

(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2003 - 528321

(P2003 - 528321A)

(43)公表日 平成15年9月24日(2003.9.24)

(51)Int.Cl⁷

識別記号

F I

テマコード (参考)

G 0 1 N 33/566

G 0 1 N 33/566

33/53

33/53

D

M

N

審査請求 未請求 予備審査請求 (全 58数)

(21)出願番号 特願2001 - 569490(P2001 - 569490)

(86)(22)出願日 平成13年3月20日(2001.3.20)

(85)翻訳文提出日 平成14年9月19日(2002.9.19)

(86)国際出願番号 PCT/US01/08788

(87)国際公開番号 W001/071354

(87)国際公開日 平成13年9月27日(2001.9.27)

(31)優先権主張番号 60/190,766

(32)優先日 平成12年3月20日(2000.3.20)

(33)優先権主張国 米国(US)

(71)出願人 マサチューセッツ インスティテュート
オブ テクノロジー

MASSACHUSETTS INST
TUTE OF TECHNOLOG
Y

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0213
9,ケンブリッジ,マサチューセッツ アベニ
ュー 77

(72)発明者 マトウシ, ヘディ

アメリカ合衆国 バージニア 22308, ア
レクサンドリア, アップル ヒル ロード
2304

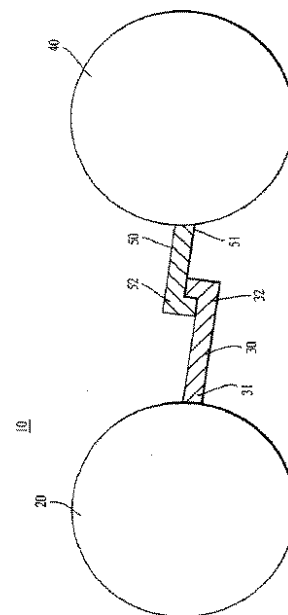
(74)代理人 弁理士 大塩 竹志

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 無機粒子結合体

(57)【要約】

イオン結合体は、高分子と静電的に結合した無機粒子を含み、この高分子は、所定の化学種または生物学的標的と特異的に相互作用し得る。無機粒子（例えば、半導体ナノクリスタル）は、蛍光タグ化の実施において、有機低分子によって起きる多くの問題に対し、利点（例えば、高い光学的退色の閾値、優れた化学的安定性、および簡便に整調し得るスペクトル特性）を提供することによって解決を提供する。本発明は、無機分子を含む組成物、遠位端および近位端を有する連結基を含む無機粒子を提供することによってイオン性結合体を形成する方法、溶液中の所定の種の存在の検出の方法、改変された無機粒子および高分子由来のイオン性結合体を形成する方法、コアおよびオーバーコートを有するナノ粒子、半導体ナノ粒子に静電的に結合した組換えタンパク質を特徴とする。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 以下：

無機粒子、

連結基であって、該連結基は、遠位端および近位端を有し、該遠位端は、該無機粒子の外側表面に結合し、そして該近位端は、第1の荷電部分またはイオン化可能部分を含む、連結基、ならびに

高分子であって、該高分子は、第2の荷電部分またはイオン化可能部分を有し、ここで、該第1および該第2の荷電部分またはイオン化可能部分が該無機粒子と該高分子とを静電的に結合して、イオン結合体を形成する、高分子、を含む、組成物。

【請求項2】 以下：

無機粒子、

連結基であって、該連結基は、遠位端および近位端を有し、該遠位端は、該無機粒子の外側表面に結合し、そして該近位端は、第1の荷電部分またはイオン化可能部分を含む、連結基、ならびに

融合タンパク質であって、該融合タンパク質は、第2の荷電部分またはイオン化可能部分を含み、ここで、該第1および該第2の荷電部分またはイオン化可能部分が該無機粒子と該融合タンパク質とを静電的に結合して、イオン結合体を形成する、融合タンパク質、を含む、組成物。

【請求項3】 前記無機粒子が、半導体ナノクリスタルである、請求項1または2に記載の組成物。

【請求項4】 前記半導体ナノクリスタルが、II～VI族化合物、II～V族化合物、III～VI族化合物、III～V族化合物、IV～VI族化合物、I～III～VI族化合物、II～IV～VI族化合物、およびII～IV～V族化合物からなる群から選択される第1半導体材料を含む、請求項2に記載の組成物。

【請求項5】 前記第1半導体材料が、ZnS、ZnSe、ZnTe、CdS、CdSe、CdTe、HgS、HgSe、HgTe、AlN、AlP、Al

As、AlSb、GaN、GaP、GaAs、GaSb、GaSe、InN、InP、InAs、InSb、TlN、TlP、TlAs、TlSb、PbS、PbSe、PbTe、およびそれらの混合物からなる群から選択される、請求項4に記載の組成物。

【請求項6】 前記第1半導体材料が、CdSeである、請求項5に記載の組成物。

【請求項7】 前記第1半導体材料が、第2半導体材料でオーバーコーティングされる、請求項6に記載の組成物。

【請求項8】 前記第2半導体材料が、ZnS、ZnO、ZnSe、ZnTe、CdS、CdO、CdSe、CdTe、MgS、MgSe、HgO、HgS、HgSe、HgTe、AlN、AlP、AlAs、AlSb、GaN、GaP、GaAs、GaSb、GaSe、InN、InP、InAs、InSb、TlN、TlP、TlAs、TlSb、PbS、PbSe、PbTe、SiO₂またはそれらの混合物である、請求項7に記載の組成物。

【請求項9】 前記無機粒子が、それぞれ独立して第3の荷電部分またはイオン化可能部分を含む複数の連結基をさらに含む、請求項1または2に記載の組成物。

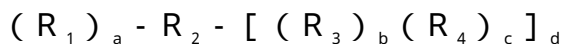
【請求項10】 請求項9に記載の組成物であって、該組成物が、さらに複数の高分子を含み、該高分子のそれぞれが第4の荷電部分またはイオン化可能部分を含み、ここで該複数の高分子が、前記複数の無機粒子連結基と静電的な相互作用を介して前記無機粒子と結合する、組成物。

【請求項11】 前記無機粒子が、Ag、Au、またはリン光体を含む、請求項1または2に記載の組成物。

【請求項12】 前記第1の荷電基またはイオン化可能基が、水酸化物、アルコキシド、カルボキシレート、スルホネート、ホスフェート、ホスホネート、または第四級アンモニウムである、請求項1または2に記載の組成物。

【請求項13】 前記第2の荷電基またはイオン化可能基が、水酸化物、アルコキシド、カルボキシレート、スルホネート、ホスフェート、ホスホネート、または第四級アンモニウムである、請求項1または2に記載の組成物。

【請求項14】 請求項1または2に記載の組成物であって、前記連結基が以下の式を有し：



ここで

R_1 は、C1 - C100ヘテロアルキル、C2 - C100ヘテロアルケニル、ヘテロアルキニル、-OR、-SH、-NHR、-NR'R''、-N(O)HR、-N(O)R'R''、-PHR、-PR'R''、-P(NR'R'')NR'R''、-P(O)R'R''、-P(O)(NR'R'')NR'R''、-P(O)(OR')OR''、-P(O)OR、-P(O)NR'R''、-P(S)(OR')OR''および-P(S)ORからなる群から選択され、ここで、R、R'、R''は、独立して、H、分枝したまたは分枝していないC1 - C100アルキル、分枝したまたは分枝していないC2 - C100アルケニル、分枝したまたは分枝していないC2 - C100アルキニル、分枝したまたは分枝していないC1 - C100ヘテロアルキル、分枝したまたは分枝していないC2 - C100ヘテロアルケニル、分枝したまたは分枝していないC2 - C100ヘテロアルキニルからなる群から選択され、ただし、aが1よりも大きい場合、 R_1 基は、 R_2 基または R_3 基に、これらの基の中の同じもしくは異なる原子で結合し得、 R_1 基は同じかまたは異なり得、あるいは R_1 基は、6員、7員、8員、9員もしくは10員のシクロアルキル、シクロアルケニル、複素環式、アリール、ヘテロアリールまたは6員～30員のクラウンエーテルまたはヘテロクラウンエーテルを形成し得；

R_2 は、結合、分枝したまたは分枝していないC2～C100アルキレン、分枝したまたは分枝していないC2～C100アルケニレン、分枝したまたは分枝していないC2～C100ヘテロアルケニレン、シクロアルキル、シクロアルケニル、シクロアルキニル、複素環式、アリール、およびヘテロアリールから選択され；

R_3 は、分枝したまたは分枝していないC2～C100アルキレン、分枝したまたは分枝していないC2～C100アルケニレン、分枝したまたは分枝していないC2～C100ヘテロアルケニレン、シクロアルキル、シクロアルケニル、

シクロアルキニル、複素環式、アリール、およびヘテロアリールから選択され；

R_4 は、水素、カルボキシレート、チオカルボキシレート、アミド、ヒドラジン、スルホネート、スルホキシド、スルホン、スルファイト、ホスフェート、ホスホネート、ホスホニウムイオン、アルコール、チオール、アミン、アンモニウム、アルキルアンモニウム、ニトレートからなる群から選択され；ならびに

aは、1～40、bは、0～3、cは、1～30、dは、1～3であり、そしてdが2または3の場合、 R_3 基は、同じかまたは異なり得るか、あるいは共に連結されて5～10員のシクロアルキル、シクロアルケニル、複素環式、アリールもしくはヘテロアリールを形成し得る、組成物。

【請求項15】 前記連結基が、式 $HS - C_2H_4 - CH(SH) - (C_4H_8) - COOH$ を有する、請求項1または2に記載の組成物。

【請求項16】 前記高分子が、ポリペプチドまたはポリヌクレオチドを含む、請求項1に記載の組成物。

【請求項17】 前記高分子が、ポリペプチドを含む、請求項16に記載の組成物。

【請求項18】 前記第2の荷電部分またはイオン化可能部分が、ロイシンジッパーである、請求項17に記載の組成物。

【請求項19】 前記第2の荷電部分またはイオン化可能部分が、ポリアスパラギン酸である、請求項17に記載の組成物。

【請求項20】 前記ポリペプチドが、マルトース結合タンパク質を含む、請求項17に記載の組成物。

【請求項21】 前記ポリペプチドが、免疫グロブリンG結合タンパク質を含む、請求項17に記載の組成物。

【請求項22】 イオン結合体を形成する方法であって、
遠位端および近位端を有する連結基を含む無機粒子を提供する工程であって、
該遠位端は、該無機粒子の外側表面に結合し、そして該近位端は、第1の荷電部分またはイオン化可能部分を含む、工程、ならびに

第2の荷電部分またはイオン化可能部分を有する高分子と該無機粒子とを接触

させる工程であって、ここで、該第1および第2の荷電部分またはイオン化可能部分は、該高分子と該無機粒子とを静電的に結合して、イオン結合体を形成する、工程、
を包含する、方法。

【請求項23】 前記無機粒子が、半導体ナノクリスタルである、請求項22に記載の方法。

【請求項24】 前記半導体ナノクリスタルが、II～VI族化合物、II～V族化合物、III～VI族化合物、III～V族化合物、IV～VI族化合物、I～III～VI族化合物、II～IV～VI族化合物、およびII～IV～V族化合物からなる群から選択される第1半導体材料を含む、請求項23に記載の方法。

【請求項25】 前記第1半導体材料が、ZnS、ZnSe、ZnTe、CdS、CdSe、CdTe、HgS、HgSe、HgTe、AlN、AlP、AlAs、AlSb、GaN、GaP、GaAs、GaSb、GaSe、InN、InP、InAs、InSb、TlN、TlP、TlAs、TlSb、PbS、PbSe、PbTe、およびそれらの混合物からなる群から選択される、請求項24に記載の方法。

【請求項26】 前記第1半導体材料が、CdSeである、請求項25に記載の方法。

【請求項27】 前記第1半導体材料が、第2半導体材料でオーバーコーティングされる、請求項26に記載の方法。

【請求項28】 前記第2半導体材料が、ZnS、ZnO、ZnSe、ZnTe、CdS、CdO、CdSe、CdTe、MgS、MgSe、HgO、HgS、HgSe、HgTe、AlN、AlP、AlAs、AlSb、GaN、GaP、GaAs、GaSb、GaSe、InN、InP、InAs、InSb、TlN、TlP、TlAs、TlSb、PbS、PbSe、PbTe、SiO₂またはそれらの混合物である、請求項27に記載の方法。

【請求項29】 前記無機粒子が、それぞれ独立して第3の荷電部分またはイオン化可能部分を含む複数の連結基をさらに含む、請求項22に記載の方法。

【請求項30】 請求項22に記載の方法であって、さらに複数の高分子を含み、該高分子のそれぞれが第4の荷電部分またはイオン化可能部分を含み、ここで、該複数の高分子が、前記複数の無機粒子連結基との静電的な相互作用を介して該無機粒子と結合する、方法。

【請求項31】 前記無機粒子が、Ag、Au、またはリン光体を含む、請求項22に記載の方法。

【請求項32】 前記第1の荷電基またはイオン化可能基が、水酸化物、アルコキシド、カルボキシレート、スルホネート、ホスフェート、ホスホネート、または第四級アンモニウムである、請求項22に記載の方法。

【請求項33】 前記第2の荷電基またはイオン化可能基が、水酸化物、アルコキシド、カルボキシレート、スルホネート、ホスフェート、ホスホネート、または第四級アンモニウムである、請求項22に記載の方法。

【請求項34】 請求項22に記載の方法であって、前記連結基が以下の式を有し：



ここで

R_1 は、C1 - C100ヘテロアルキル、C2 - C100ヘテロアルケニル、ヘテロアルキニル、-OR、-SH、-NHR、-NR'R''、-N(O)HR、-N(O)R'R''、-PHR、-PR'R''、-P(NR'R'')NR'R''、P(O)R'R''、P(O)(NR'R'')NR'R''、-P(O)(OR')OR''、P(O)OR、P(O)NR'R''、-P(S)(OR')OR''およびP(S)ORからなる群から選択され、ここで、R、R'、R''は、独立して、H、分枝したまたは分枝していないC1 - C100アルキル、分枝したまたは分枝していないC2 - C100アルケニル、分枝したまたは分枝していないC2 - C100アルキニル、分枝したまたは分枝していないC1 - C100ヘテロアルキル、分枝したまたは分枝していないC2 - C100ヘテロアルケニル、分枝したまたは分枝していないC2 - C100ヘテロアルキニルからなる群から選択され、ただし、aが1よりも大きい場合、 R_1 基は、 R_2 基または R_3 基に、これらの基の中の同じもしくは異なる原子で結合し得、 R_1 基は同じかまたは

異なり得、あるいは R_1 基は、6員、7員、8員、9員もしくは10員のシクロアルキル、シクロアルケニル、複素環式、アリール、ヘテロアリールまたは6員～30員のクラウンエーテルまたはヘテロクラウンエーテルを形成し得；

R_2 は、結合（すなわち、 R_1 が R_3 に結合する場合、 R_2 は存在しない）、分枝したまたは分枝していないC2～C100アルキレン、分枝したまたは分枝していないC2～C100アルケニレン、分枝したまたは分枝していないC2～C100ヘテロアルケニレン、シクロアルキル、シクロアルケニル、シクロアルキニル、複素環式、アリール、およびヘテロアリールから選択され；

R_3 は、分枝したまたは分枝していないC2～C100アルキレン、分枝したまたは分枝していないC2～C100アルケニレン、分枝したまたは分枝していないC2～C100ヘテロアルケニレン、シクロアルキル、シクロアルケニル、シクロアルキニル、複素環式、アリール、およびヘテロアリールから選択され；

R_4 は、水素、カルボキシレート、チオカルボキシレート、およびアミド、アミン、ヒドラジン、スルホネート、スルホキシド、スルホン、スルファイト、ホスフェート、ホスホネート、ホスホニウムイオン、アルコール、チオール、アミン、アンモニウム、アルキルアンモニウム、ニトレートからなる群から選択され；ならびに

aは、1～40、bは、0～3、cは、1～3、dは、1～3であり、そしてdが2または3の場合、 R_3 基は、同じかまたは異なり得るか、あるいは共に結合して5～10員のシクロアルキル、シクロアルケニル、複素環式、アリールもしくはヘテロアリールを形成し得る、方法。

【請求項35】 前記連結基が、式 $HS - C_2H_4 - CH(SH) - (C_4H_8) - COOH$ を有する、請求項22に記載の方法。

【請求項36】 前記高分子が、ポリペプチドまたはポリヌクレオチドを含む、請求項22に記載の方法。

【請求項37】 前記高分子が、ポリペプチドを含む、請求項36に記載の方法。

【請求項38】 前記第2の荷電部分またはイオン化可能部分が、ロイシン

ジッパーである、請求項 37 に記載の方法。

【請求項 39】 前記第 2 の荷電部分またはイオン化可能部分が、ポリアスパラギン酸である、請求項 37 に記載の方法。

【請求項 40】 前記ポリペプチドが、マルトース結合タンパク質を含む、請求項 37 に記載の方法。

【請求項 41】 前記ポリペプチドが、免疫グロブリン G 結合タンパク質を含む、請求項 37 に記載の方法。

【請求項 42】 組換え的方法によって前記高分子を形成する工程をさらに含む、請求項 22 に記載の方法。

【請求項 43】 合成的方法によって前記高分子を形成する工程をさらに含む、請求項 22 に記載の方法。

【請求項 44】 溶液中における所定の種の存在を検出する方法であって、
溶液をイオン結合体と接触させる工程であって、ここで該イオン結合体は、高分子と静電的に結合した無機粒子を含み、該高分子は、該所定の種と特異的に結合し得る、工程、
を包含する、方法。

【請求項 45】 請求項 44 に記載の方法であって、
前記溶液に無機粒子および高分子を添加することによってイオン結合体を形成する工程であって、ここで該無機粒子は、遠位端および近位端を有する連結基を含み、該遠位端は、該無機粒子の外側表面に結合し、そして該近位端は、第 1 の荷電部分またはイオン化可能部分を含み、そして該高分子は、第 2 の荷電部分またはイオン化可能部分を含み、該第 1 および第 2 荷電部分またはイオン化可能部分は、静電的に結合して、該イオン結合体を形成する、工程、
をさらに包含する、方法。

【発明の詳細な説明】**【0001】**

(優先権主張)

本出願は、2000年3月20日出願された米国特許出願第60/190,766について優先権を主張し、本明細書中でその全体の内容が参考として援用される。

【0002】

(連邦政府に支援された研究または開発)

National Science Foundationから契約番号DMR-98-08941の下に、ならびにOffice of Naval Researchから契約番号N0001499WX30470およびN0001400WX20094の下に連邦政府の支援を受けて、本発明はなされた。政府は、本発明において特定の権利を有する。

【0003】

(背景)

本発明は、無機粒子および高分子を含むイオン性結合体に関し、そしてより詳細には、特定の種の存在または非存在を検出する(例えば、生物学的標的の検出)のに有用である帯電結合体に関する。

【0004】

蛍光タグを用いた生物学的分子の標識は、一般的であり、そして生物科学において有用な慣例である。蛍光低分子(慣用的な有機色素)は、単一の検出手段および同時に複数の検出手段の両方において使用される。しかし、有機発蛍光団を用いた生物学的タギングは、顕著に限定される。蛍光分子は、狭い吸光スペクトルを有する傾向があり、そしてこれらの発光スペクトルは、通常広域であり、赤色のテーリングを示し、種々の検出チャネル間のスペクトルのクロストークに起因して、同じサンプル中に存在する異なるプローブのそれぞれの量を同時に定量的に評価することを、困難にする。さらに、標識されたバイオコンジュゲート(bioconjugate)の吸光スペクトルおよび/または発光スペクトルの任意の所望される変化は、付随する合成およびバイオコンジュゲーションの負荷

を伴う異なる分子標識の使用を必要とする。それでも、複数の標識の使用は、かなり洗練されたレベルを達成し、細胞抗原上の計10個のパラメーターを同時に測定するためのスキームを作製する3レーザー系および8色を含むフローサイトメトリーの最近の試験によって実証されている。

【0005】

(要旨)

イオン性結合体は、自己会合によって形成し、ここで無機粒子が少なくとも1つの高分子と静電的に会合接触する。会合の1つの型は、自己会合である。自己会合とは、分散した制御(すなわち、中心性でない)の下で、独立した実体の配位された活動のことであり、大きな構造を生成するか、または所望される群の効果を達成する。自己会合の例は、生物学(例えば、発生学および形態学)および化学(例えば、分子群由来のよりゆるく結合した超分子構造の形成)で生じる。イオン性結合体の自己会合は、非共有結合(例えば、無機粒子、帯電、イオン化、または帯電可能な連結基と高分子の相補的な基との間の静電的相互作用)によって駆動される。

【0006】

それぞれの高分子はまた、予め決定された化学種または生物学的標的と反応するか、またはこれらに対する親和性を示す部分を含み得る。例えば、高分子は、抗体、ポリヌクレオチド、または荷電、イオン化、または帯電可能な連結基を有する細胞膜を含み得る。あるいは、所定の化学種または生物学的標的と反応しないか、またはこれらに対する親和性を示さない高分子は、このような特性を有する生物学的部分に接着し得る。この場合、高分子部分は、静電的に無機粒子と自己会合し、そして生物学的部分は、所定の化学種または生物学的標的と相互作用する。結果として、自己会合した超分子構造を形成する高分子は、イオン性結合体が高分子(これは、特定の化学種と直接もしくは間接的に反応するか、またはこれらに対する親和性を阻害する)を含むように、予め選択され得る。

【0007】

無機粒子(例えば、半導体ナノクリスタル)は、蛍光タグ化の実施において、有機低分子によって起きる多くの問題に対し、利点(例えば、高い光学的退色の

閾値、優れた化学的安定性、および簡便に整調し得るスペクトル特性)を提供することによって解決を提供する。ナノクリスタルの大きさに依存する蛍光発光特性を組み合わせ(有用な励起および発光の波長の広い範囲は、光学的退色に対する抵抗性、そして水溶液中における高い収量(高い感受性))によって、これらの材料が自己会合したナノクリスタル-高分子を経た生物学的標的の標識のために、非常に魅力的になり、ここでこの高分子は、特定の生物学的標的に対する親和性を有する部分を含む。

【0008】

1つの局面において、本発明は、無機分子を含む組成物を特徴とし、この連結基は、遠位端および近位端を有し、ここで、この遠位端が無機粒子の外表面に結合し、そして、近位端が第1の荷電部分またはイオン化可能部分を含み、そして高分子が第2の荷電部分またはイオン化可能部分を含み、ここで第1および第2の荷電部分またはイオン化可能部分は、静電的に無機粒子を高分子と接着してイオン性結合体を形成する。高分子は、第2の荷電部分またはイオン化可能部分を有する融合タンパク質であり得、ここで第1の荷電部分またはイオン化可能部分が、静電的に無機粒子を融合タンパク質と接着するイオン性結合体を形成する。

【0009】

別の局面において、本発明は、遠位端および近位端を有する連結基を含む無機粒子を提供することによってイオン性結合体を形成する方法を特徴とし、ここで、この遠位端は、無機粒子の外表面に結合し、そして、近位端が第1の荷電部分またはイオン化可能部分を含み；第2の荷電部分またはイオン化可能部分を有する高分子を、無機粒子と接触させ、ここで、第1の荷電部分またはイオン化可能部分が、静電的に無機粒子を高分子と接着してイオン性結合体を形成する。この方法はさらに、複数の高分子に接触する工程を含み、ここでそれぞれの高分子が、荷電部分またはイオン化可能部分を含み、複数の高分子を無機粒子と、複数の無機粒子連結基によって、静電的に会合するための無機粒子を有する。高分子は、組み換えまたは合成的方法によって形成され得るか、または天然の供給源から単離され得る。複数の高分子のそれぞれのメンバーは、同じかまたは異なる種であり得る。

【0010】

別の局面において、本発明は、溶液中の所定の種の存在の検出の方法を特徴とする。この方法は、溶液をイオン性結合体と接触させる工程を含み、ここでこのイオン性結合体は、静電的に高分子と会合した無機粒子を含み、この高分子は、予め決定された種に特異的に結合し得る。この方法はさらに、溶液に無機粒子および高分子を添加することによってイオン性結合体を形成する工程を含む。この無機粒子は、遠位端および近位端を有する連結基を含み、ここで、この遠位端が無機粒子の外表面に結合し、そして、近位端が第1の荷電部分またはイオン化可能部分を含む。この高分子は、第2の荷電部分またはイオン化可能部分を含む。第1および第2の荷電部分またはイオン化可能部分が、静電的にイオン性結合体に接着する。

【0011】

本発明の実施形態は、以下の1つ以上を含み得る。無機粒子は、半導体ナノクリスタル(QD)であり得る。半導体ナノクリスタルは、以下のからなる群から選択される第1の半導体材料を含み得る；II～VI族化合物、II～V族化合物、III～VI族化合物、III～V族化合物、IV～VI族化合物、I～III～VI族化合物、II-IV-VI族化合物およびII～IV～V族化合物。第1の半導体材料は、以下からなる群から選択され得る；ZnS、ZnSe、ZnTe、CdS、CdSe、CdTe、HgS、HgSe、HgTe、AlN、AlP、AlAs、AlSb、GaN、GaP、GaAs、GaSb、GaSe、InN、InP、InAs、InSb、TlN、TlP、TlAs、TlSb、PbS、PbSe、PbTe、およびこれらの混合物。第1の半導体材料は、CdSeであり得る。第1の半導体材料は、第2の半導体材料を用いて、オーバーコートされ得る。第2の半導体材料は、以下であり得る；ZnS、ZnO、ZnSe、ZnTe、CdS、CdO、CdSe、CdTe、MgS、MgSe、HgO、HgS、HgSe、HgTe、AlN、AlP、AlAs、AlSb、GaN、GaP、GaAs、GaSb、GaSe、InN、InP、InAs、InSb、TlN、TlP、TlAs、TlSb、PbS、PbSe、PbTe、SiO₂またはこれらの混合物。

【0012】

無機粒子は、それぞれ独立して荷電部分またはイオン化可能部分を含む複数の連結基を含み得る。イオン性結合体は、複数の高分子を含み得、それぞれの高分子は、荷電部分またはイオン化可能部分を含む。複数の高分子は、複数の無機粒子連結基を静電的相互作用によって無機粒子に会合し得る。無機粒子は、Ag、Au、またはリンを含み得る。第1および第2の荷電基またはイオン化基は、以下を含む；水酸基、アルコキシド基、カルボン酸基、スルホン酸基、リン酸基、ホスホン酸基、または四級アンモニウム基。第2の荷電部分またはイオン化可能部分は、ロイシンジッパーであり得る。第2の荷電部分またはイオン化可能部分は、ポリアスパラギン酸であり得る。この高分子は、ポリペプチドまたはポリヌクレオチド（例えば、マルトース結合タンパク質または免疫グロブリンG結合タンパク質）を含み得る。

【0013】

連結基は、以下の式を有し得る：



ここで、

R_1 は、以下からなる群から選択される；C1 - C100ヘテロアルキル、C2 - C100ヘテロアルケニル、ヘテロアルキニル、-OR、-SH、-NHR、-NR'R''、-N(O)HR、-N(O)R'R''、-PHR、-PR'R''、-P(NR'R'')NR'R''、P(O)R'R''、P(O)(NR'R'')NR'R''、-P(O)(OR')OR''、P(O)OR、P(O)NR'R''、-P(S)(OR')OR''およびP(S)OR。ここで、R、R'、R''は、独立して以下からなる群から選択される；H、分枝または非分枝C1 - C100アルキル、分枝もしくは非分枝C2 - C100アルケニル、分枝もしくは非分枝C2 - C100アルキニル、分枝もしくは非分枝C2 - C100ヘテロアルキル、分枝もしくは非分枝C2 - C100ヘテロアルケニル、分枝もしくは非分枝C2 - C100ヘテロアルキニル。ただし、aが1より大きい場合、 R_1 基は、これらの基の中の同じか異なる原子において R_2 基または R_3 基に結合し得、 R_1 基が同じか異なり得るか、または R_1 基が6員環、7員環、8員環、9員環

、または10員環のシクロアルキル、シクロアルケニル、複素環式、アリール、ヘテロアリール、または6～30員環のクラウンエーテルもしくはヘテロクラウンエーテルを形成し得る。

【0014】

R_2 は、以下から選択される；結合、分枝もしくは非分枝C2-C100アルキレン、分枝もしくは非分枝C2-C100アルケニレン、分枝もしくは非分枝C2-C100ヘテロアルケニレン、シクロアルキル、シクロアルケニル、シクロアルキニル、複素環式、アリール、およびヘテロアリール；

R_3 は、以下から選択される；分枝もしくは非分枝C2-C100アルキレン、分枝もしくは非分枝C2-C100アルケニレン、分枝もしくは非分枝C2-C100ヘテロアルケニレン、シクロアルキル、シクロアルケニル、シクロアルキニル、複素環式、アリール、およびヘテロアリール；

R_4 は、以下からなる群から選択される；水素、カルボキシレート、チオカルボキシレート、アミド、ヒドラジン、スルホネート、スルホキシド、スルホン、スルファイト、ホスフェート、ホスホネート、ホスホニウムイオン、アルコール、チオール、アミン、アンモニウム、アルキルアンモニウム、ニトレート；および

aは、1～40、bは、0～3、cは、1～30、dは、1～3であり、dが2または3である場合、 R_3 基は、同じか異なり得、または、連結され得て、5～10員環シクロアルキニル、シクロアルケニル、複素環式、アリール、もしくはヘテロアリールを形成し得る。連結基は、式 $HS-C_2H_4-CH(SH)-(C_4H_8)-COOH$ を有し得る。

【0015】

別の局面において、本発明は、改変された無機粒子および高分子由来のイオン性結合体を形成する方法を特徴とする。粒子および分子の両方は、荷電連結基またはイオン化連結基を含み、これらはともに、相補的なイオン対を形成して、少なくとも1つの高分子を粒子に静電的に結合する。無機粒子は、1つの荷電した連結基またはイオン化した連結基を粒子表面に結合することによって改変され得る。高分子は、タンパク質表面上に（例えば、荷電可能なポリペプチド）荷電し

た連結基またはイオン化した連結基の一端を取りこむように、例えば、組換えタンパク質の工程によって改変されたタンパク質であり得る。

【0016】

別の局面において、本発明は、半導体ナノ粒子に静電的に結合した組換えタンパク質を特徴とする。組換えタンパク質は、例えば、塩基性ロイシンジッパーを含むように改変された生物学的活性を伝達する任意のタンパク質を含む融合タンパク質であり得る。ロイシンジッパーは、一端をタンパク質に結合し、別の端が結合していない荷電可能なポリペプチドであり、タンパク質の表面から突き出ている。ロイシンジッパーはまた、チオール基を含み、これは、別の融合タンパク質のロイシンジッパーのチオール基と共有結合を形成し、融合タンパク質の2量体を形成し得る。半導体ナノ粒子は、ジヒドロリポ酸を含み得、これは、塩基性ロイシンジッパーの結合していない端と静電的に相互作用して、イオン化結合体を形成する。

【0017】

別の局面において、本発明は、コアおよびオーバーコートを有するナノ粒子を特徴とする。慣用的な調製の中に、ナノクリスタルの無機コアは、有機の殻 (shell) (例えば、トリオクチルホスフィンおよびトリオクチルホスフィンオキシド混合物 (TOP/TOPO)) でキャップされ、これはさらに、改変されて、種々の溶媒中での合成後の操作、および粒子の溶解性の変更を可能にする。(例えば、より大きなバンドギャップ半導体材料 (例えば、ZnSまたはCdS) を用いて) CdSe コアをオーバーコートすることによって、電気をういたバンドギャップ技術の概念に基づくプロセスは、コア表面状態の受動性、および核の外の励起子の漏出を減少することが可能になる。このオーバーコートは、これらの材料の光化学的安定性を増大し、そして発光量子量の産生を、実施的に発光波長および発光スペクトル幅に影響を与えずに増大する (すなわち、CdSe-ZnS ナノ粒子は、FWHM 約 40 ~ 60 nm を有する)。さらに、オーバーコートは、光退色に対する抵抗性を増大し得る。上記の特性は、シグナル産生のためにこれらのナノ粒子を用いた検出方法の感度を増大する。良好なシグナル - 対 - ノイズ比を伴う実質的な PL 強度 (良好に分解されたスペクトルを伴う) は、

ナノ粒子 1 nmol/L よりかなり小さい濃度を伴う分散に対して測定される。TOP/TOP Oキャップを極性末端基に置きかえることによって、水溶液中での高い光発光量子量産生の保存を伴って、これらのコア-オーバーコートナノ粒子の分散が可能になる。ジヒドロリポ酸の存在は、15~20%の量子量でCdSe-ZnSの安定な水の分散物を提供した。ナノ粒子の表面上のジヒドロリポ酸基は、荷電基またはイオン化基であり、これらは、高分子の相補的な荷電基またはイオン化基に静電的に接着する。

【0018】

生物学的活性を示す本発明のイオン結合体は、化学的に安定であり、そして静電的に結合したタンパク質を欠失している無機粒子に対して増加した量子収率を示す。この結合体はまた、予想外に、生物学的部分が無機分子に直接共有結合している生物学的結合体に対して減少した凝集を示す。本発明のイオン結合体を生成するプロセスの別の利点は、その単純性および多能性である。例えば、所望のタンパク質は、ほとんど瞬時に無機粒子の表面に付着する。

【0019】

ZnSおよびジチオールキャッピング基でオーバーコーティングされ、そして高分子で自己構築されたCdSeナノクリスタルを含有するイオン結合体は、以下のいくつかの利点を与える：1) 各ジチオールキャッピング分子が2つの表面原子に付着し得るために、例えば、モノジチオールキャッピング分子と比較して、単位領域当たりのキャッピング基の密度が等しいかまたはより小さくても、より高い表面不動態化が達成され得る。2) 塩基性pHで水溶液中のナノクリスタルの分散を可能にし、有効正電荷を有する他の高分子に、直接自己構築（または反応）するために使用され得る表面荷電分布を提供するカルボン酸基。3) このZnSの適用範囲は、極性環境からのCdSeコアのより良好な遮蔽およびエキシトン（電子-正孔対）のより効率的な制限を提供し、これは、水中で安定でありかつ高度に発光性のナノクリスタル分散体を生じる。長期間（数ヶ月）にわたり安定でありかつ約20%の光ルミネセント量子収率である水中でのコアオーバーコーティングナノクリスタルの分散体は、上記のアプローチを使用して簡単に調製され得る。4) 合成アプローチは、多数の種々のコアオーバーコーティング

ナノクリスタルに容易に適応され、そして半導体材料、II-VIおよびII-III-V（これらは、スペクトル的に調整され得る一群の発光性プローブを生成し得る）の他の組み合わせに拡張され得る。これは、各有機蛍光色素についての特定の化学的経路をその都度開発する必要性とは対照的である。5）高分子（例えば、構築ベクターストラテジーに基づく融合タンパク質）の合成は、一般的でかつ一貫したスキームを提供し、特定の機能およびナノクリスタル用いた自己構築を行い得る生物学的高分子の広域な選択を調製する。6）組換えタンパク質のアプローチは、高分子の荷電部分またはイオン化可能部分の変更（例えば、荷電、サイズ、pHおよび温度に対する安定性）を可能にし、それによって、無機粒子に自己構築し得る、高分子の単量体、二量体および四量体を形成するように、高分子の自己構築の変化および制御を可能にする。高分子の各々は、同じかまたは異なる生物学的因子に対する親和性を有する部分を含有し得る。7）ペプチド尾部（tail）の特性を制御することで、これらのタンパク質は、このタンパク質のリンカー尾部の電荷と反対の電荷を有する種々の材料（例えば、無機コロイド粒子およびさらに無機コロイド表面）と非共有結合的に相互作用するのを可能にする。

【0020】

本発明の1以上の実施形態の詳細は、添付した図面および以下の記載に示される。本発明の他の特徴、目的および利点は、その記載、図面および特許請求の範囲から明らかである。

【0021】

（詳細な説明）

イオン結合体としては、高分子と静電的に会合する無機粒子が挙げられる。この高分子は、予め決定した種と相互作用するように選択され得る。結果として、イオン結合体をアッセイに使用して、特定の化合物の存在を検出し得るかまたはそれらの量を定量化し得るか、生物系の特定の相互作用を検出し得るか、特定の生物学的プロセスを検出し得るか、特定の生物学的プロセスにおける変更を検出し得るか、あるいは特定の化合物の構造における変更を検出し得る。

【0022】

図1を参照すると、イオン結合体10は、無機粒子20および高分子40を含み、これらの各々は、それぞれ、連結基30および50を含有し、末端31および51で粒子20を高分子40に付随的に結合する。末端31および51は、荷電しているかまたはイオン化可能である（つまり、これらの末端部は、正電荷または負電荷の局在的な量を含有し得、そして末端31の部分的負電荷および末端51の部分的正電荷（逆もまた同様）のような、相補的なイオン対または静電気対を形成する）。一般的に、高分子40は、高分子内または高分子上の任意の位置において連結基を含有し、この高分子は、連結基30と静電的に相互作用するために接近可能であり、この高分子を無機粒子20に付着する。代表的に、連結基50の荷電部分またはイオン化可能部分は、高分子40から離れて伸長（隆起）する。

【0023】

一般的に、無機粒子は、その材料を同定するために使用され得る、明瞭な物理的特性を示す任意の無機材料であり得る。この物理的特性は、磁気特性および光学的特性であり得るがこれらに限定されない。光学的特性には、光ルミネセンスのような発光、吸収、散乱およびプラスモン共鳴が挙げられるがこれらに限定されない。例えば、この無機粒子は、吸収波長において光源を用いて照射されて、発光物質と他の物質とを識別するために使用され得る発光波長において発光を生じ得る。

【0024】

無機粒子の例としては、無機コロイドおよび半導体ナノ粒子が挙げられるがこれらに限定されない。この粒子は、金属粒子または磁気粒子であり得る。この粒子はまた、結晶性粒子であり得る。無機コロイドの例としては、Ag、Auまたはリン光体が挙げられる。リン光体は、希土類酸化物のような無機リン光体であり得る。この無機コロイドは、このコロイド中の粒子サイズに依存して、放射に対して異なる反射率、散乱特性およびプラスモン共振を示し得る。半導体ナノ粒子の例としては、周期表のII族～VI族、III族～V族およびIV族からの元素が挙げられるがこれらに限定されない。これらの群からの元素としては、CdS、CdSe、CdTe、ZnS、ZnSe、ZnTe、MgTe、GaAs

、GaP、GaSb、GaN、HgS、HgSe、HgTe、InAs、InP、InSb、InN、AlAs、AlP、AlSb、AlS、PbS、PbSe、Ge、Siまたはそれらの合金もしくは混合物（三元混合物および四元混合物を含む）が挙げられるがこれらに限定されない。この半導体ナノ粒子は、半導体ナノクリスタルであり得る。このナノクリスタルは、吸収波長において、光源を用いて照射されて、発光波長で発光を生じ得る。この発光は、量子閉じ込め（quantum confined）半導体材料のバンドギャップに対応する振動数を有する。このバンドギャップは、ナノクリスタルのサイズの関数である。小さな直径を有するナノクリスタルは、物質の分子形態とバルク形態との間の中間の特性を有し得る。例えば、小さな直径を有する半導体材料に基づくナノクリスタルは、三つの次元全てにおいて、電子および正孔の両方の量子閉じ込めを示し得、これは結晶サイズの減少と共に、この材料の有効バンドギャップの増加を導く。従って、ナノクリスタルの光吸収および発光の両方は、この結晶のサイズが減少するにつれて青色に（すなわち、より高エネルギーに）シフトする。

【0025】

ナノクリスタルからの発光は、狭いガウス発光バンド（Gaussian emission band）であり得、この発光バンドは、ナノクリスタル、ナノクリスタルの組成物、またはその両方のサイズを変化させることによって、紫外領域、可視領域、または赤外領域のスペクトルの完全な波長範囲を通して調整され得る。例えば、CdSeは、可視領域において同調し得、そしてInAsは、赤外領域において同調し得る。ナノクリスタルの集団の狭いサイズ分布は、狭いスペクトル範囲の光の発光を生じ得る。この集団は、単分散され得、そしてナノクリスタルの直径において15% rms未満の偏差、好ましくは10% rms未満の偏差、より好ましくは5%未満の偏差を示し得る。約75 nm以下、好ましくは60 nm以下、より好ましくは40 nm以下、そして最も好ましくは30 nm以下の半波高全幅値（FWHM）の狭い範囲のスペクトルの発光が、観測され得る。この発光の幅は、ナノクリスタルの直径の多分散の減少に伴って減少する。半導体ナノクリスタルは、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、または80%より高い高蛍光量子効率を有し得る。

【0026】

ナノクリスタルを形成する半導体としては、II族～VI族の化合物、II族～V族の化合物、III族～VI族の化合物、III族～Vの化合物、IV族～VI族の化合物、I族～III族～VI族の化合物、II族～IV族～VI族の化合物およびII族～IV族～V族の化合物（例えば、ZnS、ZnSe、ZnTe、CdS、CdSe、CdTe、HgS、HgSe、HgTe、AlN、AlP、AlAs、AlSb、GaN、GaP、GaAs、GaSb、GaSe、InN、InP、InAs、InSb、TlN、TlP、TlAs、TlSb、PbS、PbSe、PbTe、またはこれらの混合物）が挙げられ得る。

【0027】

単分散半導体ナノクリスタルを調製する方法は、高温の配位溶媒に注入された有機金属試薬（例えば、ジメチルカドミウム）の熱分解を含む。これにより、分散した核形成を可能にし、そしてナノクリスタルの巨視的な量の制御された成長を生じさせる。ナノクリスタルの調製および製造は、例えば、米国出願番号08/969,302（本明細書中でその全体が参考として援用されている）に記載されている。ナノクリスタルを製造する方法は、コロイド成長プロセスである。このコロイドの成長は、高温の配位溶媒にMドナーおよびXドナーを迅速に注入することによって生じる。この注入により、ナノクリスタルを形成するために制御された様式で成長され得る核を生成する。この反応混合物を、穏やかに加熱し、このナノクリスタルを成長およびアニールさせ得る。サンプル中におけるナノクリスタルの平均サイズおよびサイズ分布の両方は、成長温度に依存する。安定した成長を維持するために必要な成長温度は、平均結晶サイズの増加に伴って増加する。このナノクリスタルは、ナノクリスタルの集団のメンバーである。別個の核形成および制御された成長の結果として、得られたナノクリスタルの集団は、狭い直径の単分散分布を有する。この直径の単分散分布はまた、サイズとも呼ばれ得る。核形成に続く配位溶媒中でのナノクリスタルの制御された成長およびアニーリングのプロセスによりまた、均一の表面誘導体化および規則的なコア構造が得られ得る。このサイズ分布が鋭い場合、この温度は、安定的な成長を維持するために引き上げられ得る。より多くのMドナーまたはXドナーを添加するこ

とによって、成長期間が、短縮され得る。

【0028】

Mドナーは、無機化合物、有機金属化合物、または金属元素であり得る。Mは、カドミウム、亜鉛、マグネシウム、水銀、アルミニウム、ガリウム、インジウム、またはタリウムである。Xドナーは、Mドナーと反応して一般式MXを有する物質を形成し得る化合物である。代表的に、Xドナーは、カルコゲニドドナーまたはピニクチドドナー（例えば、ホスフィンカルコゲニド、ビス（シリル）カルコゲニド、二酸素、アンモニウム塩、またはトリス（シリル）ピニクチド）である。適切なXドナーとしては、以下が挙げられる：二酸素、ビス（トリメチルシリル）セレニド（ $(\text{TMS})_2\text{Se}$ ）、トリアルキルホスフィンセレニド（例えば、（トリ-n-オクチルホスフィン）セレニド（TOPSe）または（トリ-n-ブチルホスフィン）セレニド（TBPSe））、トリアルキルホスフィンテルリド（例えば、（トリ-n-オクチルホスフィン）テルリド（TOPTe）またはヘキサプロピルホスホラストリアミドテルリド（HPPTTe））、ビス（トリメチルシリル）テルリド（ $(\text{TMS})_2\text{Te}$ ）、ビス（トリメチルシリル）スルフィド（ $(\text{TMS})_2\text{S}$ ）、トリアルキルホスフィンスルフィド（例えば、（トリ-n-オクチルホスフィン）スルフィド（TOPS））、アンモニウム塩（例えば、ハロゲン化アンモニウム（例えば、 NH_4Cl ））、トリス（トリメチルシリル）ホスフィン（ $(\text{TMS})_3\text{P}$ ）、トリス（トリメチルシリル）アルセニド（ $(\text{TMS})_3\text{As}$ ）、あるいはトリス（トリメチルシリル）アンチモニド（ $(\text{TMS})_3\text{Sb}$ ）。特定の実施形態において、MドナーおよびXドナーは、同一の分子内の部分であり得る。

【0029】

配位溶媒は、ナノクリスタルの成長を制御するのに役立ち得る。配位溶媒は、ドナー孤立電子対を有する（例えば、成長するナノクリスタルの表面に配位するために利用可能な孤立電子対を有する）化合物である。溶媒の配位により、成長するナノクリスタルを安定化させ得る。代表的な配位溶媒は、アルキルホスフィン、酸化アルキルホスフィン、アルキルホスホン酸、またはアルキルホスフィン酸が挙げられるが、ピリジン、フラン、およびアミンのような他の配位溶媒もま

た、ナノクリスタルの生成のために適切であり得る。適切な配位溶媒の例としては、ピリジン、トリ - n - オクチルホスフィン (TOP) およびトリ - n - オクチルホスフィン酸化物 (TOPO) が挙げられる。技術グレードのTOPOが使用され得る。

【0030】

この反応の成長段階の間のサイズ分布は、この粒子の吸収線幅をモニタリングすることによって推定され得る。この粒子の吸収スペクトルまたは発光スペクトルの変化に応答する反応温度の改変により、成長の間の急な粒子サイズの分布の維持を可能にする。反応物を、結晶の成長の間に核形成溶液に添加して、より大きな結晶に成長させ得る。特定のナノクリスタル平均直径で成長を停止させ、そして半導体材料の適切な組成を選択することによって、ナノクリスタルの発光スペクトルは、400 nm ~ 800 nmの波長範囲にわたって連続的に同調され得る。このナノクリスタルは、150 未満の直径を有する。ナノクリスタルの集団は、15 ~ 125 の範囲の平均直径を有する。

【0031】

このナノクリスタルは、狭いサイズ分布を有するナノクリスタルの集団のメンバーであり得る。このナノクリスタルは、球形状、ロッド形状、円盤形状、または他の形状であり得る。このナノクリスタルは、半導体材料のコアを含み得る。このナノクリスタルは、式MXを有するコアを含み得、ここでMはカドミウム、亜鉛、マグネシウム、水銀、アルミニウム、ガリウム、インジウム、タリウム、またはこれらの混合物であり、そしてXは、酸素、硫黄、セレン、テルル、窒素、リン、砒素、アンチモン、またはこれらの混合物である。

【0032】

このコアは、このコアの表面にオーバーコーティングを有する。このオーバーコーティングは、コアの組成と異なる組成を有する半導体材料であり得る。ナノクリスタル表面上のこの半導体材料のオーバーコートとしては、以下が挙げられ得る：II - VI族の化合物、II - V族の化合物、III - VI族の化合物、III - V族の化合物、IV - VI族の化合物、I - III - VI族の化合物、II - IV - VI族の化合物、およびII - IV - V族の化合物（例えば、Zn

S、ZnO、ZnSe、ZnTe、CdS、CdO、CdSe、CdTe、MgS、MgSe、HgO、HgS、HgSe、HgTe、AlN、AlP、AlAs、AlSb、GaN、GaP、GaAs、GaSb、GaSe、InN、InP、InAs、InSb、TlN、TlP、TlAs、TlSb、PbS、PbSe、PbTe、SiO₂またはそれらの混合物)。例えば、ZnS、ZnSe、またはCdSのオーバーコーティングはCdSeナノクリスタルまたはCdTeナノクリスタル上で成長され得る。オーバーコーティングプロセスは、例えば、米国出願第08/969,302号に記載され、これは本明細書中で全体が参考として援用される。オーバーコーティングの間にこの反応混合物の温度を調節し、そして吸収スペクトルをモニタリングモニタリングするか、またはコアの吸収スペクトルをモニタリングすることによって、高い発光量子効率と狭いサイズ分布とを有するオーバーコートされる物質を入手し得る。

【0033】

粒子サイズ分布は、米国出願第08/969,302（本明細書中で参考として援用される）に記載されるメタノール/ブタノールのような、ナノクリスタルに対する貧溶媒を用いるサイズ選択的沈殿によってさらに精密化され得る。例えば、ナノクリスタルは、10%のブタノールのヘキサン溶液中で分散され得る。メタノールを、乳光が持続するまで攪拌溶液に滴下により添加し得る。遠心分離による上清と凝集物との分離により、サンプル中の最も大きな結晶で富化された沈殿物を生成する。この手順を、光学吸収スペクトルのさらなる鋭利化が認められなくなるまで繰り返し得る。サイズ選択的沈殿を、種々の溶媒/非溶媒のペア（このペアには、ピリジン/ヘキサンおよびクロロホルム/メタノールが挙げられる）中で実施し得る。サイズ選択されたナノクリスタル集団は、平均直径からのrms偏差が15%以下であり、好ましくは、rms偏差が10%以下であり、そしてより好ましくは、rms偏差が5%の以下であり得る。

【0034】

ナノクリスタルの外部表面は、成長プロセスの間に使用された配位溶媒から誘導される化合物の層を含み得る。この表面は、過剰な競合的配位基への繰り返し曝露によって改良され、上層を形成し得る。例えば、キャップされたナノクリス

タルの分布は、配位有機化合物（例えば、ピリジン）を用いて処理され、ピリジン、メタノール、および芳香族化合物中で容易に分散するが、もはや脂肪族溶媒中で分散しない結晶を生成し得る。このような表面交換プロセスは、ナノクリスタルの外部表面と配位または結合し得る任意の化合物（例えば、ホスフィン、チオール、アミンおよびリン酸塩を含む）を用いて実施され得る。ナノクリスタルは、表面に対して親和性を示し、そして懸濁物または分散媒体に対して親和性を有する部分で終結する、短鎖ポリマーに曝露され得る。このような親和性により、懸濁物の安定性を改良し、そしてナノクリスタルの凝集を阻止する。

【0035】

透過型電子顕微鏡（TEM）または小角X線散乱（SAXS）は、ナノクリスタル集団のサイズ、形状、および分布についての情報を提供し得る。粉末X線回折（XRD）パターンは、ナノクリスタルの結晶構造の型および質に関する最も完全な情報を提供し得る。粒子径は、ピーク幅に対して、X線コヒーレンス長を介して、反比例するから、サイズの推定も可能である。例えば、ナノクリスタルの直径は、透過型電子顕微鏡によって直接測定できるし、または例えば、シェラー（Scherrer）式を用いて、X線回折データから推定できる。これはまた、UV/可視光の吸収スペクトルから推定され得る。

【0036】

高分子は、荷電した基、荷電可能な基、またはイオン化可能な基を備える任意の有機種または任意の無機種であり得る。荷電した基、荷電可能な基またはイオン化可能な基としては、以下が含まれるが、これらに限定されない：カルボキシレート、チオカルボキシレート、アミド、ヒドラジン、スルホネート、スルホキシド、スルホン、サルファイト、ホスフェート、ホスホネイト、ホスホニウムイオン、アルコール、チオール、アミン、アンモニウム、四級アンモニウム、アルキルアンモニウムまたはニトレート。例えば、イオン化可能な基は、アミノ酸の酸性側鎖または塩基性側鎖であり得る（例えば、リジン、アルギニン、ヒスチジン、アスパラギン酸、またはグルタミン酸）。高分子は、複数のイオン化可能な基（例えば、ポリリジン、ポリ（アクリル酸）（PAA）、ポリ（アリルアミン塩酸塩）（PAH）、スルホン化ポリスチレン（SPS）、およびポリジアリル

ジメチルアンモニウムクロライド (PDADMAC)) を含み得る。この高分子はポリペプチドまたはポリヌクレオチドであり得る。

【0037】

この高分子は別個の分子または生物学的標的との特異的な相互作用を提示し得る。例えば、この高分子としては、タンパク質、抗体、DNA、RNAまたは細胞膜が挙げられ、これらは特定の化合物と結合し、相互作用し、または特定の化合物と複合体化する。あるいは、既定された種に対する所望の親和性を提示しない高分子は、所望の相互作用を提示する化学的部分または生物学的部分（例えば、タンパク質、抗体、DNA、RNA、または細胞膜）と付着し得る。例えば、この高分子は、例えば、組換え生物の培養物（細菌細胞、酵母細胞、昆虫細胞、または哺乳動物細胞）からの生物学的プロセス、また、あるいは全合成方法 (total synthetic method) もしくは半合成方法によって化学的部分または生物学的部分に付着し得る。生物学的部分は、RNA、cDNA、ゲノムDNA、ベクター、ウイルスまたはこれらのハイブリッドであっても種々の供給源から分離され、遺伝学的に操作され、増幅され、そして/または組換え的に発現され得る。任意の組換え発現システムが使用され得、これは細菌細胞に加え、例えば哺乳動物細胞、酵母細胞、昆虫細胞、または植物細胞の発現系を含む。生物学的部分の例としては、マルトース結合タンパク質 (MBP) および免疫グロブリンG結合タンパク質 (Gタンパク質) が挙げられる。

【0038】

あるいは、核酸が、以下に記載されるような周知の化学的技術によってインビトロで合成され得る：例えば、Carruthers (1982) Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 47:411-418; Adams (1983) J. Am. Chem. Soc. 105:661; Belousov (1997) Nucleic Acid Res. 25:3440-3444; Frenkel (1995) Free Radic. Biol. Med. 19:373-380; Blommers (1994) Biochemistry 33:7886-7896; Narang (1979) Meth. Enzymol. 68:90; Brown (1979) Meth. Enzy

mol. 68:109; Beaucage (1981) Tetra. Lett. 22:1859; 米国特許第4,458,066号。次いで、二本鎖DNAフラグメントを、相補鎖を合成し、これらの鎖を適切な条件下でアニーリングするか、または適切なプライマー配列と共にDNAポリメラーゼを使用して相補鎖を付加することによって入手し得る。

【0039】

核酸操作技術（例えば、配列中の変異生成、サブクローニング、標的化プローブ、配列決定、ハイブリダイゼーションなど）は、科学文献または特許文献に十分に記載されている（例えば、以下を参照のこと：Sambrook編、Molecular Cloning: a Laboratory Manual（第2版）、第1～3巻、Cold Spring Harbor Laboratory、（1989）；Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel編 John Wiley & Sons, Inc., New York（1997）；Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology: Hybridization With Nucleic Acid Probes, Part I. Theory and Nucleic Acid Preparation, Tijssen編、Elsevier, N.Y.（1993）。荷電したかまたはイオン化可能な高分子（例えば、ロイシンジッパー）の挿入についての技術はまた、以下に議論されている：O'Sheaらによる「Peptide 「Velcro」 : Design of a Heterodimeric Coiled Coil、Current Biology 3（10）、658-667（1993）、およびMaurorらによる「Fiber-Optic Fluorometric Sensing of Polymerase Chain Reaction-Amplified DNA Using an Immobilized DNA Capture Protein」、Analyt. Biochemistry 235、61～72（1996）。

【0040】

組換え（融合）タンパク質を、適切なクローニングストラテジー、分子の生物工学操作でよく知られている技術を使用して構築したプラスミド（二本鎖DNA）中に調製し得る。このクローニング工程およびタンパク質発現工程は、*Escherichia coli* (*E. coli*) 中で実施し得、これはまた増殖環境としての役割を果たす。適切かつ特異的な酵素（制限エンドヌクレアーゼ）を導入して、適切なポリリンカークローニング部位でプラスミドを切断し得る。このポリリンカークローニング部位において、特定の機能を有する遺伝子が導入される。次いで、連結基（例えば、ペプチドテール）を、所望の機能を有する生物学的部分のコード領域のカルボキシ末端にクローニングし得る。生物学的部分としては、マルトース結合タンパク質（MBP）およびプロテインGが挙げられ、マルトース結合タンパク質は高親和性で糖マルトースに結合し、プロテインGはそのbサブユニットを介して免疫グロブリンG（IgG）のFc領域へ特異的に結合することが公知である。生物学的部分はまたさらに変異され得、その結果この部分は所望の機能（例えば、特定の生物学的標的への結合）を提示するようになる。例えば、プロテインGは、特定の分子に対して相互作用し、かつロイシンジッパーの機能を組み込むように改変され得る。次いで、プロテインGは、静電的に無機粒子に付着し得、そして特定の生物学的標的との相互作用を検出するために使用され得る。

【0041】

高分子を生物学的標的に付着させるための合成方法は、公知の固相ペプチド結合技術を介して実施され得る。例えば、この高分子が荷電した部分またはイオン化可能部分、および生物学的特異性を提示する部分を備える単一の共有結合ポリペプチド鎖から形成され得る。この高分子を作製するための合成方法は、この高分子を形成する構成ポリペプチド鎖のいずれか、または両方の全てまたは部分（すなわち、荷電したかまたはイオン化可能である部分および生物学的に特異的な部分）が、インビトロ合成を使用して調製され得るプロセスを含み得る。あるいは、構成ポリペプチド鎖のいずれかまたは両方の全てまたは部分は、上記の組換え生物を使用して調製され得る。例えば、ポリペプチドの、荷電したかまたはイオン化可能な部分は合成的に作製し得、そして生物学的に特異的な部分が組換え

方法または合成方法により得られ得る。荷電した部分／イオン化可能部分および生物学的に特異的な部分が独立に得られる場合、これらは、以下によって付着され得る：a) ペプチド末端の化学的活性化後の化学的手段（例えば、EDC（1-エチル-3,3-ジメチルアミノプロピルカルボジイミド（carbiimide））結合）、b) 活性化されたか、または活性化されていないポリペプチドの酵素学的に補助された触媒、c) O_2 を使用する酸化またはさらなる化学的手段もしくは酵素学的手段によって促進されたジスルフィド（S-S）結合の形成、またはd) 高分子を粒子に静電的に付着させるために使用される自己集合的な相互作用とは別個の非共有結合的な、静電的相互作用または疎水の相互作用の使用。この合成方法はまた、ポリ核酸アプタマー（DNA、RNA）、ペプチド核酸（PNA）オリゴマー、オリゴ糖、リポ多糖類、ポリデキストリン、環状ポリデキストリン、クラウンエーテルまたは類似の誘導体および他の、天然または合成の、「レセプター」種に対する上記の方法のいずれかによる、荷電したかまたはイオン化可能な部分の付着を含む。

【0042】

代替的な合成アプローチにおいて、自己集合化した複合体は、正に荷電した高分子電解質（例えば、ポリジアリルジメチルアンモニウム（polydiallyldimethylammonium）クロリド）と負に荷電したホスフィン-カルボン酸複合体（例えば、トリス2-カルボキシエチルホスフィン）との静電的結合を介して形成され得る。得られた複合体はこの粒子に、結合され得、ここでホスフィン基は粒子表面に結合する束縛を提供し、一方で正に荷電したポリマーは粒子の水溶性を増大させる。この荷電したポリマーは、末端に、アミノ基または水酸基を含み得るか、またはアミノ基または水酸基を含むモノマー（例えば、アリルアミンおよびヒドロキシメタクリレート）と共重合し得る。標準的なEDC型結合化学を使用して、（例えば、ペプチド結合を介して）、アミノ基または水酸基と生物学的な部分との間の結合を達成し、特異的な生物学的親和性を提示する自己集合したイオン性結合体を作製し得る。

【0043】

図2Aを参照すると、いくつかの実施形態において、この無機粒子は、半導体

化コア110とこのコアをカプセル化するオーバーコート120とを有する半導体化ナノクリスタル100である。半導体化コア110およびオーバーコート120は、上述した半導体化元素から作製される。複数の連結基130が、このオーバーコートまたはナノクリスタルの材料に結合する表面相互作用性基132を介してオーバーコート120の表面に付着する。代表的には、このオーバーコート材料のバンドギャップエネルギーは、このコアのバンドギャップエネルギーより大きい。各連結基130はまた、スペーサー134によって表面相互作用性基132に対して束縛された荷電したかまたはイオン化可能な基136を備える。一般に、スペーサー134は、基132または基120と基136との間の電子電荷の移動を妨げるのに十分な長さである。

【0044】

図2Bを参照すると、他の実施形態において、本発明の無機粒子200は、表面相互作用性基222を介して粒子210の表面に付着した複数の連結基220を有する無機コロイド粒子210である。連結基220は、上記の連結基130に類似し、そして荷電したかまたはイオン化可能な基226およびスペーサー224を備える。

【0045】

一般に、本発明の無機粒子の直径は、約10 と約1000 との間にあり；好ましくは約10 と約500 との間にあり；そして最も好ましくは約10 と約250 との間にある。この無機粒子の平均サイズの周りにあるサイズ分散は、代表的には、約20%未満であり；好ましくは約15%未満であり；そしてより好ましくは約10%未満であり、そして最も好ましくは約5%未満である。一般的に、約40%を超え；好ましくは約50%を超えるものが収まり；そして最も好ましくは約60%を超える粒子が特定のサイズ範囲に収まる。

【0046】

表面相互作用性基は、無機粒子の表面に結合し得る元素または化学的基を含む任意の化学的部分であり得る。例えば、この表面の基としては、S基、N基、P基、O基、またはO=P基が挙げられ得る。荷電したかまたはイオン化可能な基136および226は任意のイオン化可能な化学的基または任意の天然の電荷を

有する化学基（例えば、四級アンモニウム基）を含み得る。荷電したかまたはイオン化可能な化学的基の例としては、水酸化物、アルコキシド、カルボキシレート、スルホネート、ホスフェート、ホスホネート、四級アンモニウム等が挙げられるがこれらに限定されない。

【0047】

連結基30、130、220はまた、この粒子の周りに水溶化層を形成することを補助する。特定の実施形態において、この無機粒子の表面は複数の連結基を含み、そしてこれらのいくつかは、この粒子を水溶化する補助をし、そして静電的に高分子と結合せず、そして他のものは静電的に高分子と結合する。連結基はまた、この粒子をより安定にし得る（すなわち、この粒子はより希薄な濃度において使用し得る）。例えば、一座の連結基がこの粒子の表面に付着され、次いで自己集合化により、オリゴマーの単層がこの粒子の周囲を覆い得、粒子表面に官能基を効果的に架橋する。自己集合化は、ナノメートルスケールでイオン性結合体の組織化の制御を可能にし、そして巨大な合成ポリマーおよび生物学的ポリマーを組織化するために使用される一層ずつの自己集合化（または連続吸着）の技術に類似している。例えば、M. FerreiraおよびM. F. Rubnerによる「Molecular-Level processing of Conjugated polymers. 1. Layer-by-Layer Manipulation of Conjugated Polyions」、Macromolecules 28、7107（1995）；Decherらによる「New Nanocomposite Films for Biosensors: Layer-by-layer Adsorbed Films of Polyelectrolytes, Proteins or DNA」Biosensors & Bioelectronics 9、677～684（1994）；およびG. Decherによる「Fuzzy Nanoassemblies: Toward Layered Polymeric Multicomposites」Science 277:1232-1237（1997）を参照のこと。

【0048】

好ましい実施形態において、連結基30、130および220は、以下の式：



を有し、ここで、 $(R_1)_a$ は、1つ以上の表面相互作用基であり、 R_2 は、スパーサーであり、そして $[(R_3)_b(R_4)_c]_d$ は、荷電基またはイオン化可能基であり；

R_1 は、C1 - C100ヘテロアルキル、C2 - C100ヘテロアルケニル、ヘテロアルキニル、-OR、-SH、-NHR、-NR'R''、-N(O)HR、-N(O)R'R''、-PHR、-PR'R''、-P(NR'R'')NR'R''、P(O)R'R''、P(O)(NR'R'')NR'R''、-P(O)(OR')OR''、P(O)OR、P(O)NR'R''-P(S)(OR')OR''およびP(S)ORからなる群から選択され、ここで、R、R'、R''は、H、分岐したC1 - C100アルキルまたは分岐していないC1 - C100アルキル、分岐したC2 - C100アルケニルまたは分岐していないC2 - C100アルケニル、分岐したC2 - C100アルキニルまたは分岐していないC2 - C100アルキニル、分岐したC1 - C100ヘテロアルキルまたは分岐していないC1 - C100ヘテロアルキル、分岐したC2 - C100ヘテロアルケニルまたは分岐していないヘテロケニル、分岐したヘテロC2 - C100ヘテロアルキニルまたは分岐していないC2 - C100ヘテロアルキニルからなる群から独立的に選択されるが、但し、aが、1より大きい場合、 R_1 基は、 R_2 または R_3 基内の同じかまたは異なる原子において R_2 または R_3 基に結合され得、 R_1 基は、同じであっても異なってもよく、あるいは、 R_1 基が、6、7、8、9または10員のクロアルキル、シクロアルケニル、複素環式(thereocyclic)、アリール、ヘテロアリール、または6～30員のクラウンエーテルまたはヘテロクラウンエーテルを形成し得る；

R_2 は、結合(すなわち、 R_1 が、 R_3 に結合する場合、 R_2 は存在しない)、分岐したC2 - C100アルキレンまたは分岐していないC2 - C100アルキレン、分岐したC2 - C100アルケニレンまたは分岐していないC2 - C100アルケニレン、分岐したC2 - C100ヘテロアルケニレン、シクロアルキル、シクロアルケニル、シクロアルキニル、複素環式、アリールおよびヘテロア

リールまたは分枝していないC₂-C₁₀₀ヘテロアルケニレン、シクロアルキル、シクロアルケニル、シクロアルキニル、複素環式、アリールおよびヘテロアリールから選択される；

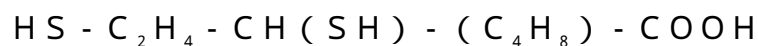
R₃は、分枝したC₂-C₁₀₀アルキレンまたは分枝していないC₂-C₁₀₀アルキレン、分枝したC₂-C₁₀₀アルケニレンまたは分枝していないC₂-C₁₀₀アルケニレン、分枝したC₂-C₁₀₀ヘテロアルケニレン、シクロアルキル、シクロアルケニル、シクロアルキニル、複素環式、アリールおよびヘテロアリールまたは分枝していないC₂-C₁₀₀ヘテロアルケニレン、シクロアルキル、シクロアルケニル、シクロアルキニル、複素環式、アリールおよびヘテロアリールから選択される；

R₄は、以下：水素、カルボキシレート、チオカルボキシレートおよびアミド、アミン、ヒドラジン、スルホネート、スロホキシド、スルホン、スルファイト、ホスフェート、ホスホネート、ホスホニウムイオン、アルコール、チオール、アミン、アンモニウム、アルキルアンモニウム、ニトレートからなる群から選択される；そして

aは、1～4であり、bは、0～3であり、cは、1～3であり、dは、1～3であり、dは、2～3である場合、R₃基は、同じであっても異なってもよく、あるいは一緒に結合されて、5～10員のシクロアルキル、シクロアルケニル、複素環式、アリールまたはヘテロアリールを形成し得る。

【0049】

別の好ましい実施形態において、連結基130は、以下の式：



を有する。

【0050】

オーバーコート材料と共にまたは伴う半導体CdSeナノ粒子のような無機粒子を調製するための方法は、F.V.Mikulecによる「Semiconductor Nanocrystal Colloids: Manganese Doped Cadmium Selenide, (Core) Shell Composites for Biological Labeling, a

nd Highly Fluorescent Cadmium Telluride」MIT PhD Thesis, Sept. 1999、Dabbousiらによる「(CdSe)ZnS core-shell nanocrystals: Synthesis and characterization of a size series of highly luminescent nanocrystallites」J. Phys. Chem. B 101, 9463-9475 (1997); およびBruchez, Jrらによる「Semiconductor Nanocrystals as Fluorescent Biological Labels」Science 281, 2013-2016 (1998)に議論される。

【0051】

図3A～3Cを参照すると、生物学的部分300（例えば、特定の生物学的機能を有する組換えタンパク質）は、タンパク質310およびタンパク質310の表面から突出する連結基320を含む。連結基320は、結合セグメント326（例えば、ポリAsnリンカー）、架橋基322（例えば、硫黄）およびテイル324を含む。特定の実施形態において、テイル324は、約30個のアミノ酸残基を含むポリペプチドである。例えば、テイルは、荷電しているかまたはイオン化可能である任意のポリペプチド（すなわち、陽性電荷または陰性電荷の局在した量を含む）であり得る。図3Bは、ロイシンジッパーとして通常称される陽性に荷電されたテイル324を示す。他のありそうなテイルとしては、アルギニン基またはアスパラギン酸基を含むポリペプチドが挙げられるがこれらに限定されない。代表的に、ロイシンジッパーを含むタンパク質は、ダイマーを形成して、疎水性相互作用を最小にする傾向がある（図3C）。得られたダイマーは、ロイシンを用いてコードされるタンパク質に対して高確率状態（high probability state）である。ダイマー380（図3Cに示される）は、2つの別々のタンパク質310およびタンパク質312を含み、これらは、同じである（ホモダイマー）かまたは異なり（ヘテロダイマー）得、2つの架橋基322（例えば、チオール基）を介して結合される。テイル324は、原子または分子（例えば、ポリペプチド）であり得る連結基326を介して各タンパク

質の表面に結合される。それぞれの架橋基および連結基は、同じであってもまたは異なってもよい。

【0052】

図4Aを参照すると、イオン結合体500は、連結基520および530を介してタンパク質540に静電的に結合される無機粒子510を含む。一般に、生物学的部分は、ダイマーとしてかまたはモノマーとしてかのいずれかで無機粒子に静電的に結合し得る。ダイマーは、ホモダイマーまたはヘテロダイマーであり得る。さらに、粒子510は、同一かまたは異なり得るいくつかのタンパク質に静電的に結合され得る。異なるタンパク質を含む粒子は、興味ある多数の生物学的標的を同時に検出するのに使用され得る。もちろん、粒子に結合されるタンパク質の正確な数は、粒子の直径、連結基の全体の長さ、およびタンパク質のサイズに依存する。図4Bを見ると、タンパク質の数、Nは、以下の関係式：

$$N = (4\pi/3)(r_2^3 - r_1^3) / V(\text{タンパク質})$$

によって与えられ、ここで r_2 および r_1 は、図4Bに示され、 $(r_2^3 - r_1^3)$ は、タンパク質パッキングのために利用可能な空間の容積であり、そしてVは、粒子に結合するタンパク質の平均容積である。あるいは、Nは以下の式：

$$N = 0.65((r_2^3 - r_1^3) / r_p^3)$$

から誘導され得、ここで r_p は、タンパク質の半径である。代表的に、イオン結合体は、約1～約25の間；好ましくは、約5～約15；および最も好ましくは約5～約10の、約19の直径を有する無機粒子に静電的に結合するタンパク質を含む。

【0053】

他の実施形態において、無機粒子は、a)有機殻、b)薄いシリカ層、c)aおよびbの組み合わせのいずれから作製される外殻を含み得る。有機殻は、無機粒子の表面に関して単座接続または複座接続であり得る。有機殻はまた、粒子の周りでポリマー化され得る。

【0054】

外殻は、生物学的部分に自己集合し得る基を用いて機能化され得る。この基は、生物学的部分に結合されるか、その部分自身に自己集合するか、または、合成

分子に自己集合し、次いで、生物学部分に特異的に結合するかのいずれかである。自己集合工程は、表面基に静電的に相互作用し得る。自己集合は、水素結合または疎水性相互作用を介し得る。

【0055】

さらに苦勞することなく、当業者は、本明細書中の説明に基づいて、最大限に本発明を利用し得ることが考えられる。従って、本発明の種々の化合物の合成、スクリーニングおよび生物学的試験を記載する、以下の特定の実施例は、単に例示として、そして少しも、どちらにしても本開示の残りを限定しないと解釈される。本明細書中に引用されるすべての刊行物（特許を含む）は、その全体が参考として本明細書中に援用される。

【0056】

（CdSe-ZnS-リポ酸ナノ粒子の合成：）

半導体ナノ粒子を水溶性にするために使用される連結基は、所望の連結基と粒子の表面上のトリオクチルホスフィン（TOP）/トリオクチルホスフィンオキシド（TOPO）基とを交換することによって半導体粒子の表面に結合される。ジヒドロリポ酸連結基は、水素化ホウ素ナトリウム（ NaBH_4 ）を用いて、粉末としてAldrichから購入される市販のリポ酸（チオクト酸とも呼ばれる）を還元することによって調製された。A. F. Wanger, J. Organic Chemistry, 1956, 5079-81における手順を参照のこと。ジヒドロリポ酸連結基は、粒子の安定性を増大させ、その結果、改変された粒子は、さらなる希釈状態において使用され得る。粒子の表面基を交換する手順は、以下に記載される。

【0057】

高温における有機金属化合物の増大およびアニーリングに基づく合成経路（Dabbousiら参照のこと）を使用して調製される半導体ナノ粒子（CdSe-ZnS）の容積を、増大溶液から取り、そしてメタノールの添加によって沈殿させた。ナノ粒子は、ZnS-オーバーコーティング（5-7単層）を含んだ。次いで、単離された沈殿物を、最小容積のブタノール：ヘキサンの約1：10の溶液において再分散させた。再度、半導体ナノ粒子を、メタノールの添加によ

て破壊した。沈殿、再分散および沈殿の手順を、粒子の表面のTOP/TOP T基の大部分が、取り除かれるまで、2～3回繰り返した。10～20倍超(重量)の所望の連結基を、湿った沈殿物に添加した。この混合物を、油浴(約60～80℃)中に配置し、そして約3～12時間攪拌した。基変換手順を、油浴から混合物を取り除くことによって停止した。この混合物を、少量のDMF(約200mgの所望の連結基に対して、100～200μlのDMFで十分である)を添加することによって希釈した。別々に、1:10容積のDMF:H₂O中のわずかに過剰なモル濃度(1.5:1)のカリウムt-ブトキシドを含む別の溶液を、調製し、そして上で調製した半導体粒子/DMF溶液を添加して、リポ酸基をプロトン化した。やや白い沈殿物が、生じた。この沈殿物は、遠心分離によって溶液の残りから分離された。この沈殿物を、直ぐに水に分散した。ナノクリスタル分散物を、ウルトラフリー遠心濾過装置(Millipore製、約50,000ダルトンにおけるカットオフを有する)を使用して希釈溶液から濃縮することによって(過剰のカリウムt-ブトキシドおよびDMFから)精製し、そして水中に再分散した。この操作を3～4回繰り返すことによって、清澄さ(約95%またはそれより高い純度)および水中での安定な分散物が提供される。これは、ナノクリスタルの放出特性および約15～20%のPL収率を有する。

【0058】

他の合成スキームにおいて、塩基(テトラメチルアンモニウムヒドロキシド)は、DMF中でカリウムt-ブトキシドと置換し得る。前者の塩基は、空気下で保存可能であるが、後者は、不活性雰囲気において保存する必要がある。ジヒドロリポ酸が、全体的に清澄な場合、最もうまく行く。ジヒドロリポ酸を生成するためのリポ酸の還元が、完全でない場合、溶液の黄色呈色が、明かである。この黄色の溶液を、蒸留して(真空下140℃で蒸留する)、ジヒドロリポ酸の透明な溶液を得ることができる。

【0059】

(MBP-塩基性ジッパートンパク質のクローニングおよび調製)

(背景参照)

1)細菌におけるMBPダイマー発現に関する:

「Engineering the quaternary structure of an exported protein with a leucine zipper」Blondel, A. および Bedouelle, H (1991) Protein Eng. 4(4):457-61。

【0060】

2) 発現した組換えタンパク質を介するヘテロダイマー形成に関する:

「A general method of facilitating heterodimeric pairing between proteins: application to expression of alpha and beta T-cell receptor extracellular segments」Chang, H.C., Bao, Z., Yao, Y., Tse, A.G., Goyarts, E.C., Madsen, M., Kawasaki, E., Brauer, P.P., Sachettini, J.C., Nathenson, S.G. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91(24):11408-11412。

【0061】

3) この作業に使用するロイシンジッパーの設計および塩基性的特徴付けに関する:

「Peptide Velcro: design of a heterodimeric coiled coil」O'Shea, E.K., Lumb, K., および Kim, P.S. (1993) Current Biology 3(10):658-667。

【0062】

4) 生体結合体の説明に関する: 「Bioconjugation of Highly Luminescent Colloidal CdSe-ZnS Quantum Dots with an Engineered Two-Domain Recombinant Protein」H. Mattoussi (2001) Phys. Stat. Sol. (b), 224(1): 277-283。

【0063】

5) 生体結合体の説明に関する: 「Self-Assembly of Cd Se-ZnS Quantum Dot Bioconjugates Using an Engineered Recombinant Protein」H. Mattoussiら(2001) J. Am. Chem. Soc., 122: 12142-12150。

【0064】

(塩基性(正に荷電した)ロイシンジッパー遺伝子の調製)

2つのDNAオリゴヌクレオチドプライマーを、合成して、Changらによって提供されたPCR II Basicプラスミドにおける塩基性ロイシンジッパーの5'末端および3'末端にアニールした。

【0065】

プライマー1: 5' - TGCGGTGGCTCAGCTCAGTTG - 3'

プライマー2: 5' - GCTCTAGATTAAATCCCCACCCTGGGCGAGTTTTC - 3'。

【0066】

PCRを使用して、塩基性ジッパーを、プライマー1およびプライマー2ならびにpfuポリメラーゼを使用して増幅して、塩基性ジッパーをコードし、MalE遺伝子の3'挿入の前のプロセシングに適した末端を有し、停止コドンおよび発現した融合タンパク質において最終的な共有結合性のダイマーの形成のためのジッパー配列の特定のシステイン残基5'をコードする、約120bpのDNAフラグメントを産生した。増幅したジッパーコードフラグメントのプロセシングを、制限エンドヌクレアーゼXbaIを用いてDNAの一部を消化することによって達成して、連続クローニング工程のためのおよそ重複する3'末端を提供した。PCRフラグメントの5'末端を、平滑末端化するように設計したので、さらなるプロセシング工程を、次の工程の前に必要としなかった。

【0067】

(MBPのC末端コード配列への、ロイシンジッパー遺伝子のクローニング)

次いで、調製されたDNAフラグメントを、制限エンドヌクレアーゼXmnI

およびXbaIでプロセスした市販のベクターpMal-c2(New England Biolabs)中に酵素的に連結した。DNAベクター中のこれらの酵素の切断部位は、上記のように調製されたフラグメントを含む、調製された塩基性ロイシンジッパーの成功する連結のために必要な5'平滑配列および3'重複配列を提供した。連結産物によるE.coli DH5"の形質転換およびアンピシリン耐性細菌コロニーの獲得の後、いくつかのコロニーを、このベクターのクローニング部位に隣接するDNAオリゴヌクレオチドプライマーを使用するコロニーPCRによって、所望の挿入された塩基性ロイシンジッパーDNAの存在について試験した。いくつかの陽性のコロニーを、小規模での一晚の増殖による増幅のために選択し、次いで、少量のpMal-Basic Zipper DNAを調製した。

【0068】

(細菌におけるMBP-塩基性ジッパータンパク質の発現)

上記のクローニング手段からのいくつかの候補プラスミドを、小規模の細胞培養(10ml)およびIPGI誘導発現産物のSDSゲル電気泳動によって評価されるように、DH5"宿主細菌株において所望の融合タンパク質を発現する能力について試験した。いくつかの成功したクローンのうち、1つを選択して、DNA配列の確かさを確認するために、さらなる発現研究のために、そして最終的にはより大きい規模の発現研究のためにDNA配列決定を実行した。選択されたクローンについての正確な予測DNA配列を、University of GeorgiaでのMGIF配列決定設備によって確認した。

【0069】

種々の細菌株におけるさらなる小規模の発現研究を、融合タンパク質産物を最適化するために続いて実行した。ロンプロテアーゼ欠失株であるE.coli BL21は、タンパク質の発現のために適切であることを証明した。

【0070】

(融合タンパク質のC末端への(His)6(ヘキサヒスチジン)ペプチドの付加)

この融合タンパク質および他の類似の融合タンパク質の調製および精製におけ

プライマー-3 : 5' - GCTCTAGATGAATCCCCACCCTGGG
CGAGTTTTC - 3'。

5' - CTAGCGGTCACCAACCACCACTGACTG
CA - 3'

【 0 0 7 2 】

新たに形質転換された *E. coli* BL21 の単一のコロニーを、 $100\mu\text{g}/\text{ml}$ のカルベニシリンを含む 10ml の *Luria Broth* (LB) 中に移し、そしてこの培養物を、 37°C で一晩 (約 15 時間) 振とうした。この一晩培養物の 2.0ml を、 $50\mu\text{g}/\text{ml}$ のカルベニシリンおよび 2g のグルコ

ースを含む1リットルのLB中に移した。37℃で最適な密度0.6まで増殖させた後、この細胞培養物を含むフラスコを、最終濃度1mMまでIPTG（イソプロピルチオガラクトピラノシド）を添加する前に、30℃で15分間の振とうに移した。この温度での2時間の振とう後、細胞を4℃で遠心分離によって沈殿させた。得られた細胞ペレットを、粉末ドライアイスで急速に冷凍し、そして精製のための解凍まで、-80℃で貯蔵した。

【0073】

（1リットルの細胞培養物からのMBP-塩基性ジッパー-（His）6の精製）

溶解緩衝液（35mlの、Beohringer EDTA-freeプロテアーゼインヒビターカクテルの錠剤1つを含む50mMのHEPES、0.3MのNaCl、5mMのイミダゾール、pH7.9）を、-80℃の貯蔵から新たに取り出された解凍ペレットを含むチューブに添加した。氷上での完全な再懸濁後、細胞を、氷水中で5×1分間の超音波処理によって溶解させた。この溶解した細胞を、4℃で16,000RPMで30分間遠心分離した。粗い上清を、0.8/0.2ミクロンの二段階シリンジ限外濾過膜を通過させた後、溶解緩衝液で平衡化したNiNta金属キレート樹脂（Qiagen）の50%の懸濁液15mlを添加し、そしてこのチューブを、4℃で1時間回転させた。この樹脂および結合したタンパク質を、短時間遠心分離し、そして上清を捨てた；次いで、この樹脂を40mlの溶解緩衝液で2回洗浄した。この洗浄した樹脂を、4℃で直径1.5cmのガラスクロマトグラフィーに注ぎ、そして50mlの溶解緩衝液（プロテアーゼインヒビターなし）を、0.8ml/分でカラムを通過させ、次いで、90mlの洗浄緩衝液（50mMのHEPES、0.3MのNaCl、20mMのイミダゾール、pH7.9）を通過させた。この産物を、溶出緩衝液（50mMのHEPES、0.3MのNaCl、250mMのイミダゾール、pH7.4）で洗浄されたカラムから溶出した。次いで、タンパク質を含むプールされた画分を、約1ml/分で、50mMのHEPES、0.1MのNaCl、pH7.4で予め平衡化された、固定されたアミロース（4）の、25mlのパックされた吸着床（直径2cm）カラムにアプライした。このカラムを、上記の

緩衝液100mlで洗浄し、次いで、このタンパク質を、10mMのマルトースを含むこの緩衝液で溶出した。精製されたタンパク質を含む回収された画分を、プールし、そして無菌の0.45ミクロンのシリンジフィルターを通過させ、そして4℃で貯蔵した。精製されたタンパク質を、SDSゲル電気泳動+/-ジチオトレイトール還元剤(沸騰させたサンプル中に15mg/ml)によって分析して、二量体形成の度合いを評価した。

【0074】

(マルトース結合タンパク質イオン性結合体)

MBP-ロイシンジッパー融合タンパク質を、融合タンパク質とpH約8~9でホウ酸塩緩衝化された溶液中の無機粒子とを混合することによって、CdSe(コア)-ZnS(被覆)-ジヒドロリポ酸で改変された半導体粒子に静電的に付着させた。約7より高いpHが、ナノクリスタル溶解性を予防し、そして陰性の表面電荷被覆を与えることによるタンパク質操作に最も適している。緩衝溶液中に一定量のナノクリスタルを含む溶液へのMBP-ロイシンジッパー融合タンパク質の単純な添加は、タンパク質に対する無機粒子のモル比にかかわらず、凝集体のないイオン性バイオ結合体(bio-conjugate)をもたらした。代表的には、タンパク質に対する無機粒子の比は、1と10との間である。この無機粒子は、平均約19nmの直径を有した。

【0075】

本方法を使用した表面改変の利点は、その容易さおよび汎用性である。粒子を被覆するために融合タンパク質を添加することのみが必要であり、そして所望のタンパク質は、即時に表面に付着する。さらに、いくつかの場合において、生物学的部分による無機イオン粒子の被覆は、光ルミネセンス収率の増強を生じる。図5は、静電的に生物学的部分に結合されていない粒子と比較して、MBP-ジッパータンパク質によって被覆された粒子が、約3倍のルミネセンス強度の増大を有することを示す。

【0076】

非共有的架橋を介して調製されたMBP-ジッパー被覆ナノクリスタル(および粒子)をまた、蛍光共焦点顕微鏡画像を使用して試験した。図6A~6Cは、

例えば、1 - エチル - 3 - (3 - ジメチルアミノプロピル) カルボジイミドヒドロクロリド (E D A C または E D C) を介してオボアルブミンに共有的に架橋された同じ粒子のサンプルの画像と共に、ナノクリスタル (コア半径 19 nm を有するコア被覆) に結合した M B P - Z i p p e r 溶液のレーザー走査型共焦点顕微鏡を使用した、断面画像を示す。共有的架橋手順は、Bruchez, Jr. による「Semiconductor Nanocrystals as Fluorescent Biological Labels」Science 281、2013 - 2016 (1998) ; W. C. W. Chan および S. N. Ie による「Quantum Dot Bioconjugates for Ultrasensitive Nonisotopic Detection」Science 281、2016 - 2018 ; ならびにこれらの中で参照された参考文献中に開示される。有意な凝集体 (コンステレーション (constellation) 様の特徴の外観において明らかである) は、共有的方法を使用した場合に見出されるが (図 6 C) 、一方、M B P - ジッパーで被覆された無機粒子のイオン性結合体は、非被覆材料と同一であるように見えた (図 6 A および 6 B を参照のこと) 。図 6 A および 6 B において記録された発光は、単一の粒子から生じ、そして安定かつ凝集のない溶液を特徴とする。さらに、M B P - ジッパーで被覆された無機粒子の光ルミネセンス (図 6 A) は、比較可能な粒子濃度を含む薄膜について、非被覆無機粒子 (図 6 B) と比較して増大した。各画像について、イオン性バイオ結合体溶液を、488 nm で、すなわち、このナノ粒子の第一の吸光ピークの位置より下で励起した。適切なフィルターを使用して、この励起シグナルを遮断した。共有 (E D A C) 結合アプローチを使用してオボアルブミンで被覆されたナノ粒子の画像もまた、純粋なナノ粒子 (タンパク質なし) および融合タンパク質と複合体化したナノ粒子の画像と共に、記録した。各画像は、レーザー通路 (垂直に移動する励起シグナル) に沿った、非常に薄いスライス (各々、約 15 ミクロンの厚さおよび 150 × 100 平方ミクロンの面積) を示す。図の下最後の画像は、支持体表面 (光学ディッシュの底) に隣接した切断を示す。画像上の緑の明るいスポットは、この溶液薄膜に分散された個々のナノ粒子からのルミネセンス発光を示す。上記の結果は、本被覆アプローチが

、凝集体のない（非常に小さい規模でさえ）ナノクリスタル-タンパク質バイオ結合体を提供することにおいて有効であることを示す。これらのサンプルは、長い期間（数ヶ月）にわたって安定である。凝集体（図6C）は、重力によってサンプルの底へ沈殿し、そして非反応粒子を溶液中に浮遊させる。これは、共有的に被覆された粒子が安定であり、かつより大きな規模の凝集体に衝突しないという、誤った印象を与え得る。凝集は、IgGがEDACを介してナノクリスタルに結合した溶液において、さらにより言明される（データは示さない）。

【0077】

図7Aおよび7Bを参照して、pHおよびナノ粒子上のタンパク質数の効果を試験した。約9のpHで、この光ルミネセンスは、ナノ粒子に静電的に付着した融合タンパク質の数が増大するにつれて増大した。ナノ粒子に複合体化した一定の数のタンパク質で、この光ルミネセンスは、漸増するpHと共に増大した。

【0078】

続く実験において、MBPを含むイオン性結合体の生物活性を、アミロース官能化樹脂のカラムにイオン性結合体を通過させることによって試験した。MBPのように樹脂に結合したイオン性結合体は、アミロースと相互作用した。従って、このイオン性結合体は、その生物活性を維持した。アミロース官能化樹脂に結合したイオン性結合体を、マルトース溶液でのカラムの洗浄によって放出させた。

【0079】

（G-塩基性ジッパータンパク質のクローニングおよび調製）

連鎖球菌タンパク質G（PG）のb2サブドメインと結合するIgGをコードする配列を、クローニングし、そしてE. coliのクローニングベクターpBad/HisB（Invitrogenからの誘導性発現ベクター）で発現させた。リンカー+ロイシンジッパー尾部を、3'部位でPGから下流に挿入した。さらに、ポリヒスチジン短鎖（ヘキサヒスチジン）を、ロイシン尾部の末端に結合させて、最終産物の精製を容易にした。これらの連続的な遺伝子操作は、IgG b2結合サブドメインおよびロイシンジッパー荷電尾部（本被覆スキームにおいて主要な役割を果たす）を有する融合連結球菌タンパク質Gを提供した。

【0080】

タンパク質G - ジッパーで被覆された半導体ナノ粒子 (CdSe - ZnS) を含むイオン性結合体を、上記の方法を介して合成した。しかし、生物分子に対する無機粒子の比は、代表的には、無機粒子に対するMBP - タンパク質の比より小さかった。

【0081】

得られたイオン性バイオ結合体を、IgGで官能化された樹脂を含むカラムに通過させて、約15分間にわたって反応させた。純粋な緩衝溶液によるカラムの洗浄は、無視できない量のイオン性バイオ結合体の放出を生じた。官能化されたカラムは、約95～98%のイオン性バイオ結合体を保持した。このカラム内に含まれるイオン性結合体の割合を、半導体粒子を示すルミネセンスについて、カラムからの流出をモニターすることによって決定した。これらの結果は、タンパク質G - ジッパー分子が、無機粒子に結合することを示す。

【0082】

本発明の実施形態の多くを記載してきた。それにもかかわらず、種々の改変が、本発明の精神および範囲から逸脱することなくなされ得ることが、理解される。従って、他の実施形態が、上記の特許請求の範囲内にある。

【図面の簡単な説明】

【図1】

図1は、本発明のイオン結合体の概略図である。

【図2】

図2A～2Bは、図1のイオン結合体の無機粒子の概略断面図である。

【図3A】

図3Aは、図1のイオン結合体の組換えタンパク質、融合タンパク質の概略図である。

【図3B】

図3Bは、図3Aの組換えタンパク質の表面から隆起するイオン化可能な連結基の図表である。

【図3C】

図3Cは、図1のイオン結合体の別の組換えタンパク質の概略図である。

【図4】

図4A～4Bは、図1に示したイオン結合体の詳細図である。

【図5】

図5は、CdSe-ZnS半導体粒子およびMBP-ジッパーでコーティングされたCdSe-ZnS半導体粒子を含む溶液の、吸光度および光ルミネセンススペクトルを含む。

【図6】

図6A～6Cは、MBP-ロイシンジッパー組換えタンパク質でコーティングされたCdSe-ZnSナノ粒子(a)；コーティングされていないCdSe-ZnSナノ粒子(b)；共有結合架橋剤EDACを用いてIgGでコーティングされたCdSe-ZnSナノ粒子(c)の薄膜溶液の断面図(各々、約15mmの厚さ)を示す。

【図7A】

図7Aは、静電的に結合したタンパク質の数の関数としての光ルミネセンスのグラフである。

【図7B】

図7Bは、pHの関数としての光ルミネセンスのグラフである。

種々の図面における同様の参照記号は、同様のエレメントを示すことに注意のこと。

【図1】

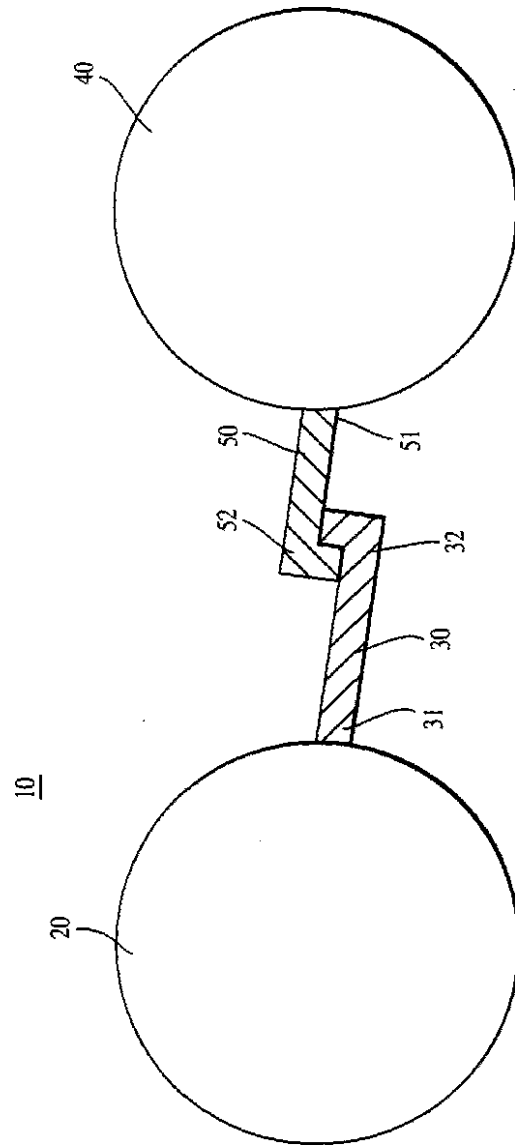


FIG. 1

【図2A】

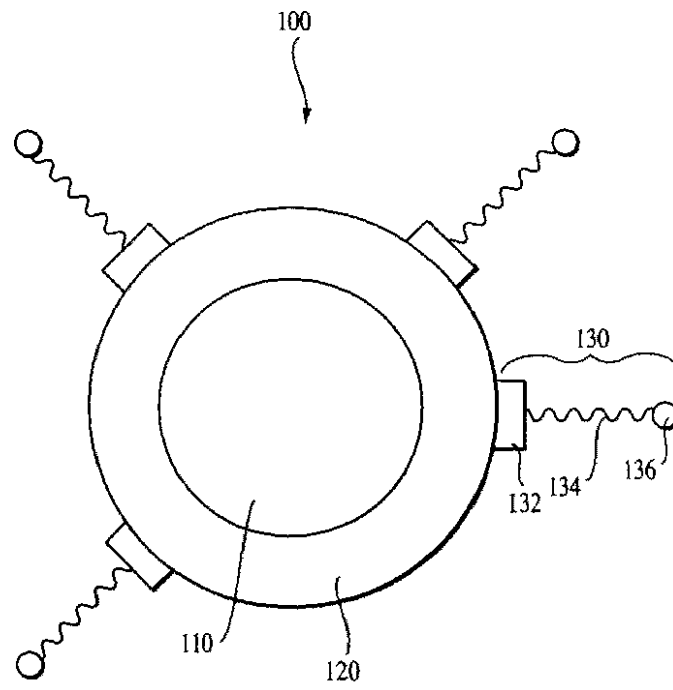


FIG. 2A

【図2B】

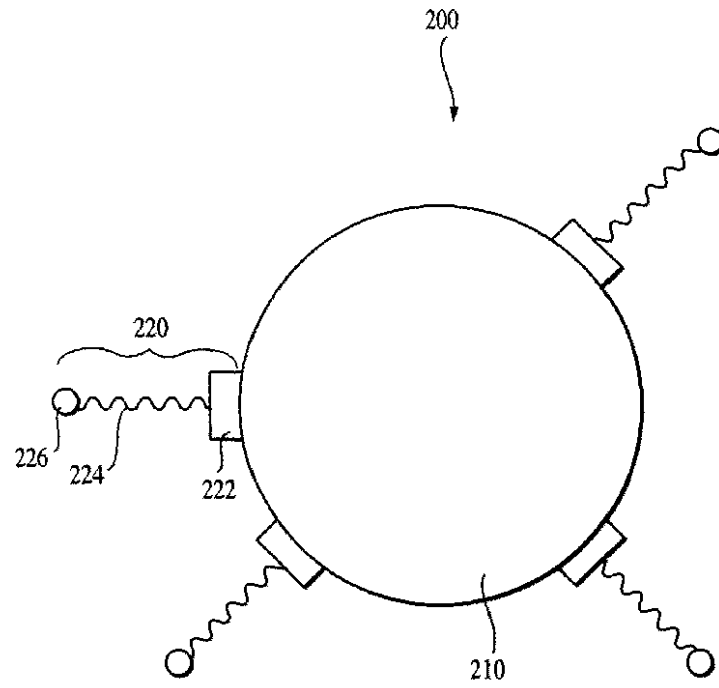


FIG. 2B

【図3A】

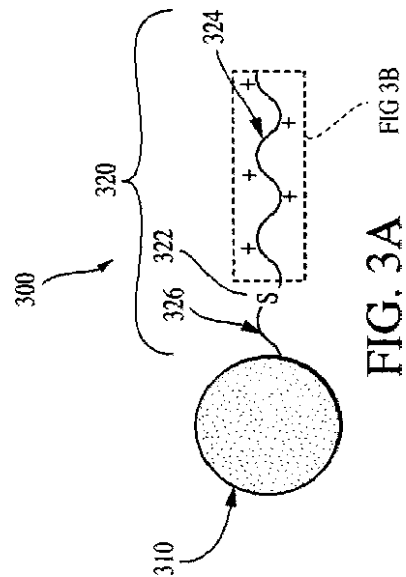


FIG. 3A

【図3B】

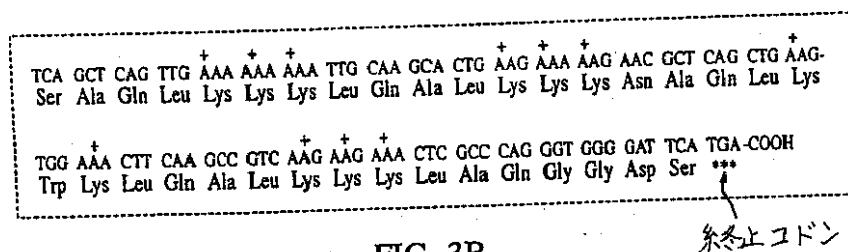


FIG. 3B

【図3C】

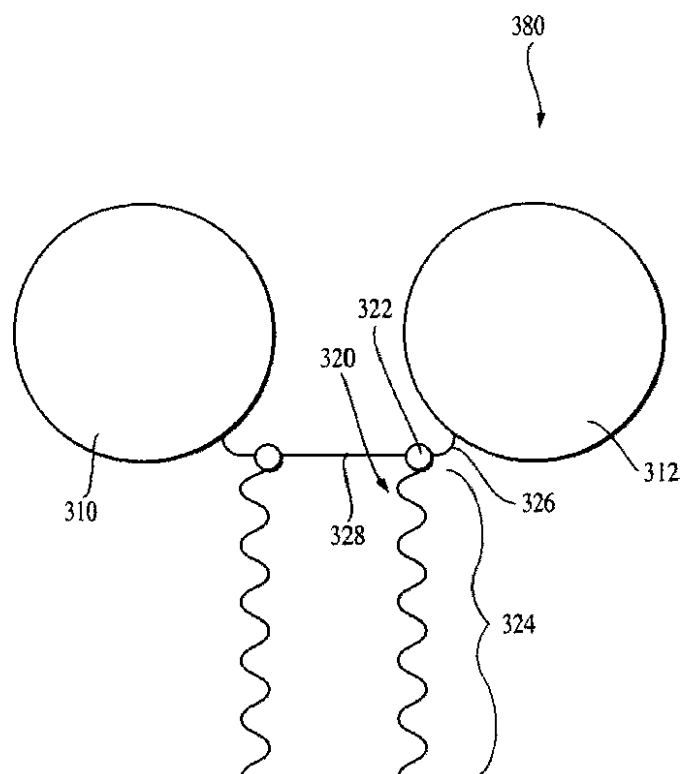


FIG. 3C

【図4A】

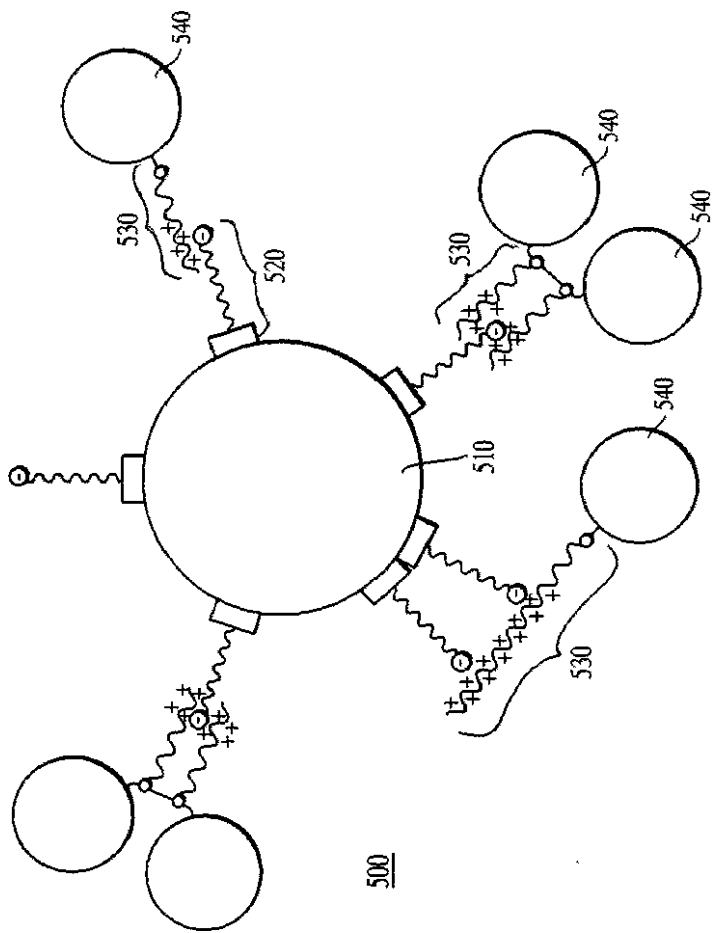


FIG. 4A

【図4B】

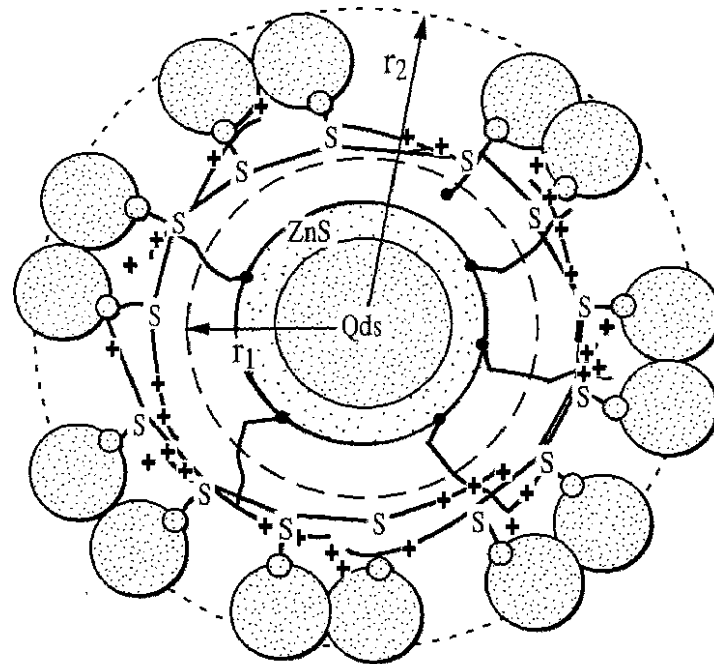


FIG. 4B

【図5】

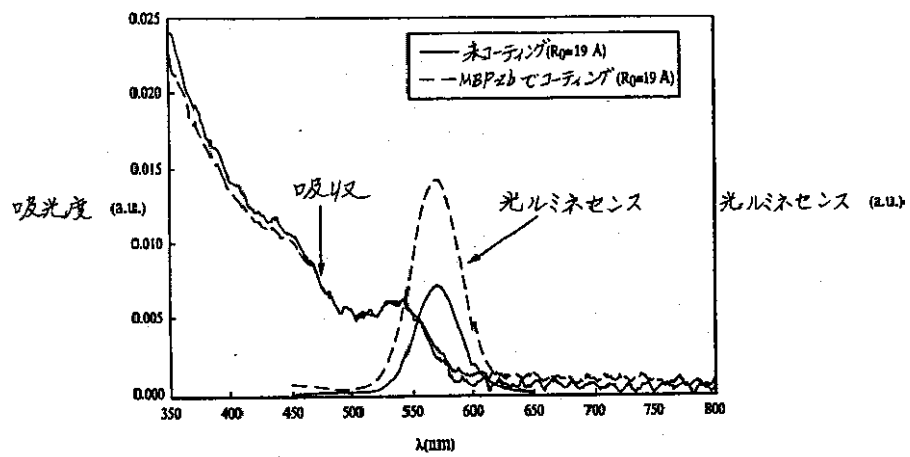
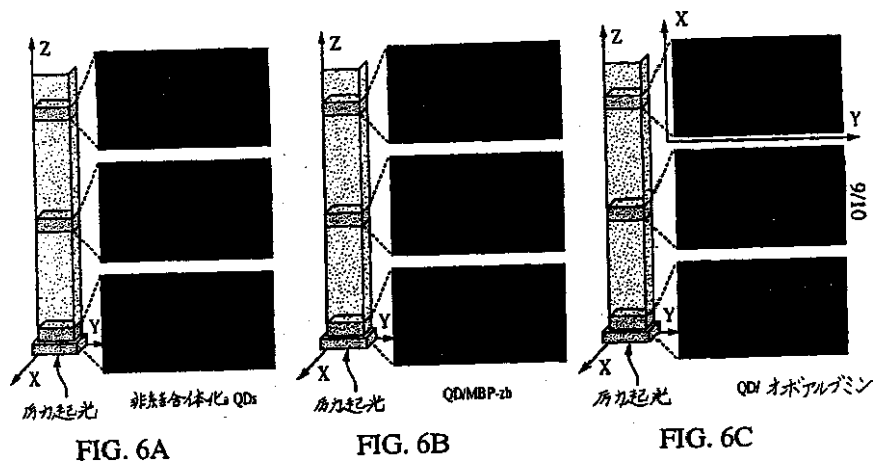
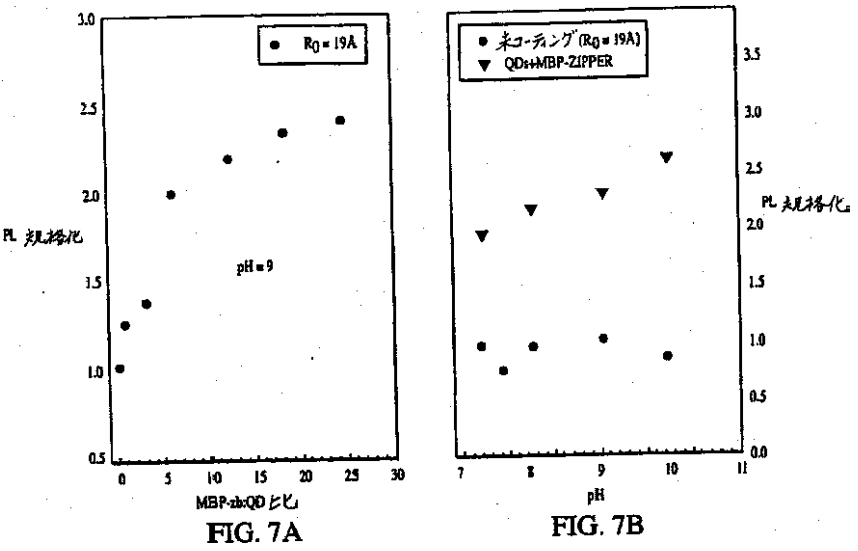


FIG. 5

【図6】



【図7】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

		Internal Application No PCT/US 01/08788
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 G01N33/551 G01N33/547 G01N33/58 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		
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		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 4 738 932 A (YABUSAKI KENICHI K) 19 April 1988 (1988-04-19)	1-45
Y	abstract claim 1	1-45
X	WO 94 11103 A (SMETHURST DIANE ELIZABETH ; WILLIAMS JOHN FRANCIS (GB); BRUCE IAN J) 26 May 1994 (1994-05-26)	1-45
Y	claims 1,6	1-45
Y	US 5 990 479 A (BRUCHEZ JR MARCEL ET AL) 23 November 1999 (1999-11-23) the whole document	1-45
	--- -/-	
☒ Further documents are listed in the continuation of box C. ☒ Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents : *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *I* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *&* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 28 May 2002		Date of mailing of the international search report 06/06/2002
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Pellegrini, P

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/US 01/08788

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category ^a	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, AMERICAN ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF SCIENCE,, US, vol. 281, 25 September 1998 (1998-09-25), pages 2016-2018, XP002125871 ISSN: 0036-8075 the whole document -----	1-45
Y	EP 0 990 903 A (MASSACHUSETTS INST TECHNOLOGY) 5 April 2000 (2000-04-05) the whole document -----	1-45

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/US 01/08788

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 4738932	A	19-04-1988	EP 0249627 A1	23-12-1987
			JP 63501902 T	28-07-1988
			WO 8703692 A1	18-06-1987
			ZA 8609137 A	26-08-1987
WO 9411103	A	26-05-1994	AU 5427394 A	08-06-1994
			EP 0621802 A1	02-11-1994
			WO 9411103 A1	26-05-1994
US 5990479	A	23-11-1999	US 6207392 B1	27-03-2001
EP 0990903	A	05-04-2000	US 6326144 B1	04-12-2001
			AU 6392399 A	10-04-2000
			EP 0990903 A1	05-04-2000
			EP 1116036 A1	18-07-2001
			GB 2342651 A, B	19-04-2000
			WO 0017103 A2	30-03-2000
			WO 0017655 A1	30-03-2000
			WO 0017642 A2	30-03-2000
			US 6306610 B1	23-10-2001
			US 2001023078 A1	20-09-2001

 フロントページの続き

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

(71)出願人 ネイベル リサーチ ラボラトリー
 アメリカ合衆国 ディストリクト オブ
 コロンビア 20375, ワシントン, コ
 ード 5611, オプティカル サイエンス
 デイビジョン

(72)発明者 マトウシ, ヘディ
 アメリカ合衆国 バージニア 22308,
 アレクサンドリア, アップル ヒル ロ
 ード 2304

(72)発明者 アンダーソン, ジョージ ピー.
 アメリカ合衆国 メリーランド 20706,
 ラナム, ウッドストリーム プレイス
 9904

(72)発明者 マウロ, ジェイ. マシュー
 アメリカ合衆国 メリーランド 20901,
 シルバー スプリング, マーカム ス
 トリート 10012

(72)発明者 バウエンディ, マウンジ ジー.
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ
 02116, ボストン, コモンウェルス
 アベニュー 263 ナンバー5

(72)発明者 サンダー, ビクラム シー.
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ
 02180, ストーンハム, メイン スト
 リート 555, スイート 104

专利名称(译)	无机粒子结合体		
公开(公告)号	JP2003528321A	公开(公告)日	2003-09-24
申请号	JP2001569490	申请日	2001-03-20
[标]申请(专利权)人(译)	麻省理工学院 奈伊贝尔实验室的研究		
申请(专利权)人(译)	麻省理工学院 Neiberu研究实验室		
[标]发明人	マトウシヘディ アンダーソングジョージピー マウロジェイマシュー パウエンディマウンジジー サンダービクラムシー		
发明人	マトウシ, ヘディ アンダーソン, ジョージ ピー. マウロ, ジェイ. マシュー パウエンディ, マウンジ ジー. サンダー, ビクラム シー.		
IPC分类号	G01N33/566 G01N33/53 G01N33/551 G01N33/58		
CPC分类号	B82Y15/00 G01N33/551 G01N33/588		
FI分类号	G01N33/566 G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/53.N		
优先权	60/190766 2000-03-20 US		
其他公开文献	JP4951184B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

离子共轭物包括与大分子静电结合的无机颗粒，这些大分子可以与给定的化学物种或生物学目标发生特异性相互作用。无机颗粒（例如半导体纳米晶体）提供了许多优点（例如，高的光学褪色阈值，良好的化学稳定性和易于使用），而在进行荧光标记时，有机小分子带来了许多问题。通过提供可调谐的光谱特性来提供解决方案。本发明提供了包含无机分子的组合物，通过提供包含具有远端和近端的连接基团的无机颗粒来形成离子缀合物的方法，检测溶液中给定物质的存在。方法，形成衍生自聚合物的改性无机颗粒和离子粘合剂的方法，具有核和外涂层的纳米颗粒以及与半导体纳米颗粒静电结合的重组蛋白。

