

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2009-508105

(P2009-508105A)

(43) 公表日 平成21年2月26日(2009.2.26)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/553 (2006.01)	GO 1 N 33/553	
B 8 2 B 1/00 (2006.01)	B 8 2 B 1/00	
B 8 2 B 3/00 (2006.01)	B 8 2 B 3/00	
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 7 5	
GO 1 N 33/574 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 2 5 U	
審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 25 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2008-529921 (P2008-529921)  
 (86) (22) 出願日 平成18年9月8日 (2006.9.8)  
 (85) 翻訳文提出日 平成20年5月7日 (2008.5.7)  
 (86) 国際出願番号 PCT/KR2006/003569  
 (87) 国際公開番号 W02007/029980  
 (87) 国際公開日 平成19年3月15日 (2007.3.15)  
 (31) 優先権主張番号 11/220,969  
 (32) 優先日 平成17年9月8日 (2005.9.8)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)  
 (31) 優先権主張番号 10-2005-0112245  
 (32) 優先日 平成17年11月23日 (2005.11.23)  
 (33) 優先権主張国 韓国 (KR)

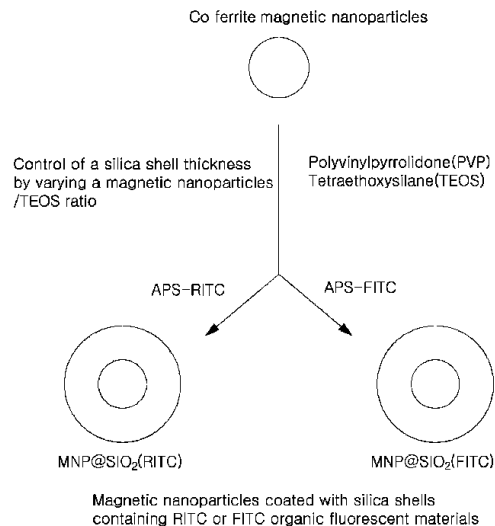
(71) 出願人 508071320  
 ビテリアルズ カンパニー リミテッド  
 B I T E R I A L S C O . , L T D .  
 大韓民国 441-853 ギョンギード  
 , スウォン, クォンスング, ソドゥン  
 ドン 103-2, ソウル ナショナル  
 ユニバーシティ ビジネス インキュー  
 ティング センター 1-304  
 Seoul Nat 'l Univ. B  
 usiness Incubating C  
 enter, 1-304, Seodun  
 dong, 103-2, Kwonsun  
 gu, Suwon, Gyeonggi-d  
 o 441-853 (KR)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 蛍光性を有する磁性ナノ粒子、その製造方法及びその用途

(57) 【要約】

本発明は、蛍光性を有する磁性ナノ粒子、その製造方法及びその用途に関する。本発明による磁性ナノ粒子は、光学的性質及び磁氣的性質を同時に有するので、様々なバイオ分野への適用が可能であり、シリカシェルを水溶性物質を利用して表面改質することによって、多様な化学官能基をナノ物質に導入することができ、これらを利用して細胞内への浸透力を増加または減少させることができるだけでなく、所望の特定の細胞だけに作用するように選択性を付与することができる。



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

磁気物質を含むコアと、コアの外部に有機蛍光物質とを含み、表面改質されたシリカシェルで覆われた、そのサイズが100nm以下で且つ水溶性である磁性ナノ粒子。

## 【請求項 2】

前記磁性ナノ粒子は、コバルト、鉄、マンガン、亜鉛、ニッケル及び銅からなる群から選択された1種の金属酸化物を含むことを特徴とする請求項1に記載の磁性ナノ粒子。

## 【請求項 3】

前記有機蛍光物質は、ローダミンBイソチオシアネート(RITC)またはフルオレセインイソチオシアネート(FITC)であることを特徴とする請求項1に記載の磁性ナノ粒子。

10

## 【請求項 4】

前記シリカシェルは、電荷を帯びた物質で表面改質されたものであることを特徴とする請求項1に記載の磁性ナノ粒子。

## 【請求項 5】

前記電荷を帯びた物質は、イオン性官能基を有する有機シリコン化合物であることを特徴とする請求項4に記載の磁性ナノ粒子。

## 【請求項 6】

前記イオン性官能基を有する有機シリコン化合物は、 $(\text{CH}_3\text{O})_3\text{Si}-\text{PEG}[(\text{CH}_3\text{O})_3\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_{6\sim 9}\text{CH}_3]$ 、 $(\text{CH}_3\text{O})_3\text{Si}-\text{PMP}[(\text{CH}_3\text{O})_3\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{PO}_2(\text{OCH}_3)\text{Na}]$ 、 $(\text{CH}_3\text{O})_3\text{Si}-\text{PTMA}[(\text{CH}_3\text{O})_3\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3\text{Cl}^-]$ 及び3-アミノプロピルトリエトキシシラン(3-aminopropyltriethoxysilane; APS)よりなる群から選択された1種であることを特徴とする請求項5に記載の磁性ナノ粒子。

20

## 【請求項 7】

前記磁性ナノ粒子は、細胞内に浸透し、外部磁場(0.3テスラ)によって0.5~1mm/secの速度で移動することを特徴とする請求項1に記載の磁性ナノ粒子。

## 【請求項 8】

前記細胞は、真核細胞、ヒトの細胞、動物細胞、または植物細胞であることを特徴とする請求項7に記載の磁性ナノ粒子。

30

## 【請求項 9】

請求項1乃至8のいずれかに記載の磁性ナノ粒子の表面改質されたシリカシェルの表面に陰電荷を帯びた遺伝子が結合されている遺伝子結合磁性ナノ粒子。

## 【請求項 10】

前記陰電荷を帯びた遺伝子は、プラスミドDNAであることを特徴とする請求項9に記載の遺伝子結合磁性ナノ粒子。

## 【請求項 11】

前記プラスミドDNAは、pcDNA3.1/CT-GFPであることを特徴とする請求項10に記載の遺伝子結合磁性ナノ粒子。

## 【請求項 12】

請求項9に記載の遺伝子結合磁性ナノ粒子を含む遺伝子デリバリーシステム。

40

## 【請求項 13】

請求項1乃至8のいずれかに記載の磁性ナノ粒子の表面改質されたシリカシェルの表面に陰電荷を帯びた核酸が結合されている核酸結合磁性ナノ粒子。

## 【請求項 14】

請求項13に記載の核酸結合磁性ナノ粒子を含む遺伝子デリバリーシステム。

## 【請求項 15】

請求項1乃至8のいずれかに記載の磁性ナノ粒子の表面改質されたシリカシェルの表面に抗体が結合されている抗体結合磁性ナノ粒子。

## 【請求項 16】

50

前記表面改質されたシリカシェルは、3-アミノプロピルトリエトキシシランによって表面改質されたものであることを特徴とする請求項15に記載の抗体結合磁性ナノ粒子。

【請求項17】

前記3-アミノプロピルトリエトキシシランのアミン基をマレイミドブチル酸で処理し、アミン基にマレイミド基を導入したことを特徴とする請求項16に記載の抗体結合磁性ナノ粒子。

【請求項18】

前記抗体は、2-メルカプトエチルアミン(2-mercaptoethylamine)と反応してチオール基を有することを特徴とする請求項17に記載の抗体結合磁性ナノ粒子。

【請求項19】

前記抗体は、白血病細胞に対してCD-10抗体または乳房癌細胞に対してHer2<sub>Ab</sub>抗体であることを特徴とする請求項18に記載の抗体結合磁性ナノ粒子。

【請求項20】

請求項15に記載の抗体結合磁性ナノ粒子を含む細胞染色剤。

【請求項21】

1)水溶性磁性体ナノ粒子の表面をポリビニルピロリドン(PVP)高分子で処理し、エタノールに分散される形態に変換させた後、遠心分離する段階と、

2)前記1)段階で分離された高分子によって安定化された磁性ナノ粒子をシリカコーティングをするためにエタノールに分散させる段階と、

3)前記2)段階で製造した溶液に、有機蛍光物質を3-アミノプロピルトリエトキシシラン(3-aminopropyltriethoxysilane; APS)で処理した溶液とテトラエトキシシラン(tetraethoxysilane; TEOS)の溶液を添加し、NH<sub>4</sub>OHを添加し、有機蛍光物質を含む磁性ナノ粒子の表面からシリカが形成されるように誘導する段階と、

4)前記3)段階で得た磁性ナノ粒子のシリカシェルの表面をシリコン化合物で表面処理する段階と、を含む磁性ナノ粒子の製造方法。

【請求項22】

1)陰電荷を帯びた遺伝子と陽電荷を帯びたMNP@SiO<sub>2</sub>(RITC)-PTMAをHEPES[N-(2-ヒドロキシエチル)-ピペラジン-N'-(2-エタンスルホン酸)]緩衝溶液に入れ、培養させる段階と、

2)前記1)段階で培養された溶液にCaCl<sub>2</sub>を入れ、2時間さらに培養させる段階と、3)前記2)段階で培養された溶液にDMEMを入れ、Ca<sup>2+</sup>イオン濃度を4.5mMに調整した後、4時間さらに培養させ、PBS緩衝溶液で洗浄する段階と、を含む陰電荷を帯びた遺伝子結合磁性ナノ粒子の製造方法。

【請求項23】

1)有機蛍光物質を含む磁性ナノ粒子の表面をSi-PEG/3-アミノプロピルトリエトキシシラン(3-aminopropyltriethoxysilane; APS)で同時に処理する段階と、2)

前記1)段階で得た磁性ナノ粒子にマレイミドブチル酸を反応させて、磁性ナノ粒子のシリカシェルの表面にあるアミン基にマレイミド基(maleimide; MaI)を導入する段階と、3)抗体に2-メルカプトエチルアミン(2-mercaptoethylamine)を反応させてチオール基を有する抗体を形成する段階と、4)前記2)段階で得た磁性ナノ粒子のシリカシェルの表面にあるマレイミド基に前記3)段階で得た抗体を結合する段階と、を含む抗体結合磁性ナノ粒子の製造方法。

【請求項24】

請求項1乃至8のいずれかに記載の磁性ナノ粒子を利用して蛍光分析とMRI分析が同時に可能な分析試薬。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、蛍光性を有する磁性ナノ粒子、その製造方法及びその用途に関する。

【背景技術】

10

20

30

40

50

## 【 0 0 0 2 】

磁気物質は、診断及びバイオセンサーを含む通常の生物学的適用において重要である。したがって、ナノ粒子を利用した細胞染色 (bio-imaging)、細胞分離 (cell separation)、生体内ドラッグデリバリー (drug delivery) 及び遺伝子デリバリー (gene delivery) は、最近に主要研究対象になってきた。特に、発光性量子ドット (quantum dot) ナノ粒子を利用して細胞内に量子ドットを浸透させて (uptake)、量子ドットから発散される蛍光を外部で測定する研究を始めとしてナノ粒子を利用したバイオ分野へのアプローチは、最近多く研究されている [ 米国特許第 6, 194, 213 号 : Barbera-Guillem Emilio, 'Lipophilic, Functionalized Nanocrystals and Their Use for Fluorescence Labeling of Membranes' ; 米国特許第 6, 306, 610 号 : Bawendi Mounji G., Mikulec Frederic V., Sundar Vikram C. 'Biological applications of quantum dots' ]。

10

## 【 0 0 0 3 】

しかし、量子ドットをはじめとする大部分のナノ粒子は、カドミウム、亜鉛、コバルトなど重金属からなっていて、バイオ分野への応用性を増大させるためには、合成されたナノ粒子の表面を生体に適合するように (biocompatible) 処理しなければならない。例えば、生体に無毒性を示すと知られているシリカやポリエチレングリコール (PEG) のような無機、有機化合物を、合成されたナノ粒子の表面に導入することによって、ナノ粒子の親水性程度を増加させることができるだけでなく、これにより、生体内流れ時間 (circulation time) を増加させることができるなど、最近になってこのような研究が急速に進められている Shuming Nie et al., 'In vivo Cancer Targeting And Imaging With Semiconductor Quantum Dots' Nat. Biotechnol., 2004(22), 969 ]。

20

## 【 0 0 0 4 】

しかし、このような量子ドットを合成する技術は、非常に複雑で且つ難しい条件を経なければならないし、表面処理過程を通じた全体収率が非常に低いという問題点を有している。最近、量子ドットの表面に特定の癌細胞の結合が可能のように抗体を導入させて癌細胞を認識する研究が進められたが、この研究の最大の難点の1つである量子ドットから発生する光を検出して位置を確認する方法は、生体外 (in vitro) 研究だけに対して意味を有し、生体内 (in vivo) の研究に対しては限界がある。その理由は、量子ドットから発散される光が生体組織を貫いて検出されにくいからである [ Mark Strohm et al., 'Zooming In and Out With Quantum Dots' Nat. Biotechnol., 2004(22), 959 ]。

30

## 【 0 0 0 5 】

これを克服するための他のアプローチとして、磁性を有するナノ粒子に対して研究し始めた。これは、磁性を有するナノ粒子を生体内に導入すれば、磁性体が有する磁氣的性質を磁気共鳴装置 (MRI) のような外部の強い磁場によって検出することが容易であるからである [ 米国特許第 5, 565, 215 号、Gref; Ruxandra et al., 'Biodegradable Injectable Particles for Imaging' ]。

## 【 0 0 0 6 】

したがって、最近、国内外の研究者らは、磁氣的性質を示すナノ粒子を合成し、これをバイオ分野に適合するようにシリカシェルを導入するなど量子ドットを利用したバイオ分野へのアプローチに対する問題点を克服するための努力をしてある。しかし、このような外部の強い磁場を利用する方法は、反対に細胞研究のような生体外 (in vitro) 研究に対しては適用することが容易ではない問題点を有している。

40

## 【 0 0 0 7 】

既存の磁氣的性質を利用するさらに他の分野は、300ナノメートルから数マイクロメートルサイズの高分子塊りの中にいくつかの磁性ナノ粒子を含ませる形態 (プリンの形態) の物質が利用されてきた。この物質の表面にバンコマイシン (Vancomycin) のような化合物を導入し、特定のバクテリアを認識して外部の磁場によって分離することができる可能性を提示した。しかし、有機高分子の場合、生体内 (in vivo) 毒性を有しており、形成された全体のサイズがあまり大きいため、血管を通じた流れに適合しないので、生体内 (in vivo) 研究に対する問題点が提示されている。

50

## 【 0 0 0 8 】

また、有機高分子シェルからなるこのような物質は、所望の表面で処理するために、非常に複雑な合成過程が先行されなければならないので、その適用に対する限界点が存在する。すなわち、生体内 (in vivo) ドラッグデリバリーや遺伝子デリバリーのような応用性を有するためには、合成された物質のサイズと表面処理可能性がどれほど容易であるかが非常に重要な要素である。

## 【 発明の開示 】

## 【 発明が解決しようとする課題 】

## 【 0 0 0 9 】

本発明の目的は、蛍光性を有する磁性ナノ粒子を提供することにある。また、本発明の他の目的は、蛍光性を有する磁性ナノ粒子と陰電荷を帯びた遺伝子または核酸が結合されている磁性ナノ粒子、及びこれを含む遺伝子デリバリーシステムを提供することにある。

10

## 【 0 0 1 0 】

また、本発明のさらに他の目的は、蛍光性を有する磁性ナノ粒子と陰電荷を帯びた核酸が結合されている磁性ナノ粒子、及びこれを含む遺伝子デリバリーシステムを提供することにある。また、本発明のさらに他の目的は、蛍光性を有する磁性ナノ粒子と抗体が結合されている磁性ナノ粒子、及びこれを含む細胞染色剤を提供することにある。また、本発明のさらに他の目的は、前記磁性ナノ粒子の製造方法を提供することにある。

## 【 課題を解決するための手段 】

## 【 0 0 1 1 】

すなわち、本発明者らは、前記問題点を克服し、生体内及び生体外に共に適用可能な磁性ナノ粒子について研究したところ、生体適合性のためにシリカシェルをポリエチレングリコール ( P E G ) に改質した磁性ナノ粒子を合成し、発表した。 [ Tae-Jong Yoon et al., ' Multifunctional Nanoparticles Possesing a Magnetic Motor Effect for Drug or Gene Delivery ' Angew. Chem. In. Ed. 2005(44), 1068 ~ 1071 ]。しかし、前記 P E G には、電荷がないので、 D N A のように電荷を帯びた生体分子の結合などに困難があった。

20

## 【 0 0 1 2 】

したがって、本発明者らは、有機蛍光物質を含み、シリカシェルで覆われた磁性ナノ粒子の表面を電荷を有する物質に改質する方法について研究したところ、有機蛍光物質を含み、表面が電荷を有する物質で表面改質されたシリカで覆われた磁性ナノ粒子を合成するようになり、このような磁性ナノ粒子が細胞内に投入される場合、外部の磁場によって位置確認及び調節が可能であると同時に、容易に蛍光を検出することによって、生体内及び生体外の研究に共に効率的に適用が可能であることを確認し、本発明を完成した。

30

## 【 0 0 1 3 】

本発明は、磁気物質を含むコアと、コアの外部に有機蛍光物質とを含み、表面改質されたシリカシェルで覆われた、そのサイズが 1 0 0 n m 以下で且つ水溶性である磁性ナノ粒子を提供する。

## 【 0 0 1 4 】

また、本発明は、前記磁性ナノ粒子と陰電荷を帯びた遺伝子または核酸が結合されている磁性ナノ粒子、及びこれを含む遺伝子デリバリーシステムを提供する。

40

## 【 0 0 1 5 】

また、本発明は、蛍光性を有する磁性ナノ粒子と陰電荷を帯びた核酸が結合されている磁性ナノ粒子、及びこれを含む遺伝子デリバリーシステムを提供する。

## 【 0 0 1 6 】

また、本発明は、前記磁性ナノ粒子と抗体が結合されている磁性ナノ粒子、及びこれを含む細胞染色剤を提供する。また、本発明は、前記磁性ナノ粒子の製造方法を提供する。

## 【 発明の効果 】

## 【 0 0 1 7 】

本発明による磁性ナノ粒子は、光学的性質及び磁氣的性質を同時に有し、バイオ分野へ

50

の適用が可能であり、高い親水性と簡単な化学的表面処理技術を通じて多様な化合物を利用して化学官能基をナノ物質に導入することができ、これらを利用して細胞内浸透力を増加または減少させることができる。

【0018】

また、これらのうち陽電荷を帯びるナノ物質を利用してプラスミドDNAを細胞内に移動させて遺伝子デリバリーシステムとして有用に利用することができ、表面処理技法を利用して特定の細胞に選択的に結合、認知することができる技術に基づいて細胞染色に有用に利用することができる。また、選択的に認知された細胞を外部の強い磁場によって細胞を分離、精製することができる。

【発明を実施するための最良の形態】

10

【0019】

以下、本発明について詳しく説明する。本発明の磁性ナノ粒子は、粒子内部に磁気物質を含み、コア外部に有機蛍光物質を含む電荷を帯びた物質で表面改質された非磁気シリカシェルで覆われているので、光学的性質及び磁氣的性質を同時に有し、バイオ分野への適用が可能である。

【0020】

本発明による磁性ナノ粒子は、

- 1) 水溶性磁性体ナノ粒子の表面をポリビニルピロリドン(PVP)で処理し、エタノールに分散される形態に変換させた後、遠心分離する段階と、
- 2) 前記1)段階で分離された高分子によって安定化された磁性ナノ粒子をシリカコーティングをするためにエタノールに分散させる段階と、
- 3) 前記2)段階で製造した溶液に、有機蛍光物質を3-アミノプロピルトリエトキシシラン(3-aminopropyltriethoxysilane; APS)で処理した溶液とテトラエトキシシラン(tetraethoxysilane; TEOS)の溶液を添加し、NH<sub>4</sub>OHを添加し、有機蛍光物質を含む磁性ナノ粒子表面からシリカが形成されるように誘導する段階と、
- 4) 前記3)段階で得た磁性ナノ粒子のシリカシェルの表面をシリコン化合物で表面処理する段階とを含んで製造されることができる。

20

【0021】

本発明による磁性ナノ粒子の製造方法を段階別に詳しく説明すれば次の通りである。

前記1)段階で、水溶性磁性体ナノ粒子は、湿式、乾燥または真空方法など公知の方法によって製造されることができる。例えば、粉碎する大きい物質、溶液から沈殿、共沈殿、マイクロエマルジョン、ポリオール、有機前駆体の高温分解、溶液技術、エアロゾル/気泡方法、スプレイ熱分解、プラズマ原子化、及びレーザ熱分解方法を含むが、これらに限らない。本発明において、水溶性磁性体ナノ粒子は、共沈殿法(coprecipitation)によって製造して使用することができる。前記水溶性磁性体ナノ粒子は、コバルトと鉄酸化物からなり、マンガン、亜鉛、ニッケル、銅などの遷移金属酸化物を含むことができる。

30

【0022】

前記3)段階で、有機蛍光物質は、ローダミンBイソチオシアネート(Rhodamine B isothiocyanate, RITC)またはフルオレセインイソチオシアネート(fluoresceine isothiocyanate, FITC)が好ましく、これらに限らず、現存する有機蛍光物質を化学的に変形させてすべて含むことができる。例えば、アレクサフルオロ(Alexa Fluor)、ローダミンレッド-X(Rhodamine Red-X)、テキサスレッド(Texas Red)、テトラメチルローダミン(Tetramethylrhodamine)、カスケードブルー(Cascade Blue)、DAPI、クマリン類(coumarine)、ルシファーイエロー(Lucifer Yellow)、ダンシルアミンデ(Dansylamine)などが挙げられる。

40

【0023】

本発明において、シリカの原料であるTEOSの量が増加するほど磁性ナノ粒子のシリカシェルが厚くなる。したがって、TEOSの量を調節することによって、磁性ナノ粒子のサイズを調節することができる。

50

## 【0024】

前記4)段階で、シリカシエルの表面改質に使われるシリコン化合物は、電荷を帯びた物質、すなわちイオン性官能基を有する有機シリコン化合物が好ましい。例えば、 $(\text{CH}_3\text{O})_3\text{Si}$ -官能基が導入されたイオン性化合物、水溶性化合物または薬物など特定の機能性化合物が含まれることができる。具体的に、 $(\text{CH}_3\text{O})_3\text{Si}-\text{PEG}[(\text{CH}_3\text{O})_3\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_6\sim_9\text{CH}_3]$ 、 $(\text{CH}_3\text{O})_3\text{Si}-\text{PMP}[(\text{CH}_3\text{O})_3\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{PO}_2(\text{OCH}_3)\text{Na}]$ 、 $(\text{CH}_3\text{O})_3\text{Si}-\text{PTMA}[(\text{CH}_3\text{O})_3\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3\text{Cl}^-]$ 及び3-アミノプロピルトリエトキシシラン(3-aminopropyltriethoxysilane; APS)よりなる群から選択された1種を含むが、これらに限らず、すべてのシリコン化合物を含むことができる。

10

## 【0025】

本発明による磁性ナノ粒子は、すべての細胞[乳房癌細胞(MCF-7)、肺癌細胞(A549)、肺正常細胞(NL20)]に対して毒性を示さない。本発明による磁性ナノ粒子が細胞内に侵透した後、細胞が外部磁場に露出された時、磁性ナノ粒子の数は、細胞毒性を起こすには十分ではないが、磁気粒子の数が磁気運動をする細胞を提供するには十分な磁気粒子を含む。前記細胞は、真核細胞、ヒトの細胞、動物細胞、または植物細胞であり得る。前記磁気粒子は、約100nm以下、特に約30~80nmの平均粒子サイズを有することができる。前記ナノ磁気粒子が浸透された細胞は、外部磁場(約0.3テスラ)によって0.5~1mm/secの速度で移動し、外部磁場の強さと移動速度は、これに限定されない。

20

## 【0026】

一方、本発明による有機蛍光物質を含み、電荷を帯びた物質で表面改質されたシリカシエルで覆われた磁性ナノ粒子は、表面改質されたシリカシエルの表面に陰電荷を帯びた遺伝子または核酸、または抗体など多様な物質を結合させることによって、多様な用途に使用されることができる。一例として、本発明による磁性ナノ粒子の表面改質されたシリカシエルの表面に、陽電荷を帯びたMNP@SiO<sub>2</sub>(RITC)-PTMAは、陰電荷を帯びた遺伝子と結合が可能である。

## 【0027】

前記陰電荷を帯びた遺伝子と結合した磁性ナノ粒子は、

1)陰電荷を帯びた遺伝子と陽電荷を帯びたMNP@SiO<sub>2</sub>(RITC)-PTMAをHEPES[N-(2-ヒドロキシエチル)-ピペラジン-N'-(2-エタンスルホン酸)]緩衝溶液に入れ、培養させる段階と、

30

2)前記1)段階で培養された溶液にCaCl<sub>2</sub>を入れ、2時間さらに培養させる段階と、

3)前記2)段階で培養された溶液にダルベッコ改変イーグル培地(DMEM)を入れ、Ca<sup>2+</sup>イオン濃度を4.5mMに調整した後、4時間さらに培養させ、PBS緩衝溶液で洗浄する段階とを含んで製造されることができる。

## 【0028】

上記のように、陰電荷を帯びた遺伝子と結合した磁性ナノ粒子{プラスミドDNA-[MNP@SiO<sub>2</sub>(RITC)-PTMA]}が細胞に入ると、細胞膜を通過することによって、陰電荷を帯びた遺伝子を伝達した後、分離され、細胞質内に磁性ナノ粒子として残るようになる(赤色蛍光)。また、伝達されたDNAによって青色タンパク質が細胞質で合成されることを確認することができる(図8参照)。

40

## 【0029】

前記陰電荷を帯びた遺伝子は、プラスミドDNA、具体的にpcDNA3.1/CT-GFPであることが好ましいが、これに限らず、多様な遺伝子の結合が可能である。

## 【0030】

本発明による磁性ナノ粒子は、陰電荷を帯びた遺伝子以外に陰電荷を帯びた核酸と結合することもできる。したがって、本発明による磁性ナノ粒子は、陰電荷を帯びた遺伝子または核酸と結合することによって、遺伝子デリバリーシステムとして有用に使用されるこ

50

とができる。また、本発明による磁性ナノ粒子の表面改質されたシリカシェルの上に抗体を導入し、特定の細胞に選択的に結合することができ、これを外部磁場によって動きを誘導して分離することができる。

#### 【0031】

前記抗体結合磁性ナノ粒子は、

1) 有機蛍光物質を含む磁性ナノ粒子の表面を Si-PEG/3-アミノプロピルトリエトキシシラン (3-aminopropyltriethoxysilane; APS) で同時に処理する段階と、

2) 前記 1) 段階で得た磁性ナノ粒子にマレイミドブチル酸を反応させて磁性ナノ粒子のシリカシェルの上にあるアミン基にマレイミド基 (maleimide; M a I) を導入する段階と、

3) 抗体に 2-メルカプトエチルアミン (2-mercaptoethylamine) を反応させてチオール基を有する抗体を形成する段階と、

4) 前記 2) 段階で得た磁性ナノ粒子のシリカシェルの上にあるマレイミド基に前記 3) 段階で得た抗体を結合する段階とを含んで製造されることがある。

#### 【0032】

前記 4) 段階で使用された抗体としては、白血病細胞に対して CD-10 抗体または乳房癌細胞に対して Her2<sub>Ab</sub> 抗体を含むが、これらに限らず、幹細胞など多様な細胞の抗体を含むことができる。したがって、本発明による磁性ナノ粒子は、抗体と結合することによって、細胞染色剤として有用に使用されることができる。

#### 【0033】

また、本発明による磁性ナノ粒子は、マウスの腹腔内に投与した後、マウスの肝で黒色磁性信号として観察される。したがって、本発明による磁性ナノ粒子は、細胞染色、細胞分離、生体内ドラッグデリバリーまたは遺伝子デリバリーに有用に利用することができる。また、本発明による磁性ナノ粒子は、蛍光分析と MRI 分析が同時に可能な分析試薬として利用することもできる。

#### 【実施例】

#### 【0034】

(実施例 1) 本発明による磁性ナノ粒子の製造

1. 有機蛍光物質を含み、シリカシェルで覆われた磁性ナノ粒子の製造

コバルトフェライト磁性ナノ粒子 (20 mg/mL) 水溶液 34.7 mL をポリビニルピロリドン (PVP) 水溶液 0.65 mL (濃度は 25.6 g/L) に添加し、常温で一晩攪拌した。ポリビニルピロリドンで安定化された磁性ナノ粒子溶液に水/アセトン = 1/10 比率の溶液を添加し、4000 rpm の速度で 10 分間遠心分離した。上澄液を除去し、沈殿されたナノ粒子は、エタノール 10 mL にさらに分散させた。

#### 【0035】

これに、有機蛍光物質であるローダミン B イソチオシアネート (Rhodamine B isothiocyanate, RITC) またはフルオレセインイソチオシアネート (fluoresceine isothiocyanate, FITC) を 3-アミノプロピルトリエトキシシラン (3-aminopropyltriethoxysilane; APS) で処理した溶液と、テトラエトキシシラン (tetraethoxysilane; TEOS) を 0.04/0.3 のモル比率でエタノールに溶解したものを添加した。NH<sub>3</sub> が 30 重量% 含まれた NH<sub>4</sub>OH を 0.86 mL 添加し、磁性ナノ粒子表面からシリカが形成されるように誘導した。有機蛍光物質が含まれたシリカシェルで覆われた磁性ナノ粒子を高速遠心分離器を利用して 18,000 rpm で 30 分間遠心分離した後、沈殿をエタノールと水で洗浄することによって、精製した。形成された物質は、水またはアルコールによく分散された。

#### 【0036】

有機蛍光物質を含むシリカシェルで覆われた磁性ナノ粒子 (MNP@SiO<sub>2</sub> (RITC または FITC)) の製造過程を図 1 に示し、シリカシェルで覆われた磁性ナノ粒子 (MNP@SiO<sub>2</sub> (RITC または FITC)) の透過電子顕微鏡の写真を図 2 に示す。

#### 【0037】

10

20

30

40

50

図 2 に示されたように、磁性ナノ粒子のサイズは、シリカの原料である T E O S の量が増加するほど磁性ナノ粒子のサイズが増加した。したがって、T E O S の量を調節することによって、磁性ナノ粒子のシェル厚さを調節することができることが分かる。

【 0 0 3 8 】

2 . 有機蛍光物質を含み、電荷を帯びた物質で表面改質されたシリカシェルで覆われた磁性ナノ粒子の製造

上記 1 で製造した磁性ナノ粒子 ( M N P @ S i O <sub>2</sub> ( R I T C ) ) 4 5 m g をエタノール 1 0 m L に分散させ、各シリコン化合物 0 . 0 2 m m o l [ ( C H <sub>3</sub> O ) <sub>3</sub> S i - P E G 、 ( C H <sub>3</sub> O ) <sub>3</sub> S i C H <sub>2</sub> C H <sub>2</sub> C H <sub>2</sub> O ( C H <sub>2</sub> C H <sub>2</sub> O ) <sub>6</sub> ~ <sub>9</sub> C H <sub>3</sub> は 1 2 5 m g ; ( C H <sub>3</sub> O ) <sub>3</sub> S i - P M P 、 ( C H <sub>3</sub> O ) <sub>3</sub> S i C H <sub>2</sub> C H <sub>2</sub> C H <sub>2</sub> P O <sub>2</sub> ( O C H <sub>3</sub> ) N a は 2 3 8 m g ; ( C H <sub>3</sub> O ) <sub>3</sub> S i - P T M A 、 ( C H <sub>3</sub> O ) <sub>3</sub> S i C H <sub>2</sub> C H <sub>2</sub> C H <sub>2</sub> N <sup>+</sup> ( C H <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> C l <sup>-</sup> は 2 5 7 m g ] を入れ、N H <sub>4</sub> O H を利用して p H を 1 2 に調整した。

【 0 0 3 9 】

3 時間 6 0 で強く攪拌した。溶液を高速遠心分離機を利用して 1 8 , 0 0 0 r p m で 3 0 分間回転させて、表面処理されたナノ粒子を沈殿させた。濾液には、過量のシリコン化合物が残るようになる。沈殿されたナノ粒子をエタノールと水を利用して 3 回洗浄し、精製及び分離した。製造されたナノ粒子は、水に対して非常に高い安定性を示した。

【 0 0 4 0 】

本発明による磁性ナノ粒子の表面を多様なシリコン化合物で化学的処理する過程を図 3 に示し、本発明による磁性ナノ粒子の多様な表面処理によって全体ナノ粒子の表面電荷が変わったことを測定したゼータ電位 ( zeta-potential ) を図 4 に示す。

【 0 0 4 1 】

図 3 及び図 4 に示されたように、M N P @ S i O ( R I T C ) [ A 線 ] は、表面処理されないもので、電荷は、- 1 6 . 8 m V の値を示し、( C H <sub>3</sub> O ) <sub>3</sub> S i - P E G で表面処理された M N P @ S i O <sub>2</sub> ( R I T C ) - P E G [ B 線 ] の電荷は、2 . 4 m V の値を示し、( C H <sub>3</sub> O ) <sub>3</sub> S i - P M P で表面処理された M N P @ S i O <sub>2</sub> ( R I T C ) - P M P [ C 線 ] の電荷は、- 5 0 m V の値を示し、( C H <sub>3</sub> O ) <sub>3</sub> S i - P T M A で表面処理された M N P @ S i O <sub>2</sub> ( R I T C ) - P T M A [ D 線 ] の電荷は、+ 3 5 . 7 m V を示した。

【 0 0 4 2 】

( 実験例 1 ) 本発明による磁性ナノ粒子の細胞浸透率比較

本発明による磁性ナノ粒子の細胞内浸透率を調べるために、下記のような実験を行った。

【 0 0 4 3 】

乳房癌細胞 ( M C F - 7 ) は、A T C C ( American type culture collection ) から購入した。前記乳房癌細胞を 1 0 % 牛胎児血清 ( Fetal Bovine Serum ; F B S ) 4 0 μ L 、前記実施例 1 で製造した表面処理されない磁性ナノ粒子 [ M N P @ S i O <sub>2</sub> ( R I T C ) ] 及びシリコンで表面処理された磁性ナノ粒子 [ M N P @ S i O <sub>2</sub> ( R I T C ) - P E G 、 M N P @ S i O <sub>2</sub> ( R I T C ) - P M P 、または M N P @ S i O <sub>2</sub> ( R I T C ) - P T M A ] 2 m g / m L が含まれたダルベッコ改変イーグル培地 ( Dulbecco ' s Modified Eagle ' s Medium 、 D M E M ) で培養させた。すべての細胞は、ラップ - テック ( L a b - T e k ) ガラスチャンパスライドで培養させ、共焦点レーザー蛍光顕微鏡 ( Confocal Laser Scanning Microscope ; C L S M ) で観察した。

【 0 0 4 4 】

表面処理されない磁性ナノ粒子 [ M N P @ S i O <sub>2</sub> ( R I T C ) ] 及びシリコンで表面処理された磁性ナノ粒子 [ M N P @ S i O <sub>2</sub> ( R I T C ) - P E G 、 M N P @ S i O <sub>2</sub> ( R I T C ) - P M P または M N P @ S i O <sub>2</sub> ( R I T C ) - P T M A ] を同一の量及び同一の条件で乳房癌細胞に注入した時、細胞に浸透される程度を図 5 に示し、M N P @ S i O <sub>2</sub> ( R I T C ) - P E G と M N P @ S i O <sub>2</sub> ( R I T C ) - P M P を同一の量及び同一の条件で乳房癌細胞に注入した時、細胞に浸透される程度を図 6 に示す。

## 【0045】

図5に示されたように、シリコンで表面処理された磁性ナノ粒子は、同一の量を同一の条件で細胞に注入した時、細胞に浸透される程度は、 $MNP@SiO_2(RITC)-PEG > MNP@SiO_2(RITC)-PTMA > MNP@SiO_2(RITC) > MNP@SiO_2(RITC)-PMP$ の順に磁性ナノ粒子がさらに多く浸透された。

## 【0046】

また、図6に示されたように、A～Dは、 $MNP@SiO_2(RITC)-PEG$ に関する写真であり、E～Hは、 $MNP@SiO_2(RITC)-PMP$ に関する写真である。AとEは、赤色蛍光写真であり、BとFは、光学顕微鏡写真であり、CとGは、核染色を確認するDAPIモードの蛍光写真であり、DとFは、それぞれA～C、E～Gの写真を重ねた写真である。 $(CH_3O)_3Si-PEG$ で表面処理された磁性ナノ粒子は、中性的な電気的特徴を有するので、細胞に侵透した時、細胞質に不規則的に位置しているが、 $(CH_3O)_3Si-PMP$ で表面処理された磁性ナノ粒子は、陰イオン性を有するので、核膜の周辺に存在している。

10

## 【0047】

すなわち、本発明による有機蛍光物質を含み、電荷を帯びた物質で表面改質されたシリカシェルで覆われた磁性ナノ粒子は、その改質成分によって細胞内の位置を異なるので、本発明による磁性ナノ粒子の表面電荷を利用すれば、細胞内の位置変化を誘導することができる。

## 【0048】

(実験例2)細胞毒性実験(MTT assay)

本発明による磁性ナノ粒子の細胞毒性を調べるために、下記のような実験を行った。

20

## 【0049】

乳房癌細胞(MCF-7)、肺癌細胞(A549)、肺正常細胞(NL20)は、ATCC(American type culture collection)から購入した。MCF-7細胞は、10%牛胎児血清(Fetal Bovine Serum; FBS)40 $\mu$ Lと本発明によるナノ粒子2mg/mLが含まれたダルベッコ改変イーグル培地(Dulbecco's Modified Eagle's Medium、DMEM)で培養させ、A549細胞とNL20細胞は、同一の条件下にRPMI(10%牛胎児血清、2mM L-グルタミン、1mMピルビン酸ナトリウム、1 $\times$ 不必須アミノ酸、5mM 2-メルカプトエタノール含有)で培養させた。全ての細胞は、ラップ-テック(Lab-Tek)ガラスチャンバスライドで培養させ、共焦点レーザー蛍光顕微鏡で観察を容易にした。

30

## 【0050】

各細胞は、96-ウェル容器で培養させ、培養が終わる頃、各ウェルに50 $\mu$ LのMTT[3-(4,5-ジメチルチアゾール-2-イル)-2,5-ジフェニルテトラゾリウムブロミド]をリン酸緩衝溶液[phosphate-buffered saline; PBS(0.2mg/mL、pH=7.2)]に添加し、最後濃度を0.4mg/mLにした。これを5%CO<sub>2</sub>の環境で37 $^{\circ}$ Cで4時間さらに培養させた。培養培地を用心深くピペットで除去し、生きている細胞のミトコンドリアの細胞呼吸から形成される脱水素酵素(dehydrogenase)によって形成されるホルマザン結晶(formazan crystal)を150 $\mu$ LのDMSOに溶解した。これを10分程度攪拌器で攪拌させ、490nmと620nmで吸光度を測定した。

40

## 【0051】

結果を図7に示した。図7に示されたように、本発明による磁性ナノ粒子は、全ての細胞[乳房癌細胞(MCF-7)、肺癌細胞(A549)、肺正常細胞(NL20)]に対して毒性を示さなかった。

## 【0052】

(実施例2)プラスミドDNAが結合された $MNP@SiO_2(RITC)-PTMA$ の製造

プラスミドDNA遺伝子は、pcDNA3.1/CT-GEPを利用した。プラスミド

50

DNAとMNP@SiO<sub>2</sub>(RITC)-PTMAを30μLのHEPES[N-(2-ヒドロキシエチル)-ピペラジン-N`-(2-エタンスルホン酸)]緩衝溶液(pH-7.4)に入れ、2つの混成体を2時間4 で培養させ、100mM CaCl<sub>2</sub> 30μLを添加した。この溶液を2時間さらに培養させ、24-ウェルプレートに移した。

【0053】

これに0.6mLのDMEMを入れ、Ca<sup>2+</sup>イオン濃度を4.5mMに調整した。37で4時間さらに培養させた後、DNAが結合されたナノ粒子をPBS緩衝溶液で洗浄した。細胞にDNAが結合されたナノ粒子を入れ、遺伝子伝達信号を観察した。

【0054】

本発明による磁性ナノ粒子表面を(CH<sub>3</sub>O)<sub>3</sub>Si-PTMAで処理して得られたMNP@SiO<sub>2</sub>(RITC)-PTMAをプラスミドDNAと結合して遺伝子デリバリーシステムとして利用する過程を図8に示し、プラスミドDNAが結合されたMNP@SiO<sub>2</sub>(RITC)-PTMAを利用して遺伝子デリバリーに利用されてトランスフェクションを起こした細胞を共焦点レーザー蛍光顕微鏡で観察した写真を図9に示す。

10

【0055】

図8に示されたように、プラスミドDNA遺伝子pcDNA3.1/CT-GFPが結合された陽電荷性ナノ粒子(MNP@SiO<sub>2</sub>(RITC)-PTMA)は、細胞に入ると、細胞膜を通過した後、プラスミドDNAから分離され、細胞質内に磁性ナノ粒子が残るようになり(赤色蛍光)、結果的に細胞内にプラスミドDNAを伝達するようになる。このように伝達されたDNAによって青色タンパク質が細胞内で合成された。

20

【0056】

図9に示されたように、Aは青色蛍光写真であり、Bは光学顕微鏡写真であり、Cは赤色蛍光写真であり、Dはすべての写真を重ねたもので、赤色点線は、MNP@SiO<sub>2</sub>(RITC)-PTMAに該当し、青色は、DNAトランスフェクションによってGFP蛍光が細胞質で現われる様子である。

【0057】

したがって、本発明による磁性ナノ粒子は、プラスミドDNA遺伝子と結合することによって、遺伝子デリバリーシステムとして有用に利用することができる。

【0058】

(実施例3)MNP@SiO<sub>2</sub>(FITC)-PEG/APS-MaI物質の製造

30

前記実施例1の2で磁性ナノ粒子(MNP@SiO<sub>2</sub>(RITC))を(CH<sub>3</sub>O)<sub>3</sub>Si-PEG化合物で処理する時、3-アミノプロピルトリエトキシシラン(3-aminopropyltriethoxysilane; APS)を一緒に入れて処理することを除いて、前記実施例1と同一の方法にしてMNP@SiO<sub>2</sub>(FITC)-PEG/APSを製造した。

【0059】

前記MNP@SiO<sub>2</sub>(FITC)-PEG/APSを無水DMFに溶解した溶液[36.5mL; Si-PEG/APS=5/1(モル比率)、22.9mg/mL、ここでアミンの濃度は6.5mmol/g]をマレイミドブチル酸(maleimidobutyric acid)(0.96g、1.4mmol)、ベンゾトリアゾール-1-イル-オキシ-トリス(ピロリジノ)ホスホニウムヘキサフルオロホスフェート(benzotriazol-1-yl-oxy-tris(pyrolidino)phosphonium hexafluorophosphate、PyBOP)(0.43g、0.826mmol)及びN-ヒドロキシベンゾトリアゾール(N-Hydroxybenzotriazole、HOBt)(0.19g、1.4mmol)が溶解されている無水DMFに入れた。次に、精製されたジイソプロピルエチルアミン(diisopropylethylamine)(0.2mL)を入れ、常温で20時間攪拌させた。反応物をエッペンドルフ(Eppendorf)チューブに移し、それぞれDMFで数回洗浄した。ナノ粒子を0.8mLのDMFにさらに分散させ、光を遮断させた後、常温で貯蔵した。

40

【0060】

磁性ナノ粒子の表面を(CH<sub>3</sub>O)<sub>3</sub>Si-PEGとAPSで同時に処理し、磁性ナノ粒子表面のアミン基にマレイミド基を導入した後、これに特定細胞認知用抗体を導入する過程

50

を図10に示す。

【0061】

(実施例4)本発明による磁性ナノ粒子に抗体生体分子を導入する過程及び細胞染色実験PBS緩衝溶液に溶解されている(CD-10またはHer2<sub>Ab</sub>)抗体溶液(200ug/mL)をEDTA溶液(10μL、0.5M)であらかじめ処理しておいた。これに500μLのPBSに溶解されている2-メルカプトエチルアミン(2-mercaptoethylamine)溶液(5μL、0.779mmol)を添加し、37℃で90分間培養した。

【0062】

この工程を通じて、抗体を半分に切り、これをセファデックスG-25を利用して精製し、前記実施例3で製造されたMNP@SiO<sub>2</sub>(FITC)-PEG/APS-MaI(0.8mL、22.9mg/mL PBS)に入れ、37℃で20時間培養した。抗体が結合されたナノ粒子を13,000rpmで20分間遠心分離して沈殿を誘導し、濾液を除去した後、PBS 1mLを加え、再分散させて4℃で保管した。

10

【0063】

抗体が結合された磁性ナノ粒子を利用して細胞染色に利用されている様子を共焦点蛍光顕微鏡で観察した結果を図11に示す。また、抗体が結合された磁性ナノ粒子が白血病細胞と肺癌細胞に対して細胞染色に利用されている様子を共焦点蛍光顕微鏡で観察した結果を図12に示す。

【0064】

図11に示されているように、細胞内に浸透させた物質は、赤色蛍光を有するMNP@SiO<sub>2</sub>(RITC)であり、細胞膜に結合された物質は、青色蛍光を有するMNP@SiO<sub>2</sub>(FITC)-Her2<sub>Ab</sub>である。Aは、青色蛍光写真であり、Bは、光学顕微鏡写真であり、Cは、赤色蛍光写真であり、Dは、すべての写真を重ねたものである。

20

【0065】

図12に示されたように、CD-10抗体は、白血病細胞(SP2/O)膜には選択的に結合したが(A~C)、肺癌細胞に対しては結合しなかった(D~F)。

【0066】

(実施例5)本発明による磁性ナノ粒子のマウスの腹腔内投与実験(in vivo実験)

本発明による磁性ナノ粒子の生体内作用を調べるために、下記のような実験を行った。

30

【0067】

実験に使用した動物は、4週齢の特定病原体不在(specific pathogens free)環境で育てたICR雄性マウス12匹を温度22±3℃、湿度55±10%、照明12L/12Dの動物室内で飼育した。マウスは、実験に使用される前に1週間程度順化させた。実験動物用飼料((株)第一製糖、マウス用)及び飲水は、滅菌した後供給し、自由摂取させた。

【0068】

本発明によるMNP@SiO<sub>2</sub>(RITC)をマウスに腹腔注射を通じて注入し、15分間隔でMRIを通じて観察した。対照群としては、ナノ粒子を注入しないものを使用した。

40

【0069】

結果を図14に示す。図14に示されたように、投入された磁性ナノ粒子は、マウスの肝で黒色磁性信号として観察された。

【産業上の利用可能性】

【0070】

本発明による磁性ナノ粒子は、光学的性質及び磁氣的性質を同時に有し、バイオ分野への適用が可能であり、高い親水性と簡単な化学的表面処理技術を通じて多様な化合物を利用して化学官能基をナノ物質に導入することができる。

【図面の簡単な説明】

【0071】

50

【図1】図1は、有機蛍光物質を含み、シリカシェルで覆われた磁性ナノ粒子 ( $MNP@SiO_2(RITC)$  または  $FITC$ ) の製造過程を示す図である。

【図2】図2は、有機蛍光物質を含み、シリカシェルで覆われた磁性ナノ粒子 ( $MNP@SiO_2(RITC)$  または  $FITC$ ) を透過電子顕微鏡で観察した図である。

【図3】図3は、本発明による磁性ナノ粒子 ( $MNP@SiO_2(RITC)$ ) の表面を多様なシリコン化合物で化学的処理する過程を示す図である。

【図4】図4は、本発明による磁性ナノ粒子 ( $MNP@SiO_2(RITC)$ ) の多様な表面処理によって全体ナノ粒子の表面電荷が変わったことを測定したゼータ電位 (zeta-potential) を示す図である。(Aは、表面処理されないもので、 $MNP@SiO_2(RITC)$ 、Bは、 $(CH_3O)_3Si-PEG$  で表面処理された  $MNP@SiO_2(RITC)-PEG$ 、Cは  $(CH_3O)_3Si-PMP$  で表面処理された  $MNP@SiO_2(RITC)-PMP$ 、Dは  $(CH_3O)_3Si-PTMA$  で表面処理された  $MNP@SiO_2(RITC)-PTMA$  を示す)

10

【図5】図5は、 $MNP@SiO_2(RITC)-PEG$ 、 $MNP@SiO_2(RITC)-PTMA$ 、 $MNP@SiO_2(RITC)$  及び  $MNP@SiO_2(RITC)-PMP$  の乳房癌細胞に対する浸透率を共焦点レーザー蛍光顕微鏡で観察した図である。

【図6】図6は、 $MNP@SiO_2(RITC)-PEG$  と  $MNP@SiO_2(RITC)-PMP$  を同一の量及び同一の条件で乳房癌細胞に注入した時、ナノ粒子の細胞内位置を共焦点レーザー蛍光顕微鏡で観察した図である。(A~Dは、 $MNP@SiO_2(RITC)-PEG$  に関する写真であり、E~Hは、 $MNP@SiO_2(RITC)-PMP$  に関する写真である。AとEは、赤色蛍光写真であり、BとFは、光学顕微鏡写真であり、CとGは、核染色を確認するDAPIモードの蛍光写真であり、DとFは、それぞれA~C、E~Gの写真を重ねた写真である)

20

【図7】図7は、 $MNP@SiO_2(RITC)$ 、 $MNP@SiO_2(RITC)-PEG$ 、 $MNP@SiO_2(RITC)-PMP$ 、及び  $MNP@SiO_2(RITC)-PTMA$  を乳房癌細胞 (MCF-7)、肺癌細胞 (A549) 及び肺正常細胞 (NL20) に処理して細胞毒性検査 (MTT実験) をした結果を示す図である。

【図8】図8は、 $MNP@SiO_2(RITC)-PTMA$  をプラスミドDNAと結合させて遺伝子デリバリーシステムとして利用する過程を示す図である。

【図9】図9は、プラスミドDNAが結合された  $MNP@SiO_2(RITC)-PTMA$  を利用して遺伝子デリバリー後トランスフェクション (transfection) を起こした細胞を共焦点レーザー蛍光顕微鏡で観察した図である。(Aは、青色蛍光写真であり、Bは、光学顕微鏡写真であり、Cは、赤色蛍光写真であり、Dは、すべての写真を重ねたものである)

30

【図10】図10は、 $MNP@SiO_2(FITC)$  の表面を  $(CH_3O)_3Si-PEG$  と3-アミノプロピルトリエトキシシラン (3-aminopropyltriethoxysilane: APS) で同時に処理し、前記表面のアミン基にマレイミド (maleimide) 基を導入した後、これに特定の細胞認知用抗体を導入する過程を示す図である。

【図11】図11は、抗体が結合された  $MNP@SiO_2(FITC)-PEG/APS-MaI$  が細胞染色に利用されている様子を共焦点蛍光顕微鏡で観察した図である。[Aは青色蛍光写真であり、Bは光学顕微鏡写真であり、Cは赤色蛍光写真であり、Dはすべての写真を重ねたものである。細胞内浸透された物質は、赤色蛍光を有する  $MNP@SiO_2(RITC)$  であり、細胞膜に結合された物質は、青色蛍光を有する  $MNP@SiO_2(FITC)-PEG/APS-MaI-Her2_{Ab}$  (以下、 $MNP@SiO_2(FITC)-Her2_{Ab}$  という) である]

40

【図12】図12は、白血病細胞 (SP2/O) 膜に選択的に結合が可能な  $CD-10$  抗体を青色ナノ粒子に導入した  $MNP@SiO_2(FITC)-CD10_{Ab}$  であり、A~Cのように、白血病細胞 (SP2/O) の細胞壁に選択的に結合し、D~Fのように、肺癌細胞 (A549) に対しては結合しない選択性を示す図である。

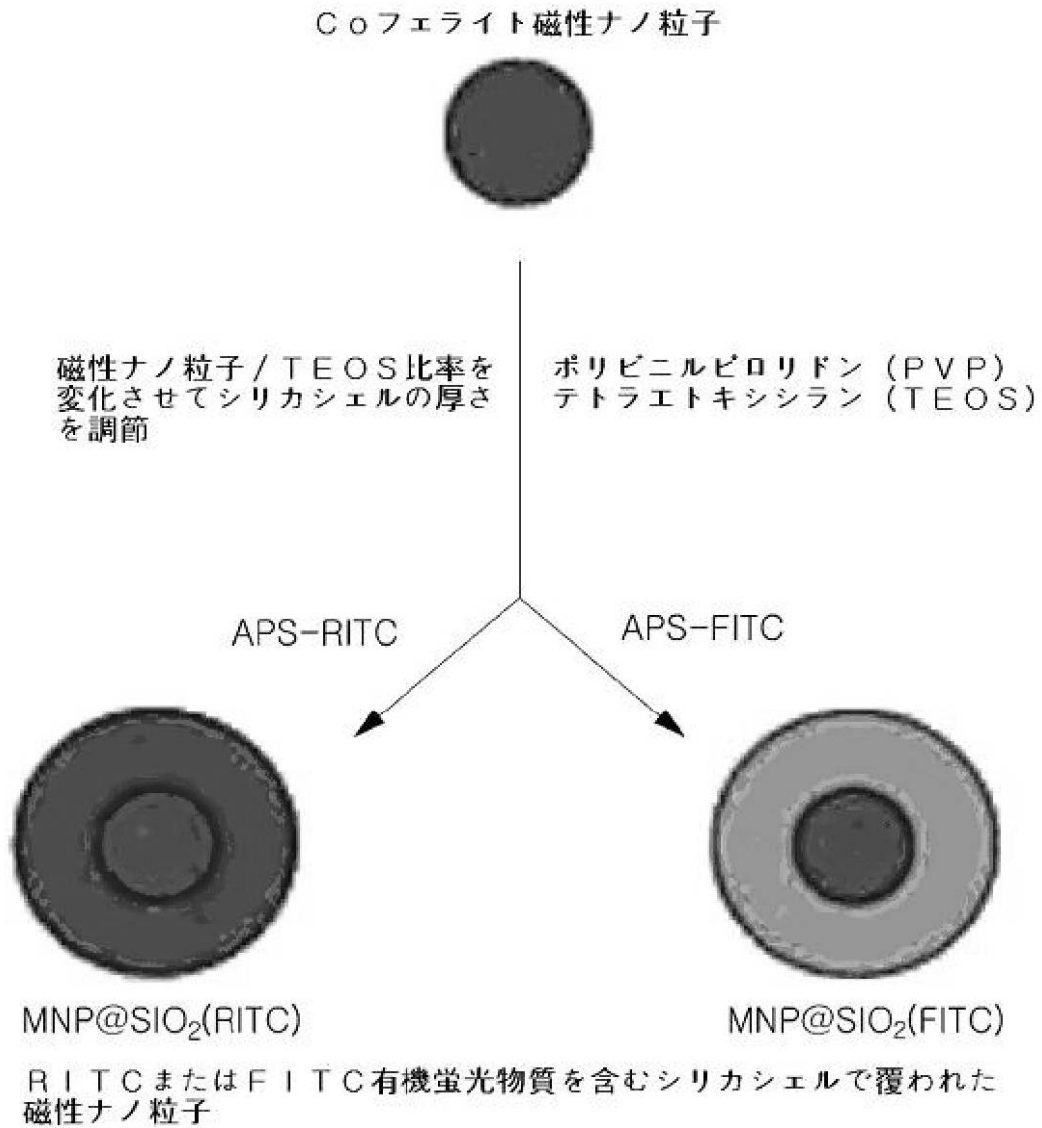
【図13】図13は、 $MNP@SiO_2(FITC)-CD10_{Ab}$  が白血病細胞の細胞壁

50

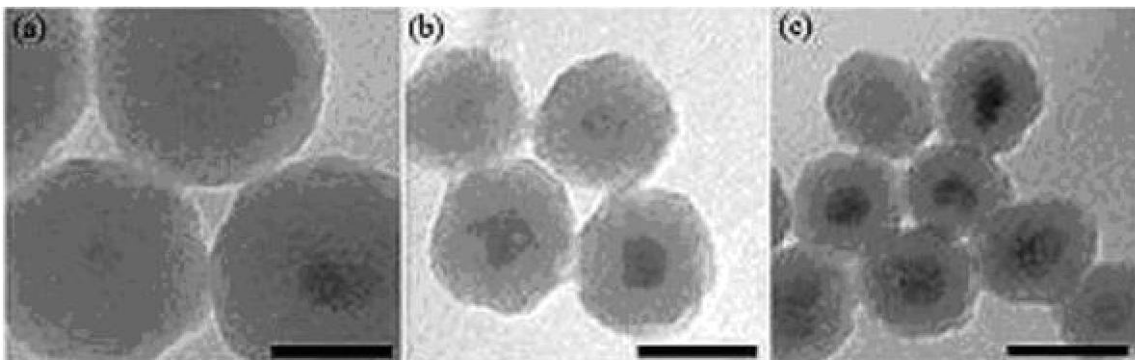
に選択的に認知された後、外部磁場によって引き込まれることを光学顕微鏡で観察した図である。(Aは外部に磁場を加えない状態であり、Bは赤色点線部分に外部磁場を加えて細胞を特定の位置に移動させたものである)

【図14】図14は、 $MNP@SiO_2$ (RITC)をマウスに腹腔注射を通じて注入し、一定の時間間隔でMRIを通じて観察した図である。(対照群は、合成された磁性ナノ粒子を注入しないものであり、残りは、合成された磁性ナノ粒子を注入したマウスから15分、30分、1時間、1日及び3日後に観察した写真である)

【図1】

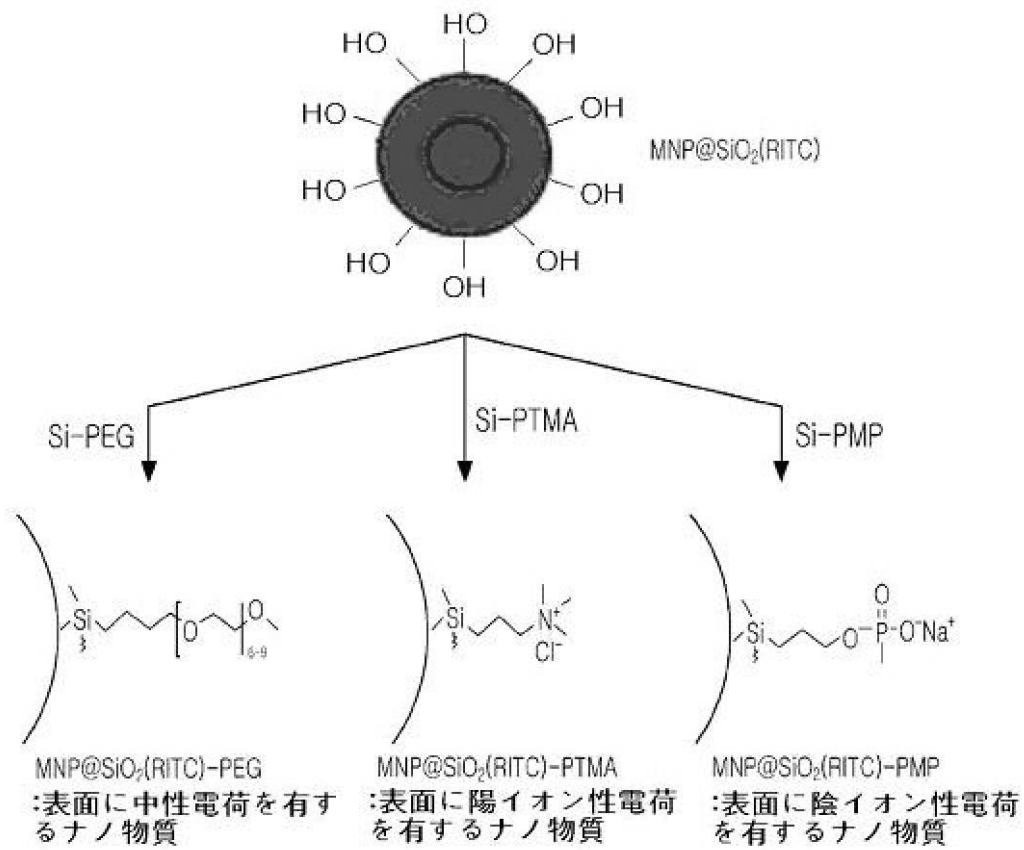


【図2】

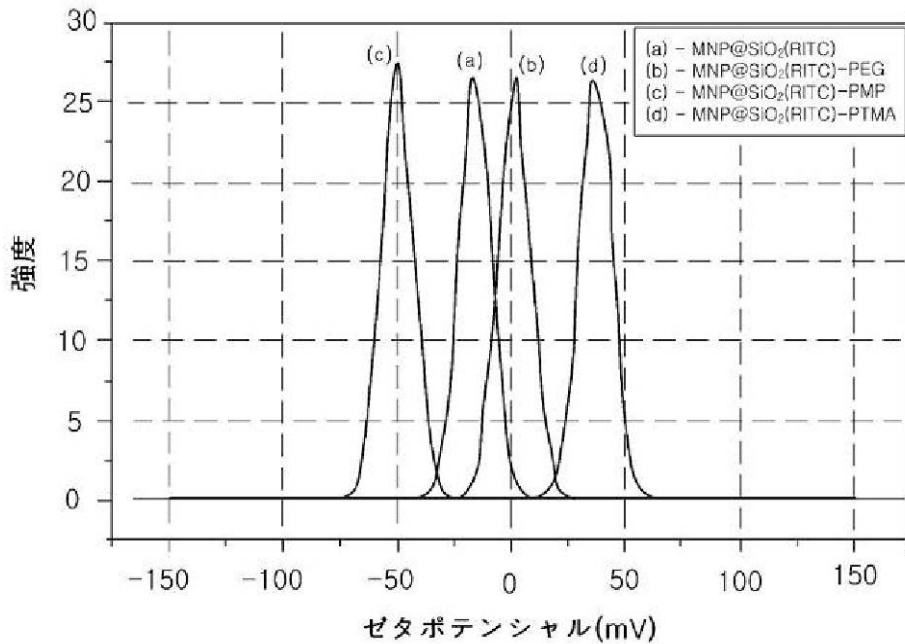


(a)TEOS/MNP=0.12mg/4mg, パーサイズ: 100nm  
(b)TEOS/MNP=0.06mg/4mg, パーサイズ: 50nm  
(c)TEOS/MNP=0.03mg/4mg, パーサイズ: 50nm

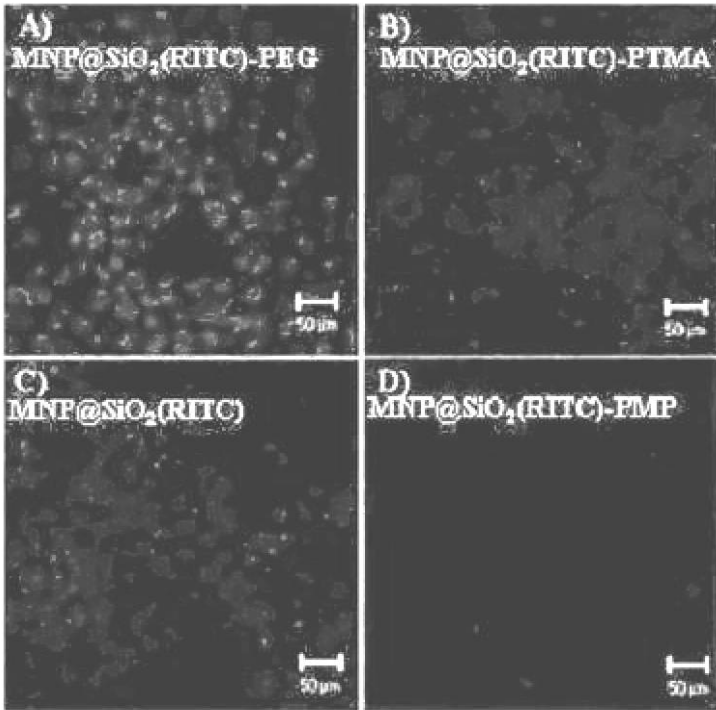
【 図 3 】



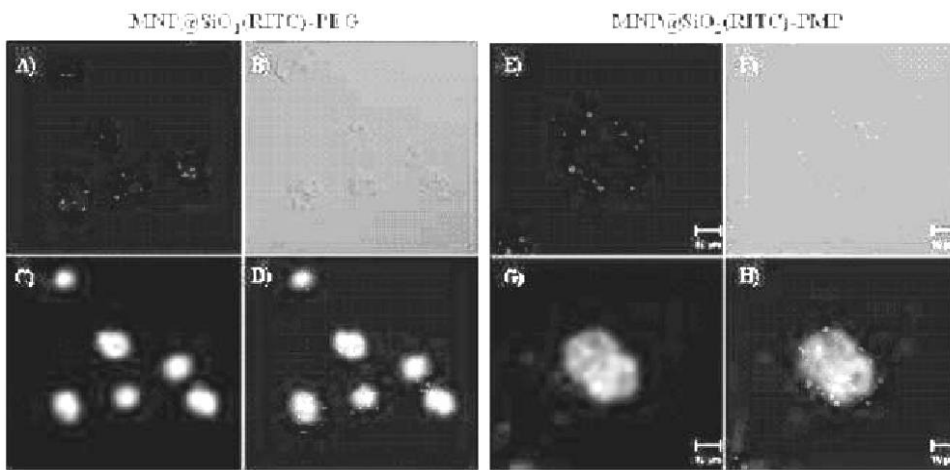
【 図 4 】



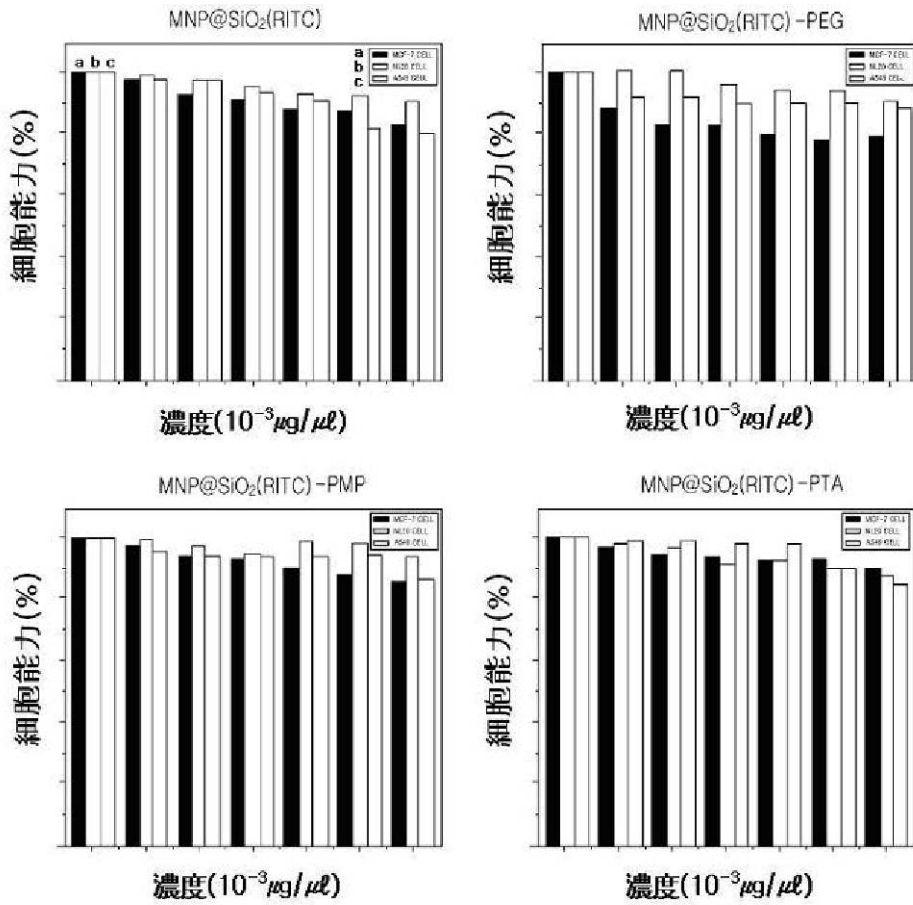
【 図 5 】



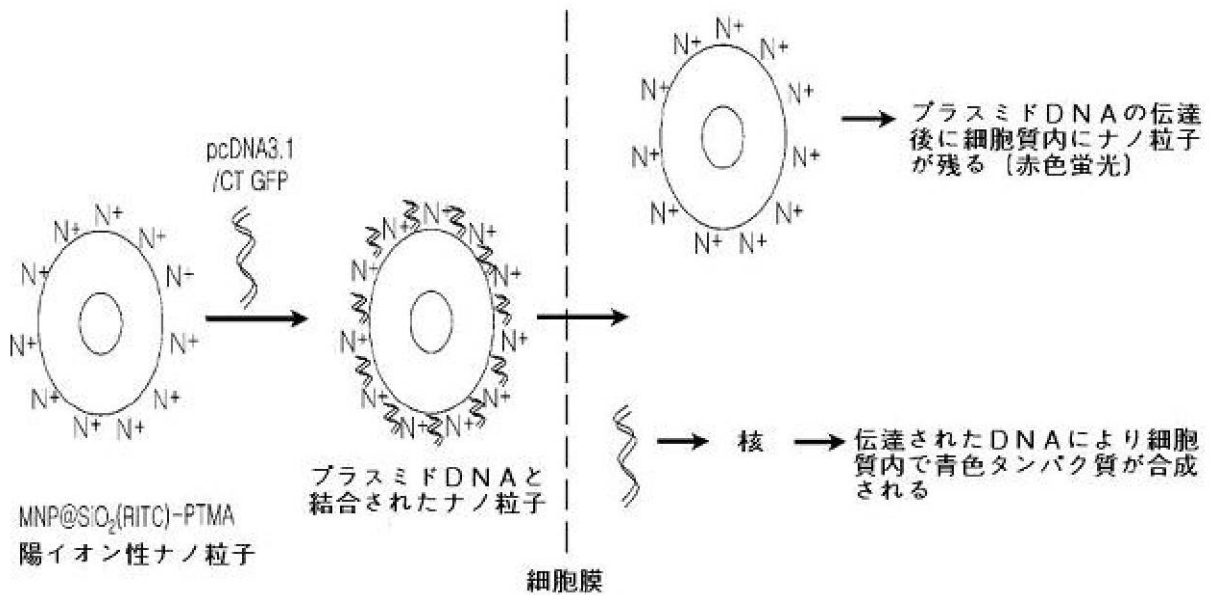
【 図 6 】



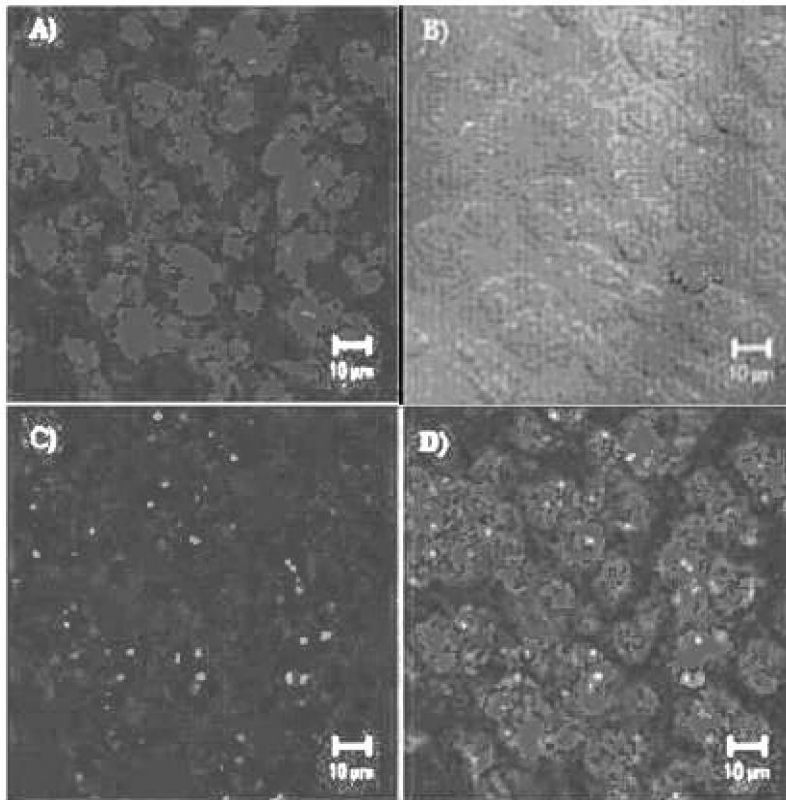
【 図 7 】



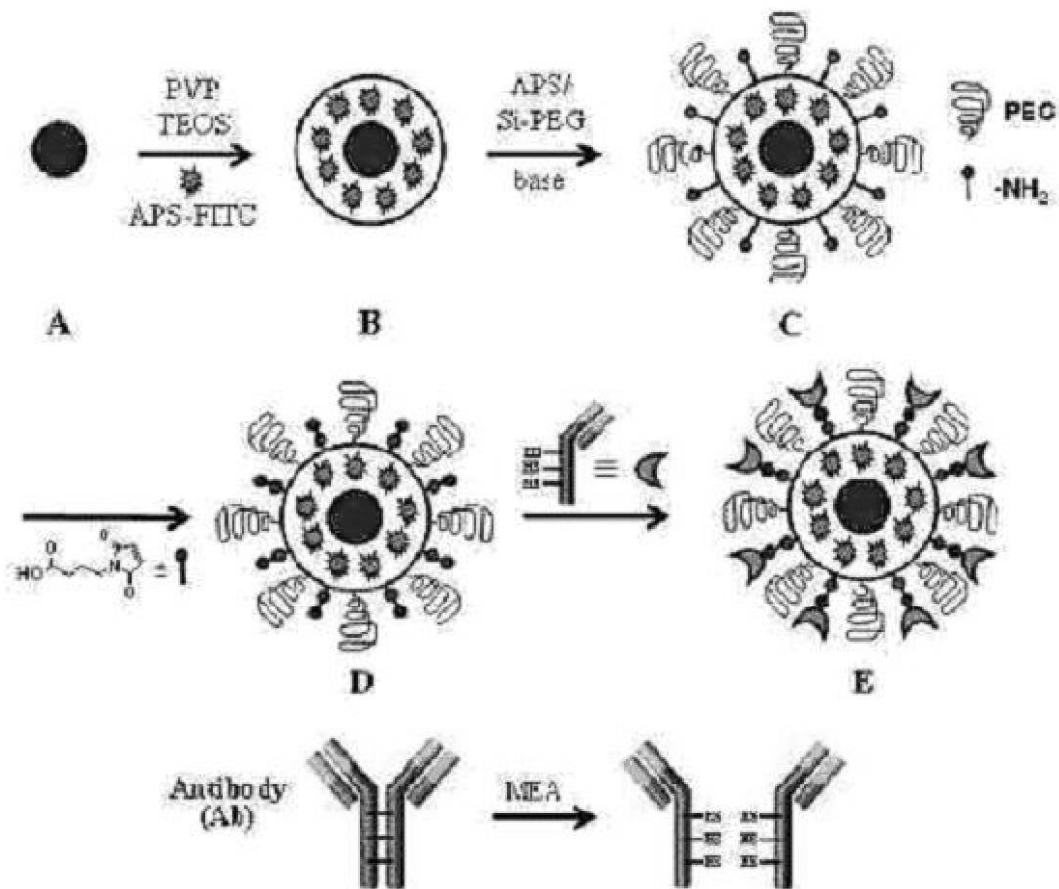
【 図 8 】



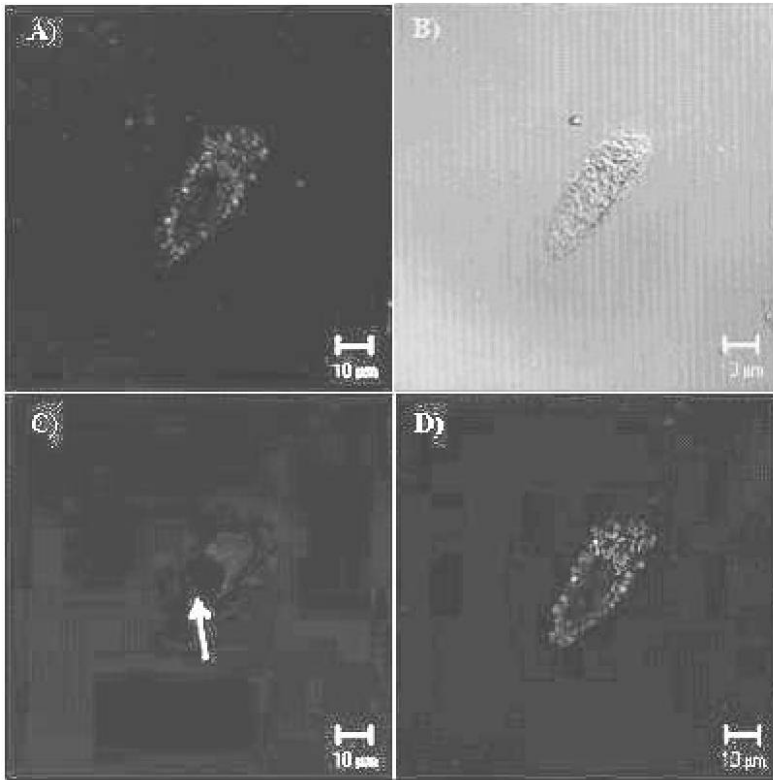
【 図 9 】



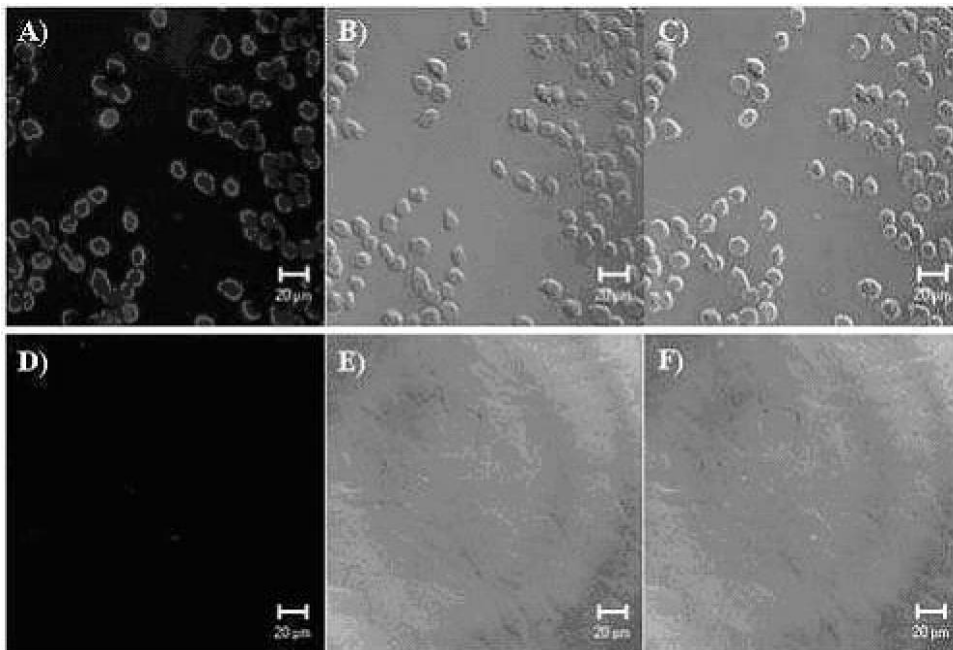
【 図 10 】



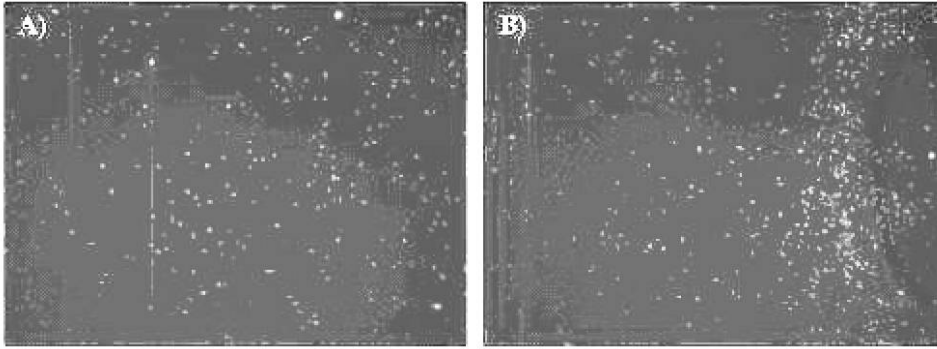
【 図 1 1 】



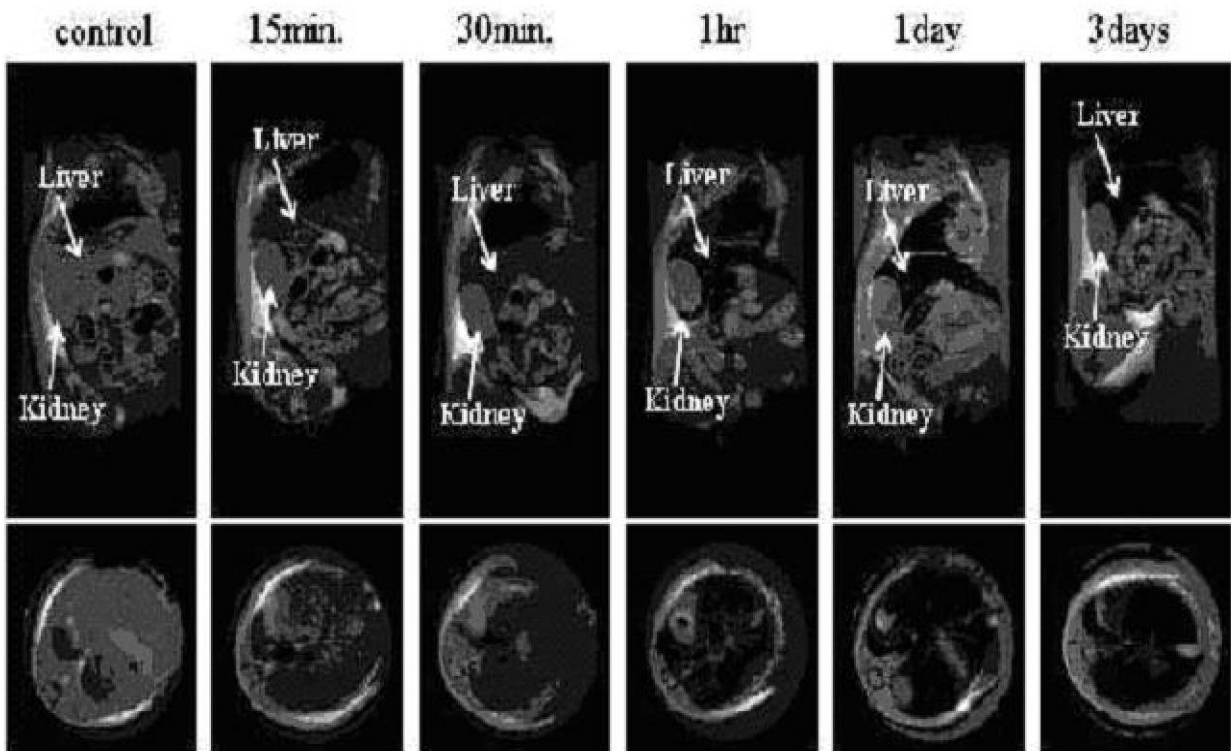
【 図 1 2 】





【 図 1 3 】



【 図 1 4 】



## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/KR2006/003569
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
<i>G01N 33/533(2006.01)i</i>		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 8 G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean Patent and Applications for inventions since 1975		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) eKIPASS(KIPO Internal), Delphion, USPTO, Pubmed, Google Scholar("nanoparticle, magnet, silica, fluorescent etc")		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Levy et al., "Nanoechemistry: Synthesis and characterization of multifunctional nanoclinics for biological applications" in Chem. Mater. 2002, Vol.14 pages 3715-3721 See entire document, especially Fig 1 and 2	1 - 24
X	Lu et al., "Modifying the surface properties of superparamagnetic iron oxide nanoparticles through a sol-gel approach" in Nano Letters 2002 Vol2(3), pages 183-186 See entire document, especially page 186	1 - 24
X	US 20040067503 A1(Weihong Tan et al.) 8 Apr. 2004 See entire document, especially [0031]-[0042] and Examples	1 - 24
X	US 20040101822 A1 (U.Wiesner and H. Ow) 27 May 2004 See entire document, especially pages 2-5, examples	1 - 24
A	US 20040075083 A1 (Medgene. Inc.) 22 Apr 2004 See abstract, [004]-[007],[0036]-[0049], Examples	1 - 24
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"&amp;" document member of the same patent family</p>		
Date of the actual completion of the international search 11 DECEMBER 2006 (11.12.2006)		Date of mailing of the international search report <b>11 DECEMBER 2006 (11.12.2006)</b>
Name and mailing address of the ISA/KR  Korean Intellectual Property Office 920 Dunsan-dong, Seo-gu, Daejeon 302-701, Republic of Korea Facsimile No. 82-42-472-7140		Authorized officer CHO, Myung Sun  Telephone No. 82-42-481-5594

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No. PCT/KR2006/003569
--

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 20040014060 A1(Werner Hoheisel et al.) 22 Jan. 2004 See abstract and claims	1 - 24
A	KR1020040074807 A1 (HANYANG HAK WON CO., LTD.) 26 Aug 2004 See entire document	1 - 24
A	H. Ow et al., "Bright and stable core-shell fluorescent silica nanoparticles" in Nano.Lett. 2005. Jan. Vol.5(1) pages 113-117 See entire document	1 - 24

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2006/003569

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US2004067503A1	08.04.2004	W02003089906A2	30.20.2003
		EP1499895A2	26.01.2005
		CA2482611A1	30.10.2003
		CN1662815A	31.08.2005
		JP2005523027T	04.08.2005
		KR1020050018663A1	23.02.2005
US2004101822A1	27.05.2004	AU2003303290A1	09.09.2004
		AU2003303309A1	10.08.2004
		CN1742094A	01.03.2006
		EP1572445A2	14.09.2005
		EP1604031A2	14.12.2005
		JP2006514708T	29.07.2004
		W02004074504A2	02.09.2004
		W02004063387A2	29.07.2004
		KR1020050109455A1	21.11.2005
US2004075083A1	22.04.2004	US6783699B2	31.08.2004
US2004014060A1	22.01.2004	AT320605T	15.04.2006
		AU5835801A	20.11.2001
		CA2407899A1	15.11.2001
		DE10106643A1	08.11.2001
		EP1282824A2	12.02.2003
		JP2003532898T	05.11.2003
KR1020040074807A1	26.08.2004	KR10538767B1	26.12.2005

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>G 0 1 N 33/53 (2006.01)</b>	G 0 1 N 33/543 5 2 5 C	
	G 0 1 N 33/543 5 4 1 A	
	G 0 1 N 33/574 D	
	G 0 1 N 33/543 5 2 5 G	
	G 0 1 N 33/53 Y	

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

(74) 代理人 100074332

弁理士 藤本 昇

(74) 代理人 100114421

弁理士 薬丸 誠一

(74) 代理人 100114432

弁理士 中谷 寛昭

(74) 代理人 100134452

弁理士 小山 雄一

(72) 発明者 リー, ジン - キュ

大韓民国 1 5 1 - 0 1 0 ソウル, グワナク - グ, シンリム - ドン, サン 5 6 - 1

(72) 発明者 チョー, ミュン - ハイニング

大韓民国 1 5 1 - 0 1 0 ソウル, グワナク - グ, シンリム - ドン, サン 5 6 - 1

(72) 発明者 パーク, スン - バム

大韓民国 1 5 1 - 0 1 0 ソウル, グワナク - グ, シンリム - ドン, サン 5 6 - 1

(72) 発明者 ヨーン, タエ - ジョン

大韓民国 1 5 1 - 0 1 0 ソウル, グワナク - グ, シンリム - ドン, サン 5 6 - 1

(72) 発明者 キム, ジュン - スン

大韓民国 1 5 1 - 0 1 0 ソウル, グワナク - グ, シンリム - ドン, サン 5 6 - 1

(72) 発明者 キム, ビュン - ゴル

大韓民国 1 5 1 - 0 1 0 ソウル, グワナク - グ, シンリム - ドン, サン 5 6 - 1

(72) 発明者 ユー, キョン - ナム

大韓民国 1 5 1 - 0 1 0 ソウル, グワナク - グ, シンリム - ドン, サン 5 6 - 1

专利名称(译)	具有荧光的磁性纳米颗粒，其制备方法及其用途		
公开(公告)号	<a href="#">JP2009508105A</a>	公开(公告)日	2009-02-26
申请号	JP2008529921	申请日	2006-09-08
[标]申请(专利权)人(译)	BITERIALS		
申请(专利权)人(译)	Biteriaruzu有限公司		
[标]发明人	リージンキュ チョーミュンハイング パークスンバム ヨーンタエジョン キムジュンスン キムビュンゴル ユーキョンナム		
发明人	リー,ジン-キュ チョー,ミュン-ハイング パーク,スン-バム ヨーン,タエ-ジョン キム,ジュン-スン キム,ビュン-ゴル ユー,キョン-ナム		
IPC分类号	G01N33/553 B82B1/00 B82B3/00 G01N33/543 G01N33/574 G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/587 A61K49/0002 A61K49/0041 A61K49/0043 A61K49/0093 A61K49/183 A61K49/1848 A61K49/186 A61K49/1875 B82Y5/00		
FI分类号	G01N33/553 B82B1/00 B82B3/00 G01N33/543.575 G01N33/543.525.U G01N33/543.525.C G01N33 /543.541.A G01N33/574.D G01N33/543.525.G G01N33/53.Y		
代理人(译)	藤本登 大山雄一		
优先权	11/220969 2005-09-08 US 1020050112245 2005-11-23 KR		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

#### 摘要(译)

技术领域本发明涉及具有荧光的磁性纳米颗粒，其制备方法及其用途。由于根据本发明的磁性纳米颗粒同时具有光学和磁性两者，因此它们可以应用于各种生物领域，并且通过使用水溶性物质改性二氧化硅壳的表面，各种可以将化学官能团引入纳米材料中，这些不仅可以用于增加或减少对细胞的穿透能力，而且可以用于仅对所需的特定细胞起作用的选择性。它可以赋予。