最小となるまで；混合床（ H^+ 、 OH^- 形態）、BiO-RadAG501-X8樹脂でバッチ式で脱イオン化された。樹脂はレイヨン布により懸濁液のろ過で除去され、ろ液中のアミノデキストラン（ $\sim 50\text{ mg/mL}$ ）はアセトンでの沈澱により分別された（0～43%カット）。固体沈殿物はアセトンで洗浄され、シリカゲルで真空弟子ケータール中で乾燥された。この脱イオンおよび分別物質の元素分析はC = 45.5%、H 7.03%、N 3.82%、Cl < 0.5%、O（差引き）= 43.60%、であり塩化物イオンが除去されたことを示す。

実施例2 - 光散乱、粘度、および屈折率データ

90°光散乱が、COULTER（商標）N4MDサブミクロン粒子アナライザを用いて1cmパスセル中で蒸留水中の10mg/mLのデキストランおよびアミノデキストランについて測定された。値はデキストランについて $7.4 \times 10^4 \sim 1.1 \times 10^5$ カウント/mLで $2.9 \sim 3.7 \times 10^4$ カウント/sec；5X-Amdexロットについて10mg/mLで $2.5 \times 10^4 \sim 1.2 \times 10^5$ カウント/secに変動し、これに対して蒸留水は 4.5×10^3 カウント/secであった。

【0045】

11の試料、1つのデキストランおよび10のアミノデキストランについての分子データは、Viscotek（テキサス州Houston）の三重検出システム〔Haney, M.A., Gillespie, D, およびYau, W.W., のToday's Chemist at Work 3(11), 39(1994)〕による2重バッチ分析から測定され、表1に要約される。器械システムは、モデルT-60微分粘度形/光散乱二重検出器、および670.0nmダイオードレーザー源を有するモデルLR40示差レーザー屈折計からなる。方法および分析の原理は説明されている〔Haney, 上述のとおり〕。試料はバッチモードのカラム充填なしに0.01"の同一ステンレス鋼の50'コイルからなるカラムにより0.2M水性硝酸ナトリウム中で0.7～1.0mg/mLの濃度で実施された。2つの溶解プロトコールが従われた：1.試料1, 3, 5, 6および8に対して $\sim 70 \sim 80$ で5～10分間最小加熱することによる；2.

試料2, 4, 7, 9, 10および11について、室温で1~2時間、第1の浸液し、ついで $\sim 70 \sim 80$ で30分間加熱することによる。3つの主な検出器の応答は次のとおりである：光散乱、 $M \times (dn/dc)^2 \times c$ ；粘度計、 $IV \times C$ ；屈折率計、 $dn/dc \times c$ 。粘度計検出を組合わされるとき右角度の光散乱は分子量を与える。90°のLSは、粘度計で与えられる分子の大きさの情報と一緒に、デバイの式を用いて角度不斉について補正される。粘度計は配置および分枝に関連する分子密度を与え、そして屈折率形は試料の濃度で測定し、ポリマー試料の屈折率増加、 dn/dc の直接測定を与える。超らせん化Rgの半径の3乗に関連する溶液中のポリマー分子の流体力学容積は固有粘度（IVもしくは η ）およびアボガドロ数で割られた重量平均分子量（Mw）に直接に比例する。三重検出器システムによりRg値の精度は0.5nm以内が要求される。

【0046】

【表1】

表1 デキストランおよび種々のアミノデキストランについての三重検出システムデータ

試料	濃度 mg/mL	dn/dc, mL/g	M _w , kDa	IV, dL/g	R _g , nm	R _h , nm
1. 5X-Amdex, lot -11	0.860	0.155	414	0.262	15.6	38.2
2. 5X-Amdex, lot -11	1.940	0.132	25.6	0.0602	3.79	9.28
3. 1X-Amdex	0.940	0.155	1,044	0.442	25.2	61.7
4. 1X-Amdex	3.480	0.132	93.9	0.205	8.80	21.5
5. Dextran, T-2M	0.800	0.147	2,102	0.609	35.5	87.0
6. 5X-Amdex, lot 1-5	0.800	0.190	70.0	0.167	7.38	18.1
7. 5X-Amdex, lot 1-5	3.010	0.132	34.4	0.100	4.96	12.1
8. Amdex-3M	0.770	0.155	2,999	0.674	41.3	101.2
9. 5X-Amdex, lot -69	2.400	0.132	69.95	0.141	7.06	17.3
10. 5X-Amdex, lot 11-6	2.610	0.132	44.5	0.0999	5.40	13.2
11. 5X-Amdex, lot 2-2	2.390	0.132	168.4	0.186	10.35	25.3
デキストラン*			54,600		70.0	
デキストラン**			65			25.0
デキストラン**			20			20.0
デキストラン**			500			45.0

* Bovey, F. A., J. Polym. Sci. 35, 167(1959).

**Titova, E. F., et al., Farmatsiya 23(5), 12(1974).

【0047】

11の試料についてのデータは図1に示されるように $\log(IV)$ 対 $\log(M_w)$ noMark-Houwinkプロットを構成するのに用いられた。すべてのデータに対する線形回帰(Linear regression)分析は、相関係数0.976、Y切片-3.062および傾き0.451を与えた。その傾きはMark-Houwink-Skuradaの式、 $[\eta] = KM^a$ における指数に相当し、上述の試料においてその値は、編集されているように $[K$

urata, M. および Tsunashima, Y. の *Polymer Handbook*, J. Brandrup および E. M. Immergut, Eds. (Wiley-Interscience, New York, 1989) chap. VII, 1~55頁] 25 で水中での 20,000~100,000 Da のデキストランの線状画分について得られた $a = 0.50$ に非常に近い。指数のこの値、 $a = 0.50$ は線状の可とう性ポリマーについて、「シータ」温度もしくは溶媒条件下で確立されたものであり、一方、800,000 Da のデキストランの分枝画分については 25 の水中で、 $a = 0.20$ を与えた。したがってアミノデキストランは水性硝酸ナトリウム溶液中で、緻密な、球状構造に配置された可とう性、線状鎖のようにふるまい、そして 5X-Amdex 中の 1 級アミノ基の正の電荷は緻密なデキストラン構造に作用するには十分でないと結論づけられた。ランダムにコイルした、線状ポリマー分子の超らせんの半径は $R_g^2 = 1/6 n l^2$ としてランダムウォーク統計に由来し、ここで n はポリマー鉛における統計学的セグメント数、 l は各統計学的セグメントの長さである。さらに、ランダムコイルにおける平均 2 乗端 - 端 (end-to-end) 距離は $R^2 = n l^2$ [Hiemenz, P. C. の *Principles of Colloid and Surface Chemistry* (Marcel Dekker, New York, ed. 2, 1986) 102~107頁] により与えられる。このように、正確な R_g および光散乱および粘度ならびに元素分析 (実験式および置換度) により得られる質量 / 平均分子量値を用いることは、平方根平均 2 乗端 - 端距離、 R 、セグメントあたりの平均分子質量、 M_i 、統計学的セグメントの数、および各ポリマーにおける統計学的セグメント長さを計算するために可能となる。ついで、これらの後者の値は約 8 長として報告された [Bovey, F. A. の *J. Polym. Sci.* 35, 167 (1959)] 1.6 - 結合グルコースの単 1 単位の長に比較されうる。統計学的セグメント長さはアミノデキストランについて 7.5 ~ 9.0 であった。デキストラン中の 1、6 - グルコシル単位の残基間のメチレン基のまわりの自由回転は、グリコース残基がエーテル結合によってのみ結合される硝酸セルロース [Doty, P. らの *J. Amer. Chem. Soc.* 75, 754 (1953)] における 1、

4 - グルコシル単位の鎖の剛性に比較してデキストラン鎖についての格別の可とう性を与えるようにみえる。2,000 Daより大きい分子量のデキストランについての従来の研究は、繊維の開いた、拡張構造ならびにセルロースおよびプロデオグリカンのような細胞外のマトリックス多糖類と比較して、すべて指摘される球状構造〔Bovey, 上述のとおり; Titova, 上述のとおり〕を示した。

実施例3 アミノデキストランのゲル電気泳動

リン酸塩緩衝塩類液、1×PBS, pH 7.1~7.3および伝導度13,500~15,500 $\mu\text{mho} \cdot \text{cm}^{-1}$ が、 K_2HPO_4 26.9 g dm^{-3} , KH_2PO_4 6.4 g dm^{-3} および NaCl 170.0 g dm^{-3} を含む20×PBS貯蔵液から蒸留水で希釈して製造された。アミノデキストランのドデシル硫酸ナトリウム - ポリアクリルアシトゲル電気泳動 (SDS-PAGE) が、30~300 kDa分子量範囲のための4~15ゲル勾配およびSDS緩衝液細片を用いて、Pharmacia PHASTシステム上で400V (65V-h) で実施された。アミノデキストランのためのこのシステムの使用はSDS緩衝液細片のpH 8での1組アミン基のプロトン化および装入、ならびに広く用いられているCoomassie青染色 (Pierceカタッグ) の負に荷電したスルホネート基とプリント化アミン基の間の選択的静電相の研究に適用される電気泳動は、サイズ排除クロマトグラフィーよりももっと詳細な分子量分布を付与することが示された〔Smisek, D. I.らのMacromolecules 22, 2270 (1989)〕ので、電気泳動団でのバンドの拡散からアミノデキストランのサイズ分布の正確な測定を得ることを希望した。固体アミノデキストランのいくつかのロットは水性媒体への溶液に抵抗した; このように2つのプロトコールが完全な溶解のために試料を試験する必要があった。プロトコール1において、~70~80 °Cでの蒸留水中で試料の最小限の加熱は5~10分間実行されたが、プロトコール2では同一試料は30分間、同様に加熱された。両方の溶解プロトコールは1×PBS緩衝液のAmdex溶液1mg/mL (それぞれSDS緩衝液で1:1に混合) を製造するのに用いられ、ついで高分子量(200,166,97,66、および45 kDa) 標準試料とともに実験された。ゲ

ル電気泳動バンドは2つの実験についてCoomassie青のままであり、図2に示される。分子量範囲は、同一ゲル中の5つの標準の相対的に狭いバンド位置に照らして、各レーンのゲルの最も青い染色の範囲からアミノデキストランについて評価された。5X-Amdexロット1-5, 2-2、-11および11-6、ならびに1X-Amdexロット75はそれぞれ、約30~75、60~190、50~150、35~250および150~250KDaの範囲の分子量をプロトコール溶解についてあたえ、そしてプロトコール溶解についてはそれぞれ約30~75、55~175、40~90、30~110および150~250KDaであった。5X-Amdexロットはもっと広範なプロトコール溶解手順で、もっと低分子量フラグメントへの最大の変化を示した。大部分の場合、Viscotek三重検出器(光散乱、粘度、屈折率)システム測定から測定された平均分子量は、電気泳動団の種の位置が厳密にその大きさに対する装入比に依存としても、SDS-PAGEにより示される範囲の中央に低下した。

実験4 - 本発明のCdSナノ粒子の製造

CdSナノ粒子の製造に関するすべての溶液は新たに製造され、各実験の前に0.22 μ m孔径幕膜によりろ過された。CdS分散対のUV-可視スペクトルはPerkin Elmer Lambda6UV/visもしくはBeckmanDU640分光光度計で記録された。CdSなノ粒子の粒径は従来刊行された検定曲線〔Weller, H.らのChem. Phys. Lett. 124, 557(1986)にもとづいて光吸収の徴候から測定された。Amdex-CdS分散対のルミネセンス発光スペクトルは380nm励起を用いて、Tracor Northern TN6500急速走者分光計検出システムを備えたSpex Fluorolog器械で記録された。

A. 制御されたダブルジェット沈澱(CDJP)のための装置は従来詳しく述べられている〔Wang, LらのCollid Polym, Sci. 275, 593(1997); Schulty, M.およびMatijejevic, E.のColloids Surf. 131, 173(1998); Lee, S.-H.らのJ. Colloid Interface Sci. 186, 193(1997)〕代表的な実験で、それぞれCd(II)塩およびNa₂Sを含む溶液の等

容量 (50 cm^3) が、同時にぜん動ポンプ (peristaltic pumps) により、 10 cm^3 /分の一定流速でジャケット付き反応器に導入された。反応器は水性の5x-アミノデキストラシン溶液 100 cm^3 を含み、 700 rpm で攪拌された。反応器の外部ジャケットは 25 ± 0.1 に保持された温度調節循環水浴に接続された。溶液を混合すると、すぐにCdSゾルを生成したが、さらに15分間攪拌された。この実験に使用された実験条件の要約は下の表2に示される。

【0048】

Cd(II)塩に存在するアニオンの種類に関して、得られるCdS分散体の粒径および光学的性質の依存性を確立するために、それぞれ等量の CdCl_2 、 $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ 、 $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ 、 CdSO_4 および $\text{Cd}(\text{ClO}_4)_2$ の 1×10^{-3} M 溶液が 1×10^{-3} M の Na_2S 溶液と反応された。CdS および 5X-アミノデキストラシンの最終濃度はそれぞれ 2.5×10^{-4} M および 2.5 g dm^{-3} であった。反応物濃度の効果を確立するために、実験は比較的高い (1×10^{-1} M まで) 濃度の CdSO_4 および Na_2S を用いて実行された。

【0049】

合成CdS分散体のルミネセンス強度を増強するために、いくつかの実験で、比較的高濃度のCd(II)塩 (1.3×10^{-3} M) が使用されたが、一方、 Na_2S の濃度は同一に保持され、なお反応物溶液の同一容量を維持した。この理由から、数滴の 0.1 M の NaOH 溶液も $\text{pH} \sim 11$ に到達するように製造されたCdS分散体に添加された。

B. 反応物溶液の急速混合

この手順は CdSO_4 溶液 100 cm^3 を、5x-アミノデキストラシン 5 g dm^{-3} を含有する攪拌 Na_2S 溶液 100 cm^3 に急速添加し、 $[\text{Cd}^{2+}] / [\text{S}^{2-}] = 1$ に保持することからなる。この実験で用いられる CdSO_4 および Na_2S 溶液の濃度は表2に示される。

【0050】

【表2】

表2 CDJPおよび急速混合法によるナノサイズCdS粒子の製造条件。
5x-アミノデキストラン, ロット 11-6の最終濃度は 2.5 g dm^{-3}
である。

	CdSO ₄ + Na ₂ S溶液 の初期濃度試料		最終CdS濃度 (M)	評価粒径 (nm)	懸濁液 安定性
	(M)	pH			
CDJP法					
a	0.001	9.1	0.00025	2.7	安定
b	0.01	9.0	0.0025	4.0	安定
c	0.1	8.8	0.025	~8.0	安定
急速混合法					
a 1	0.0005	9.1	0.00025	2.2	安定
b 1	0.005	9.0	0.0025	3.1	安定
c 1	0.05	8.8	0.025	-	不安定

【0051】

大きさが異なるアミノデキストラン(5x-アミノデキストラン、ロット11-6、1-5、および2-2、1x-アミノデキストラン、Amdex-3MおよびAmdex-3000)、安定性、および蛍光の影響を評価するために、CdSナノ粒子が $1.5 \times 10^{-3} \text{ M}$ のCd(ClO₄)₂を、 $1 \times 10^{-3} \text{ M}$ のNa₂Sを含み、アミノデキストラン濃度を $0.05 \sim 16 \text{ g dm}^{-3}$ で変動する溶液 50 cm^3 と急速混合することにより製造された。同一の実験が濃度 2.5 および 20 g dm^{-3} のデキストラン500, 000で、ならびに 5 g dm^{-3} のデキストラン20, 000で実行された。溶液の混合はただちにCdSゾルを生成するが、さらに15分間攪拌された。すべての試料において、pHはNaOHで ~ 10.5 に上昇された。

C. (A) CDJPおよび(B)急速混合により製造されたナノ粒子の粒径

異なるCd(II)塩および安定剤として、5x-アミノデキストラン、ロット11-6で製造され、 $[\text{CdS}] = 2.5 \times 10^{-4} \text{ M}$ に希釈されたCdS分散体の吸収スペクトル(図3)が、得られるナノ粒子の粒径を評価するために用いられた。このように、CdCl₂溶液で得られたゾルは、平均粒径 2.3 nm に相当する $\lambda_{\text{max}} \sim 425 \text{ nm}$ (スペクトルa)の吸収徴候を示すが、Cd(NO₃)₂,

CdSO_4 、および $\text{Cd}(\text{ClO}_4)_2$ により溶液中で沈殿されたものは、2.7 nmの径(0 ~ 455 nm、スペクトルb, cおよびd)を有する。

【0052】

図4は、 $[\text{CdS}] = 5 \times 10^{-4} \text{M}$ に希釈後のCDJPプロセスの間の時間とともにCdS分散体の吸収スペクトルの変化を示す。吸収徴候における高い方の波長へのシフトは、6秒後の2.3 nmから5分後の約8 nmへの粒径増加を示す。

【0053】

5x-アミノデキストラン、ロット11-6を含む、得られるCdS分散体の粒径への、 CdSO_4 および Na_2S 溶液の異なる濃度の影響が図5に示される。比較の目的のために、すべての分散体は $[\text{CdS}] = 2.5 \times 10^{-4} \text{M}$ の同一濃度に希釈された。

【0054】

吸収の徴候は、反応物濃度が 1×10^{-3} から $1 \times 10^{-1} \text{M}$ に増加するにつれて、460 nmから540 nmまで上昇した。前者の徴候値は2.7 nmの粒径に相当するが、後者は比較的大きな粒径の生成を示し、その大きさは、Weller, H.らのChem. Phys. Lett. 124, 557 (1986)で与えられる検量曲線から確定しえない。しかし、Weller, H.のAngew. Chem. Int. Ed. Engl. 32, 41 (1993)で報告された結果から、これらの粒子の大きさが約8 nmであると評価されうる。類似の傾向は、急速混合法(図6)で製造されたCdSナノ粒子でも観察され、すなわち CdSO_4 および Na_2S のモル濃度が 5×10^{-4} から $5 \times 10^{-3} \text{M}$ に変化されたときに、粒径は2.2から3.1 nmにシフトした。

【0055】

その2つの手順で得られた結果は、同一条件でCDJPおよび急速混合法がCdSナノ粒子を含む分散体を生成することを示す。しかし、急速混合はCDJPよりも一貫して小さいCdS粒子を生成した(表2)。さらに、比較的高い反応物濃度で得られた分散体は、CDJP法が使用されるとき、もっと安定である。

【0056】

別な方法で同一濃度のCdSにおける懸濁安定性および粒径の差異は、2つの方法による粒子生成のメカニズムが異なることを示す。CDJPの間、反応物は

同時に反応器に供給され、核の連続的生成を可能にし、ついでもっと大きなクラスタに集合しうる。粒子成長は沈殿プロセスの間の吸収徴候値の徐々の増加により確認される(図4)。これらの結果は懸濁色彩の観察される変化と一致する：沈殿プロセスのはじめの淡黄色から、その終りに明るいオレンジ色に。急速混合プロセスはもっと大きい過飽和のために同時のもっと大きい核濃度を生じる。ついで、これらの核はもっと小さい粒子に成長し(表2)、多分拡散メカニズムによる。これらの分散の比較的低い安定性は比較的小さい粒子の比較的大きい比表面積に多分よるのであろうが、比較的大量のポリマーがこの系を安定するのに要求される。

【0057】

CDJP法により製造されるCdS懸濁のルミネセンススペクトルは、pH約9でCdSの等しい最終濃度において、 CdSO_4 で得られる粒子の発光強度は、他のCd(II)塩で製造された系のそれよりはるかに低い(図7)。すべての場合、ルミネセンス強度最大値は $\sim 540\text{nm}$ であり、バンドギャップ端 500nm 、および長めの波長でのトラップルミネセンスを有する。このように、カドミウム塩とともに供給されるアニオンの種類は、図3および7に示されるように、CdSナノ粒子の大きさおよび発光強度の両方に強い影響を有する。ルミネセンスクエンチへのアニオンの影響は従来記述されており〔Henglein, A.のBer. Bunsenges. Phys. Chem. 86, 301 (1982)〕、電子による再結合の前に、半導体表面の正孔は、アニオンとイオン-対-型表面複合体を形成し、ルミネセンスをクエンチすると考えた。試験されたアニオンの中で、多分 SO_4^{2-} イオンはCdS表面に最強の親和性を有し、発光を最小の強度にする。

【0058】

Cd^{2+} の30%モル過剰でpH系を増加することよりルミネセンスを活性化することは、図8に明りように示される。同一のCdS懸濁液の発光強度はpH9でよりpH11で著しく高い。比較的高いpH値でのCdS分散体の発光強度の著しい増加(図8)はCdS表面上の $\text{Cd}(\text{OH})_2$ 層の生成により引起され得、電荷キャリアのトラッピングに責任のある表面の不完全さを阻害している。その $\text{Cd}(\text{OH})_2$ 層も、非放射性再結合を犠牲にして放射性再結合速度を増加する〔Well

er, H. のAngew. Chem. Int. Ed. Eng. 32, 41 (1993); Spanhel, L. のJ. Am. Chem. Soc., 109, 5649 (1987)]。

D . C d S ナノ粒子の大きさ、安定性およびルミネセンスに対する異なるデキストランおよびアミノデキストランの影響

C d S ナノ粒子の吸収スペクトル (図 9) は、製造に使用されたデキストラン 5 0 0 , 0 0 0 のすべての濃度について 5 1 5 nm の吸収徴候を示す。同一の吸収徴候も、デキストラン 2 0 , 0 0 0 5 g dm^{-3} を含む C d S 分散体で得られた。粒径は 5 nm より大きいと評価された [Henglein, A. Chem Rev. 89, 1861 (1989) ; Fojtik, A. らの Ber. Bunsenges. Phys. Chem., 88, 969 (1984)]。これらの懸濁液のどれもルミネセンスではなかった。

【 0 0 5 9 】

アミン誘導体化多糖類、アミノデキストランの使用は C d S ナノ粒子の大きさおよび吸収特性に重大な影響を及ぼす：すなわち、高ポリマー濃度の存在下で、吸収スペクトルはよく構成され、急勾配の吸収徴候は分散の狭い粒径分布を示す青の波長範囲 (図 1 0) にある。具体的には、1 x - アミノデキストランの濃度が 0 . 0 5 ~ 1 6 g dm^{-3} に増加は、(他の反応物の同一濃度を保持して、) 5 2 0 nm (スペクトル h、粒径 > 5 nm) から 4 2 0 nm (スペクトル a、粒径 = 2 . 3 nm) への吸収の徴候シフトを生じる (図 1 0)。濃度 > 1 g dm^{-3} でこのポリマーで製造された C d S 分散体は約 1 ヶ月間安定なままであるが、比較的少量を有するものは数日間のみ安定である。

【 0 0 6 0 】

図 1 1 は相対的なルミネセンス強度は 1 x - アミノデキストランの濃度増加とともに高く、最大 4 9 0 nm であり最大 A m d e x 濃度で 5 0 0 nm にシフトし、約 1 5 0 nm のバンド幅であることを示す。

【 0 0 6 1 】

5 x - アミノデキストラン、ロット 2 - 2 - C d S 分散体の挙動は 1 - アミノデキストラン - C d S 分散体のそれに類似する。図 1 2 は 5 x - アミノデキストラン、ロット 2 - 2 および 1 x - アミノデキストランの関数として C d S 粒子の平均径を比較する。

【0062】

特に、図12は、CdSナノ粒子の平均径がアミノデキストランの濃度が大きくなるにつれて減少することを示す。

【0063】

5x - アミノデキストリン、ロット2 - 2 - CdS分散体のルミネセンススペクトルは低いAmdex濃度に対して490nmで最大値を示し、最大濃度で約500nmにシフトし、約150nmのバンド幅を維持する(図13)。

【0064】

すべてのAmdex - CdS分散体のスペクトルの特徴は同一の器機の設定(5および2.5nmスリット)、励起源、およびすべての測定のための蛍光セルを用いることにより比較上の基礎に置かれた。大部分の実験において、Amdex濃度は2.5, 5.0, 10および20 g dm⁻³であり、一方、CdS濃度は5 × 10⁻⁴, 1 × 10⁻³, 5 × 10⁻³および1 × 10⁻² Mであった。1x - アミノデキストラン - CdS分散体は2つの最低CdS濃度について任意ユニット(arbitrary units)で約40 ~ 90に増加するルミネセンス強度を示した。1 × 10⁻³ Mより大きいCdS濃度ではほとんど、もしくは何もルミネセンス強度は検出されなかった。5x - アミノデキストラン、ロット2 - 2 - CdS分散体は2つの最低CdS濃度に対して70 ~ 50 a.u.にわたる強度、そして1 × 10⁻³ Mより大きな濃度に対しては < 5 a.u.を有していた。ルミネセンスバンド幅は、比較的低いAmdex濃度で約100nmと比較的狭かった。5x - アミノデキストラン、ロット11 - 6 - CdSゾルは、最低CdS濃度に対して100 ~ 75 a.u.に及ぶ約490nmでのルミネセンス強度、そしてすべてのAmdex濃度で100nmの比較的狭いルミネセンスバンド幅を示した。再び、最高の2つのCdS濃度は最大で < 5 a.u.のルミネセンス強度を与えた。5x - アミノデキストラン、ロット1 - 5 - CdSゾルは、最低の2つのCdS濃度に対して約80 ~ 130 a.u.の490nmでのルミネセンス強度を示し、約100nmの比較的狭いバンド幅を有していた。比較的高い2つのCdS濃度でのヒドロゾルはすべて15 a.u.未満の最大ルミネセンス強度を有した。最低CdS濃度でのAmdex - 3 M - CdS懸濁液は530 ~ 540nmの間で最大のルミネセンス強度2

～5 a.u.を示し、バンド幅約100 nmであった。比較的高いCdS濃度で製造されたゾルはたいてい不安定であり、数時間内に沈降する白色沈殿の生成を示した。吸収徴候からの平均CdS粒径は3.2～4.1 nmに及んだ。Amdex-3000-CdS分散体は、450～510 nmの最大バンドで20～190 a.u.のルミネセンス強度および75～100 nmの最も狭いバンド幅を、2つの最低CdS濃度で与えた。2つの最高濃度で製造されたゾルは不安定で、<5 a.u.の強度を与えた。吸収徴候から得られたCdSナノ粒子径は非常に小さく、最低CdS濃度に対して2.4～1.9 nmの範囲であった。同一容量の20 g dm⁻³で5x-Amdex、ロット1-5分子の数に対して1×10⁻³ MのCdS 200 mL中に生成するmLあたりの2.8 nm径CdSナノ粒子の数と比べるために上記濃度のアミノデキストランおよび硫化カドミウムを使用するのも教訓的である。かさ密度4.50 g cm⁻³およびナノ粒子あたり11.49 nm³の容積を有する2×10⁻⁴ モルCdS (144.47 g モル⁻¹) に対して、我々は2.8×10¹⁵ 粒子/mLを得る。20 g dm⁻³で平均MW 34.4 kDa の5x-Amdexは3.5×10¹⁷ 分子/mLを与える。このように、5x-Amdex分子に対するナノ粒子の比は20 g dm⁻³で約1:100である；しかし5x-Amdex 0.2 g dm⁻³で、その比は約1:1である。アミノデキストラン-CdS分散体の安定性およびルミネセンス強度は、それらが1～20 g dm⁻³の範囲で過剰ポリマー濃度で製造されるときにはるかに大きい。

【0065】

ポリマーキャリア、アミノデキストラン、特徴の範囲は幅広い種類のアミノデキストランを含むために拡張されている。20 g dm⁻³でCdSナノ粒子製造に用いられるアミノデキストランについて、合計アミン濃度の順序は：

Amdex-3 M [8.7×10⁻⁴ M] < Amdex-3000 [1.1×10⁻² M] < 1X-Amdex [1.2×10⁻² M] < 5X-Amdex、ロット2-2 [8.2×10⁻² M] ~ 5X-Amdex、ロット11-6 [8.2×10⁻² M] < 5X-Amdex、ロット1-5 [9.8×10⁻² M] であった。各20 g dm⁻³アミノデキストラン溶液における合計アミン(1級および2級)の濃度は表3に示されるデータから算出された。

【0066】

【表3】

表3 アミノデキストランについてのアミン置換データ

	MW, Kda	グルコース 単位分子 あたり	置換度	モルジアミノプロ パン モルAmdex あたり	モルアミン モルAmdex あたり
5X-Amdex, lot 1-5	34	209.7	2/5	83.9	167.8
5X-Amdex, lot 11-6	44.5	274.5	1/3	91.4	182.8
5X-Amdex, lot 2-2	168.4	1038.9	1/3	345.9	691.8
1X-Amdex	93	573.7	1/20	28.7	57.4
Amdex-3M	3,000	18,507	1/142		130
Amdex-3000	3	18.5	1/11		1.7

【0067】

増加するルミネセンス発光強度の順序は：

Amdex-3M〔約3～4〕<5X-Amdex、ロット2-2〔50〕<5X-Amdex、ロット11-6〔約60～80〕<1X-Amdex〔約90〕<5X-Amdex、ロット1～5〔約90～120〕<Amdex-3000〔約180～190〕であった。5X-Amdexロットは増加する合計アミン濃度を有し、増加するルミネセンス発光の一般的傾向に並ばないことに留意されたい；しかし、5X-Amdexのロット間で、その傾向は維持される。水性溶液におけるAmdexの増加する大きさの順序は：Amdex-3M〔R=101.2nm径〕>5X-Amdex、ロット2-2〔25.3nm〕>1X-Amdex〔21.5nm〕>5X-Amdex、ロット11-6〔13.2nm〕>5X-Amdex、ロット1-5〔12.1nm〕>Amdex-3000である

。大きさが最小のアミノデキストランは最も強いルミネセンス発光を有するCdS-アミノデキストラン接合体を生じたことを留意されたい。さらに最大のCdS-Amdexナノ粒子は、最大のAmdex (3MDa) が最少のアミノ基 (置換度1/142) および最低のアミン濃度を有するので、最小のルミネセンス強度を示した。

【0068】

デキストランを用いてルミネセンスCdSナノ粒子を製造することは不可能であるが、強いルミネセンスは反応混合物の濃度に依存して、アミノデキストランで達成されることが留意されるべきである。この知見は、デキストラン分子中のアミノ基および高pH媒体の存在がCdSナノ粒子ルミネセンスの活性化に必須であることを示す。1x-アミノデキストランで得られた粒子よりも5x-アミノデキストランで製造された粒子の高いルミネセンス強度はこれらの2つのポリマーの置換度の差異によりもっとも生じやすい。明らかな問題はいかにアミノ基がルミネセンス強度を増強するかである。従来の研究は、クラスター表面の化学修飾へのルミネセンス量子生成の強い敏感さを報告している [Fojtik, A., Weller, H., Koch, U., およびHenglein, A.のBer, Bunsenges. Phys. Chem. 88, 969 (1984); Rossetti, R.らのJ. Chem. Phys. 80, 4464 (1984)]。CdSナノ結晶のウルツ鉱もしくは閃亜鉛鉱型結晶構造は、表面カドミウム原子にイオウ原子の最近接に少な目の結合、ナノ結晶の内部に通常の4つの代わりに3つ、を残す。半導体ナノ粒子は表面欠陥部位の高密度を有し、広範囲のエネルギーをカバーすることが知られている [Fojtik, A., 上述のとおり; Henglein, 上述のとおり; Nozik, A.のJ. Phys. Chem. 90, 12 (1986)]。これらの部位の大部分はミッドバンドギャップエネルギーに存在し、生成した電子ホール対を最初に捕捉することを含む。

【0069】

Dannhauserおよび共同研究者の研究は、CdSナノ粒子の懸濁液に添加される時、いくつかの3級アミンは有意にルミネセンス強度を増強することを示した [Dannhauser, T.らのJ. Phys. Chem., 90, 6074 (1986)]。この効果はミッドバンドギャップ相の修飾、多分アミンへのCd²⁺結合に関係する、によると解釈

された。後者は部位エネルギーを上昇し、効率的なトラップとしてこれらの部位を除去し、したがってルミネセンス強度を増加させる。

【0070】

CdSナノ粒子からの増強されたルミネセンス発光強度は、アミノデキストランの単1ポリマー分子のドメインにおいて多数のナノ粒子を生成することにより達成される。径2~3nmのナノ粒子は5x-アミノデキストラン、 $R = 9.28 \sim 25.3$ nmおよびMW = $25.6 \sim 168.4$ Daよりも実質的に小さく、それはつづいてモノクローナル抗体と一緒に使用された。このように、1つより多いナノ粒子が5x-アミノデキストランの単1分子に付着されることができる。これは上述のように、アミノデキストランにモノクローナル抗体と一緒に多数のフィコエリスリン(PE)分子を複合するのに似ている。PEは分子量270,000 Daおよび径27.7 nmを有し、単分散性である。CdSナノ粒子は同様に特徴づけられうる。CdS粒子あたりの原子数は、2.8 nm径の球状粒子あたりの容積を 11.49 nm^3 として、4つのCdS単位もしくは8原子により占められる単位セル(キュービックスセルについて 0.5975 nm 端)の容積 0.2133 nm^3 で割ることにより算出される。商($11.49 \text{ nm}^3 // 0.2133 \text{ nm}^3 / 8$ 原子)は431原子である。原子の1/2はカドミウムであり、そして1/2はイオウであるので、2.8 nm径のCdS粒子の分子量は($215 \times 112.41 + 215 \times 32.06$) = 31,000 Daとして評価される。閃亜鉛鉱型構造におけるバルクCdSの密度は 4.50 g/cc であり、典型的な有機ポリマーの密度よりも4倍大きい;このように、CdS粒子の大きさは典型的な5x-アミノデキストランよりも、比例して小さい。

【0071】

大きなルミネセンス強度を生じ、活性化剤に適度に安定性を有する、アミノデキストランと一緒に、CdSナノ粒子の最適生成を得るための主な成功基準は次のとおりであるように思われる: 1. 高いアミノデキストラン濃度; 2. デキストラン中のアミン(1級および2級)基の高い濃度; 3. アミノデキストランの高分子量; 4. 過剰Cd(II)イオン濃度; 5. 高いpH。

【0072】

本実験は、ナノ結晶表面とアミノデキストランとの間の相互作用がアミノデキストラン分子中のアミン基の置換度を変えることにより制御され得、大きさ、安定性、およびCdS分散体の光学的性質を、組成およびこれらのポリマーの濃度の選択により適合させることができる、ことを示した。

実施例5 - CDJP法によるナノ粒子の製造

CDJP法において、硫酸亜鉛 ($ZnSO_4$) および硫化ナトリウム (Na_2S) 溶液 50 cm^3 が、安定化剤として5x-アミノデキストランを含む水性溶液 100 cm^3 中に 10 cm^3 /分の一定流速で別々に、そして同時に導入された。分散体は 700 rpm で攪拌された。すべての実験は 25°C の一定温度で実行された。

【0073】

反応物、すなわち亜鉛塩および硫化ナトリウムの濃度は $1 \times 10^{-3}\text{ M} \sim 1 \times 10^{-2}\text{ M}$ に変動されたが、一方、モル比は $[Zn^{2+}] / [S^{2-}] = 1$ で一定に保持された。系における5x-アミノデキストランの濃度は 5 g dm^{-3} で一定であった。これらの溶液の濃度を変えると、イオン強度が変動し、粒径に作用し得る。ZnS分散体の生成において使用された沈殿条件の要約が表4に示される。

【0074】

【表4】

表4 5 g dm^{-3} の5x-アミノデキストランの存在下でCDJP法によりナノサイズZnS粒子を製造するための条件

試料	$[Zn^{2+}]$ & $[S^{2-}]$ M	pH	色	吸収生起 nm	バンドギャップ eV
a	0.001	9.2	無色	290	4.28
b	0.005	8.6	無色	299	4.15
c	0.01	8.3	無色	306	4.05

【0075】

5x-アミノデキストランの存在下でCDJP法による硫化亜鉛の沈殿はナノサイズ粒子の安定分散体をもたらした。粒径の差異は、吸収の徴候から認識され

得、反応物濃度への粒径の依存性を示す。 $5 \times 10^{-4} \text{ M}$ のZnS分散体から測定された吸収の徴候は290 nm (試料a) から306 nm (試料c) にシフトした。これらの結果は、巨視的 (macroscopic) 固体 (3.67 eV) としてZnSのものより大きい量子エネルギーに相当し、量子化ZnSナノ粒子の生成を示す。バンドギャップは文献 [Henglein, A.らのBer. Bunsenges. Phys. Chem. 87, 852~858 (1983); Weller, H.らのBer. Bunsenges. Phys. Chem. 88, 649~656 (1984); Dunstan, D.E.らのJ. Phys. Chem. 94, 6797~6804 (1990); Qi, L.らのColloids Surfaces 111, 195~202 (1996)] に報告されているものよりエネルギーが多少大きく、非常に小さな量子化ZnSナノ粒子の生成を示す。このように、5x-アミノデキストランはナノサイズZnS粒子をCDJP法で製造するための良好な媒体を付与する。

実施例6 - 混合したCdS - ZnSナノ粒子の製造

単一のCdSもしくはZnSナノ粒子も $2 \times 10^{-3} \text{ M}$ の CdSO_4 もしくは ZnSO_4 溶液 50 cm^3 を、5x-アミノデキストラン 5 g dm^{-3} を含有する $2 \times 10^{-3} \text{ M}$ の Na_2S 溶液 50 cm^3 と急速混合することにより製造された。最終的なCdSもしくはZnS濃度は $1 \times 10^{-3} \text{ M}$ であった。

【0076】

合計濃度 $2 \times 10^{-3} \text{ M}$ (しかし異なる比で) で CdSO_4 および ZnSO_4 を含む溶液 50 cm^3 を、 $2 \times 10^{-3} \text{ M}$ の Na_2S 溶液 50 cm^3 と急速混合すると混合 $\text{Zn}_x\text{Cd}_{1-x}\text{S}$ ナノ粒子の生成をもたらした。最終的な $\text{Zn}_x\text{Cd}_{1-x}\text{S}$ 濃度は 1×10^{-3} であったが、x値は溶液中に含まれる Cd^{2+} と Zn^{2+} のモル比により決定されて変動された。

【0077】

これらのナノ粒子の化学組成およびいくつかの特性が表5に示される。

【0078】

【表5】

表5 混合CdS-ZnSナノ粒子の特徴づけ

試料	組成	pH	色	吸収生起 nm	バンドギャップ eV
a	ZnS	9.0	無色	294	4.22
b	Zn _{0.7} Cd _{0.3} S	9.1	無色	344	3.60
c	Zn _{0.5} Cd _{0.5} S	9.3	無色	375	3.31
d	Zn _{0.3} Cd _{0.7} S	9.4	淡黄色	406	3.05
e	CdS	9.5	黄色	431	2.88

【0079】

単1のZnSナノ粒子は294nmに吸収徴候を有し、これはバンドギャップ4.22eVに相当し、非常に小さな量子化ZnSナノ粒子の生成を示す。単1のCdS粒子は431nmに吸収徴候を示し、平均粒径<2.5nmに相当する。Zn_xCd_{1-x}Sナノ粒子の吸収スペクトルは、CdSとZnSナノ粒子のスペクトルの間にあることがわかった。吸収徴候は、Zn_xCd_{1-x}SにおけるZnの量が増加するにつれて、431nmから294nmに、短いほうの波長方向に系統的にシフトした。混合ナノ粒子は単1のCdSナノ粒子から単1のZnSナノ粒子に連続的に同調しうるエネルギーギャップを示す。

【0080】

Zn/Cdモル比1:1で別々に製造された単1のCdSナノ粒子および単1のZnSナノ粒子の混合物についての吸収スペクトルは、単1のCdSおよびZnSのものに相当する、2つの別々の吸収端を示し、共沈ナノ粒子と異なりCdSおよびZnSスペクトルの重層をほとんど反映する。

実施例7 - アミノデキストランへの金属イオン配位

水性媒体中のアミノデキストランの存在下でCdSナノ粒子の生成メカニズムについての一貫した描写の表現に重大なのは、アミノデキストラン上の部位への金属イオン結合の初期的可能性である。この目的点に向けて、実験が実施され、対照としてデキストランを用いて、発色団の、水性銅(II)イオンをアミノデキ

ストランと反応させた。実験質量 $1,381.2 \text{ Da}$ を有し $\text{C}_{49}\text{H}_{84}\text{O}_{40}\text{N} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ として分析されたロット - 26 1 X - A m d e x が使用された。このように、1つの糖環を2つのジアミノプロパンで置換された最小のくり返し単位の分子量は $5,525 \text{ Da}$ である。1つの実験において、1 X - A m d e x、ロット - 26 の 2.000×10^{-4} モルもしくは 1.105 g および同一量の対照、デキストラン T - 2 M 1.105 g が別々に蒸留水 50 mL に溶解された。ついで、各試料に、蒸留水 10 mL に溶解した酢酸ナトリウム 2.00×10^{-3} モル、もしくは 0.328 g 、つづいて蒸留水 25 mL に溶解した $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 5/2 \text{H}_2\text{O}$ 2.00×10^{-3} モル、もしくは 0.465 g が段階的に添加された。各試料の合計容量は蒸留水で 100 mL に調節され、そして混合物は磁石で3日間攪拌された。Cu(II) - デキストラン混合物は濁っており、可視～近UV領域での電子吸収スペクトルを測定する前に $0.45 \mu\text{m}$ フィルターでろ過された。混合期間後に、Cu(II) - デキストラン試料は $\text{pH} = 5.31$ 、伝導度 = $6.05 \text{ mmho} \cdot \text{cm}^{-1}$ 、 $\lambda_{\text{max}} = 771 \text{ nm}$ 、および $A_{771} = 0.453$ を与え、一方、Cu(II) - 1 X - A m d e x 試料は $\text{pH} = 5.79$ 、伝導度 = $5.68 \text{ mmho} \cdot \text{cm}^{-1}$ 、 $\lambda_{\text{max}} = 747 \text{ nm}$ 、および $A_{747} = 0.534$ を与えた。ついで両試料は、膜ろ過 (A/G Technology Corp. モデル U F P - 30 - E - 4 中空系カートリッジ、 $30,000 \text{ Da}$ MW カット) により蒸留水で別々に洗浄され、過剰塩を除去した。洗浄後に、無色の Cu(II) - デキストラン試料は $\text{pH} = 6.53$ 、伝導度 = $4.25 \mu\text{mho} \cdot \text{cm}^{-1}$ を与え、 400 および 900 nm の間に 0.007 単位より大きい検出可能な吸収はなかった；一方、明らかに青い Cu(II) - 1 X - A m d e x 試料は $\text{pH} = 6.32$ 、伝導度 = $4.05 \mu\text{mho} \cdot \text{cm}^{-1}$ 、 $\lambda_{\text{max}} = 630 \text{ nm}$ 、および $A_{630} = 0.050$ を与えた。洗浄の前後に Cu(II) 種の d - d 転移に由来する弱い吸収バンドはそのモル吸光係数 (molar extinction coefficients) をあまり変えないと考えて、約 10% 残る吸収は、1 X - A m d e x の二重にジアミノプロパン置換された糖部位のすべてを正確に占めるのに必要な量の Cu(II) に一致する。すべての Cu(II) - 1 x - A m d e x 試料は凍結乾燥され、乾燥固体 0.765 g を与え、 630 nm 吸収バンドのモル吸光係数は約 $35 \text{ dm}^3 \cdot \text{cm} / \text{mol}$ であると算出された。固体の元素分析、N 0.56% および Cu 0

54%は二重にジアミノプロパン置換されたグルコース残基の4N部位の85%がCu(II)により占められていることが示された。これらのDAP置換された残基の分子モデルは、デキストランの同一グルコース残基上に置換された2つのジアミノプロパン単位の4つの窒素電子対ドナー原子へのCu(II)の4-配位が立体的に実施可能であることを示した。Cu(NH₂CH₂CH₂CH₂N)₂からなる2つの6員キレート環は安定な遷移金属キレートについての公知の配位化学と矛盾しない。異なるグルコース残基上の2つのジアミノプロパン単位の分子内もしくは分子間Cu(II)架橋は立体的にはあまり好ましくない。Zn(II)およびCd(II)のような他の2価遷移金属イオンの同様な結合は期待される。Cu(II)イオンに対する1X-Amdexの選択性は、上述のように、しかしZn(NO₃)₂・6H₂Oからの50倍過剰のZn(II)イオンの存在下で、同一量の1X-AmdexおよびCu(II)とともに示された。混合物は一夜攪拌され、ついで膜ろ過で洗浄され、薄青色溶液を与え、pH=6.75、伝導度=4.15 μmho·cm⁻¹、 λ_{max} = 618 nm、およびA₆₁₈ = 0.038であった。Cu(II)のみが存在するときの吸収に対する比較は、過剰Zn(II)の存在下で79%のCu(II)配合をした。周期律表において同一のIIB族であるので、カドミウム(II)はZn(II)と同様にアミノデキストランに結合することが期待される。

実施例8 - T4抗体 - 5X - Amdex - CdS接合体の製造

Coulter T4モノクローナル抗体、CD4クローンSFCl 12T4D11(IgG1)、は、末梢ヒトTリンパ球(フロリダ州MiamiのBeckman Coulter, Inc.からのT4抗体)で免疫されたBALB/cJマウスのひ臓細胞によりマウスNS/1-AG4細胞をハイブリダイゼーションして得られた。

【0081】

T4-5X-Amdex-CdS接合体の発光および励起スペクトルは励起のためにキセノンランプを用いてShimadzuモデルRF5000U分光蛍光分析計(spectrofluorimeter)により測定された。準弾性(quasi-elastic)光散乱、QELS(すなわち光子相関分析(photon correlation spectroscopy), PCS)お

よびその解析はCOULTERモデルN4MDサブミクロン粒子アナライザーで得られ、それは粒度分布プロセッサ(SDP) 分析ならびに632.8nm He/Neレーザー励起を有する多重散乱角検出を伴う。

【0082】

Pierceカタログ〔Pierce Catalog and Handbook, Life Science & Analytical Research Products, 1994/95, Pierce Chemical Company, Rockford、イリノイ州〕および他の説明〔Wong, S.S.のChemistry of Protein Conjugation and Cross-Linking (CRC Press, Inc., Boca Raton、フロリダ州、1991) ; Hermanon, G.T.のBioconjugate Techniques (Academic Press, San Diego、カリフォルニア州、1996) ; Aslam, M.およびDent, A.のBioconjugation-Protein Coupling Techniques for the Biomedical Sciences (Grove's Dictionaries Inc., New York, NY, 1998) 〕に詳細に説明されている、標準的な1級アミノ官能基活性化および接合手順が続けられた。スルホサクシンイミジル4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシレート(スルホ-SMCC)はPierceの製品であるが、一方、2-イミノチオラン、L-システイン遊離塩基、およびヨードアセトアミドはSigmaグレードであった。

【0083】

実験7において、5X-Amdex、ロット1-5濃度、 20 g dm^{-3} で製造された生の5X-Amdex-CdS分散体10mLが精製され、平衡化されたG-25 Sephadexカラム $2.5\text{ cm} \times 48\text{ cm}$ で緩衝液を交換され、 $1 \times \text{PBS}$ で溶出され、120滴($\sim 3.6\text{ mL}$)の画分を捕集された。2つのルミネセンスバンドが366nm UVランプで観察され、狭い第1バンドと、幅広く明るい第2バンドであった。第2バンドの最も明るい画分の3つ(24~26)が一緒にされ10.8mLの容量となった。スルホ-SMCC溶液0.200mL($1 \times \text{PBS}$ 10mg/mL中)が活性化のために使用された。混合物は1時間、ローラー混合され、ついでG-25 Sephadexカラム〔Pharmacia Biotek〕で分離され、合計容量7.2mLの2つの最も明るい画分(23および24)を残した。47.16mg/mLのT4抗体濃縮物25mgが2.0mg/mLの2-イミノチオランの $1 \times \text{PBS}$ 溶液0.161mLで活性化された。 $1 \times \text{PBS}$

S緩衝溶液0.976 mLが混合物に添加され、ついで1時間ローラー混合された。混合物はG-50 Sephadex〔Pharmacia Biotech〕で精製され、第1バンドの中央画分を残し、3.831 mg/mLの4.5 mLもしくは17.240 mgのIT-T4を含んでいた。スルホ-SMCC-5X-Amdex-CdS懸濁液7.2 mLのIT-T4溶液4.5 mLとの接合はローラー混合で2時間を実施された。接合混合物は、1×PBSで平衡化されたBio-Gel A-5mカラム(Bio-Rad Laboratories)(2.5 cm×48 cm)で分離された。2つの初期のブロードな、不十分に分離されたバンド(画分22~30、32.4 mLおよび31~40、36.0 mL)は、残され、それぞれ貯蔵され、IEC Centra 8遠心分離で20分間、2000 rpmで3.7および2.8 mLにそれぞれ遠心分離され、Amicon Centri-Prepの30チューブに濃縮された。実験(Run)9および10は同様に実行された。ただし15 mLの生5X-Amdex-CdSゾルはG-25 Sephadexで精製され、10 mg/mLスルホ-SMCC溶液0.300 mLが活性化に用いられ、そしてスルホ-SMCC-5X-Amdex-CdSの2つの最も明るい画分(22および23)が貯蔵され、実験9のIT-T4の17.000 mg(5.229 mL)と混合された。実験10は実験9と同様であったが、10 mg/mLのスルホ-SMCC溶液0.400 mLが使用され、スルホ-SMCC-5X-Amdex-CdSの4つの最も明るい画分(21, 22, 23および24)が貯蔵され、IT-T4の17.900 mg(5.000 mL)と混合された。実験7, 9および10のBio-Gel A-5mカラムから捕集された画分のUVモニターレコーダーのトレースが、図14に、各実験からの特定の、貯蔵画分のSDS-PAGE結果とともに示される。

【0084】

従来の5X-AmdexのCD3抗体との接合〔米国特許5,527,713; 5,658,741号明細書〕のように、スルホ-SMCCとの、またはフィコエリスリンおよびモノクローナル抗体との、5X-Amdexの同一レベルの活性化を用いることは、5X-Amdex 25 mgにつき、10 mg/mLのスルホ-SMCC溶液0.450 mLもしくはスルホ-SMCC(MW、436.37 g

/モル) 0.010 mモルを必要とする。4 × 355.3 Daの2つのジアミノプロパン基くりかえし単位およびくりかえし単位あたり2モルの1級アミンのために、5 X - Amdex 25 mgにつき、アミン基0.035 mモルがある。このように、スルホ - SMCCに対するアミンモル比は3.5であり、5 X - Amdex中の1級アミンの約30%を活性化するのに十分なスルホ - SMCCを与える。5 X - Amdex - CdS接合体を用いるこの実験において、最良の結果は約10倍の低い活性化レベルで得られ、そこではスルホ - SMCCに対するアミンのモル比は約30 ~ 50であり、5 X - Amdex中の1級アミン基の2 ~ 3%を活性化するのに十分なスルホ - SMCCを与えた。上述の手順において、10 mg/mLスルホ - SMCC溶液の0.400 ~ 0.900 mLのもっと高いスルホ - SMCC量はCdSナノ粒子のルミネセンス強度を約5 ~ 10倍の非常に低レベルに低下させた。接合の間の18 ~ 42 mgのもっと高いIT - T4量はBio - Gel A - 5カラム (Bio - Rad Laboratories) 上の画分35 ~ 50にもっと過剰の抗体を単に与えただけであり、フリーの抗体から接合体の不十分な分離をもたらした。

実施例9 - 精製5 X - Amdex - CdSおよびT4抗体 - 5 X - Amdex - CdS接合体

生のゾル15 mLが1 × PBSで平衡化したG - 25 Sephadexカラム (2.5 cm × 48 cm) の頂部に加えられた。120滴もしくは約3.6 mLの画分が捕集された。画分No. 21の狭い第1バンドおよび画分No. 23 ~ 25の幅広い第2バンドがA₂₈₀ モニターならびに手支持ランプ (366 nm、モデルUVL - 21 Black - Rayランプ、Ultra-Violet Products, Inc., San Gabriel, CA) で観察され、カラムのルミネセンス発光を観察した。吸収スペクトル、360 nm励起ルミネセンス発光スペクトル、およびQELSが関連画分について測定され、結果は表6に要約される。

【0085】

【表6】

表6 G-25 Sephadexでクロマトグラフ分析された未加工5X-Amdex-CdSゾル画分データ

画分No.	ルミネセンス強度 任意ユニット	90° 光散乱強度 カウント/sec × 10 ⁴	平均径 nm
20	214	2.34	4.5(3)
21	255	6.91	4.4(3)
22	586	8.79	4.7(3)
23	980	8.35	7.0(3)
24	910	6.33	9.2(3)
25	840	4.29	10.4(2)

【0086】

約365nmでの最大吸収は画分No. 21について観察された；しかし、最大ルミネセンス発光強度は3つの画分、No. 23～25で検出され、一方、最大90°光散乱は画分No. 22および23で生じた。T4-5X-Amdex-CdS接合体は図15の実験7試料でみられるように、280nmを中心とする付加的なタンパク吸収バンドを示した。さらに、T4-5X-Amdex-CdS接合体のいくつかの実験の発光スペクトルは図16において、同一の蛍光計設定で比較される。500nmでのこれらの発光バンド強度の最高は親の5X-Amdex-CdS複合体について、さらに、1×PBS緩衝溶液中の5μM濃度で蛍光、有機染料、フラ-2,5ペンタカリウム塩(Molecular Probes, Inc.)について、約4～5倍低い。実験7接合体、画分22～30および画分31～40についてのQELSの結果は、試料あたり3つの測定からの平均径についてそれぞれ、32.7nmおよび24.3nmであった。貯蔵された5X-Amdex-CdSの生ゾル画分について平均径9nmを用いると、5X-Amdex-CdS粒子まわりのT4モノクローナル抗体(IgG1クラス)の層の平均厚さは11.8および7.6nmとそれぞれ計算された。

実施例10-T4-5X-Amdex-CdS接合体の生物学的活性

全血の対照 (IMMUNO-TROL (商標)、Beckman Coulter Inc., Miami、フロリダ州) が12×75mmチューブに100μL容量で送り出された。T4-5X-Amdex-CdS接合体懸濁液がそれぞれのチューブに添加された。試料は1×PBS中のジギトニンもしくはサポニン (Sigma) のいずれかで処理され、赤血球の非酸分解を与えた。T4-5X-Amdex-CdS接合体のタイター (10~50μL) はリンパ球CD4レセプター部位の飽和を確立するために実施された。1×PBS中の500μg/mLジギトニンもしくは0.1%サポニン溶液の500μLが添加され、混合され、チューブ中の試料混合物とともに1~2分間、それぞれインキュベートされた。細胞はチューブにPBSF (0.01%アジ化ナトリウム、2.5%ウシ胎児血清を含む1×PBS) 2mLを添加することにより洗浄され、200gで5分間、遠心分離され、上清溶液は廃棄され、PBSF 1mLが添加された。各実験は非処理 (T4-5X-Amdex-CdSでない) 対照を含み、負のゲート領域およびT4-5X-Amdex-CdS処理対照のための蛍光バックグラウンドを確立するためにT4-5X-Amdex-CdS接合体結合を同定する。処理対照は、さらにひ臓抗マウス抗体-フィコエリスリン、SAM-PE (Silenus Laboratories, Hawthorne、オーストラリアの製品) を含むチューブに15分間、インキュベートすることにより得られ、結合T4-5X-Amdex-CdS接合体で細胞の%を同定する。処理されたIMMUNO-TROL細胞はCOULTER (登録商標) EPICS (登録商標) Elite ESP (商標) 流動細胞計測法で分析された。細胞懸濁液は100mW出力レーザーパワーで488.0nmに同調されたアルゴンイオンレーザーを用いて励起された。PEもしくはFITCからの蛍光発光はフォトマルチプライヤーを用いて干渉フィルターにより捕捉された。10,000の結果が、電子ノイズおよび破片を識別した後に各試料について捕集された。すべての試料データは集められ、さらなるデータ減少のためにリスト態様で記憶された。

【0087】

T4-5X-Amdex-CdS接合体/SAM-PEと混合され、そしてジギトニンもしくはサポニンで分解された全血対照について述べられたように調製

された試料の流動細胞計測法から得られたヒストグラムが図17の上部半分に示される。T4-5X-Amdex-CdS/SAM-PEの代りに、直接マーカーT4-FITCで処理された、同一の全血対照のヒストグラムは、図17の下部半分に示される。パーセントT4ポジティブリンパ球についての同様な結果は、精製T4-5X-Amdex-CdS接合体は参照マーカーT4-FITCのようにリンパ球上の同一レセプター部位を標識化することを確認する。このように、T4-5X-Amdex-CdS接合体の生成モデルおよびT4+リンパ球へのその結合は図18に示される。

【0088】

流動細胞計測法の結果は、すべてのカルコゲン化カドミウムを直接的なルミネセンス標識として一様に使用することは不可能であることを示す；むしろ、CdSeおよびCdTe粒子のみが、可視および近赤外スペクトル領域でバンドギャップ吸収バンド最大値を示し、直接マーカーとして容易に使用される潜在能力を有する。MW範囲30~75kDaのアミノデキストランに、近UVレーザー線で励起されて付着される2~5nm径のCdSナノ粒子のルミネセンス発光強度は白血球セルを高蛍光バックグラウンドから識別しうるほどには十分ではなかった。5~10nm径のもっと大きなCdSナノ粒子は、それらの励起バンドは400~500nmの可視光領域にシフトされるので有用であり得、そこでは白血球からのバックグラウンド蛍光強度はそんなに高くない。さらに、100~500kDaの範囲のもっと大きい5X-アミノデキストランは分子あたり、もっと多くのCdSナノ粒子を備え、これらのマーカーの傾向強度を増強する。

【図面の簡単な説明】

【図1】

表1に示される1つのデキストランおよび10のアミノデキストラン試料に関するデータから構成されるMark-Houwinkプロットを示す。

【図2】

1xPBS緩衝溶液に溶解された種々のアミノデキストランロットについてのSDS-PAGEの結果を示す：LHS、プロトコール1溶解；RHS、プロトコール2溶解。各セットにおいて、レーン1~6L~Rは5X-Amdex、口

ロット1～5；5X - Amdex、ロット2 - 2；5X - Amdex、ロット - 11；5X - Amdex、ロット11 - 6；および1X - Amdex、ロット - 75をそれぞれ含む。5つの狭いバンドを含むレーンは分子量標準を含む。

【図3】

1×10^{-3} モル dm^{-3} (M) Na_2S 、 1×10^{-3} モル dm^{-3} (M) (a) CdCl_2 、(b) $\text{Cd}(\text{ClO}_4)_2$ 、(c) $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ 、(d) CdSO_4 溶液、および5x - アミノデキストラン、ロット11 - 6 5 g dm^{-3} を使用する、制御されたダブル - ジェット沈殿 (CDJP) 法により製造されたCdSナノ粒子の吸収スペクトルを示す。

【図4】

CDJP法開始後の6秒、30秒、3分、および5分後に集められたCdS試料の吸収スペクトルを示す。 CdSO_4 および Na_2S 溶液の濃度は 1×10^{-3} モル dm^{-3} (M)、5x - アミノデキストラン、ロット11 - 6は 5 g dm^{-3} であった。

【図5】

安定化剤として 5 g dm^{-3} の5x - アミノデキストラン、ロット11 - 6を用いて、(a) 1×10^{-3} 、(b) 1×10^{-2} および(c) 1×10^{-1} モル dm^{-3} (M) CdSO_4 および Na_2S 溶液を用いるCDJPにより製造されたCdSナノ粒子の吸収スペクトルを示す。

【図6】

安定剤として 5 g dm^{-3} の5x - アミノデキストラン、ロット11 - 6を用いて、(a1) 5×10^{-4} および(b1) 5×10^{-3} モル dm^{-3} (M)の CdSO_4 および Na_2S 溶液の急速混合により製造されたCdSナノ粒子の吸収スペクトルを示す。

【図7】

1.3×10^{-3} モル dm^{-3} (M)の CdCl_2 、 $\text{Cd}(\text{ClO}_4)_2$ 、 $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ 、および CdSO_4 溶液ならびに 1×10^{-3} モル dm^{-3} (M)の Na_2S 溶液を用いるCDJPにより製造されたCdSナノ粒子の蛍光発光スペクトルを示す。 CdS および5x - アミノデキストラン、ロット11 - 6の最終濃度はそ

れぞれ 2.5×10^{-4} モル dm^{-3} (M) および 2.5 g dm^{-3} であった。

【図8】

図7と同一条件で CdSO_4 および Na_2S 溶液で製造された CdS 分散体のルミネセンス発光の強度に対する pH の影響を示す。

【図9】

デキストラン 500,000 (2.5 および 20 g dm^{-3}) および 5 g dm^{-3} のデキストラン 20,000 の異なる濃度を用いて、 3×10^{-3} モル dm^{-3} (M) $\text{Cd}(\text{ClO}_4)_2$ および 2×10^{-3} モル dm^{-3} (M) Na_2S 溶液で製造された CdS ナノ粒子の吸収スペクトルを示す。

【図10】

安定剤として異なる濃度の 1x-アミノデキストラン: 16 (a), 8 (b), 4 (c), 2 (d), 1 (e), 0.5 (f), 0.2 (g) および 0.05 (h) g dm^{-3} 、を用いて 3×10^{-3} モル dm^{-3} (M) $\text{Cd}(\text{ClO}_4)_2$ および 2×10^{-3} モル dm^{-3} (M) Na_2S 溶液で製造された CdS ナノ粒子の吸収スペクトルを示す。

【図11】

安定剤として、異なる濃度の 1x-アミノデキストラン: 16 (a), 8 (b), 4 (c), 2 (d), 1 (e), 0.5 (f)、および 0.2 (g) g dm^{-3} 、を用いて、 3×10^{-3} モル dm^{-3} (M) $\text{Cd}(\text{ClO}_4)_2$ および 2×10^{-3} モル dm^{-3} (M) Na_2S 溶液で製造された CdS ナノ粒子のルミネセンススペクトルを示す。

【図12】

CdS ナノ粒子の平均径 vs. 1x-アミノデキストランおよび 5x-アミノデキストラン、ロット 2-2 の濃度、のプロットである。

【図13】

安定剤として異なる濃度の 5x-アミノデキストラン: 16 (a), 8 (b), 4 (c), 2 (d), 1 (e), 0.5 (f) および 0.2 (g) g dm^{-3} 、を用いて、 3×10^{-3} モル dm^{-3} (M) $\text{Cd}(\text{ClO}_4)_2$ および 2×10^{-3} モル dm^{-3} (M) Na_2S 溶液で製造された CdS ナノ粒子のルミネセンススペクトルを

示す。

【図14】

$T_4 - 5X - Amdex - CdS$ 接合体混合物についての、 A_{280} モニターの読み対Bio-Gel A-5mの画分No.クロマトグラムを示す：A. 実験(run)7; B; run9; C, run10。RHSについてSDS-PAGEの結果は次のとおり：A. レーン1、貯蔵画分22~30; レーン2、貯蔵画分31~40; レーン3、精製 T_4 -抗体; 標準; B、レーン1~3、Sephadex G-25上で精製された $5X - Amdex - CdS$ 複合体の連続画分; レーン4、IT-T4抗体; レーン5、貯蔵画分31~40; レーン6、標準; C、レーン4、標準; レーン1, 2, 3, 5および6は、それぞれ貯蔵画分31~35, 36~40, 41~45, 46~50、および51~55である。

【図15】

1xPBS緩衝溶液中の $T_4 - 5X - Amdex - CdS$ 接合体の吸収スペクトルを示す：上部、run7、貯蔵および濃縮画分31~40; 下部、run7、貯蔵および濃縮画分22~30。

【図16】

360nm励起した1xPBS緩衝溶液中の $T_4 - 5X - Amdex - CdS$ 接合体のルミネセンス発光スペクトルを示す：A、run7、貯蔵および濃縮画分22~30; B、run9、貯蔵および濃縮画分31~40; C、run10、貯蔵および濃縮画分31~45; およびD、run10、貯蔵および濃縮画分36~40。

【図17】

流動細胞計測法ヒストグラムを示す。細胞数(蛍光の場合)対log(蛍光強度)であり、全血対照、デジトニンもしくはサポニンで分解; ならびに抗-CD4-FITC蛍光マーカーで全血対照中の T_4 +細胞の直接標識化した、 $T_4 - 5X - Amdex - CdS$ 接合体/SAM-PE混合物に関する。

【図18】

$T_4 - 5X - Amdex - CdS$ 接合体の生成、ならびに T_4 +白血球へのその結合を示す概略図である。

【圖 1】

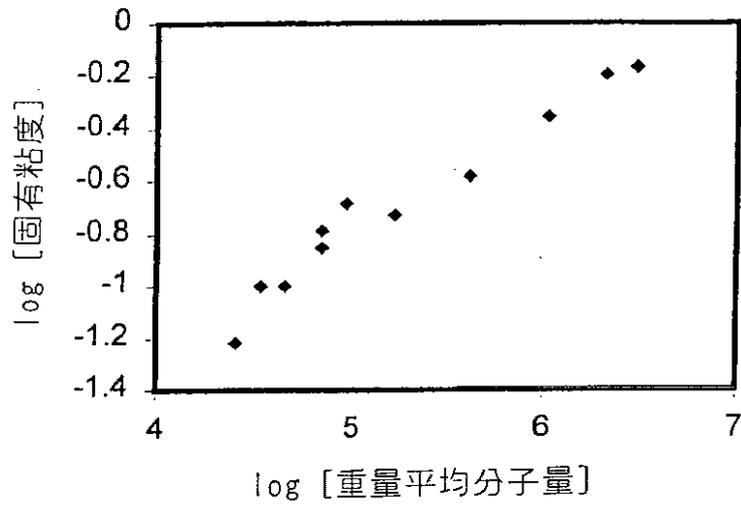


FIG. 1

【圖 2】

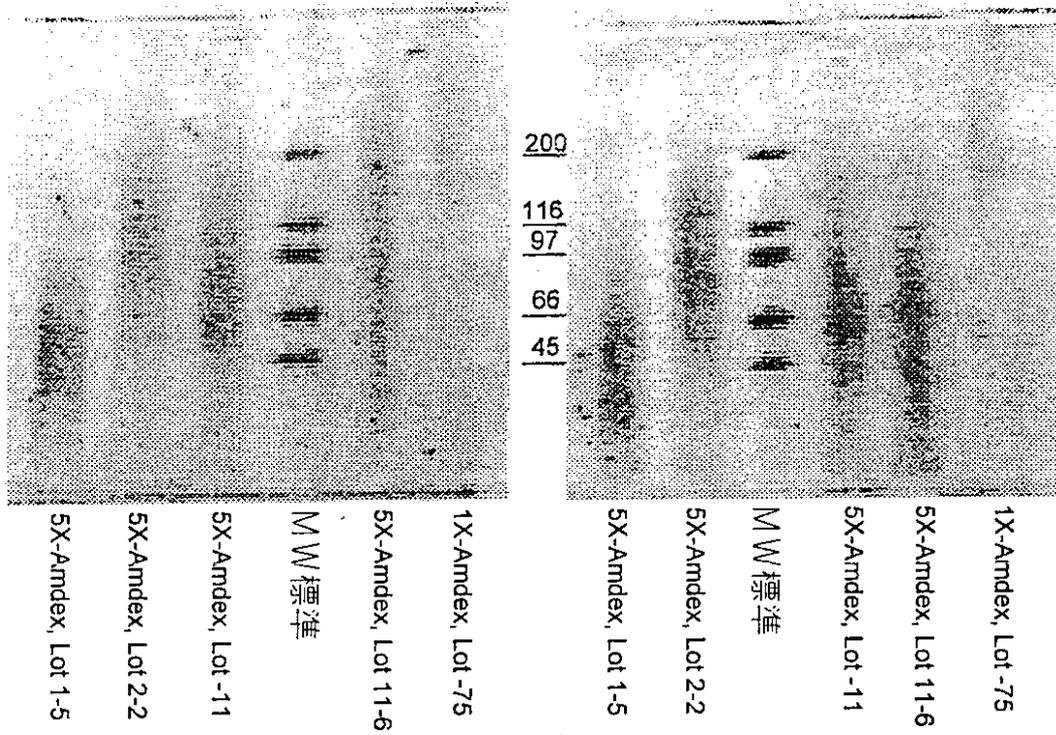


FIG. 2

【图3】

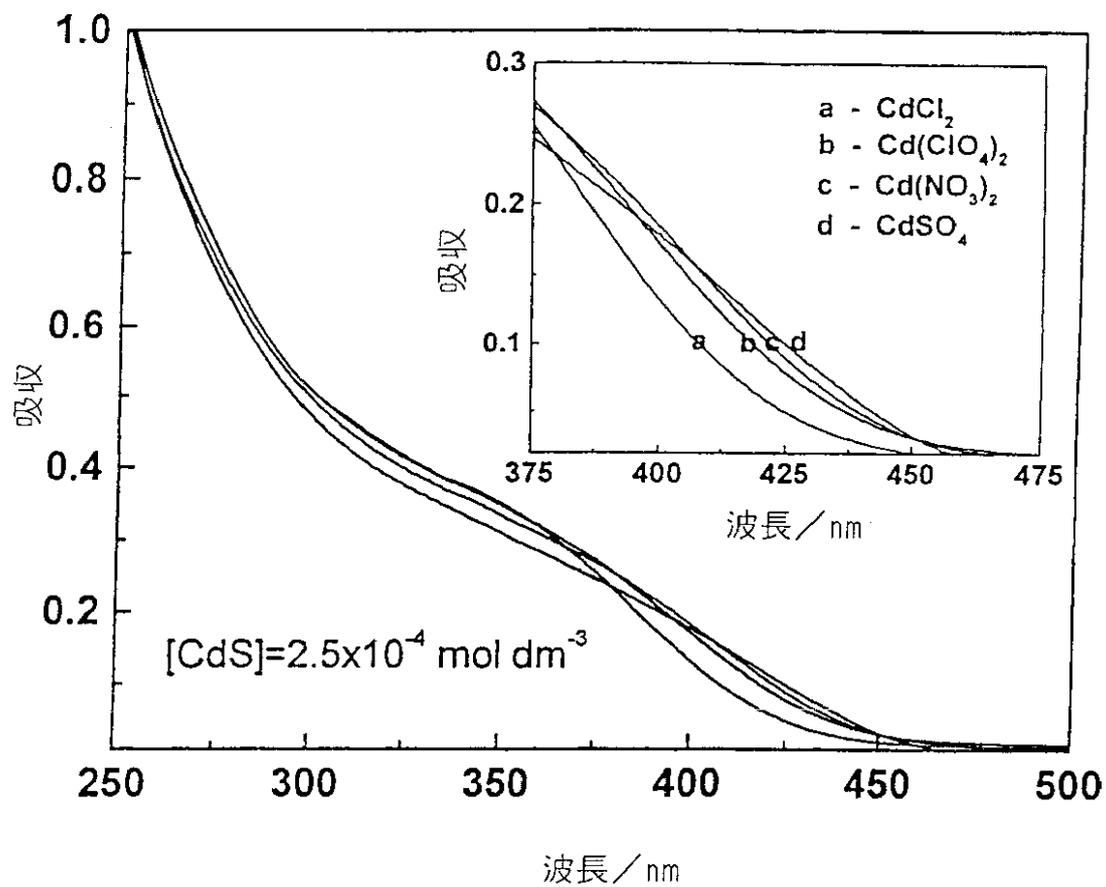


FIG. 3

【图4】

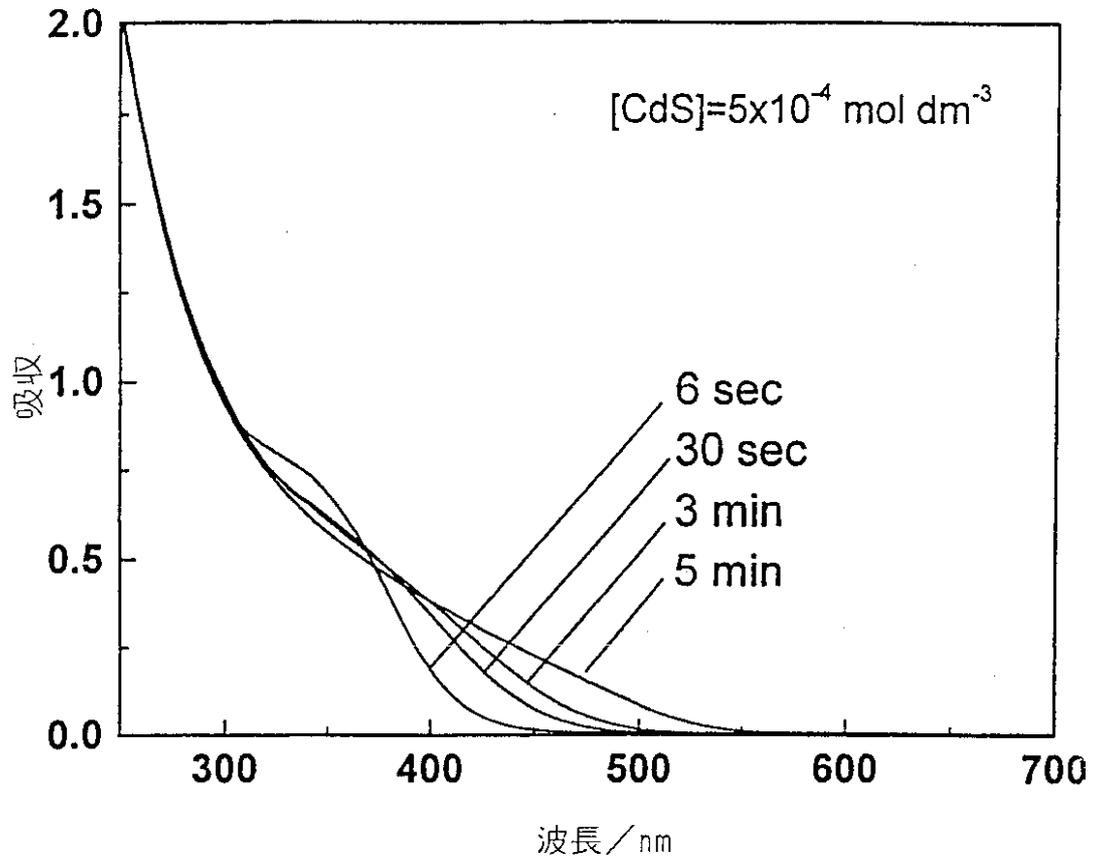


FIG. 4

【図5】

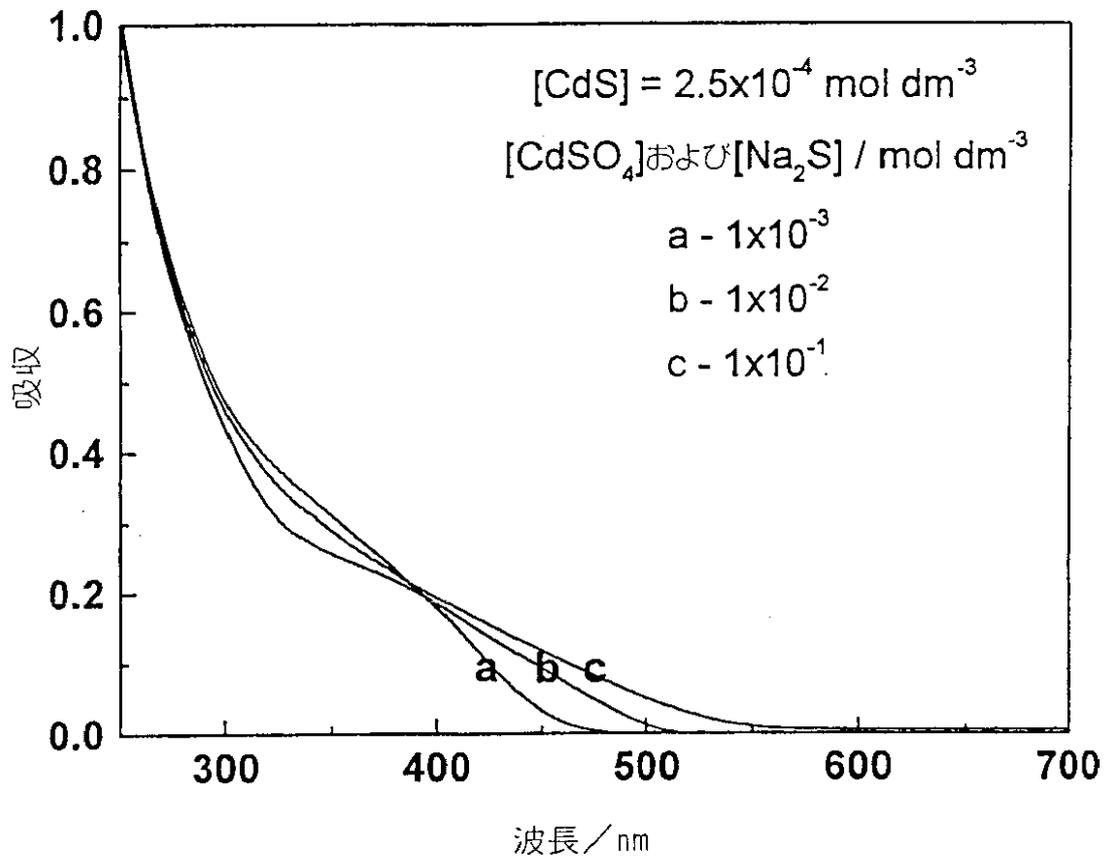


FIG. 5

【図6】

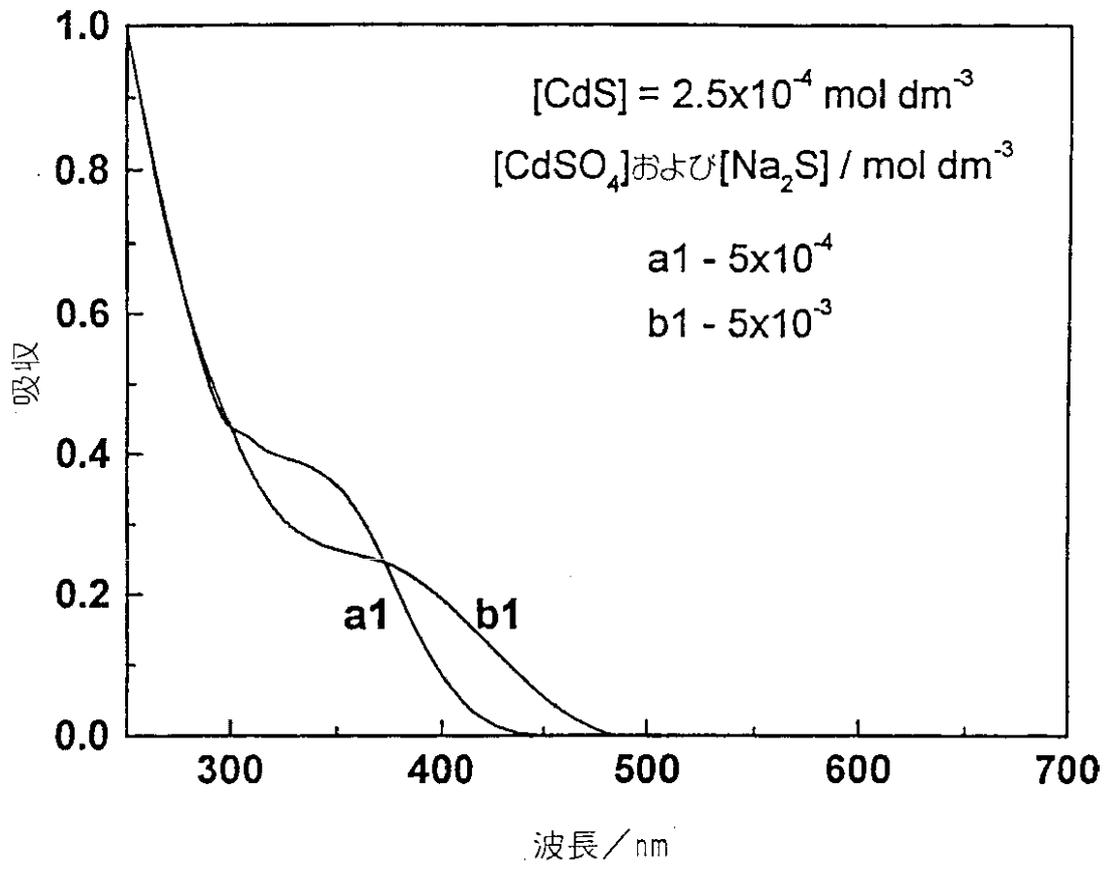


FIG. 6

【図7】

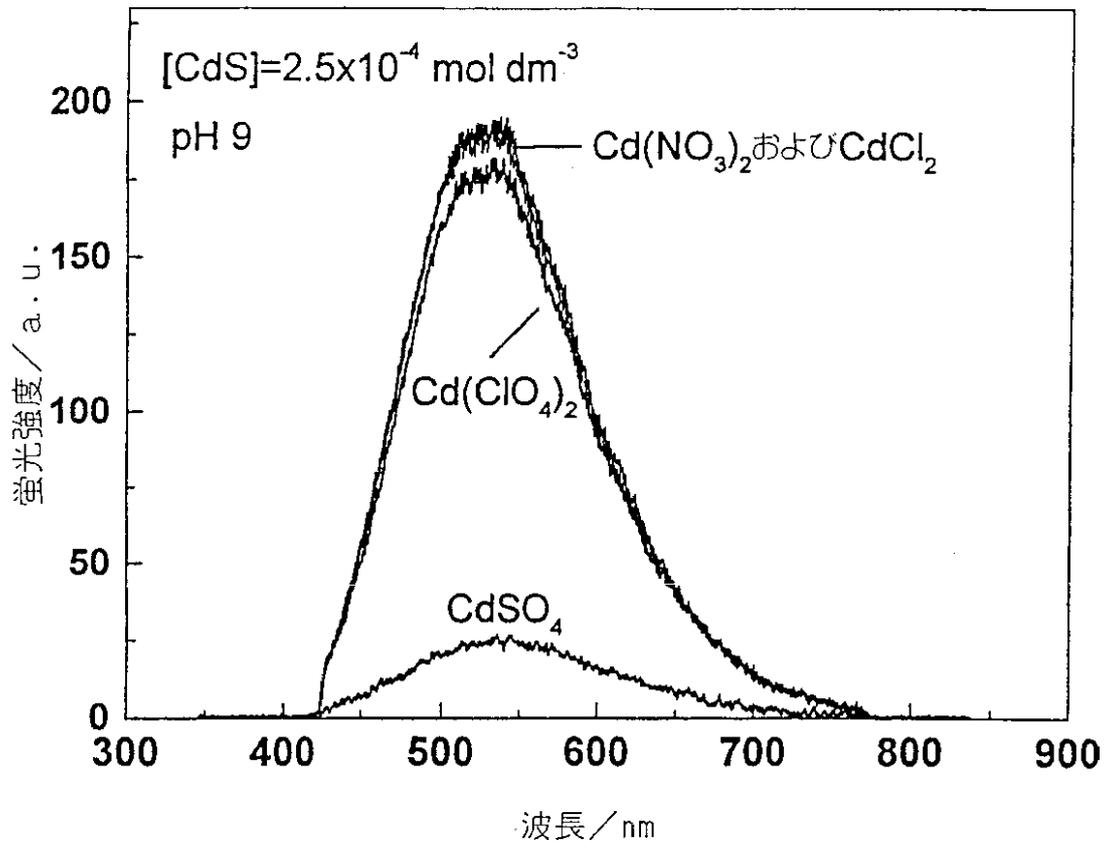


FIG. 7

【图8】

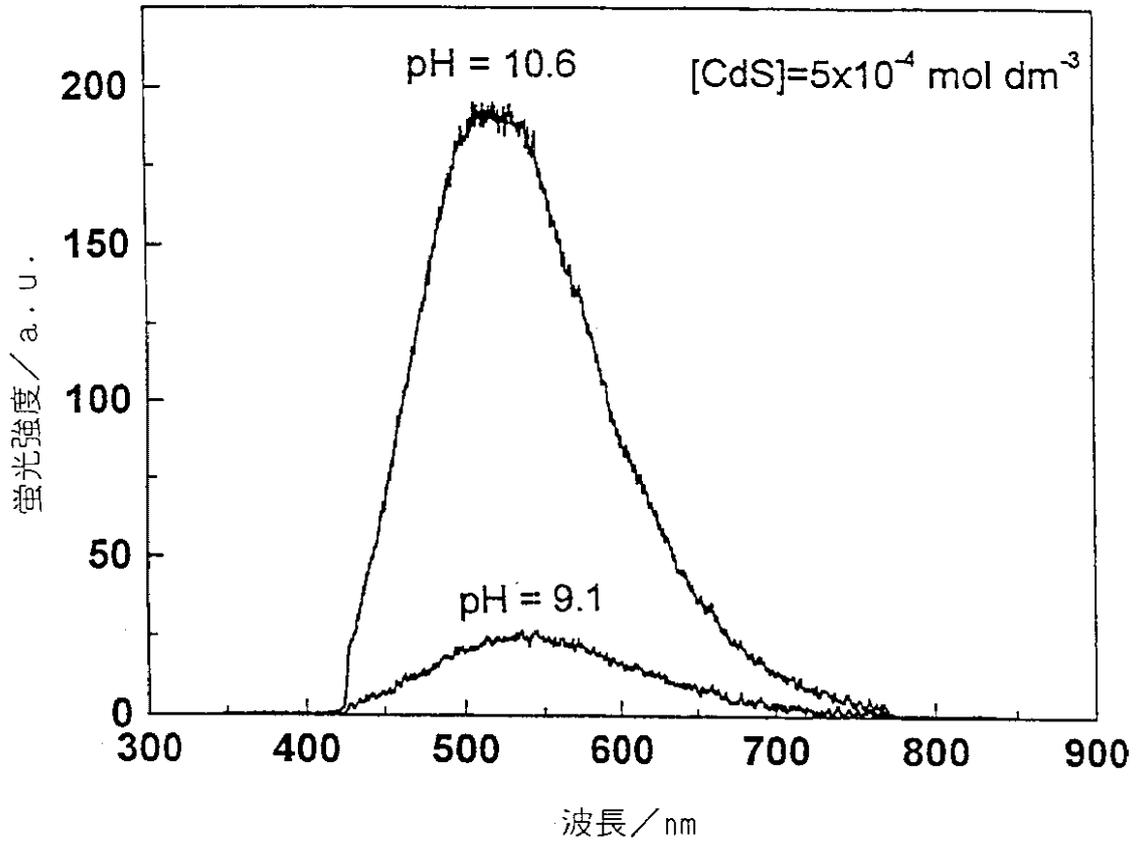


FIG. 8

【图9】

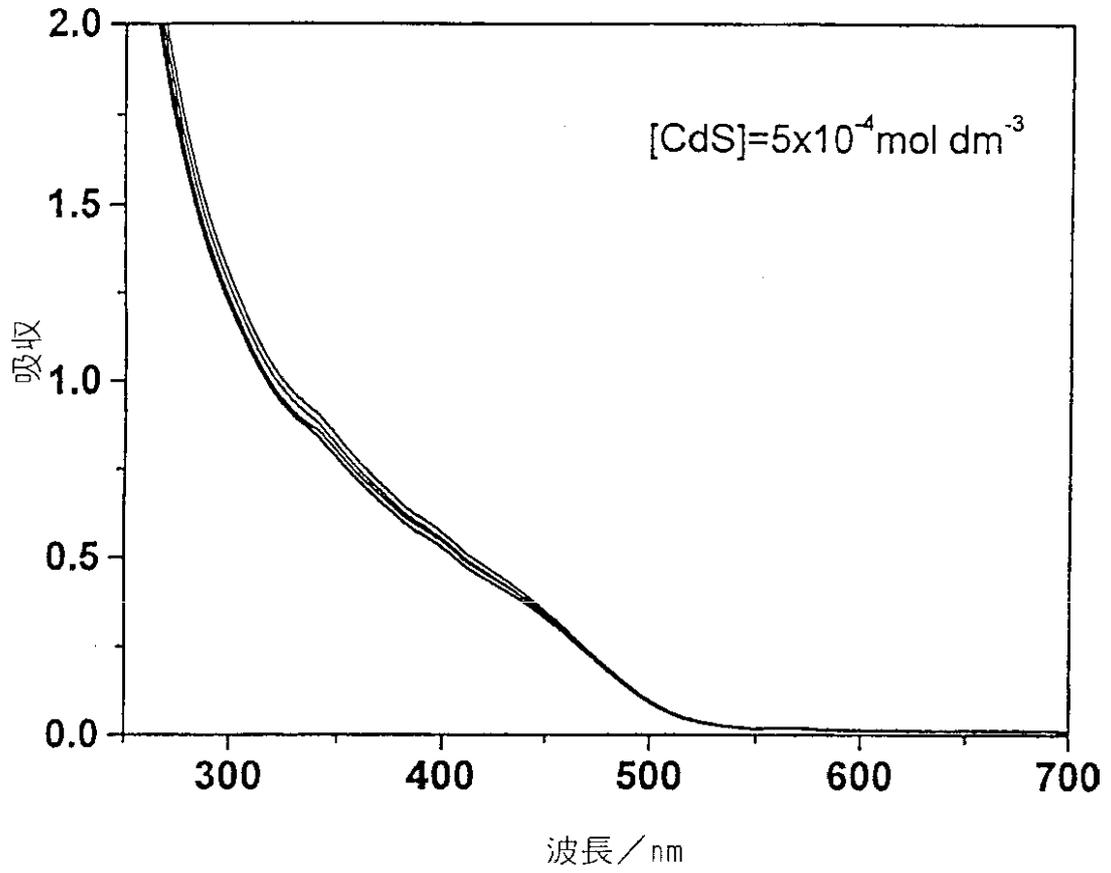


FIG. 9

【图10】

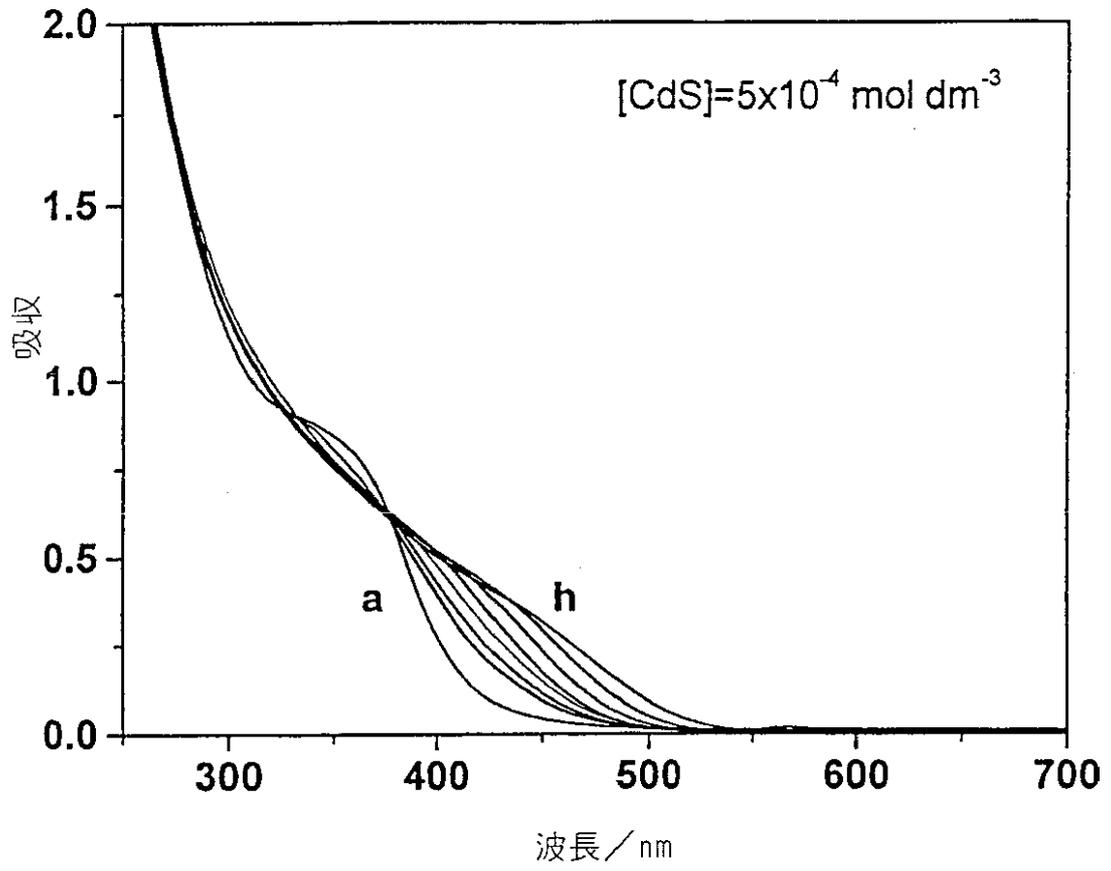


FIG. 10

【图 1 1】

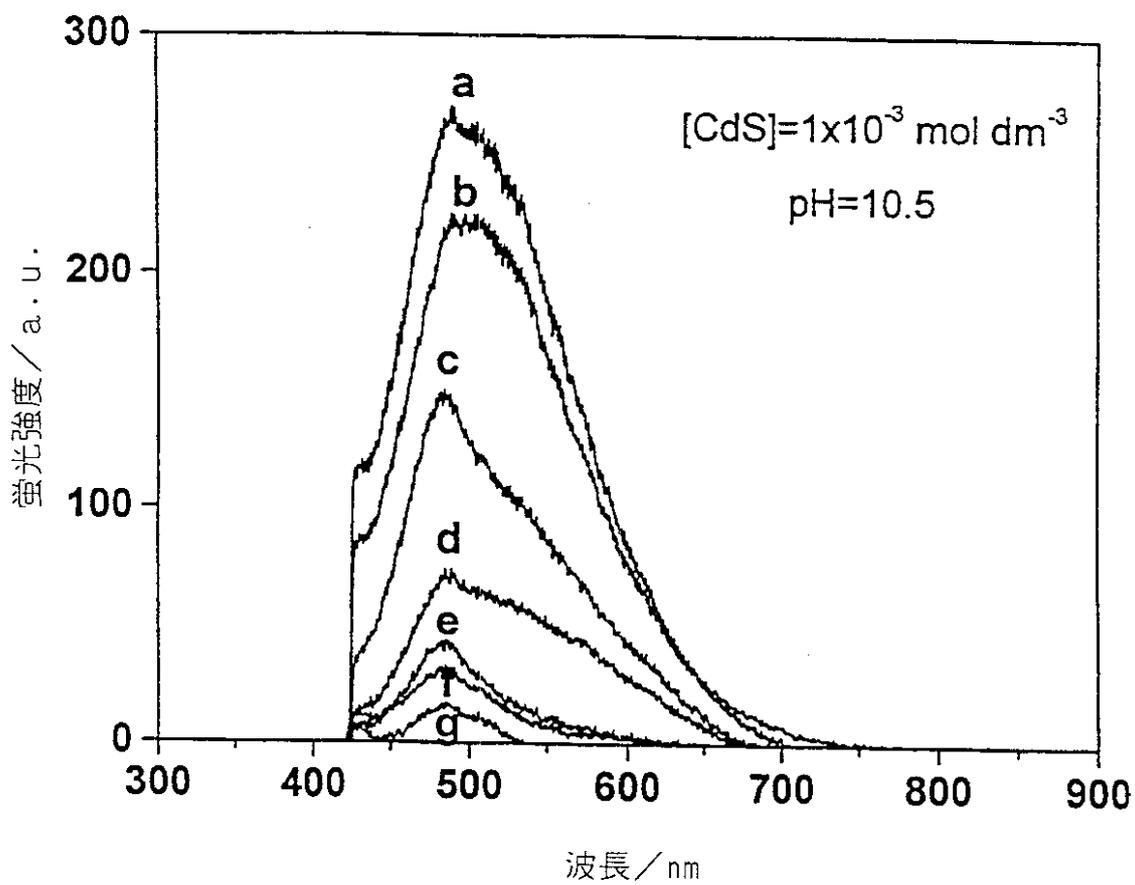


FIG. 11

【図12】

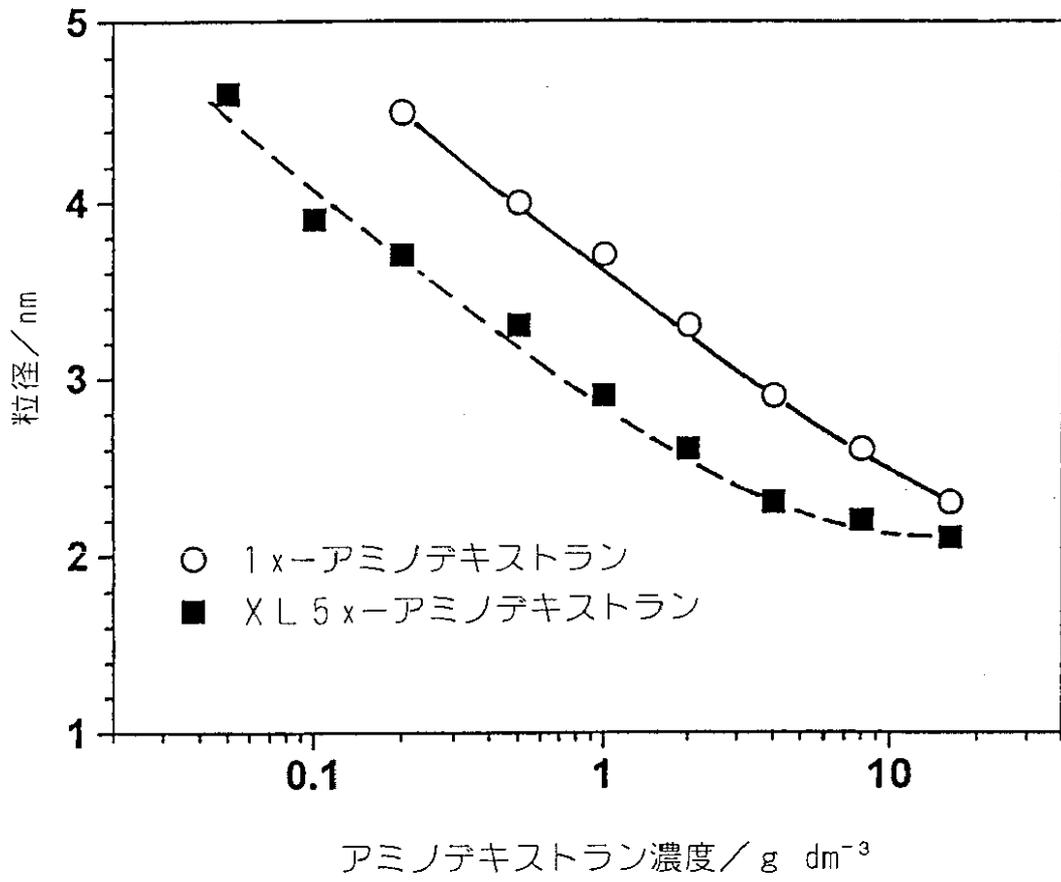


FIG. 12

【图13】

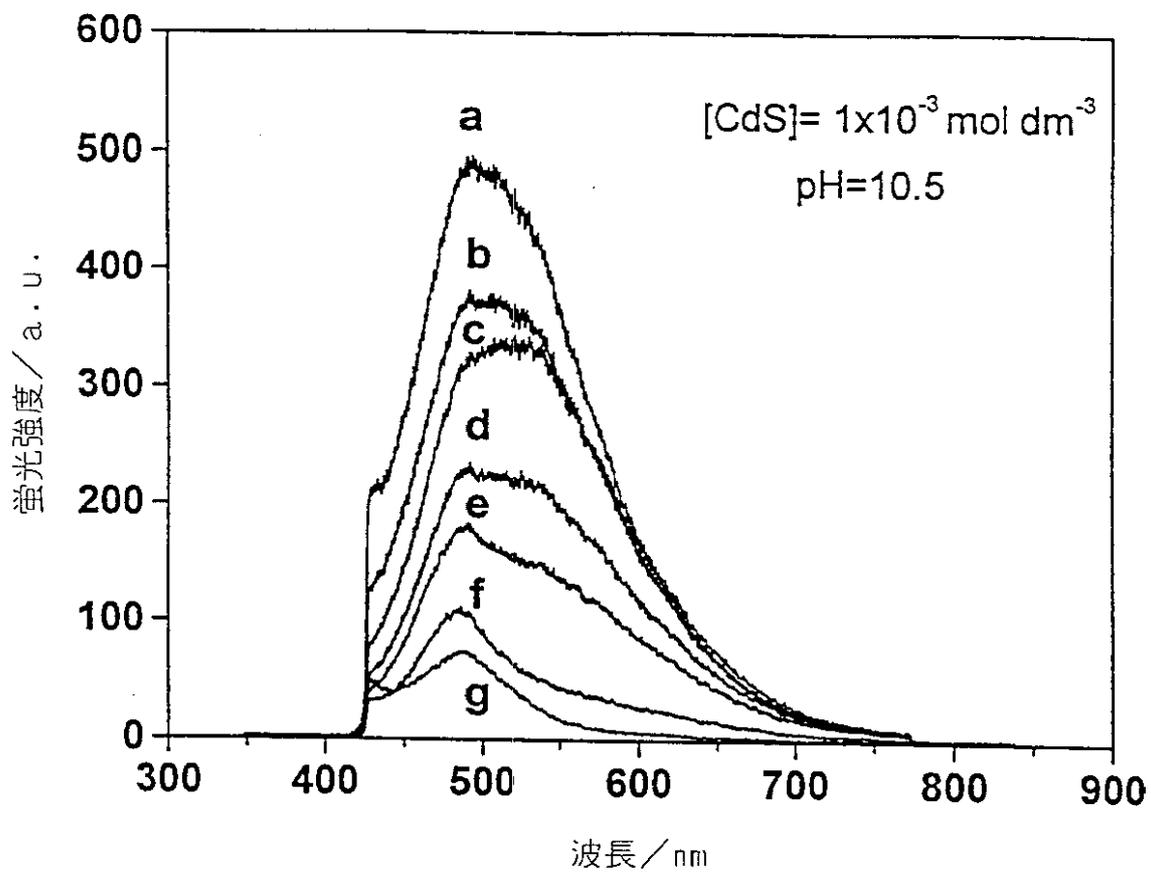
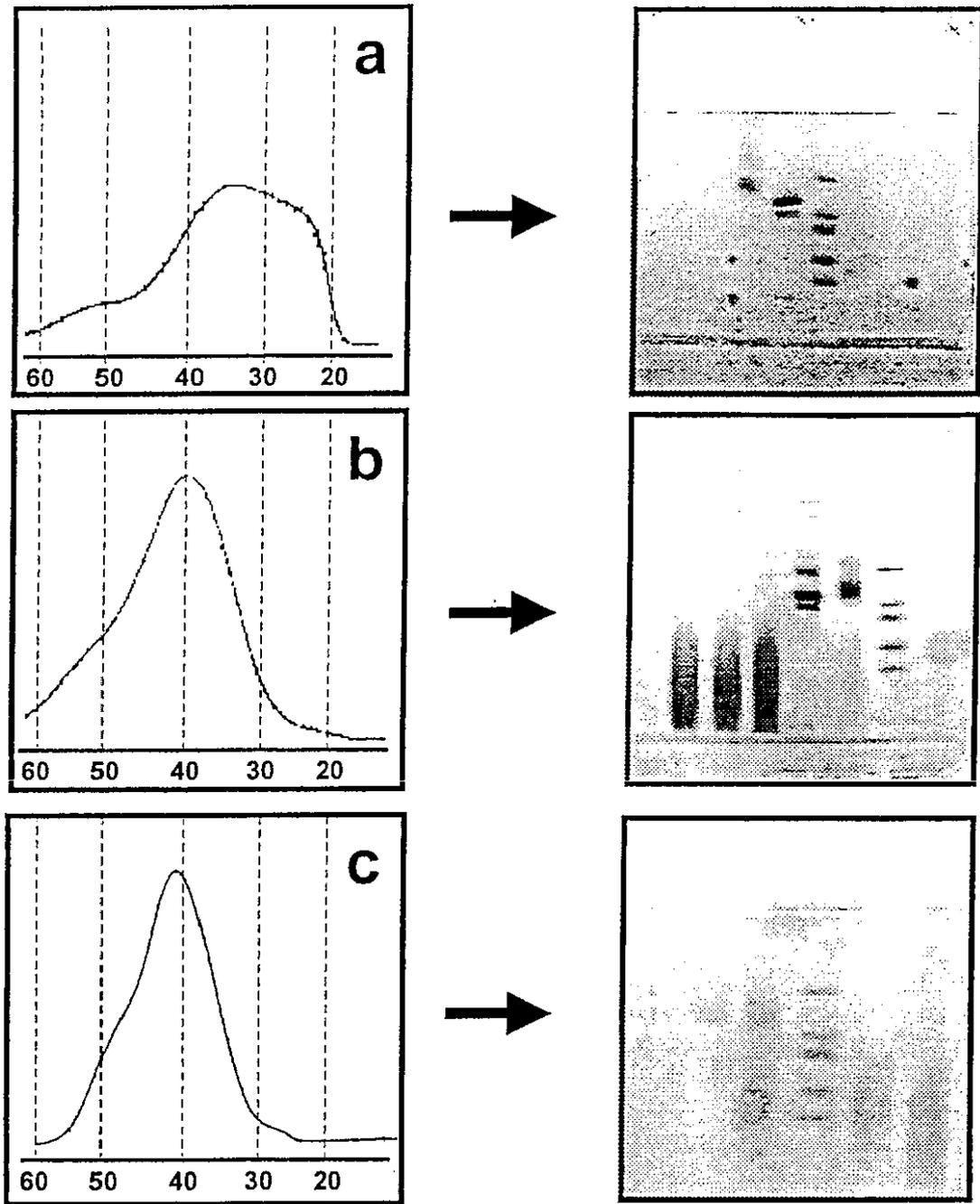


FIG. 13

【図14】



画分No.

FIG. 14

【図15】

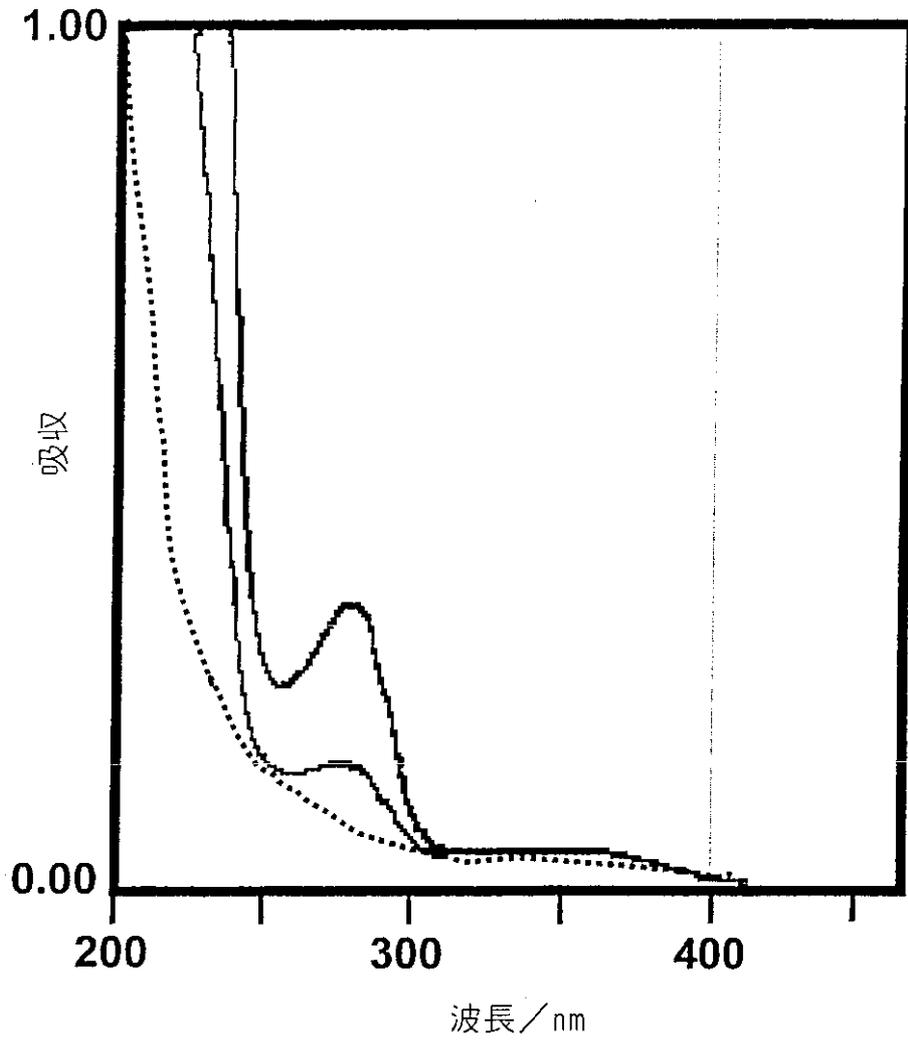


FIG. 15

【圖16】

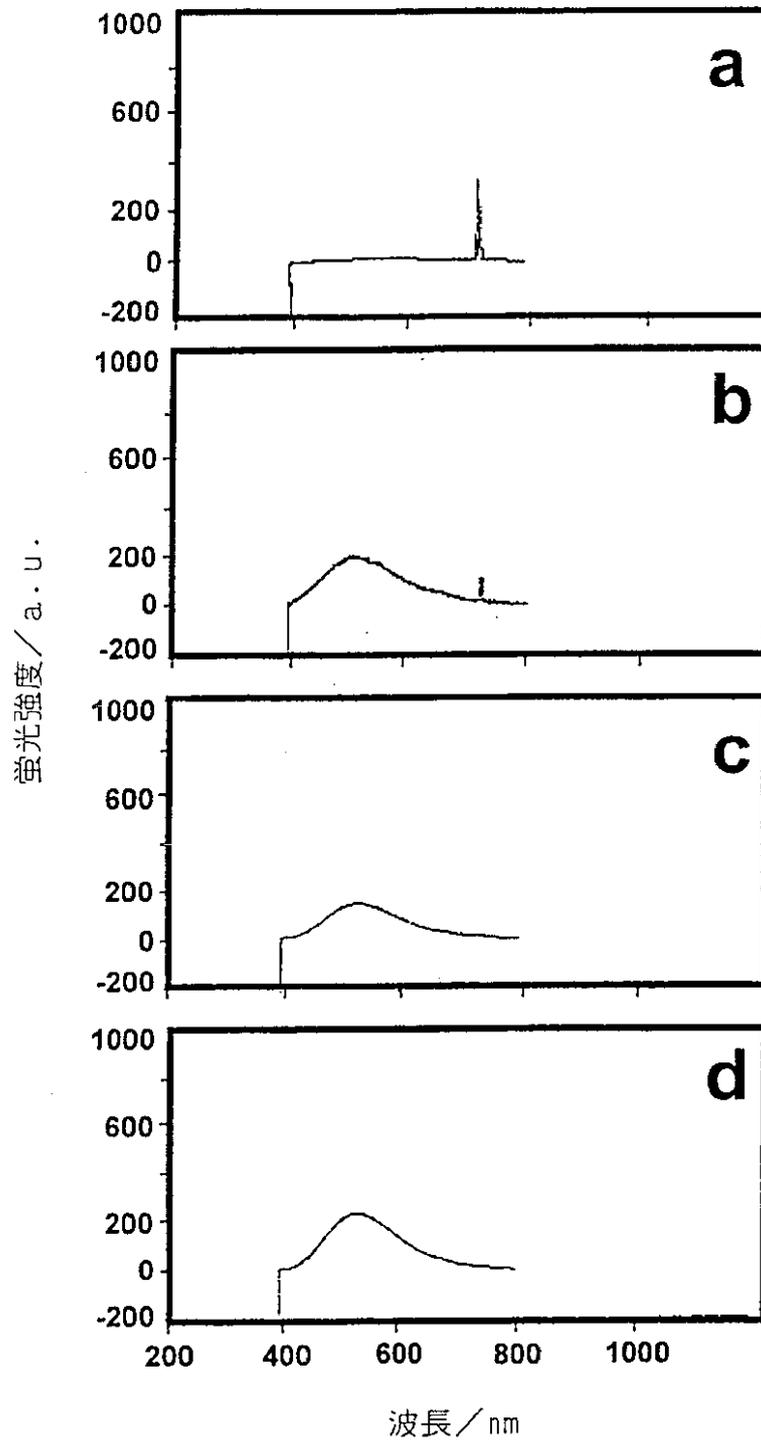


FIG. 16

【図17】

ナノ粒子-CD4/SAM-PE

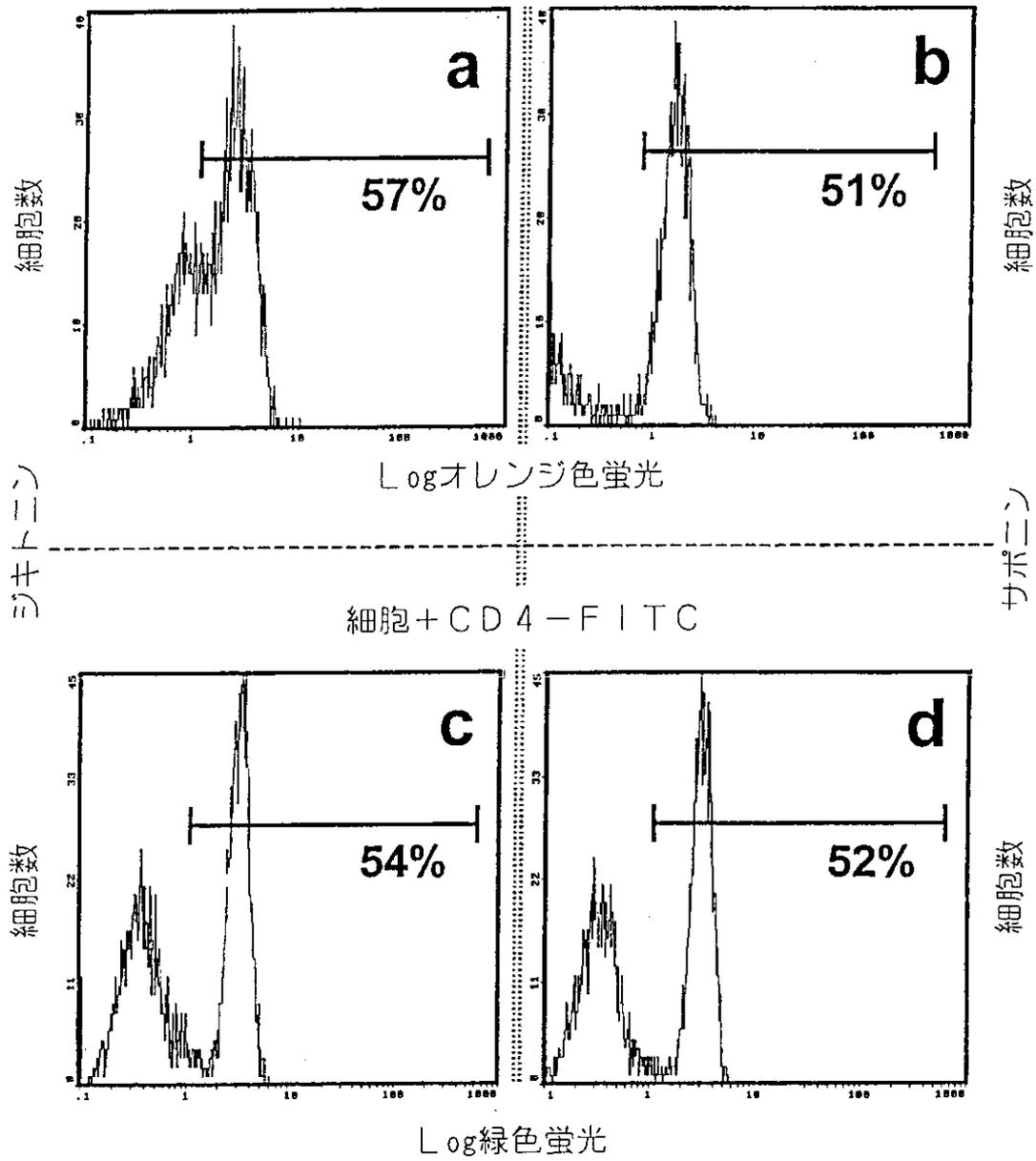


FIG. 17

【圖18】

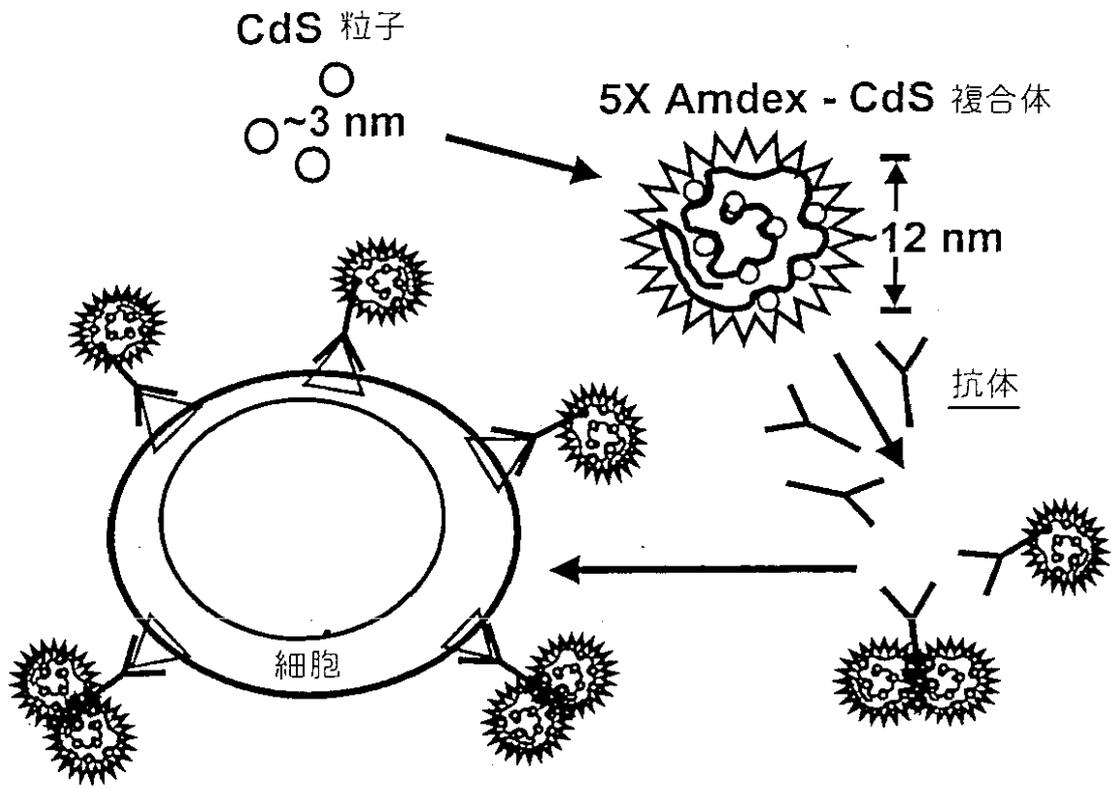


FIG. 18

【手続補正書】

【提出日】平成13年11月20日(2001.11.20)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】特許請求の範囲

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】 流体試料の分析のための半導体ナノ粒子であり、

a) 平均分子量3,000~3,000,000Da、150nmより小さい粒径を有し、そして多糖類分子における1級および2級アミノ基の合計数の置換度が1/150~4/1の範囲である、多糖類の水溶性アミノ誘導体；ならびに

b) 式： $(XY)_n$ の少なくとも1つのナノ粒子、

ここでXはCd²⁺、Hg²⁺およびZn²⁺ならびにそれらの組合わせからなる群より選ばれ；そしてYはS²⁻、Se²⁻およびTe²⁻ならびにそれらの組合わせからなる群より選ばれ；そしてn=50~1000であり、該ナノ粒子は該アミノ多糖類に結合されている、

を含む半導体ナノ粒子。

【請求項2】 粒径が1~10nmである請求項1記載の半導体ナノ粒子。

【請求項3】 多糖類がデキストランである請求項1記載の半導体ナノ粒子

。

【請求項4】 デキストランが5X-アミノデキストランおよび1X-アミノデキストランからなる群より選ばれる請求項3記載の半導体ナノ粒子。

【請求項5】 デキストランが1,3-ジアミノプロパンで置換されている請求項3記載の半導体ナノ粒子。

【請求項6】 少なくとも1つのナノ粒子がCdSである請求項1記載の半導体ナノ粒子。

【請求項7】 置換度が1/25~2/5の範囲である請求項1記載の半導体ナノ粒子。

【請求項8】 多糖類のアミノ誘導体が500,000より少ない分子量を有する請求項1記載の半導体ナノ粒子。

【請求項9】 1~3000のナノ粒子が多糖類の該アミノ酸誘導体に共有結合で結合されている請求項1記載の半導体ナノ粒子。

【請求項10】 半導体ナノ粒子の製造方法であり：

a)分子量3,000~3,000,000Daを有する多糖類のアミノ誘導体を、b)周期律表II B族水溶性塩、およびc)VI A族塩と反応させて半導体ナノ粒子を生成する、段階を含み；

多糖類の該アミノ誘導体は150nmより小さい粒径を有し、ならびに多糖類分子における1級および2級アミノ基の合計数の置換度が1/150~4/1の範囲にあり；そして該II B族塩は Cd^{2+} 、 Hg^{2+} および Zn^{2+} 、ならびにそれらの組み合わせからなる群より選ばれるカチオン；さらには Cl^- 、 ClO_4^- 、 NO_3^- および SO_4^{2-} からなる群より選ばれるアニオンを有し；

該VI A族水溶性塩は、 Li^+ 、 Na^+ 、 K^+ 、 Rb^+ 、 Cs^+ 、 Sr^{2+} および Ba^{2+} からなる群より選ばれるカチオン；さらには S^{2-} 、 Se^{2-} および Te^{2-} およびそれらの組み合わせからなる群より選ばれるアニオンを有し；したがってII B族塩について選ばれるアニオンはVI A族塩のカチオンとともに沈殿せず、

ここで多糖類は、形成された半導体ナノ粒子に含まれるナノ粒子の光酸化を妨げる還元糖を含有する、半導体ナノ粒子の製造方法。

【請求項11】 該周期律表II B族水溶性塩が多糖類の該アミノ誘導体と混合されて第1生成物を生成し、その第1生成物は該VI A族塩と反応して半導体ナノ粒子を生成する請求項10記載の方法。

【請求項12】 該VI A族塩が多糖類の該アミノ誘導体と混合されて第1生成物を生成し、その第1生成物は該周期律表II B族塩と反応して半導体ナノ粒子を生成する請求項10記載の方法。

【請求項13】 VI A族塩は多糖類の該アミノ誘導体と混合され第1生成物を生成し、該周期律表II B族水溶性塩は多糖類の該アミノ誘導体と混合されて第2生成物を生成し、そして該第1生成物は該第2生成物と反応して半導体ナノ粒子を生成する請求項10記載の方法。

【請求項14】 該第1生成物および第2生成物が多糖類の付加的アミノ誘導体の存在下で反応される請求項13記載の方法。

【請求項15】 該周期律表IIB族水溶性塩および該VIA族塩が多糖類の該アミノ誘導体と同時に混合されて半導体ナノ粒子を生成する請求項10記載の方法。

【請求項16】 IIB族塩カチオンが Cd^{2+} である請求項10記載の方法。

【請求項17】 VIA族塩アニオンが S^{2-} である請求項10記載の方法。

【請求項18】 第1の塩が第2の塩よりも高濃度である請求項10記載の方法。

【請求項19】 多糖類のアミノ誘導体が $0.2 \sim 20 \text{ mg/ml}$ の量で存在する請求項10記載の方法。

【請求項20】 反応が $\text{pH}9 \sim 12$ で生じる請求項10記載の方法。

【請求項21】 リガンドに接合された少なくとも1つの半導体ナノ粒子を有するリガンドを含むリガンド-半導体ナノ粒子であり、該半導体ナノ粒子は：

a) 平均分子量 $3,000 \sim 3,000,000 \text{ Da}$ 、 150 nm より小さい粒径を有し、そして多糖類分子における1級および2級アミノ基の合計数の置換度が $1/150 \sim 4/1$ の範囲である、多糖類の水溶性アミノ誘導体；ならびに

b) 式： $(XY)_n$ の少なくとも1つのナノ粒子、

ここでXは Cd^{2+} 、 Hg^{2+} および Zn^{2+} ならびにそれらの組合わせからなる群より選ばれ；そしてYは S^{2-} 、 Se^{2-} および Te^{2-} ならびにそれらの組合わせからなる群より選ばれ；そして $n = 50 \sim 1000$ であり、該ナノ粒子は該アミノ多糖類に結合されている、

を含むリガンド-半導体ナノ粒子。

【請求項22】 該半導体ナノ粒子がアミノデキストラン- CdS を含む請求項21記載のリガンド-半導体ナノ粒子。

【請求項23】 半導体ナノ粒子に対するリガンドの比が $1:1 \sim 1:5$ の範囲である請求項21記載のリガンド-半導体ナノ粒子。

【請求項24】 該リガンドが抗体もしくはその機能性断片である請求項21記載のリガンド-半導体ナノ粒子。

【請求項25】 該リガンドが抗-CD4抗体である請求項21記載のリガンド-半導体ナノ粒子。

【請求項26】 リガンド-半導体ナノ粒子の製造方法であり：

a) 半導体ナノ粒子を：

(i) 平均分子量3,000~500,000Da、50nmより小さい粒径を有し、そして多糖類分子における1級および2級アミノ基の合計数の置換度が1/150~4/1である、多糖類のアミノ誘導体；

(ii) 水溶性第1塩、該第1塩は Cd^{2+} 、 Hg^{2+} および Zn^{2+} 、ならびにそれらの組合わせからなる群より選ばれるカチオン；ならびに Cl^{-} 、 ClO_4^{-} 、 NO_3^{-} および SO_4^{2-} からなる群より選ばれるアニオン、を有し、ならびに

(iii) 水溶性第2塩、該第2塩は、 Li^{+} 、 Na^{+} 、 K^{+} 、 Rb^{+} 、 Cs^{+} 、 Sr^{2+} および Ba^{2+} からなる群より選ばれるカチオン；ならびに S^{2-} 、 Se^{2-} および Te^{2-} ならびにそれらの組合わせからなる群より選ばれるアニオン、を有し；したがって第1塩について選ばれるアニオンは第2塩のカチオンとともに沈殿しない；

を反応させることにより生成すること；

b) 過剰な未反応試薬を除去するために多糖類半導体ナノ粒子を含む分散体を精製すること；

c) 半導体ナノ粒子を活性化および精製すること；

d) 選択されたりガンドを活性化および精製すること；ならびに

e) 活性化され、精製されたりガンドと活性化され、精製された半導体ナノ粒子を混合し、それによりリガンド-半導体ナノ粒子を生成させること、の段階を含むリガンド-半導体ナノ粒子の製造方法。

【請求項27】 生物学的試料中のターゲットの検出方法であり：

(a) 選択されたりガンドのためのターゲットを含むと考えられる生物学的試料をリガンド-半導体ナノ粒子と接触させ、結合したりガンド-半導体ナノ粒子-生物学的試料を形成し、該リガンド-半導体ナノ粒子は、リガンドに接合された少なくとも1つの半導体ナノ粒子を有する、選択されたりガンドを含み、そこで該半導体ナノ粒子は：

(i) 平均分子量3,000~3,000,000Da、150nmより小さい粒径を有し、そして多糖類分子における1級および2級アミノ基の合計数の置換度が1/150~4/1の範囲である、多糖類の水溶性アミノ誘導体；ならびに

(ii) 式： $(XY)_n$ の少なくとも1つのナノ粒子、

ここでXは Cd^{2+} 、 Hg^{2+} および Zn^{2+} ならびにそれらの組合わせからなる群より選ばれ；そしてYは S^{2-} 、 Se^{2-} および Te^{2-} ならびにそれらの組合わせからなる群より選ばれ；そして $n = 50 \sim 1000$ であり、該ナノ粒子は該アミノ多糖類に結合されている；

を含む；

(b) 該結合した半導体ナノ粒子 - 生物学的試料を赤外ないし紫外光で励起して、それにルミネセンスを生じさせること；ならびに

(c) ルミネセンス信号を検出し、それにより生物学的試料中において、選択リガンドのためのターゲットの存在を検出すること、の段階を含む検出方法。

【請求項28】 ルミネセンス信号が流動細胞計測法分析により測定される請求項27記載の方法。

【請求項29】 生物学的試料が白血球を含む請求項27記載の方法。

【請求項30】 リガンドが抗体もしくはその機能的断片である請求項27記載の方法。

【請求項31】 リガンドが抗-CD4抗体である請求項30記載の方法。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0041

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0041】

次の例は例証を提供するのみであり、本発明の範囲を限定するものではない。

実施例1 - アミノデキストランの製造

アミノデキストラン - 3Mおよび - 3000がオレゴン州EugeneのMo

Molecular Probes, Inc. から入手された。デキストラン、アミノ、称呼分子量 2,000,000、Cat. No. D-7145 がオレゴン州 Eugene の Molecular Probes, Inc. より購入された。ロット 6551-3 についての分析値：130 アミン/モル。Viscotek 三重検出システム（下記参照）によるこのロットのアミノデキストランの分子量測定は、 $\sim 3 \text{ MDa}$ を与えた。したがって、 $3,000,000 \text{ g/モル} \div 162.1 \text{ g/モルグルコースモノマー} = 18,507 \text{ グルコース単位/デキストラン分子}$ または $130 / 18,507 = 0.00702$ 、すなわち反応グルコース単位当り 1 つのアミン基との置換度 $\sim 1 / 142$ である。他に表示がなければ、置換度はアミノデキストラン分子中のモノマーグルコース単位あたりのアミノ基（1級もしくは2級）の合計数として定義される。異なる平均分子量（20,000 Da および 500,000 Da）のデキストランが Fluka Company から得られた。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/US 00/06864		
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 G01N33/58 G01N33/533 G01N33/543		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 G01N A61K		
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, BIOSIS, CHEM ABS Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	CHAN WCW ET AL: "Quantum Dot bioconjugates for ultrasensitive nonisotopic detection" SCIENCE, US, AMERICAN ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF SCIENCE,, vol. 281, no. 281, 25 September 1998 (1998-09-25), pages 2016-2018-2018, XP002125871 ISSN: 0036-8075 cited in the application the whole document --- -/-	1-32
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.
* Special categories of cited documents:		
<ul style="list-style-type: none"> *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 		<ul style="list-style-type: none"> *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. *Z* document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 28 August 2000	Date of mailing of the international search report 11/09/2000	
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) 340-3018	Authorized officer Pellegrini, P	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/US 00/06864

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	BRUCHEZ M JR ET AL: "Semiconductor nanocrystals as fluorescent biological labels" SCIENCE,US,AMERICAN ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF SCIENCE,, vol. 281, no. 281, 25 September 1998 (1998-09-25), pages 2013-2016-2016, XP002125872 ISSN: 0036-8075 cited in the application the whole document	1-32
Y	WO 94 09368 A (COULTER CORP) 28 April 1994 (1994-04-28) abstract claims	1-32
Y	US 5 248 772 A (BURSHTEYN ALEXANDER ET AL) 28 September 1993 (1993-09-28) cited in the application abstract claims	1-32
Y	SMITH C.U. ET AL.: "Detection of low-density cell surface markers using novel amplified fluorochrome-conjugated antibodies" CYTOMETRY, vol. Supplement 9, 1998, pages 56-57, XP000933826 abstract	1-32

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/US 00/06864

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9409368 A	28-04-1994	US 5466609 A	14-11-1995
		AU 5360394 A	09-05-1994
		CA 2146964 A	28-04-1994
		EP 0665955 A	09-08-1995
		JP 8502443 T	19-03-1996
		US 5639620 A	17-06-1997
		US 5776706 A	07-07-1998
		US 5707877 A	13-01-1998
US 5248772 A	28-09-1993	AU 3608993 A	01-09-1993
		CA 2128230 A, C	05-08-1993
		CN 1074844 A	04-08-1993
		EP 0625993 A	30-11-1994
		IL 104455 A	18-06-1996
		JP 7504843 T	01-06-1995
		MX 9300391 A	01-07-1993
		NZ 245701 A	28-03-1995
		WO 9315117 A	05-08-1993
		US 5552086 A	03-09-1996
		ZA 9300525 A	25-07-1994

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マコ-ト (参考)
G 0 1 N 33/548		G 0 1 N 33/548	A
// G 0 1 N 33/53		33/53	K
			Y

(72)発明者 ソンディ, イバン
 アメリカ合衆国, ニューヨーク 13676,
 ポツダム, ガーデン ストリート 16
 Fターム(参考) 2G045 AA02 BB10 CA11 CB01 FB12
 GC15
 2G054 AA06 CE02 EA03 GA04 GB02
 4G075 AA23 AA27 BA06 BB05

专利名称(译)	用于分析血细胞群的新型半导体纳米颗粒		
公开(公告)号	JP2002540428A	公开(公告)日	2002-11-26
申请号	JP2000608178	申请日	2000-03-15
申请(专利权)人(译)	库尔特国际公司		
[标]发明人	シイマンオラビ マティジェビツクエゴン ソンドイイバン		
发明人	シイマン,オラビ マティジェビツク,エゴン ソンドイ,イバン		
IPC分类号	B01J19/00 G01N21/78 G01N33/483 G01N33/53 G01N33/532 G01N33/548 G01N33/58		
CPC分类号	B82Y15/00 G01N33/588 Y10T428/2982 Y10T428/2991		
FI分类号	G01N33/58.Z B01J19/00.N G01N21/78.C G01N33/483.C G01N33/532.Z G01N33/548.A G01N33/53.K G01N33/53.Y		
F-TERM分类号	2G045/AA02 2G045/BB10 2G045/CA11 2G045/CB01 2G045/FB12 2G045/GC15 2G054/AA06 2G054/CE02 2G054/EA03 2G054/GA04 2G054/GB02 4G075/AA23 4G075/AA27 4G075/BA06 4G075/BB05		
优先权	09/281512 1999-03-30 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

描述了用于生物样品分析的半导体纳米颗粒，其由结合至至少一个式 (XY)_n 纳米颗粒的氨基葡聚糖组成，其中 X选自Cd²⁺，Hg²⁺和Zn²⁺及其组合；并且Y是S²⁻，Se²⁻和Te²⁻及其组合。从以下组成的组中选择；并且n = 约50-1000。还提供了制备这些半导体纳米颗粒的方法，以及制备包含与配体连接的这些半导体纳米颗粒的缀合物的方法，并进一步描述了缀合物在各种生物学测定中的用途。

ノ粒子

