

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2023-524994
(P2023-524994A)

(43)公表日 令和5年6月14日(2023.6.14)

(51)国際特許分類	F I	テーマコード(参考)
C 0 8 F 257/02 (2006.01)	C 0 8 F 257/02	4 G 0 0 5
B 0 1 J 13/14 (2006.01)	B 0 1 J 13/14	4 J 0 2 6
G 0 1 N 33/531 (2006.01)	G 0 1 N 33/531	Z

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全47頁)

(21)出願番号	特願2022-567337(P2022-567337)	(71)出願人	522176470 エヌ・ラブ・テクノロジー・センター・ プライベート・リミテッド N - l a b T e c h n o l o g y C e n t e r P t e . L t d . シンガポール609917シンガポール 、ザ・シナジー、インターナショナル・ ビジネス・パーク1、ナンバービー1 - 20ビー
(86)(22)出願日	令和3年4月29日(2021.4.29)	(74)代理人	100145403 弁理士 山尾 憲人
(85)翻訳文提出日	令和4年12月26日(2022.12.26)	(74)代理人	100132263 弁理士 江間 晴彦
(86)国際出願番号	PCT/SG2021/050236	(72)発明者	ルオ, ホァ - クアン シンガポール138634シンガポール 最終頁に続く
(87)国際公開番号	WO2021/225519		
(87)国際公開日	令和3年11月11日(2021.11.11)		
(31)優先権主張番号	63/020,755		
(32)優先日	令和2年5月6日(2020.5.6)		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA ,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,A T,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR ,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC, 最終頁に続く		

(54)【発明の名称】 単分散超常磁性粒子およびその製造方法

(57)【要約】

コア - シェル構造を有する単分散超常磁性ビーズおよびその調製方法が、本明細書に開示される。

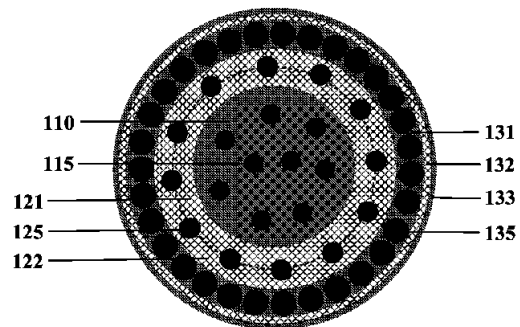


FIG. 12

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

コア - シェル構造を有する単分散超常磁性ビーズであって、前記ビーズは、ポリスチレン高分子マトリックス材料から形成されたコア部であって、前記ポリスチレン高分子マトリックス材料が第 1 のバッチの超常磁性 Fe_3O_4 ナノ粒子を封入するコア部；

前記コア部の頂部上に直接的に位置し、スチレンモノマー、架橋性モノマー、および官能基を有する第 1 の官能性モノマーから形成された架橋高分子マトリックス材料から形成された第 1 のシェル部であって、前記コポリマーマトリックス材料が第 2 のバッチの超常磁性 Fe_3O_4 ナノ粒子を封入する、第 1 のシェル部；ならびに

10

第 1 のシェル部の頂部上に直接的に位置した第 2 のシェル部を含み、前記第 2 のシェル部は、第 1 の層、第 2 の層および第 3 の層として形成され、前記第 1 の層が、超常磁性 Fe_3O_4 ナノ粒子ならびに、共役モノマーおよびバルクモノマーを含む第 1 の層高分子マトリックス材料を含み；

前記第 2 の層が、前記第 1 の層を越えて延在し、バルクモノマーを含む第 2 の層高分子材料から形成され；および

前記第 3 の層が、第 2 の層の頂部上にあり、バルクモノマー、および官能基を有する第 2 の官能性モノマーを含む第 3 の層高分子材料から形成され、

前記第 1 の層の超常磁性 Fe_3O_4 ナノ粒子が、前記第 1 のシェル部の外表面上に存在する官能基と直接的に結合し；

20

前記第 1 の層高分子マトリックス材料が、前記第 1 の層の超常磁性 Fe_3O_4 ナノ粒子を取り囲み；および

前記第 2 の層高分子マトリックス材料が、前記第 1 の層高分子マトリックス材料から延在し、各単分散超常磁性ビーズの外表面を形成する、単分散超常磁性ビーズ。

【請求項 2】

前記第 2 の層および第 3 の層の高分子マトリックス材料が、前記ビーズを溶媒に入れた場合に超常磁性磁性ナノ粒子が溶出するのを防止するように機能する、請求項 1 に記載のビーズ。

【請求項 3】

前記第 1 のシェル部および前記第 2 のシェル部の前記第 3 の層の官能性モノマー上の官能基が、独立して、アミノ、カルボキシル、エポキシ、およびヒドロキシルの 1 以上から独立して選択され、任意選択にて、前記第 1 のシェル部、および前記第 2 のシェル部の前記第 2 の層の官能性モノマー上の官能基が、独立して、ヒドロキシル基およびカルボキシル基の組合せ、またはアミノ基およびカルボキシル基の組合せから選択される、請求項 1 または請求項 2 に記載のビーズ。

30

【請求項 4】

前記ビーズが、15%未満、例えば、10%未満、例えば、5%未満のそれらの直径に基づく変動係数を有する、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 記載のビーズ。

【請求項 5】

前記ビーズが、2%以下のそれらの直径に基づく変動係数を有する請求項 4 に記載のビーズ。

40

【請求項 6】

前記ビーズが 0.2 ~ 5.0 μm 、例えば、0.5 ~ 4.0 μm の平均直径を有する、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 記載のビーズ。

【請求項 7】

前記ポリスチレン高分子マトリックス材料が、スチレン、スチレン誘導体、およびそれらのコポリマーよりなる群の 1 以上から形成され、任意選択で、前記スチレン誘導体が、4 - メチルスチレン、3 - メチルスチレン、および 4 - tert - ブチルスチレンよりなる群の 1 以上から選択される、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 記載のビーズ。

【請求項 8】

50

ビーズ中の超常磁性 Fe_3O_4 ナノ粒子のすべてが、各ビーズの全重量の 10 ~ 80 重量%、例えば、20 ~ 70 重量%、例えば、30 ~ 50 重量%を占めている、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 記載のビーズ。

【請求項 9】

(a) 第 1 のバッチの超常磁性 Fe_3O_4 ナノ粒子が、各ビーズの全重量の 0.1 ~ 5 重量%を占め；および/または

(b) 第 2 バッチの超常磁性 Fe_3O_4 ナノ粒子が、各ビーズの全重量の 0.5 ~ 10 重量%を占め；

(c) 第 2 のシェル部の第 1 の層中の超常磁性 Fe_3O_4 ナノ粒子が、各ビーズの全重量の 9.4 ~ 79.4 重量%、例えば、19.4 ~ 69.4 重量%、例えば、29.4 ~ 49.4 重量%を占める、請求項 8 に記載のビーズ。

10

【請求項 10】

前記架橋性モノマーが、ジビニルベンゼン、エチレングリコールジメチルアクリレート、ビスフェノール A ジメタクリレート、ブタンジオールジメタクリレート、トリシクロデカンジメタノールジアクリレート、ペンタエリスリトールトリアクリレート、トリプロピレングリコールジアクリレート、プロポキシ化ネオペンチルジアクリレート、ペンタエリスリトールトリアクリレート、ジトリメチロールプロパンテトラアクリレート、ジペンタエリスリトールペンタアクリレート、ジペンタエリスリトールペンタ/ヘキサアクリレート、トリプロピレンジアクリレート、トリメチロールプロパンエトキシレートトリアクリレート、トリメチロールプロパンプロポキシレートトリアクリレート、ジ(トリメチロールプロパン)テトラアクリレート、グリセロールプロポキシレートトリアクリレート、ペンタエリスリトールプロポキシレートトリアクリレート、ポリ(エチレングリコール)ジアクリレート、ポリ(プロピレングリコール)ジアクリレート、およびトリ(プロピレングリコール)ジアクリレートよりなる群から選択され、任意選択で、前記架橋性モノマーが、ジビニルベンゼン、エチレングリコールジメチルアクリレート、ビスフェノール A ジメタクリレート、および N, N' - メチレンビス(アクリルアミド)よりなる群の 1 以上から選択される、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 記載のビーズ。

20

【請求項 11】

前記第 1 の官能性モノマーが、アクリル酸、メタクリル酸、2 - カルボキシエチルアクリレート、アクリルアミド、メタクリルアミド、アシルアミン、(ヒドロキシエチル)メタクリレート、ヒドロキシプロピルメタクリレート、4 - ヒドロキシブチルアクリレート、グリシジルメタクリレート、アシルグリシジルエーテル、1, 2 - エポキシ - 5 - ヘキセン、無水マレイン酸、2 - ヒドロキシエチルメタクリレートおよび 2 - カルボキシエチルアクリレートオリゴマーよりなる群の 1 以上から選択される、請求項 1 ~ 10 のいずれか 1 記載のビーズ。

30

【請求項 12】

スチレンモノマーが、スチレン、およびスチレン誘導体よりなる群の 1 以上から選択され、任意選択で、スチレン誘導体が、4 - メチルスチレン、3 - メチルスチレン、および 4 - tert - ブチルスチレンよりなる群の 1 以上から選択される、請求項 1 ~ 11 のいずれか 1 記載のビーズ。

40

【請求項 13】

前記第 1 のシェルが、第 1 の高分子マトリックス組成物の第 1 の層および第 2 の高分子マトリックス組成物の第 2 の層をさらに含み、

前記第 1 の層が、スチレンモノマーと、架橋性モノマーとのコポリマーから形成され；および

前記第 2 の層が、スチレンモノマー、架橋性モノマーおよび官能性モノマーのコポリマーから形成される、請求項 1 ~ 12 のいずれか 1 記載のビーズ。

【請求項 14】

前記超常磁性 Fe_3O_4 ナノ粒子が、5 ~ 15 nm の平均直径を有する、請求項 1 ~ 13 のいずれか 1 記載のビーズ。

50

【請求項 15】

(a) 前記コア部および前記第 1 のシェル部におけるスチレン基 - 対 - 架橋基の重量 - 対 - 重量比が、20 : 1 ~ 1 : 2、例えば、10 : 1 ~ 1 : 1 であり、および / または

(b) 前記コア部および前記第 1 のシェル部におけるスチレン基 - 対 - 官能基の重量 - 対 - 重量比が、20 : 1 ~ 1 : 2、例えば、10 : 1 ~ 1 : 1 である、請求項 1 ~ 14 のいずれか 1 記載のビーズ。

【請求項 16】

前記 Fe_3O_4 ナノ粒子が、さらに Co_3O_4 および / または Mn_3O_4 ナノ粒子を含む、請求項 1 ~ 15 のいずれか 1 記載のビーズ。

【請求項 17】

前記共役モノマーが、メタクリロイルクロリド、3 - エトキシ - アクリロイルクロリド、アクリロイルクロリド、4 - ペンテノイルクロリド、無水メタクリル酸、無水 4 - ペンテン酸、無水クロトン酸、無水吉草酸、10 - ウンデセノイルクロリド、グリシドールメタクリレート、グリシドールおよびアリルグリシジルエーテルよりなる群の 1 以上から選択される、請求項 1 ~ 16 のいずれか 1 記載のビーズ。

【請求項 18】

前記バルクモノマーが、ポリエーテルモノマー、ポリエステルモノマー、ポリアクリルアミドモノマー、およびポリアシッドモノマーの 1 以上から選択され、任意選択で、前記バルクモノマーが、メタクリル酸メチル、アクリル酸、メタクリル酸、2 - カルボキシエチルアクリレート、2 - カルボキシエチルアクリレートオリゴマー、アクリルアミド、メタクリルアミド、アリルアミン、(ヒドロキシエチル)メタクリレート、ヒドロキシプロピルメタクリレート、4 - ヒドロキシブチルアクリレート、グリシジルメタクリレート、アリルグリシジルエーテル、1, 2 - エポキシ - 5 - ヘキセン、無水マレイン酸よりなる群の 1 以上から選択され、任意選択で、バルクモノマーが、メタクリル酸および / または 2 - ヒドロキシエチルメタクリレートから選択される、請求項 1 ~ 17 のいずれか 1 記載のビーズ。

【請求項 19】

前記第 2 の官能性モノマーが、アクリル酸、メタクリル酸、2 - カルボキシエチルアクリレート、アクリルアミド、メタクリルアミド、アリルアミン、(ヒドロキシエチル)メタクリレート、ヒドロキシプロピルメタクリレート、4 - ヒドロキシブチルアクリレート、グリシジルメタクリレート、アリルグリシジルエーテル、1, 2 - エポキシ - 5 - ヘキセン、無水マレイン酸、2 - ヒドロキシエチルメタクリレートおよび 2 - カルボキシエチルアクリレートオリゴマーよりなる群の 1 以上よりなる群の 1 以上から選択される、請求項 1 ~ 18 のいずれか 1 記載のビーズ。

【請求項 20】

前記第 2 のシェル部が、前記第 1 および / または第 2 および / または第 3 の層中に架橋性モノマーをさらに含み、任意選択で、前記架橋性モノマーが、ジビニルベンゼン、エチレングリコールジメチルアクリレート、ビスフェノール A ジメタクリレート、N, N' - メチレンビス(アクリルアミド)、ビスフェノール A エポキシアクリレート、ビスフェノールジアクリレート、トリプロピレングリコールジアクリレート、プロポキシ化ネオペンチルジアクリレート、プロポキシ化グリセロールジアクリレート、ペンタエリスリトールプロポキシレートトリアクリレート、ブタンジオールジメタクリレート、トリシクロデカンジメタノールジアクリレート、ペンタエリスリトールトリアクリレート、ジトリメチロールプロパンテトラアクリレート、ジペンタエリスリトールペンタ / ヘキサアクリレート、トリプロピレンジアクリレート、トリメチロールプロパンエトキシレートトリアクリレート、トリメチロールプロパンプロポキシレートトリアクリレート、ジ(トリメチロールプロパン)テトラアクリレート、グリセロールプロポキシレートトリアクリレート、ポリ(プロピレングリコール)ジアクリレート、ポリ(プロピレングリコール)ジアクリレート、およびトリ(プロピレングリコール)ジアクリレートよりなる群の 1 以上から選択され、例えば、前記架橋性モノマーが、ジビニルベンゼン、エチレングリコールジメチ

10

20

30

40

50

ルアクリレート、ビスフェノール A ジメタクリレートおよび N, N' - メチレンビス (アクリルアミド) よりなる群の 1 以上から選択される、請求項 1 ~ 19 のいずれか 1 記載のビーズ。

【請求項 2 1】

前記第 2 のシェルの第 2 の層および第 3 の層の組合せ重量が、各ビーズの全重量の 1 ~ 30 重量%、好ましくは 2 ~ 20 重量% を占める、請求項 1 ~ 20 のいずれか 1 記載の超常磁性ビーズ。

【請求項 2 2】

コア - シェル構造を有する、単分散超常磁性ビーズを調製する方法であって、

(a) ポリスチレン高分子マトリックス材料から形成されたコア部を含む、単分散超常磁性前駆体ビーズを提供すること、前記ポリスチレン高分子マトリックス材料が第 1 のバッチの超常磁性 Fe_3O_4 ナノ粒子を封入し;

10

前記コア部の頂部上に直接的に位置し、スチレンモノマー、架橋性モノマー、および官能基を有する第 1 の官能性モノマーから形成された架橋高分子マトリックス材料から形成された第 1 のシェル部であって、前記コポリマーマトリックス材料が第 2 のバッチの超常磁性 Fe_3O_4 ナノ粒子を封入する、第 1 のシェル部; および

前記第 1 のシェル部の頂部上に直接的に位置する第 2 のシェル部であって、超常磁性 Fe_3O_4 ナノ粒子および高分子前駆体アンカーポイントを含み、その双方は前記第 1 のシェル部の表面上の官能基に結合する、第 2 のシェル部; ならびに

(b) 単分散超常磁性前駆体ビーズ上に、ワンポットフリーラジカル重合によって機能性コーティング層を形成すること、

20

(i) 第 1 のステップにおいて、バルクモノマーを使用し; および

(i i) 第 2 のステップにおいて、官能基を有する第 2 の官能性モノマーを用いて単分散超常磁性ビーズを形成し、

前記機能性コーティング層が、高分子前駆体アンカーポイントにより第 1 のシェル部に結合する、ことを含む、方法。

【請求項 2 3】

前記バルクモノマーが、ポリエーテルモノマー、ポリエステルモノマー、ポリアクリルアミドモノマー、およびポリアシッドモノマーよりなる群の 1 以上から選択される、請求項 2 2 に記載の方法。

30

【請求項 2 4】

前記バルクモノマーが、メタクリル酸メチル、アクリル酸、メタクリル酸、2 - カルボキシエチルアクリレート、2 - カルボキシエチルアクリレートオリゴマー、アクリルアミド、メタクリルアミド、アシルアミン、(ヒドロキシエチル)メタクリレート、ヒドロキシプロピルメタクリレート、4 - ヒドロキシブチルアクリレート、グリシジルメタクリレート、アシルグリシジルエーテル、1, 2 - エポキシ - 5 - ヘキセン、無水マレイン酸よりなる群の 1 以上から選択され、任意選択で、前記バルクモノマーが、メタクリル酸および/または 2 - ヒドロキシエチルメタクリレートから選択される、請求項 2 3 に記載の方法。

【請求項 2 5】

40

前記第 1 のステップが、前記バルクモノマーおよび開始剤を含む混合物を使用し、任意選択で、前記開始剤が、ターシャリ - アミルヒドロペルオキシド、過硫酸カリウム、過硫酸ナトリウム、過硫酸アンモニア、4, 4' - アゾビス (4 - シアノ吉草酸)、2, 2' - アゾビス [2 - メチル - N - (2 - ヒドロキシエチル) プロピオンアミド、2, 2' - アゾビス [N - (2 - カルボキシエチル) - 2 - メチルプロピオンアミジン] 水和物、2, 2' - アゾビス (2 - メチルプロピオンアミジン) 二塩酸塩、2, 2' - アゾビス [2 - (2 - イミダゾリン - 2 - イル) プロパン]、および 2, 2' - アゾビス [2 - (2 - イミダゾリン - 2 - イル) プロパン] 二塩酸塩よりなる群の 1 以上から選択される、請求項 2 2 ~ 2 4 のいずれか 1 記載の方法。

【請求項 2 6】

50

前記第 1 のステップにおける混合物が、さらに、

(a) 架橋剤、任意選択で、前記架橋剤が、ジビニルベンゼン、エチレングリコールジメチルアクリレート、ビスフェノール A ジメタクリレート、N , N ' - メチレンビス (アクリルアミド)、ビスフェノール A エポキシアクリレート、ビスフェノールジアクリレート、トリプロピレングリコールジアクリレート、プロポキシ化ネオペンチルジアクリレート、プロポキシ化グリセロールジアクリレート、ペンタエリスリトールプロポキシレートトリアクリレート、ブタンジオールジメタクリレート、トリシクロデカンジメタノールジアクリレート、ペンタエリスリトールトリアクリレート、ジトリメチロールプロパンテトラアクリレート、ジペンタエリスリトールペンタ / ヘキサアクリレート、トリプロピレンジアクリレート、トリメチロールプロパンエトキシレートトリアクリレート、トリメチロールプロパンプロポキシレートトリアクリレート、ジ (トリメチロールプロパン) テトラアクリレート、グリセロールプロポキシレートトリアクリレート、ポリ (エチレングリコール) ジアクリレート、ポリ (プロピレングリコール) ジアクリレート、およびトリ (プロピレングリコール) ジアクリレートよりなる群の 1 以上から選択され、例えば、前記架橋性モノマーが、ジビニルベンゼン、エチレングリコールジメチルアクリレート、ビスフェノール A ジメタクリレート、および N , N ' - メチレンビス (アクリルアミド) よりなる群の 1 以上から選択され、および / または

(b) 溶媒、任意選択で、前記溶媒が、1 , 4 - ジオキサン、テトラヒドロフラン、ジグリム、酢酸エチル、酢酸ブチル、アセトン、メチルエチルケトン、および水よりなる群の 1 以上から選択される、

を含む、請求項 25 に記載の方法。

【請求項 27】

前記第 2 の官能性モノマーが、アクリル酸、メタクリル酸、2 - カルボキシエチルアクリレート、アクリルアミド、メタクリルアミド、アリルアミン、(ヒドロキシエチル) メタクリレート、ヒドロキシプロピルメタクリレート、4 - ヒドロキシブチルアクリレート、グリシジルメタクリレート、アリルグリシジルエーテル、1 , 2 - エポキシ - 5 - ヘキセン、無水マレイン酸、2 - ヒドロキシエチルメタクリレートおよび 2 - カルボキシエチルアクリレートオリゴマーよりなる群の 1 以上から選択される、請求項 22 ~ 26 のいずれか 1 記載の方法。

【請求項 28】

(a) 第 1 のステップおよび / または第 2 のステップの重合が、30 ~ 80 、例えば、50 ~ 70 の温度で行われ；および / または

(b) 第 1 のステップおよび第 2 のステップの総重合時間が 10 時間 ~ 30 時間、例えば、16 時間 ~ 24 時間である、請求項 22 ~ 27 のいずれか 1 記載の方法。

【請求項 29】

前記単分散超常磁性前駆体ビーズが、

(i) ネイキッド単分散超常磁性ビーズを提供すること、前記ビーズが、

ポリスチレン高分子マトリックス材料から形成されたコア部であって、前記ポリスチレン高分子マトリックス材料が第 1 のバッチの超常磁性 Fe_3O_4 ナノ粒子を封入する、コア部；

コア部の頂部上に直接的に位置し、スチレンモノマー、架橋性モノマー、および官能基を有する第 1 の官能性モノマーから形成された架橋高分子マトリックス材料から形成された第 1 のシェル部であって、前記コポリマーマトリックス材料が第 2 のバッチの超常磁性 Fe_3O_4 ナノ粒子を封入する、第 1 のシェル部；および

前記第 1 のシェル部の頂部上に直接的に位置する第 2 のシェル部であって、前記第 1 のシェル部の表面上の官能基に結合する超常磁性 Fe_3O_4 ナノ粒子を含む、第 2 のシェル部を含み；ならびに

(i i) 前記ネイキッド単分散超常磁性ビーズを、メタクリロイルクロリド、3 - エトキシ - アクリロイルクロリド、アクリロイルクロリド、4 - ペンテノイルクロリド、無水メタクリル酸、無水 4 - ペンテン酸、無水クロトン酸、無水吉草酸、10 - ウンデセノイ

10

20

30

40

50

ルクロリド、グリシドールメタクリレート、グリシドールおよびアリルグリシジルエーテルよりなる群の1以上から選択されるアンカー材料と反応させることにより、前記第1のシェル部上で高分子前駆アンカーポイントを形成させることにより、単分散超常磁性前駆体ビーズを形成することを含むプロセスにより形成される、請求項22～28のいずれか1記載の方法。

【請求項30】

前記ネイキッド単分散超常磁性ビーズが、

(a i) 単分散ビーズを提供すること、前記単分散ビーズが、ポリスチレン高分子マトリックス材料から形成されたコア部；および

前記コア部の頂部上に直接的に位置し、スチレンモノマー、架橋性モノマー、および官能基を有する第1の官能性モノマーから形成された架橋高分子マトリックス材料から形成された第1のシェル部を含み；ならびに

(a i i) 前記単分散ビーズを、 $Fe(III)$ 塩および $Fe(II)$ 塩を含む溶液に入れ、塩基を加えることによって、前記ネイキッド単分散超常磁性ビーズを形成すること

を含むプロセスによって形成される、請求項29に記載の方法。

【請求項31】

(a) 前記鉄(III)塩が、 $FeCl_3$ および/または $Fe_2(SO_4)_3$ から選択される；および/または

(b) 前記鉄(II)塩が、 $FeCl_2$ 、 $FeSO_4$ 、 $Fe(OAC)_2$ よりなる群の1以上から選択される；および/または

(c) 前記塩基が、水酸化アンモニア、 $NaOH$ 、 KOH 、およびアミンよりなる群の1以上から選択される；および/または

(d) 前記溶液が、 $CoCl_2$ および/または $MnCl_2$ をさらに含む、

請求項30に記載の方法。

【請求項32】

前記単分散ビーズが、「ワンポット3段階」連続プロセスによって形成され、このプロセスが、

(a) 第1の段階において、水とアルコールとの混合物中でスチレンモノマーを開始剤およびポリマー安定剤で分散重合することによりポリスチレンコアを生成して、核となるポリスチレンコアを形成する；

(b) 第2の段階において、核形成されたポリスチレンコアを含む混合物に架橋性モノマーを加える；および

(c) 第3の段階において、前記第2の段階から得られた材料に第1の官能性モノマーを加えて単分散ビーズを提供し、任意選択で、ポリスチレンビーズはインサイツにて生成され、架橋剤および官能性モノマーの引き続いての添加が、第2の核生成を起こさないため、表面上に官能基を担う(スチレン/架橋剤/官能性モノマー)の球状単分散コポリマービーズに導く、

ことを含む、請求項30または請求項31に記載の方法。

【請求項33】

(a) 前記開始剤が、アゾ開始剤から選択され、任意選択で、前記アゾ開始剤が、2, 2'-アゾビス(2-メチルプロピオニトリル)(AIBN)、および2, 2'-アゾビス(2-メチルブチロニトリル)(AMBN)よりなる群の1以上から選択され；および/または

(b) 前記ポリマー安定剤が、ポリ(ビニルピロリドン)(PVP)、ポリエチレンイミン(PEI)、ポリアクリル酸(PAA)、ポリビニルアルコール(PVA)、ヒドロキシプロピルメチルセルロース(HPC)およびキトサンよりなる群の1以上から選択され；および/または

(c) 前記スチレンモノマーが、スチレン、およびスチレン誘導体よりなる群の1以上から選択され、任意選択で、スチレン誘導体が、4-メチルスチレン、3-メチルスチレ

10

20

30

40

50

ン、および 4 - t e r t - ブチルスチレンよりなる群の 1 以上から選択され；および/または

(d) 前記アルコールが、メタノール、エタノール、イソプロパノール、またはそれらの混合物よりなる群の 1 以上から選択され；および/または

(e) アルコール - 対 - 水の体積比が、1 : 1 ~ 40 : 1、例えば、2 : 1 ~ 20 : 1 である、請求項 3 2 に記載の方法。

【請求項 3 4】

前記架橋性モノマーが、ジビニルベンゼン、エチレングリコールジメチルアクリレート、ビスフェノール A ジメタクリレート、ブタンジオールジメタクリレート、トリシクロデカンジメタノールジアクリレート、ペンタエリスリトールトリアクリレート、トリプロピレングリコールジアクリレート、プロポキシ化ネオペンチルジアクリレート、ペンタエリスリトールトリアクリレート、ジトリメチロールプロパンテトラアクリレート、ジペンタエリスリトールペンタアクリレート、ジペンタエリスリトールペンタノヘキサアクリレート、トリプロピレンジアクリレート、トリメチロールプロパンエトキシレートトリアクリレート、トリメチロールプロパンプロポキシレートトリアクリレート、ジ(トリメチロールプロパン)テトラアクリレート、グリセロールプロポキシレートトリアクリレート、ペンタエリスリトールプロポキシレートトリアクリレート、ポリ(エチレングリコール)ジアクリレート、ポリ(プロピレングリコール)ジアクリレート、およびトリ(プロピレングリコール)ジアクリレートよりなる群の 1 以上から選択され、任意選択で、前記架橋性モノマーが、ジビニルベンゼン、エチレングリコールジメチルアクリレート、ビスフェノール A ジメタクリレート、および N , N ' - メチレンビス(アクリルアミド)よりなる群の 1 以上から選択される、請求項 3 2 または請求項 3 3 に記載の方法。

10

20

【請求項 3 5】

前記第 1 の官能性モノマー上の官能基が、独立して、アミノ、カルボキシル、エポキシ、およびヒドロキシルの 1 つ以上から選択され、任意選択で、第 1 のシェル部、および第 2 のシェル部の第 2 の層の官能性モノマー上の官能基が、独立して、ヒドロキシル基およびカルボキシル基の組合せ、またはアミノ基およびカルボキシル基の組合せから選択される、請求項 3 2 ~ 3 4 のいずれか 1 記載の方法。

【請求項 3 6】

前記第 1 の官能性モノマーが、アクリル酸、メタクリル酸、2 - カルボキシエチルアクリレート、アクリルアミド、メタクリルアミド、ア릴アミン、(ヒドロキシエチル)メタクリレート、ヒドロキシプロピルメタクリレート、4 - ヒドロキシブチルアクリレート、グリシジルメタクリレート、アリルグリシジリエーテル、1, 2 - エポキシ - 5 - ヘキセン、無水マレイン酸、2 - ヒドロキシエチルメタクリレートおよび 2 - カルボキシエチルアクリレートオリゴマーよりなる群の 1 以上から選択される、請求項 3 5 に記載の方法。

30

【請求項 3 7】

前記スチレンモノマー - 対 - 前記架橋剤の重量比が、20 : 1 ~ 1 : 2、例えば、10 : 1 ~ 1 : 1 である、請求項 3 2 ~ 3 6 のいずれか 1 記載の方法。

【請求項 3 8】

前記スチレンモノマー - 対 - 前記第 1 の官能性モノマーの重量比が、20 : 1 ~ 1 : 2、好ましくは 10 : 1 ~ 1 : 1 である、請求項 3 2 ~ 3 7 のいずれか 1 記載の方法。

40

【請求項 3 9】

前記合成されたままの単分散ビーズが、引き続いてのプロセスステップで使用する前に 1 つ以上の溶媒で洗浄され、任意選択で、前記溶媒が、水、メタノール、エタノール、イソプロパノール、および THF よりなる群の 1 以上から選択される、請求項 3 2 ~ 3 7 のいずれか 1 記載の方法。

【請求項 4 0】

得られる単分散超常磁性ビーズが：

(a) 15 % 未満、例えば、10 % 未満、例えば、5 % 未満、例えば、2 % 以下のそれ

50

らの直径に基づく変動係数；および/または

(b) 0.2 ~ 5.0 ミクロン、例えば、0.5 ~ 4.0 ミクロンの平均直径、を有する、請求項 22 ~ 39 のいずれか 1 記載の方法。

【請求項 41】

これらのビーズが IVD アッセイにおいて適用される、請求項 1 ~ 21 のいずれか 1 記載の超常磁性ビーズ。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(発明の分野)

本発明は、体外診断（または、インビトロ診断：in-vitro diagnostic）アッセイおよび他の適用に有用な単分散超常磁性ビーズならびに前記ビーズの製造方法に関する。

【背景技術】

【0002】

(背景)

単分散超常磁性ビーズは、体外診断（IVD）およびバイオテクノロジー分野で広く使用されている。例えば、化学発光アッセイにおいて、単分散超常磁性ビーズを適用して、磁気タグを付けた抗体または抗原を介して試料中に存在する抗原または抗体の量を定量する。また、単分散超常磁性ビーズは、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）前の核酸（DNA および RNA）抽出用診断キットに一般的に使用される材料である。自動化プロセスに容易に適應されるこれらのビーズは、世界中で 25,000 台を超えるルーチン IVD 装置に使用されている。また、単分散超常磁性ビーズは、抗体精製および、広範囲の特定の哺乳動物細胞、バクテリア、ウイルス、細胞内小器官、個々のタンパク質の分離（または、単離；isolation）にも使用されている。単分散超常磁性ビーズは、その超常磁性特性およびその表面上の親和性基（例えば、ストレプトアビジン）で富化する能力のため、抗体の精製および分離の強力なツールである。分離の典型的な手順は、単分散超常磁性ビーズの懸濁液と標的分子（例えば、ビオチン標識抗体）または細胞を含む溶液とを混合することを含む。インキュベーション期間後、標的は親和性リガンドに結合し、次いで、強力な磁石を用いて、磁性ビーズおよびそれらの捕捉された標的分子または細胞を捕捉する。次いで、未結合物質または不純物は、吸引により除去し、結合した物質を下流の適用のために洗浄する。IVD およびバイオテクノロジー分野の急速な発展を支援するそれらの能力のため、単分散超常磁性ビーズは近年大きな注目を集めている。

【0003】

単分散磁性ビーズは、磁性粒子および高分子材料（複数可）の組合せである。ビーズは、これらの成分により固有に提供される特性の組合せから利益を得る。（磁性粒子から生起する）ビーズの磁性特性（または、磁気特性）は、外部磁場の印加により、ビーズの迅速かつ容易な分離を可能にする。高分子材料（複数可）は、磁性粒子を安定化させ、ビーズの密度を低下させ、様々な流体緩衝液中でのビーズのより良好な分散性を提供し、粒子に官能基を付与し、これらの官能基を介して活性部位の付着を通して免疫測定法、核酸配列、細胞および微生物などの分離における望ましい適用を可能にするために使用できる。これらのビーズの適用およびその機能化のレビューについては、European Polymer Journal 2011, 47, 542 - 559 を参照されたい。

【0004】

単分散超常磁性ビーズ（典型的には、直径 1 ~ 5 ミクロン）は、体外診断（IVD）適用の強力なツールとして一般的に使用されている（これらの適用を論じたレビュー文献につき同文献をご参照）。サイズ、形状および表面積の良好な均一性は、生体系での再現性に非常に重要であり、分離プロセス中の化学的凝集を最小化する。かくして、超常磁性特性を有する単分散ポリマービーズの発見は、この 10 年間で IVD 産業をグローバルにかなり促進し、今後 10 年間もこの産業は急速に成長を続けると予想される。

【0005】

10

20

30

40

50

磁性（または、磁気）ビーズは通常、3つのタイプの異なる構造を有する（図1、タイプI～III）。タイプIの構造は、高分子材料マトリックス全体に分布した磁性ナノ粒子（NP）を有し、タイプIIの構造は、ビーズの表面上に磁性NPで形成されたシェルを持ち、高分子コアを持つコア-シェル構造を有し、タイプIIIの構造は、磁性NPを含むコアを持つ高分子シェルを有する。加えて、タイプIIIの構造は、一般的に磁性コアが余りにも大きく、磁性NPが互いに干渉し、それによってビーズの超常磁性特性が低下し得るため、貧弱な超常磁性特性を有する傾向があることが注目される。しかしながら、これらのデザインのうち1つを選択するだけでは、超常磁性特性は得られない。最適な超常磁性特性を得るためには、ビーズに5～15nmのサイズの磁性NPを担持させる必要がある。かくして、図1に示したタイプI～IIIの複合ビーズは、磁性NPがこのサイズ範囲に入る場合に、まさに超常磁性になるであろう。

【0006】

前述のタイプIデザインを達成するために、後述される2つの合成戦略が存在する。

【0007】

第1の戦略は、超常磁性 Fe_3O_4 NPを合成し、次いで、これをスチレンの乳化重合系に分散させ、NPをポリスチレンビーズに封入することである[例えば、米国特許出願公開第2009/0092837号, Journal of Applied Polymer Science 2013, DOI: 10.1002/APP.[38857(1726-1733)、Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry, 2007, 45, 5285-5295を参照]。しかしながら、この合成戦略には2つの課題を有する。第1の課題は、通常100～200nmの小さな直径を有する超常磁性ポリスチレンビーズのみが生成できることであり、これはIVD適用について余りにも小さい。第2の課題は、超常磁性 Fe_3O_4 NPがポリスチレンビーズ全体に均一に分布せず、かくして、種々のビーズが、異なる数の超常磁性 Fe_3O_4 NPを含有することである。その結果、磁性球の磁気応答は広い分布を有することになり、これはIVD適用には望ましくない。加えて、スチレンエマルジョン重合の性質のため、この2つの課題を克服することはこれまで不可能であった。また、同様の封入戦略は、タイプIII磁性ビーズを調製するために適用されている。

【0008】

タイプI単分散超常磁性ビーズを合成するための第2の戦略は、まず超常磁性NPのキャリアとして単分散ポリマービーズを合成し、次いで、超常磁性 Fe_3O_4 NPをアップロードすることである。この合成戦略において、第1のステップは、少なくとも3つの要件：

(1) ポリマービーズが、再現性のある直径、例えば、1.0ミクロンを持つ高度に単分散であること；

(2) ポリマービーズが架橋され、かくして、良好な剛性および有機溶媒に対する耐性を有すること；および

(3) ポリマービーズを機能化して、超常磁性 Fe_3O_4 ナノ粒子のオンサイト(on-site)生成を促進させること

を満たす高度単分散ポリマービーズを合成することである。

【0009】

上記の要件を実現するために、最先端の合成技術において、複雑でかつ高価な手順が用いられている。例えば、米国特許出願公開第2017/0218095号(Ugelstadプロセス)は、超常磁性ポリマービーズの製造に使用される多孔質な機能化ポリスチレンビーズを製造する3ステップの手順を開示している。第1のステップは、乳化重合を介する低分子量のポリスチレンシードの合成である。界面活性剤としてドデシル硫酸ナトリウム(SDS)、開始剤として過硫酸アンモニウム(APS)、イオン強度を高めるためにホウ砂を使用した。スチレンを10重量%水酸化ナトリウムで抽出し、スチレンの重合を阻害しかねない安定剤(4-tert-ブチルカテコール)を除去した。得られた単分散ポリスチレンシード粒子は、50～200nmの範囲の直径を有する。第2のステ

ップは、活性な膨潤および架橋である。ポリスチレンシードは、ジオクタノイルペルオキシド、S D Sおよびアセトンを含む開始剤エマルジョンを用いて、25 で24時間膨潤させた。次いで、膨潤したシードをトルエン、D V B、スチレン、P V P、S D Sおよび水を含むモノマーエマルジョンと混合し、温度を60 に上げて架橋重合を開始し、2時間実行して、多孔質の架橋されたポリスチレンビーズを得た。第3のステップは、ビーズ中のフェニル環を硫酸および硝酸(65%)の混合物でニトロ化し、これらのポリスチレン球にNO₂基を導入することにより、多孔質の架橋されたビーズを機能化することである(米国特許第4,654,267号明細書)。ニトロ化したビーズは、アンモニア(25%)および硫酸鉄(II)七水和物で引き続いての磁化工程に使用される。著者らは、第3のステップにおける鉄含有量を増加させるために、第2のステップにおいて種々のモノマーを用いることにより、種々の官能基を導入する、多数の方法を示した。しかしながら、すべてのオプションで磁性含有量は15%未満である。鉄含有量を15%を超えるまで改善するための唯一の現実的な方法は、窒化プロセスを用いて、窒化ビーズを生成することである。この合成戦略の問題は、制御性の高い多孔質ポリスチレン担体を生成するための煩雑な操作で、時間がかかることである。最も重要なことは、5g毎の乾燥粒子をニトロ化するために、濃硝酸と125mLの濃硫酸との混合物を必要とすることである。かくして、そのプロセスは、酸化性および腐食性の双方である濃厚な酸の大量消費を必要とし、これは、深刻な環境問題を引き起こすであろう。加えて、このプロセスをスケールアップするためには、厳重なリアクターおよびプロセス制御も必要とするであろう。

10

20

30

40

50

【0010】

タイプII設計は、直径1.5μmを有する非磁性核粒子を製造する方法を開示する米国特許第7,713,627号明細書のプロトコルを用いて得ることができる。第1に、ジ(3,5,5-トリメチルヘキサノイル)パーオキシドおよびS D Sを含む乳化系において、直径0.77μmのポリスチレンビーズをシードとして用いて、75、8時間、D V Bとのスチレンのビーズ乳化重合で、一次大型ポリスチレンビーズを生成した。次いで、生成した一次ビーズを遠心により分離し、水で洗浄し、乾燥し、粉碎して平均粒子径1.5ミクロンの非磁性核粒子を得、次いで、これを用いて、疎水化表面を持つフェライト型微細磁性材料粒子(平均一次粒子径:0.01μm)を担持することにより磁性ビーズを生成した。磁性NPは、疎水性相互作用を介して球体の表面に付着ようになる。このプロセスの欠点は、(1)第2のステップ(粉碎プロセス)は高度単分散ビーズを与えなく、ビーズが球形を有さないかもしれない;(2)この特許に示された最小のビーズは、1.5μm直径であり;1.0μm以下の直径を有する、より小さなビーズを生成することが難しいようである;および(3)磁性NPはビーズの表面上に単に付着する。したがって、ビーズの外表面積は限られており、ポリマーのコア直径によって決定されるため、高い磁性または鉄分を達成することは難しいであろう。

【0011】

なお、架橋ポリ(スチレン-D V B)ビーズは、ワンポット二段重合プロセスにより生成することができる。第1の段階において、ポリスチレンビーズをインサイツ(または、反応混合物中において:in-situ)で形成し、次いで、D V Bを添加してコア-シェル構造を形成する。かかるワンポット二段重合は、乳化重合系または分散重合系において実施することができる。界面活性剤としてスチレンスルホン酸ナトリウムおよび開始剤としてK P Sを用いる乳化スチレン重合系において、得られたポリマービーズは、約200nmの直径を有する(Petroleum Science, 2008, 5, 375-378)。他方、エタノール中で安定剤としてP V Pおよび開始剤としてA I B Nを用いる分散型スチレン重合系について、得られたポリマービーズは約2.3μmの直径を有する(Journal of Applied Polymer Science, 2010, 115, 3092-3102)。ビーズのサイズの違いにかかわらず、双方の場合において、得られたポリスチレン-D V Bビーズは疎水性であり、超常磁性Fe₃O₄ナノ粒子のアップロードに使用できる親水性官能基を欠く。

【0012】

したがって、調整可能な直径、良好な剛性および有機溶媒に対する良好な耐性を持ち、ならびに超常磁性 Fe_3O_4 NP の高パーセントのアップロードを促進するのに十分な親水性官能基を含み、IVD 適用のための直径 $1 \sim 5 \mu m$ 範囲の新しい単分散超常磁性ポリマービーズの製造を可能にする、球状単分散ポリマービーズを製造する新しい合成戦略を開発する必要性が残っている。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0013】

【特許文献1】米国特許出願公開第2009/0092837号

10

【特許文献2】米国特許出願公開第2017/0218095号

【特許文献3】米国特許第4,654,267号明細書

【特許文献4】米国特許第7,713,627号明細書

【非特許文献】

【0014】

【非特許文献1】European Polymer Journal 2011, 47, 542 - 559

【非特許文献2】Journal of Applied Polymer Science 2013, DOI: 10.1002/APP.[38857(1726-1733)]

【非特許文献3】Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry, 2007, 45, 5285 - 5295

20

【非特許文献4】Petroleum Science, 2008, 5, 375 - 378

【非特許文献5】Journal of Applied Polymer Science, 2010, 115, 3092 - 3102

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0015】

(発明の概要)

本発明の態様および実施形態は、以下の番号付与された項において説明される。

30

【0016】

1. コア-シェル構造を有する単分散超常磁性ビーズであって、前記ビーズは、ポリスチレン高分子マトリックス材料から形成されたコア部であって、前記ポリスチレン高分子マトリックス材料が第1のバッチの超常磁性 Fe_3O_4 ナノ粒子を封入する(または、被包する、または、カプセル化する; encapsulate) コア部;

前記コア部の頂部上に直接的に位置し、スチレンモノマー、架橋性モノマー、および官能基を有する第1の官能性モノマーから形成された架橋高分子マトリックス材料から形成された第1のシェル部であって、前記コポリマーマトリックス材料が第2のバッチの超常磁性 Fe_3O_4 ナノ粒子を封入する、第1のシェル部; ならびに

第1のシェル部の頂部上に直接的に位置した第2のシェル部

40

を含み、前記第2のシェル部は、第1の層、第2の層および第3の層として形成され、前記第1の層が、超常磁性 Fe_3O_4 ナノ粒子ならびに、共役モノマーおよびバルクモノマーを含む第1の層高分子マトリックス材料を含み;

前記第2の層が、前記第1の層を越えて延在し、バルクモノマーを含む第2の層高分子材料から形成され; および

前記第3の層が、第2の層の頂部上にあり、バルクモノマー、および官能基を有する第2の官能性モノマーを含む第3の層高分子材料から形成され、

前記第1の層の超常磁性 Fe_3O_4 ナノ粒子が、前記第1のシェル部の外表面上に存在する官能基と直接的に結合し;

前記第1の層高分子マトリックス材料が、前記第1の層の超常磁性 Fe_3O_4 ナノ粒子

50

を取り囲み；および

前記第2の層高分子マトリックス材料が、前記第1の層高分子マトリックス材料から延在し、各単分散超常磁性ビーズの外表面を形成する、単分散超常磁性ビーズ。

【0017】

2．前記第2の層および第3の層の高分子マトリックス材料が、前記ビーズを溶媒に入れた場合に超常磁性磁性ナノ粒子が溶出するのを防止するように機能する、第1項に記載のビーズ。

【0018】

3．前記第1のシェル部および前記第2のシェル部の前記第3の層の官能性モノマー上の官能基が、独立して、アミノ、カルボキシル、エポキシ、およびヒドロキシルの1以上から独立して選択され、任意選択にて、前記第1のシェル部、および前記第2のシェル部の前記第2の層の官能性モノマー上の官能基が、独立して、ヒドロキシル基およびカルボキシル基の組合せ、またはアミノ基およびカルボキシル基の組合せから選択される、第1項または第2項に記載のビーズ。

10

【0019】

4．前記ビーズが、15%未満、例えば、10%未満、例えば、5%未満のそれらの直径に基づく変動係数を有する、第1項～第3項のいずれか1記載のビーズ。

【0020】

5．前記ビーズが、2%以下のそれらの直径に基づく変動係数を有する第4項に記載のビーズ。

20

【0021】

6．前記ビーズが0.2～5.0 μm、例えば、0.5～4.0 μmの平均直径を有する、第1項～第5項のいずれか1記載のビーズ。

【0022】

7．前記ポリスチレン高分子マトリックス材料が、スチレン、スチレン誘導体、およびそれらのコポリマーよりなる群の1以上から形成され、任意選択で、前記スチレン誘導体が、4-メチルスチレン、3-メチルスチレン、および4-tert-ブチルスチレンよりなる群の1以上から選択される、第1項～第6項のいずれか1記載のビーズ。

【0023】

8．ビーズ中の超常磁性Fe₃O₄ナノ粒子のすべてが、各ビーズの全重量の10～80重量%、例えば、20～70重量%、例えば、30～50重量%を占めている、第1項～第7項のいずれか1記載のビーズ。

30

【0024】

9．(a)第1のバッチの超常磁性Fe₃O₄ナノ粒子が、各ビーズの全重量の0.1～5重量%を占め；および/または

(b)第2バッチの超常磁性Fe₃O₄ナノ粒子が、各ビーズの全重量の0.5～10重量%を占め；

(c)第2のシェル部の第1の層中の超常磁性Fe₃O₄ナノ粒子が、各ビーズの全重量の9.4～79.4重量%、例えば、19.4～69.4重量%、例えば、29.4～49.4重量%を占める、第8項に記載のビーズ。

40

【0025】

10．前記架橋性モノマーが、ジビニルベンゼン、エチレングリコールジメチルアクリレート、ビスフェノールAジメタクリレート、ブタンジオールジメタクリレート、トリシクロデカンジメタノールジアクリレート、ペンタエリスリトールトリアクリレート、トリプロピレングリコールジアクリレート、プロポキシ化ネオペンチルジアクリレート、ペンタエリスリトールトリアクリレート、ジトリメチロールプロパンテトラアクリレート、ジペンタエリスリトールペンタアクリレート、ジペンタエリスリトールペンタ/ヘキサアクリレート、トリプロピレンジアクリレート、トリメチロールプロパンエトキシレートトリアクリレート、トリメチロールプロパンプロポキシレートトリアクリレート、ジ(トリメチロールプロパン)テトラアクリレート、グリセロールプロポキシレートトリアクリレー

50

ト、ペンタエリスリトールプロポキシレートトリアクリレート、ポリ(エチレングリコール)ジアクリレート、ポリ(プロピレングリコール)ジアクリレート、およびトリ(プロピレングリコール)ジアクリレートよりなる群から選択され、任意選択で、前記架橋性モノマーが、ジビニルベンゼン、エチレングリコールジメチルアクリレート、ビスフェノールAジメタクリレート、およびN, N'-メチレンビス(アクリルアミド)よりなる群の1以上から選択される、第1項~第9項のいずれか1記載のビーズ。

【0026】

11. 前記第1の官能性モノマーが、アクリル酸、メタクリル酸、2-カルボキシエチルアクリレート、アクリルアミド、メタクリルアミド、アリルアミン、(ヒドロキシエチル)メタクリレート、ヒドロキシプロピルメタクリレート、4-ヒドロキシブチルアクリレート、グリシジルメタクリレート、アリルグリシジルエーテル、1,2-エポキシ-5-ヘキセン、無水マレイン酸、2-ヒドロキシエチルメタクリレートおよび2-カルボキシエチルアクリレートオリゴマーよりなる群の1以上から選択される、第1項~第10項のいずれか1記載のビーズ。

10

【0027】

12. スチレンモノマーが、スチレン、およびスチレン誘導体よりなる群の1以上から選択され、任意選択で、スチレン誘導体が、4-メチルスチレン、3-メチルスチレン、および4-tert-ブチルスチレンよりなる群の1以上から選択される、第1項~第11項のいずれか1記載のビーズ。

【0028】

20

13. 前記第1のシェルが、第1の高分子マトリックス組成物の第1の層および第2の高分子マトリックス組成物の第2の層をさらに含み、

前記第1の層が、スチレンモノマーと、架橋性モノマーとのコポリマーから形成され；および

前記第2の層が、スチレンモノマー、架橋性モノマーおよび官能性モノマーのコポリマーから形成される、第1項~第12項のいずれか1記載のビーズ。

【0029】

14. 前記超常磁性 Fe_3O_4 ナノ粒子が、5~15nmの平均直径を有する、第1項~第13項のいずれか1記載のビーズ。

【0030】

30

15. (a) 前記コア部および前記第1のシェル部におけるスチレン基-対-架橋基の重量-対-重量比(weight to weight ratio)が、20:1~1:2、例えば、10:1~1:1であり、および/または

(b) 前記コア部および前記第1のシェル部におけるスチレン基-対-官能基の重量-対-重量比が、20:1~1:2、例えば、10:1~1:1である、第1項~第14項のいずれか1記載のビーズ。

【0031】

16. 前記 Fe_3O_4 ナノ粒子が、さらに Co_3O_4 および/または Mn_3O_4 ナノ粒子を含む、第1項~第15項のいずれか1記載のビーズ。

【0032】

40

17. 前記共役モノマーが、メタクリロイルクロリド、3-エトキシ-アクリロイルクロリド、アクリロイルクロリド、4-ペンテノイルクロリド、無水メタクリル酸、無水4-ペンテン酸、無水クロトン酸、無水吉草酸、10-ウンデセノイルクロリド、グリシドールメタクリレート、グリシドールおよびアリルグリシジルエーテルよりなる群の1以上から選択される、第1項~第16項のいずれか1記載のビーズ。

【0033】

18. 前記バルクモノマーが、ポリエーテルモノマー、ポリエステルモノマー、ポリアクリルアミドモノマー、およびポリアシッドモノマーの1以上から選択され、任意選択で、前記バルクモノマーが、メタクリル酸メチル、アクリル酸、メタクリル酸、2-カルボキシエチルアクリレート、2-カルボキシエチルアクリレートオリゴマー、アクリルアミ

50

ド、メタクリルアミド、アリルアミン、(ヒドロキシエチル)メタクリレート、ヒドロキシプロピルメタクリレート、4-ヒドロキシブチルアクリレート、グリシジルメタクリレート、アリルグリシジルエーテル、1,2-エポキシ-5-ヘキセン、無水マレイン酸よりなる群の1以上から選択され、任意選択で、バルクモノマーが、メタクリル酸および/または2-ヒドロキシエチルメタクリレートから選択される、第1項~第17項のいずれか1記載のビーズ。

ここで、

【0034】

19. 前記第2の官能性モノマーが、アクリル酸、メタクリル酸、2-カルボキシエチルアクリレート、アクリルアミド、メタクリルアミド、アリルアミン、(ヒドロキシエチル)メタクリレート、ヒドロキシプロピルメタクリレート、4-ヒドロキシブチルアクリレート、グリシジルメタクリレート、アリルグリシジルエーテル、1,2-エポキシ-5-ヘキセン、無水マレイン酸、2-ヒドロキシエチルメタクリレートおよび2-カルボキシエチルアクリレートオリゴマーよりなる群の1以上よりなる群の1以上から選択される、第1項~第18項のいずれか1記載のビーズ。

10

【0035】

20. 前記第2のシェル部が、前記第1および/または第2および/または第3の層中に架橋性モノマーをさらに含み、任意選択で、前記架橋性モノマーが、ジビニルベンゼン、エチレングリコールジメチルアクリレート、ビスフェノールAジメタクリレート、N,N'-メチレンビス(アクリルアミド)、ビスフェノールAエポキシアクリレート、ビスフェノールジアクリレート、トリプロピレングリコールジアクリレート、プロポキシ化ネオペンチルジアクリレート、プロポキシ化グリセロールジアクリレート、ペンタエリスリトールプロポキシレートトリアクリレート、ブタンジオールジメタクリレート、トリシクロデカンジメタノールジアクリレート、ペンタエリスリトールトリアクリレート、ジトリメチロールプロパンテトラアクリレート、ジペンタエリスリトールペンタ/ヘキサアクリレート、トリプロピレンジアクリレート、トリメチロールプロパンエトキシレートトリアクリレート、トリメチロールプロパンプロポキシレートトリアクリレート、ジ(トリメチロールプロパン)テトラアクリレート、グリセロールプロポキシレートトリアクリレート、ポリ(プロピレングリコール)ジアクリレート、ポリ(プロピレングリコール)ジアクリレート、およびトリ(プロピレングリコール)ジアクリレートよりなる群の1以上から選択され、例えば、前記架橋性モノマーが、ジビニルベンゼン、エチレングリコールジメチルアクリレート、ビスフェノールAジメタクリレートおよびN,N'-メチレンビス(アクリルアミド)よりなる群の1以上から選択される、第1項~第19項のいずれか1記載のビーズ。

20

30

【0036】

21. 前記第2のシェルの第2の層および第3の層の組合せ重量が、各ビーズの全重量の1~30重量%、好ましくは2~20重量%を占める、第1項~第20項のいずれか1記載の超常磁性ビーズ。

【0037】

22. コア-シェル構造を有する、単分散超常磁性ビーズを調製する方法であって、(a) ポリスチレン高分子マトリックス材料から形成されたコア部を含む、単分散超常磁性前駆体ビーズを提供すること、前記ポリスチレン高分子マトリックス材料が第1のバッチの超常磁性Fe₃O₄ナノ粒子を封入し;

40

前記コア部の頂部上に直接的に位置し、スチレンモノマー、架橋性モノマー、および官能基を有する第1の官能性モノマーから形成された架橋高分子マトリックス材料から形成された第1のシェル部であって、前記コポリマーマトリックス材料が第2のバッチの超常磁性Fe₃O₄ナノ粒子を封入する、第1のシェル部;および

前記第1のシェル部の頂部上に直接的に位置する第2のシェル部であって、超常磁性Fe₃O₄ナノ粒子および高分子前駆体アンカーポイントを含み、その双方は前記第1のシェル部の表面上の官能基に結合する、第2のシェル部;ならびに

50

(b) 単分散超常磁性前駆体ビーズ上に、ワンポットフリーラジカル重合によって機能性コーティング層を形成すること、

(i) 第1のステップにおいて、バルクモノマーを使用し；および

(ii) 第2のステップにおいて、官能基を有する第2の官能性モノマーを用いて単分散超常磁性ビーズを形成し、

前記機能性コーティング層が、高分子前駆体アンカーポイントにより第1のシェル部に結合する、ことを含む、方法（または、プロセス）。

【0038】

23. 前記バルクモノマーが、ポリエーテルモノマー、ポリエステルモノマー、ポリアクリルアミドモノマー、およびポリアシッドモノマーよりなる群の1以上から選択される、第22項に記載の方法。

10

【0039】

24. 前記バルクモノマーが、メタクリル酸メチル、アクリル酸、メタクリル酸、2-カルボキシエチルアクリレート、2-カルボキシエチルアクリレートオリゴマー、アクリルアミド、メタクリルアミド、アシルアミン、(ヒドロキシエチル)メタクリレート、ヒドロキシプロピルメタクリレート、4-ヒドロキシブチルアクリレート、グリシジルメタクリレート、アシルグリシジルエーテル、1,2-エポキシ-5-ヘキセン、無水マレイン酸よりなる群の1以上から選択され、任意選択で、前記バルクモノマーが、メタクリル酸および/または2-ヒドロキシエチルメタクリレートから選択される、第23項に記載の方法。

20

【0040】

25. 前記第1のステップが、前記バルクモノマーおよび開始剤を含む混合物を使用し、任意選択で、前記開始剤が、ターシャリ-アミルヒドロペルオキシド、過硫酸カリウム、過硫酸ナトリウム、過硫酸アンモニア、4,4'-アゾビス(4-シアノ吉草酸)、2,2'-アゾビス[2-メチル-N-(2-ヒドロキシエチル)プロピオンアミド]、2,2'-アゾビス[N-(2-カルボキシエチル)-2-メチルプロピオンアミジン]水和物、2,2'-アゾビス(2-メチルプロピオンアミジン)二塩酸塩、2,2''-アゾビス[2-(2-イミダゾリン-2-イル)プロパン]、および2,2'-アゾビス[2-(2-イミダゾリン-2-イル)プロパン]二塩酸塩よりなる群の1以上から選択される、第22項~第24項のいずれか1記載の方法。

30

【0041】

26. 前記第1のステップにおける混合物が、さらに、

(a) 架橋剤、任意選択で、前記架橋剤が、ジビニルベンゼン、エチレングリコールジメチルアクリレート、ビスフェノールAジメタクリレート、N,N'-メチレンビス(アクリルアミド)、ビスフェノールAエポキシアクリレート、ビスフェノールジアクリレート、トリプロピレングリコールジアクリレート、プロポキシ化ネオペンチルジアクリレート、プロポキシ化グリセロールジアクリレート、ペンタエリスリトールプロポキシレートトリアクリレート、ブタンジオールジメタクリレート、トリシクロデカンジメタノールジアクリレート、ペンタエリスリトールトリアクリレート、ジトリメチロールプロパンテトラアクリレート、ジペンタエリスリトールペンタ/ヘキサアクリレート、トリプロピレンジアクリレート、トリメチロールプロパンエトキシレートトリアクリレート、トリメチロールプロパンプロポキシレートトリアクリレート、ジ(トリメチロールプロパン)テトラアクリレート、グリセロールプロポキシレートトリアクリレート、ポリ(エチレングリコール)ジアクリレート、ポリ(プロピレングリコール)ジアクリレート、およびトリ(プロピレングリコール)ジアクリレートよりなる群の1以上から選択され、例えば、前記架橋性モノマーが、ジビニルベンゼン、エチレングリコールジメチルアクリレート、ビスフェノールAジメタクリレート、およびN,N'-メチレンビス(アクリルアミド)よりなる群の1以上から選択され、および/または

40

(b) 溶媒、任意選択で、前記溶媒が、1,4-ジオキサン、テトラヒドロフラン、ジグリライム、酢酸エチル、酢酸ブチル、アセトン、メチルエチルケトン、および水よりなる群

50

の 1 以上から選択される、
を含む、第 25 項に記載の方法。

【0042】

27. 前記第 2 の官能性モノマーが、アクリル酸、メタクリル酸、2 - カルボキシエチルアクリレート、アクリルアミド、メタクリルアミド、ア릴アミン、(ヒドロキシエチル)メタクリレート、ヒドロキシプロピルメタクリレート、4 - ヒドロキシブチルアクリレート、グリシジルメタクリレート、アリルグリシジルエーテル、1, 2 - エポキシ - 5 - ヘキセン、無水マレイン酸、2 - ヒドロキシエチルメタクリレートおよび 2 - カルボキシエチルアクリレートオリゴマーよりなる群の 1 以上から選択される、第 22 項 ~ 第 26 項のいずれか 1 記載の方法。

10

【0043】

28. (a) 第 1 のステップおよび / または第 2 のステップの重合が、30 ~ 80、例えば、50 ~ 70 の温度で行われ; および / または
(b) 第 1 のステップおよび第 2 のステップの総重合時間が 10 時間 ~ 30 時間、例えば、16 時間 ~ 24 時間である、第 22 項 ~ 第 27 項のいずれか 1 記載の方法。

【0044】

29. 前記単分散超常磁性前駆体ビーズが、
(i) ネイキッド (naked) 単分散超常磁性ビーズを提供すること、前記ビーズが、ポリスチレン高分子マトリックス材料から形成されたコア部であって、前記ポリスチレン高分子マトリックス材料が第 1 のバッチの超常磁性 Fe_3O_4 ナノ粒子を封入する、コア部;

20

コア部の頂部上に直接的に位置し、スチレンモノマー、架橋性モノマー、および官能基を有する第 1 の官能性モノマーから形成された架橋高分子マトリックス材料から形成された第 1 のシェル部であって、前記コポリマーマトリックス材料が第 2 のバッチの超常磁性 Fe_3O_4 ナノ粒子を封入する、第 1 のシェル部; および

前記第 1 のシェル部の頂部上に直接的に位置する第 2 のシェル部であって、前記第 1 のシェル部の表面上の官能基に結合する超常磁性 Fe_3O_4 ナノ粒子を含む、第 2 のシェル部を含み; ならびに

(ii) 前記ネイキッド単分散超常磁性ビーズを、メタクリロイルクロリド、3 - エトキシ - アクリロイルクロリド、アクリロイルクロリド、4 - ペンテノイルクロリド、無水メタクリル酸、無水 4 - ペンテン酸、無水クロトン酸、無水吉草酸、10 - ウンデセノイルクロリド、グリシドールメタクリレート、グリシドールおよびアリルグリシジルエーテルよりなる群の 1 以上から選択されるアンカー材料と反応させることにより、前記第 1 のシェル部上で高分子前駆アンカーポイントを形成させることにより、単分散超常磁性前駆体ビーズを形成することを含むプロセスにより形成される、第 22 項 ~ 第 28 項のいずれか 1 記載の方法。

30

【0045】

30. 前記ネイキッド単分散超常磁性ビーズが、

(ai) 単分散ビーズを提供すること、前記単分散ビーズが、ポリスチレン高分子マトリックス材料から形成されたコア部; および

40

前記コア部の頂部上に直接的に位置し、スチレンモノマー、架橋性モノマー、および官能基を有する第 1 の官能性モノマーから形成された架橋高分子マトリックス材料から形成された第 1 のシェル部を含み; ならびに

(a ii) 前記単分散ビーズを、 $Fe(III)$ 塩および $Fe(II)$ 塩を含む溶液に入れ、塩基を加えることによって、前記ネイキッド単分散超常磁性ビーズを形成すること、を含むプロセスによって形成される、第 29 項に記載の方法。

【0046】

31. (a) 前記鉄 (III) 塩が、 $FeCl_3$ および / または $Fe_2(SO_4)_3$ から選択される; および / または

50

(b) 前記鉄(II)塩が、 FeCl_2 、 FeSO_4 、 $\text{Fe}(\text{OAc})_2$ よりなる群の1以上から選択される；および/または

(c) 前記塩基が、水酸化アンモニア、 NaOH 、 KOH 、およびアミンよりなる群の1以上から選択される；および/または

(d) 前記溶液が、 CoCl_2 および/または MnCl_2 をさらに含む、第30項に記載の方法。

【0047】

32. 前記単分散ビーズが、「ワンポット3段階」連続プロセスによって形成され、このプロセスが、

(a) 第1の段階において、水とアルコールとの混合物中でスチレンモノマーを開始剤およびポリマー安定剤で分散重合することによりポリスチレンコアを生成して、核となる(nucleated)ポリスチレンコアを形成する；

(b) 第2の段階において、核形成されたポリスチレンコアを含む混合物に架橋性モノマーを加える；および

(c) 第3の段階において、前記第2の段階から得られた材料に第1の官能性モノマーを加えて単分散ビーズを提供し、任意選択で、ポリスチレンビーズはインサイツにて生成され、架橋剤および官能性モノマーの引き続いての添加が、第2の核生成を起こさないため、表面上に官能基を担う(スチレン/架橋剤/官能性モノマー)の球状単分散コポリマービーズに導く、

ことを含む、第30項または第31項に記載の方法。

【0048】

33. (a) 前記開始剤が、アゾ開始剤から選択され、任意選択で、前記アゾ開始剤が、2,2'-アゾビス(2-メチルプロピオニトリル)(AIBN)、および2,2'-アゾビス(2-メチルブチロニトリル)(AMBN)よりなる群の1以上から選択され；および/または

(b) 前記ポリマー安定剤が、ポリ(ビニルピロリドン)(PVP)、ポリエチレンイミン(PEI)、ポリアクリル酸(PAA)、ポリビニルアルコール(PVA)、ヒドロキシプロピルメチルセルロース(HPC)およびキトサンよりなる群の1以上から選択され；および/または

(c) 前記スチレンモノマーが、スチレン、およびスチレン誘導体よりなる群の1以上から選択され、任意選択で、スチレン誘導体が、4-メチルスチレン、3-メチルスチレン、および4-tert-ブチルスチレンよりなる群の1以上から選択され；および/または

(d) 前記アルコールが、メタノール、エタノール、イソプロパノール、またはそれらの混合物よりなる群の1以上から選択され；および/または

(e) アルコール-対-水の体積比が、1:1~40:1、例えば、2:1~20:1である、第32項に記載の方法。

【0049】

34. 前記架橋性モノマーが、ジビニルベンゼン、エチレングリコールジメチルアクリレート、ビスフェノールAジメタクリレート、ブタンジオールジメタクリレート、トリシクロデカンジメタノールジアクリレート、ペンタエリスリトールトリアクリレート、トリプロピレングリコールジアクリレート、プロポキシ化ネオペンチルジアクリレート、ペンタエリスリトールトリアクリレート、ジトリメチロールプロパンテトラアクリレート、ジペンタエリスリトールペンタアクリレート、ジペンタエリスリトールペンタ/ヘキサアクリレート、トリプロピレンジアクリレート、トリメチロールプロパンエトキシレートトリアクリレート、トリメチロールプロパンプロポキシレートトリアクリレート、ジ(トリメチロールプロパン)テトラアクリレート、グリセロールプロポキシレートトリアクリレート、ペンタエリスリトールプロポキシレートトリアクリレート、ポリ(エチレングリコール)ジアクリレート、ポリ(プロピレングリコール)ジアクリレート、およびトリ(プロピレングリコール)ジアクリレートよりなる群の1以上から選択され、任意選択で、前記

架橋性モノマーが、ジビニルベンゼン、エチレングリコールジメチルアクリレート、ビスフェノール A ジメタクリレート、および N, N' - メチレンビス (アクリルアミド) よりなる群の 1 以上から選択される、第 3 2 項または第 3 3 項に記載の方法。

【 0 0 5 0 】

35. 前記第 1 の官能性モノマー上の官能基が、独立して、アミノ、カルボキシル、エポキシ、およびヒドロキシルの 1 つ以上から選択され、任意選択で、第 1 のシェル部、および第 2 のシェル部の第 2 の層の官能性モノマー上の官能基が、独立して、ヒドロキシル基およびカルボキシル基の組合せ、またはアミノ基およびカルボキシル基の組合せから選択される、第 3 2 項 ~ 第 3 4 項のいずれか 1 記載の方法。

【 0 0 5 1 】

36. 前記第 1 の官能性モノマーが、アクリル酸、メタクリル酸、2 - カルボキシエチルアクリレート、アクリルアミド、メタクリルアミド、アリルアミン、(ヒドロキシエチル)メタクリレート、ヒドロキシプロピルメタクリレート、4 - ヒドロキシブチルアクリレート、グリシジルメタクリレート、アリルグリシジリエーテル、1, 2 - エポキシ - 5 - ヘキセン、無水マレイン酸、2 - ヒドロキシエチルメタクリレートおよび 2 - カルボキシエチルアクリレートオリゴマーよりなる群の 1 以上から選択される、第 3 5 項に記載の方法。

【 0 0 5 2 】

37. 前記スチレンモノマー - 対 - 前記架橋剤の重量比が、20 : 1 ~ 1 : 2、例えば、10 : 1 ~ 1 : 1 である、第 3 2 項 ~ 第 3 6 項のいずれか 1 記載の方法。

【 0 0 5 3 】

38. 前記スチレンモノマー - 対 - 前記第 1 の官能性モノマーの重量比が、20 : 1 ~ 1 : 2、好ましくは 10 : 1 ~ 1 : 1 である、第 3 2 項 ~ 第 3 7 項のいずれか 1 記載の方法。

【 0 0 5 4 】

39. 前記合成されたままの単分散ビーズが、引き続いてのプロセスステップで使用する前に 1 つ以上の溶媒で洗浄され、任意選択で、前記溶媒が、水、メタノール、エタノール、イソプロパノール、および THF よりなる群の 1 以上から選択される、第 3 2 項 ~ 第 3 7 項のいずれか 1 記載の方法。

【 0 0 5 5 】

40. 得られる単分散超常磁性ビーズが：

(a) 15% 未満、例えば、10% 未満、例えば、5% 未満、例えば、2% 以下のそれらの直径に基づく変動係数；および/または

(b) 0.2 ~ 5.0 ミクロン、例えば、0.5 ~ 4.0 ミクロンの平均直径、を有する、第 2 2 項 ~ 第 3 9 項のいずれか 1 記載の方法。

【 0 0 5 6 】

41. これらのビーズが IVD アッセイにおいて適用される、第 1 項 ~ 第 2 1 項のいずれか 1 記載の超常磁性ビーズ。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 5 7 】

【 図 1 】 図 1 は、3 つのタイプの磁性ポリマービーズを模式的に示す。タイプ (I) : ポリマービーズに分散した磁性 NP、タイプ (II) : 磁性シェルおよびポリマーコア；タイプ (III) : ポリマーシェルおよび磁性コア。

【 図 2 】 図 2 は、球状単分散超常磁性ビーズの製造プロセスを模式的に示す。

【 図 3 】 図 3 は、A - 1 の SEM 像を示す。

【 図 4 】 図 4 は、C - 1 の TEM 像を示す。

【 図 5 】 図 5 は、C - 1 のヒステリシス曲線を示す。

【 図 6 】 図 6 は、D - 1 の TEM 像を示す。

【 図 7 】 図 7 は、A - 2 の SEM 像を示す。

【 図 8 】 図 8 は、C - 2 の TEM 像を示す。

10

20

30

40

50

【図 9】図 9 は、D - 2 の TEM 像を示す。

【図 10】図 10 は、CE - 2 の SEM 像を示す。

【図 11】図 11 は、DE - 2 の TEM 像を示す。

【図 12】図 12 は、十分に形成された単分散超常磁性ビーズの詳細を模式的に示す。

【発明を実施するための形態】

【0058】

(説明)

上記の課題が、新しいタイプの単分散超常磁性ビーズの導入により、その全体または一部が解決できることを、驚くべきことに見出した。これらの単分散超常磁性ビーズは、ビーズのコアおよびシェル(複数可)全体に分布した超常磁性NPを有する。これらのビーズは、驚くべきことには、上記の問題に苦しむことなく、広範囲の重量パーセンテージ(例えば、ビーズの全重量に対して30重量%~50重量%を超える)でFe₃O₄ナノ粒子を負荷(または、担持;load)できることを見出した。これらのビーズは、下流の分離プロセスの効率を向上し、IVDプロセスの最終的適用を改善すると考えられる。

【0059】

かくして、本明細書に開示されるのは、コア-シェル構造を有する、単分散超常磁性ビーズであり、ビーズは、

ポリスチレン高分子マトリックス材料から形成されたコア部であって、ポリスチレン高分子マトリックス材料が第1のバッチの超常磁性Fe₃O₄ナノ粒子を封入するコア部;

コア部の頂部上に直接的に位置し、スチレンモノマー、架橋性モノマー、および官能基を有する第1の官能性モノマーから形成された架橋高分子マトリックス材料から形成された第1のシェル部であって、コポリマーマトリックス材料が第2のバッチの超常磁性Fe₃O₄ナノ粒子を封入する、第1のシェル部;ならびに

第1のシェル部の頂部上に直接的に位置した第2のシェル部

を含み、第2のシェル部は、第1の層、第2の層および第3の層として形成され、

第1の層が、超常磁性Fe₃O₄ナノ粒子ならびに、共役モノマーおよびバルクモノマーを含む第1の層高分子マトリックス材料を含み;

第2の層が、第1の層を越えて延在し、バルクモノマーを含む第2の層高分子材料から形成され;および

第3の層が、第2の層の頂部上にあり、バルクモノマー、および官能基を有する第2の官能性モノマーを含む第3の層高分子材料から形成され、

第1の層の超常磁性Fe₃O₄ナノ粒子が、第1のシェル部の外表面上に存在する官能基と直接的に結合し;

第1の層高分子マトリックス材料が、第1の層の超常磁性Fe₃O₄ナノ粒子を取り囲み;および

第2の層高分子マトリックス材料が、第1の層高分子マトリックス材料から延在し、各単分散超常磁性ビーズの外表面を形成する。

【0060】

本明細書で言及する「含む(comprising)」なる語は、言及された特徴を必要とするが、他の特徴の存在を制限するものではないと解釈し得る。また、別法として、

「含む(comprising)」なる語は、列挙された成分/特徴のみが存在することを意図している状況に関し得る(例えば、「含む(comprising)」なる語は、「よりなる(consists of)」または「より実質的になる(consists essentially of)」なる語句により置換し得る)。より広い解釈およびより狭い解釈の双方が、本発明のすべての態様および実施形態に適用できることが明確に考えられる。換言すれば、「含む(comprising)」なる用語およびその同義語は、「よりなる」なる語句または「より本質的になる」なる語句またはその同義語に置換でき、その逆もまた同様である。

【0061】

本明細書で用いる場合の「粒子」なる用語は、「ビーズ」および「マイクロスフィア」

なる用語と同義であることが意図される。本明細書で用いる場合の「ポリマー粒子」なる用語は、「ポリマービーズ」および「ポリマーマイクロスフィア」なる用語と同義であることが意図される。本明細書で用いる場合の「超常磁性ポリマー粒子」なる用語は、「超常磁性ポリマービーズ」および「超常磁性ポリマーマイクロスフィア」なる用語と同義であることが意図される。

【0062】

本明細書で用いる場合の「単分散」なる用語は、特定のパラメータ（例えば、粒子径）の低い変動係数（CV）、例えば、20%未満、例えば、15%未満、例えば、10%未満、例えば、5%未満のCVを有する粒子をいう。より詳細には、粒子は、2%以下、例えば、1%以下のCVを有し得る。また、「単分散」なる用語は、「高度単分散（highly monodisperse）」なる用語を包含し、「高度単分散」は、本明細書で用いる場合、5%未満、例えば、2%以下、例えば、1%以下のCVをいい得る。

10

【0063】

本明細書で用いる場合、「変動係数」なる用語は、その統計的な意味をいう。すなわち：

【0064】

【数1】

$$CV (\%) = \text{標準偏差} / \text{平均} \times 100$$

20

【0065】

をいう。

【0066】

「標準偏差」および「平均」なる用語は、それらの通常の統計的な意味を有する。

【0067】

本明細書でいう「平均」直径とは、走査型電子顕微鏡（SEM）から得られる平均直径をいう。

【0068】

本明細書に参照される磁性NPは、常磁性NP、超常磁性NP、強磁性NPまたはフェリ磁性NPの少なくとも1種を含むことができる。その定義は以下に列記される。

30

【0069】

本明細書で用いる場合の「磁性」とは、材料中の磁場に応答する特性を意味する。本明細書で用いる場合の「常磁性」とは、外部磁場が除去された後、材料が示す磁性特性がオフになることを意味する。本明細書で用いる場合の「超常磁性」とは、外部磁界を除去すると瞬時に材料の磁性が消失することを意味する。

【0070】

本明細書で用いる場合の「強磁性」とは、各ドメイン内のすべての磁性原子が材料全体の純磁化に正の値で寄与し、外部磁界を除去した後も磁性特性が保持されることを意味する。前記材料は、そのキュリー温度を超えると常磁性材料となる。

40

【0071】

本明細書で用いる場合の「フェリ磁性」とは、各ドメイン内の磁性原子のいくらかが対向しているが、材料全体としては純磁化（net magnetization）を示すことを意味する。外部磁界を除去後に、前記材料は、その磁性特性を保持する。そのキュリー温度を超えると常磁性材料となる。

【0072】

図2Dは、本発明による十分に形成された（または、完全に形成された：fully-formed）単分散超常磁性ビーズを模式形式で示す。図12は、十分に形成された単分散超常磁性ビーズをより詳細に示している。図12は、本発明による単分散超常磁性ビーズ100の断面を示す。ビーズは、コア110、第1のシェル120、および第2のシェル13

50

0を有する。コア110は、ポリスチレン高分子マトリックス材料111で形成され、コア高分子マトリックス材料は、超常磁性 Fe_3O_4 ナノ粒子115の一部を封入する孔112を含む。

【0073】

第1のシェル部120は、単層(図示せず)または2層(121、122)の形態で有り得る。単層の形態である場合、第1のシェル部は、スチレンモノマー、架橋性モノマー、および官能基を有する第1の官能性モノマーから形成される架橋性高分子マトリックス材料を有する。2層の形態である場合、第1の層は、スチレンモノマーおよび架橋性モノマーのコポリマーから形成された架橋高分子マトリックス材料123であり得、第2の層124は、スチレンモノマー、架橋性モノマーおよび官能性モノマーのコポリマーで形成し得る。再度、第1のシェル部の高分子マトリックス材料(複数可)は、 Fe_3O_4 ナノ粒子125を封入し得る。

10

【0074】

第2のシェル部130は、3つの層(131、132、133)から形成される。第1の層は、第1のシェル部120の表面上に設けられた官能基に結合する Fe_3O_4 ナノ粒子134を含む。また、加えて、第1の層は、共役モノマーおよびバルクモノマーを含む高分子マトリックス材料135の第1の層を含む。かくして、高分子マトリックス材料の第1の層は、第1のシェル部の表面から Fe_3O_4 ナノ粒子134の頂部付近まで延在する。第2の層132は、第1の層を越えて(したがって、 Fe_3O_4 ナノ粒子134の頂部を越えて)延在し、この層は、バルクモノマーを含む第2の層高分子材料から形成される。第3の層133は第2の層の頂部に形成され、この第3の層は、バルクモノマー、および官能基を有する第2の官能性モノマーを含む第3の層高分子材料から形成される。

20

【0075】

本明細書で用いる場合の「封入する」は、もう一つの材料内への材料の十分な封入をいうか、またはもう一つの材料内への材料の部分的な封入をいい得る。また、この用語は、ある材料が他の材料の孔中に捕捉される状態をいい得る。

【0076】

第2のシェル部における高分子マトリックス材料の第2の層および第3の層は、ビーズを溶媒に入れた場合に超常磁性磁性(Fe_3O_4)ナノ粒子が溶出する(leaching out)のを防ぐ機能を有することが注目される。これは、後述のごとく、新生ビーズの第1のシェル(およびコア)の表面上に Fe_3O_4 ナノ粒子を担持させた後に、第2のシェルのポリマー部分を形成させるため可能である。これは、形成された高分子シェルがバリアとして作用して、 Fe_3O_4 ナノ粒子を漏れから保護するのを可能にする。

30

【0077】

いずれかの適切な官能基は、第1のシェル部、および第2のシェル部の第3の層に使用される官能性モノマー上に存在し得る。理解されるごとく、第1のシェル部の官能基および第2のシェル部の第3の層の官能基の望ましい機能は異なる。第1のシェル部(の表面)の官能基は、 Fe_3O_4 ナノ粒子が第1のシェル部の表面上に結合するように Fe_3O_4 ナノ粒子と結合することを意図している。この結合は、配位、共有結合、静電気力または水素結合によるものごとき、いずれかの適切な化学的相互作用によるもので有り得る。第2のシェル部の第3の層における官能基は、いずれかの適切な意図された適用(例えば、十分に形成されたビーズの表面上にリガンドまたは抗体を共有結合すること)のために十分に形成されたビーズの容易な機能化を可能とすることが意図されている。それにもかかわらず、第1のシェル部および第2のシェル部の第3の層の官能性モノマー上の官能基は、独立して、アミノ、カルボキシル、エポキシおよびヒドロキシルの1以上から選択し得る。例えば、第1のシェル部、および第2のシェル部の第2の層の官能性モノマー上の官能基は、独立して、ヒドロキシル基およびカルボキシル基の組合せ、またはアミノ基およびカルボキシル基の組合せから選択し得る。

40

【0078】

本発明のビーズは、本明細書で定義のごとく、単分散である。より詳細には、本明細書

50

に開示されたビーズは、15%未満、例えば、10%未満、例えば、5%未満のそれらの直径に基づく変動係数を有し得る。さらにより詳細には、本明細書に開示されたビーズは、本明細書で定義のごとく、高度に単分散で有り得る。例えば、ビーズは、2%以下のそれらの直径に基づく変動係数を有し得る。

【0079】

本明細書に開示されたビーズは、意図された適用（例えば、IVD）において有用となるいずれかの適切な平均直径を有し得る。適切な平均直径の例は、0.2~5.0 μm、例えば、0.5~4.0 μmである。

【0080】

上述のごとく、コアはポリスチレンマトリックス材料から形成される。これは、いずれかの適切なスチレンモノマーのホモポリマーまたは2つ以上（例えば、2、3、4、5または6）のスチレンモノマーのコポリマーから形成し得る。理解されるごとく、本明細書で用いる場合の「スチレンモノマー」なる用語は、一般的にスチレンモノマーのクラス、すなわち、スチレン自体およびそのモノマー誘導体をカバーするものと解釈されるべきである。ポリスチレン高分子マトリックス材料を形成するために用い得る適切なスチレンモノマーの例として、限定されるものではないが、スチレン、スチレン誘導体、およびそのコポリマーが挙げられる。本明細書に言及し得る特定の実施形態において、スチレン誘導体は、4-メチルスチレン、3-メチルスチレン、および4-tert-ブチルスチレンよりなる群の1以上から選択し得る。コアのポリスチレンマトリックス材料は、架橋されていない材料で有り得る。

【0081】

上述のごとく、本明細書に開示されたビーズは、従来の設計が遭遇する問題に悩まされることなく、超常磁性Fe₃O₄ナノ粒子につき広範囲の負荷値（または、担持値：loading values）を有し得ることが、驚くべきことに見出された。例えば、ビーズ中の超常磁性Fe₃O₄ナノ粒子のすべてが、各ビーズの全重量の10~80重量%、例えば、20~70重量%、例えば、30~50重量%を占め得る。本明細書に言及し得る特定の実施形態において、ビーズ中の超常磁性Fe₃O₄ナノ粒子のすべてが、各ビーズの全重量の30~50重量%を占め得る。理解されるごとく、ビーズの各部に分布する超常磁性Fe₃O₄ナノ粒子の量は変化する。例えば、以下の負荷（または担持）分布の1以上が適用され得る：

（a）第1のバッチの超常磁性Fe₃O₄ナノ粒子は、各ビーズの全重量の0.1~5重量%を占め得る。

（b）第2のバッチの超常磁性Fe₃O₄ナノ粒子は、各ビーズの全重量の0.5~10重量%を占め得る；および

（c）第2のシェル部の第1の層における超常磁性Fe₃O₄ナノ粒子は、各ビーズの全重量の9.4~79.4重量%、例えば、19.4~69.4重量%、例えば、29.4~49.4重量%を占め得る。

【0082】

本明細書に前述のごとく、架橋性モノマーは、第1のシェル部において架橋された高分子マトリックス材料を形成するために使用される。ビーズ内の架橋の包含は、ビーズに剛性および/または機械的強度、ならびに溶媒によって引き起こされ得る膨潤に対する耐性を提供し得ると考えられる。ビーズの第1のシェル部の架橋を形成するために、いずれかの適切な架橋性モノマーを使用し得る。適切な架橋性モノマーは、ジビニルベンゼン、エチレングリコールジメチルアクリレート、ビスフェノールAジメタクリレート、ブタンジオールジメタクリレート、トリシクロデカンジメタノールジアクリレート、ペンタエリスリトールトリアクリレート、トリプロピレングリコールジアクリレート、プロポキシ化ネオペンチルジアクリレート、ペンタエリスリトールトリアクリレート、ジトリメチロールプロパンテトラアクリレート、ジメチロールプロパンテトラアクリレートジペンタエリスリトールペンタアクリレート、ジペンタエリスリトールペンタノヘキサアクリレート、トリプロピレンジアクリレート、トリメチロールプロパンエトキシレートトリアクリレート

、トリメチロールプロパンプロポキシレートトリアクリレート、ジ（トリメチロールプロパン）テトラアクリレート、グリセロールプロポキシレートトリアクリレート、ペンタエリスリトールプロポキシレートトリアクリレート、ポリ（エチレングリコール）ジアクリレート、ポリ（プロピレングリコール）ジアクリレート、およびトリ（プロピレングリコール）ジアクリレートよりなる群の1以上から選択し得る。本明細書に言及し得る本発明の特定の実施形態において、架橋性モノマーは、ジビニルベンゼン、エチレングリコールジメチルアクリレート、ビスフェノールAジメタクリレート、およびN,N-メチレンビス（アクリルアミド）よりなる群の1以上から選択し得る。

【0083】

上述した官能基と同様に、架橋高分子マトリックス材料中の第1の官能性モノマーは、
10
アクリル酸、メタクリル酸、2-カルボキシエチルアクリレート、アクリルアミド、メタクリルアミド、ア릴アミン、（ヒドロキシエチル）メタクリレート、ヒドロキシプロピルメタクリレート、4-ヒドロキシブチルアクリレート、グリシジルメタクリレート、ア릴グリシジリエーテル、1,2-エポキシ-5-ヘキセン、無水マレイン酸、2-ヒドロキシエチルメタクリレートおよび2-カルボキシエチルアクリレートオリゴマーよりなる群の1以上から選択し得る。理解されるごとく、上述した官能基の特定の組合せは、これらのモノマーからの選択によって得ることもできる。

【0084】

また、第1のシェル部の架橋高分子マトリックス材料は、スチレンモノマーの使用により形成される。上述のごとく、スチレンモノマーは、スチレン、およびスチレン誘導体よりなる群の1以上から選択し得る。上述のごとく、スチレン誘導体は、4-メチルスチレン、3-メチルスチレン、および4-tert-ブチルスチレンよりなる群の1以上から
20
選択し得る。

【0085】

上述のごとく、第1のシェル部は、単層の材料に代えて、2層の材料から形成し得る。すなわち、第1の高分子マトリックス組成物の第1の層と、第2の高分子マトリックス組成物の第2の層とが存在し得る。2層の実施形態において、

第1の層は、スチレンモノマーおよび架橋性モノマーのコポリマーから形成し得る；および

第2の層は、スチレンモノマー、架橋性モノマーおよび官能性モノマーのコポリマーから形成し得る。
30

【0086】

スチレンモノマー、架橋性モノマー、官能性モノマーは、前記の通りである。2つの層間の実際の境界が完全に明確でなくてもよいことが理解されるであろう。これは、製造方法が、スチレンモノマーおよび架橋性モノマーのコポリマーを添加して第1の層を形成し、続いて後の段階で官能性モノマーを添加して第2の層を形成することを含むためである。また、したがって、第1の層の一部は官能性モノマーを含み得る。疑念を回避するために、第2の層は、第1のシェル部の外表面を形成することを意図しており、したがって、超常磁性Fe₃O₄ナノ粒子および/または共役モノマーに結合できる官能基（後者が、第2のシェル部の高分子部分の形成を可能にする）を提示することが望まれる。第1のシェル部の製造のさらなる詳細は、後述および実験セクションで提供されるであろう。
40

【0087】

上述のごとく、本明細書に記載されたビーズは、超常磁性Fe₃O₄ナノ粒子を含む。これらの超常磁性Fe₃O₄ナノ粒子は、「ナノ粒子」の従来の定義に入ることを可能にするいずれかの適切な直径を有し得る。しかしながら、本明細書に言及し得る本発明の特定の実施形態において、超常磁性Fe₃O₄ナノ粒子は、5~15nmの平均直径を有し得る。

【0088】

本明細書で言及する本発明の実施形態において、コア部および第1のシェル部におけるスチレン基-対-架橋基の重量-対-重量比は、20:1~1:2、例えば、10:1~
50

1 : 1 で有り得る。本明細書に言及し得るさらなるまたは別法の実施形態において、コア部および第 1 のシェル部におけるスチレン基 - 対 - 官能基の重量 - 対 - 重量比は、20 : 1 ~ 1 : 2、例えば、10 : 1 ~ 1 : 1 で有り得る。コア部および第 1 のシェル部についての参照は、言及された構成要素の全体的な負荷（または、担持、または、添加）を決定する場合に、これらの部の組合せ重量が考慮されるべきであることを意味することを意図している。例えば、コア部は架橋基または官能基を含まないが、コア部および第 1 のシェル部におけるスチレン基の総重量に対するこれらの成分の相対重量比を決定する場合には、そのスチレン基の重量を考慮する必要がある。

【0089】

また、本明細書に言及し得る本発明の特定の実施形態において、 Fe_3O_4 ナノ粒子は Co_3O_4 および / または Mn_3O_4 ナノ粒子の一部を含む。いずれかの適切な量の Co_3O_4 および / または Mn_3O_4 ナノ粒子は、 Fe_3O_4 ナノ粒子に加えて存在し得る。疑念を回避するために、ビーズの重量と比較した Fe_3O_4 ナノ粒子の重量パーセントが本明細書に提供される場合、 Fe_3O_4 ナノ粒子の重量は、存在するいずれかの Co_3O_4 および / または Mn_3O_4 ナノ粒子の重量を含む。

10

【0090】

第 2 のシェル部は、上述のごとく、3 つの別々の材料層から形成される。第 1 の層は、第 1 のシェル部の外表面上に存在する官能基と直接的に結合した Fe_3O_4 ナノ粒子によって部分的に形成される。また、この第 1 の層は、共役モノマーおよびバルクモノマーを含む第 1 の層高分子マトリックス材料を含む。共役モノマーは、第 1 のシェル部の表面上にアンカーポイントとして使用される化合物である。したがって、共役モノマー自体が、第 1 のシェル部の表面上の官能基と反応できる官能基、ならびに重合反応に用いることができる官能基を含む。本明細書において、いずれの適切な共役モノマーも使用できる。適切な共役モノマーの例として、限定されるものではないが、メタクリロイルクロリド、3 - エトキシ - アクリロイルクロリド、塩化アクリロイル、4 - ペンテノイルクロリド、無水メタクリル酸、無水 4 - ペンテン酸、無水クロトン酸、無水吉草酸、10 - ウンデセノイルクロリド、グリシドールメタクリレート、グリシドール、アリルグリシジルエーテルおよびそれらの組合せが挙げられる。

20

【0091】

第 2 のシェル部の第 1 の層および第 2 の層の一部を形成するバルクモノマーは、ポリエーテルモノマー、ポリエステルモノマー、ポリアクリルアミドモノマー、およびポリアシッドモノマーの 1 以上から選択し得る。適切なバルクモノマーの例として、限定されるものではないが、メタクリル酸メチル、アクリル酸、メタクリル酸、2 - カルボキシエチルアクリレート、2 - カルボキシエチルアクリレートオリゴマー、アクリルアミド、メタクリルアミド、アリルアミン、(ヒドロキシエチル)メタクリレート、ヒドロキシプロピルメタクリレート、4 - ヒドロキシブチルアクリレート、グリシジルメタクリレート、アリルグリシジルエーテル、1, 2 - エポキシ - 5 - ヘキセン、無水マレイン酸およびそれらの組合せが挙げられる。本明細書に言及し得る特定の実施形態において、バルクモノマーは、メタクリル酸および / または 2 - ヒドロキシエチルメタクリレートから選択し得る。

30

【0092】

本明細書に前記のごとき第 2 のシェル部の第 3 の層は、第 2 の官能性モノマーから形成し得る。この第 2 の官能性モノマー上の官能基は、本明細書に前記のもので有り得る。適切な官能性モノマーの例として、限定されるものではないが、アクリル酸、メタクリル酸、2 - カルボキシエチルアクリレート、アクリルアミド、メタクリルアミド、アリルアミン、(ヒドロキシエチル)メタクリレート、ヒドロキシプロピルメタクリレート、4 - ヒドロキシブチルアクリレート、グリシジルメタクリレート、アリルグリシジルエーテル、1, 2 - エポキシ - 5 - ヘキセン、無水マレイン酸、2 - ヒドロキシエチルメタクリレートおよび 2 - カルボキシエチルアクリレートオリゴマーの 1 以上が挙げられる。

40

【0093】

また、第 2 のシェル部に使用される高分子材料は、架橋されていてもよい。例えば、第

50

1の層は架橋されていてもよく、第2の層は架橋されていてもよく、第3の層は架橋されていてもよく、またはそれらのいずれかの組合せで有り得る。本明細書に言及し得る実施形態において、第1の層および第2の層は架橋されていてもよく、第3の層は他の層に対して架橋を有さないかまたは少ない架橋で有り得る。

【0094】

第2のシェル部において架橋を形成するために用いられる架橋性モノマーは、ジビニルベンゼン、エチレングリコールジメチルアクリレート、ビスフェノールAジメタクリレート、N,N'-メチレンビス(アクリルアミド)、ビスフェノールAエポキシアクリレート、ビスフェノールジアクリレート、トリプロピレングリコールジアクリレート、プロポキシ化ネオペンチルジアクリレート、プロポキシ化グリセロールジアクリレート、ペンタエリスリトールプロポキシレートトリアクリレート、ブタンジオールジメタクリレート、トリシクロデカンジメタノールジアクリレート、ペンタエリスリトールトリアクリレート、ジトリメチロールプロパンテトラアクリレート、ジペンタエリスリトールペンタノヘキサアクリレート、トリプロピレンジアクリレート、トリメチロールプロパンエトキシレートトリアクリレート、トリメチロールプロパンプロポキシレートトリアクリレート、ジ(トリメチロールプロパン)テトラアクリレート、グリセロールプロポキシレートトリアクリレート、ポリ(エチレングリコール)ジアクリレート、ポリ(プロピレングリコール)ジアクリレート、およびトリ(プロピレングリコール)ジアクリレートよりなる群の1以上から選択でき、例えば、架橋性モノマーは、ジビニルベンゼン、エチレングリコールジメチルアクリレート、ビスフェノールAジメタクリレートおよびN,N'-メチレンビス(アクリルアミド)よりなる群の1以上から選択される。

【0095】

本明細書に開示され得る実施形態において、第2のシェルの第2の層および第3の層の組合せ重量は、各ビーズの全重量の1~30重量%、好ましくは2~20重量%を占め得る。

【0096】

本明細書に開示されたビーズに関連する有利さは、以下を含むが、必ずしもこれらに限定されるものではない。

【0097】

・3種のモノマーのうち、(a)スチレンが核生成テンプレートを提供し、球状単分散ビーズに導く；(b)DVBのごとき架橋剤が架橋を提供し、ビーズを剛性および有機溶媒に耐性にする；(c)官能性モノマーが超常磁性ナノ粒子(NP)のアップロードを促進させる。

・3種のモノマー(スチレン、架橋剤、官能性モノマー)の得られたコポリマービーズは球状高度単分散であり、ビーズ直径は、重合開始剤濃度、PVP濃度、モノマーの負荷量(または添加量)のごとき重合因子を調節することにより変調することができる。

・ビーズにおいて、第1のシェル表面および第2のシェル表面上の双方で、官能基を担持する種々のモノマーを使用できる。これは、ビーズの表面特性の微調整(fine-tuning)を可能にし、それらが特定の適用においてより容易に使用されるのを可能にする。

・官能性モノマー(すなわち、官能基を担持するモノマー)の負荷量(または、添加量: loading amount)を調整することにより、ビーズ表面上の官能基の密度を微調整できる。

・ビーズへの超常磁性 Fe_3O_4 NPの高負荷化(30~50重量%)は、NPのオンサイト生成により達成できる。

・表面上に形成された Fe_3O_4 NPのサイズは、PSコアへの官能基のよく制御されたグラフト化により、よく制御される。

【0098】

理解されるごとく、本明細書に記載されたビーズに関連する構造および多くの有利さは、ビーズの製造方法により生起する。

【0099】

10

20

30

40

50

本発明において、単分散超常磁性ビーズは、4つのステップを介して得られる。

ステップ - 1 : 「ワンポット3段階 (one-pot three-stage)」重合を介する3種のモノマー (スチレン、架橋剤、官能性モノマー) の高度単分散コポリマービーズの合成。

ステップ - 2 : 合成したままの (as-synthesized) コポリマービーズの有機溶媒での洗浄および表面改質 (または、表面改変 : surface modification) 。

ステップ - 3 : コポリマービーズ上での超常磁性 Fe_3O_4 NP のオンサイト生成およびアップロード (upload) 。

ステップ - 4 : 超常磁性ビーズ上への機能性コーティングの作製。

【0100】

本発明者らは、上記で概説した手順が、単分散超常磁性ビーズを製造するための新しいプロセスであり、かかるビーズを製造するために用いられる従来の合成方法とは根本的に異なるものであると考えている。このプロセスは図2に概説され、図2Aはステップ1の後に得られた生成物に対応し、図2Bはステップ2の後に得られた生成物に対応し、図2Cはステップ3の後に得られた生成物に対応し、図2Dはステップ4の後に得られた最終生成物に対応する。図2において、30は孔を表し、40は Fe_3O_4 NP を表し、60は第1のシェル部の高分子部分を表し、80は第2のシェル部を表す。

10

【0101】

各ステップのより詳細が以下に提供される。

【0102】

ステップ1 : 3種のモノマー (スチレン、架橋剤、および官能性モノマー) を用いた高度単分散コポリマービーズの「ワンポット3段階」手順を介した合成、この手順は、コアおよび第1のシェル高分子材料 (これは、 Fe_3O_4 ナノ粒子を含んでいないが) を提供する。このプロセスステップの段階は、以下に要約される。

20

【0103】

(a) 第1の段階は、溶媒 (例えば、1~20v%の水を含有するエタノール) 中のスチレンの分散重合である。この段階で核生成は完了し、スチレンの大部分 (例えば、60~80重量%) を消費し、かくして、ビーズ数はこの段階で固定される。溶媒は、1~20v%の水を含有するアルコールの混合物で有り得る。第1の段階における総重合時間は、2~12時間、例えば、4~10時間で有り得る。

(b) 第2の段階は、架橋剤の添加による架橋であり、架橋剤と残存するスチレンモノマーとの架橋共重合は、コア-シェル構造を形成する (図2のA参照)。スチレンに対する架橋剤の重量パーセンテージは、1~40重量%、例えば、5~30%で有り得る。この段階において、重合時間は、1~8時間、例えば、2~6時間で有り得る。

30

(c) 第3のステップにおいて、官能性モノマーを加えて残存量の架橋剤およびスチレンと共重合させ、かくして、ビーズ表面に親水性官能基を導入する。加えて、この段階で1を超える官能性モノマー (例えば、2つまたは3つの官能性モノマー) を一緒に添加でき、1つのステップで多官能基を導入できる。スチレンに対する官能性モノマーの重量パーセンテージは、1~30重量%、例えば、5~20重量%で有り得る。この段階において、重合時間は、8~24時間、例えば、10~20時間で有り得る。

【0104】

40

この「ワンポット3段階」重合ステップは、いずれかの適切な温度、例えば、40~80、例えば、50~70 で実施できる。

【0105】

ステップ2 : ステップ1の合成したままのコポリマービーズを有機溶媒で十分に洗浄する。洗浄の目的は、未反応のスチレン、架橋剤および官能性モノマー、ならびにPVPのごとき安定剤 (使用時) をビーズから除去することである。加えて、極性溶媒での洗浄は、ポリマーマトリックスからいくらかの線状ポリスチレンを除去でき、ビーズを緩め、ビーズのコアおよび第1のシェル内に超常磁性 Fe_3O_4 NP の負荷 (または担持) を可能にするように、いくつかの孔を生成し得る。洗浄したビーズは、保存のために溶媒 (例えば、水) に再分散できる (図2のB参照) 。

50

【0106】

この洗浄工程において、水、メタノール、エタノール、イソプロパノール、THF、およびこれらの混合溶媒の1以上でビーズを洗浄することができる。ビーズを溶媒に数時間浸漬し、線状ポリスチレンを除去してビーズを緩め、またはビーズ内部にいくつかの孔を生成させることができる。洗浄または浸漬のプロセス中に、ビーズ表面上の官能基をさらに改変して、超常磁性 Fe_3O_4 NPのアップロードを促進できる。ビーズ表面上にエポキシ基を導入した場合、エポキシ基が、浸漬プロセス中に開環加水分解、または開環アミノ分解、または開環重合を受けて、ビーズ表面をさらに改変（または、改質：modify）し得る。これは、この洗浄ステップのために使用する溶媒または前記溶媒に添加するいずれかの試薬の性質に依存するであろう。

10

【0107】

ステップ3：洗浄したビーズを、 Fe^{3+} イオンおよび Fe^{2+} イオンを適当なモル比（例えば、 Fe^{3+} ： Fe^{2+} イオンの2：1のモル比）で含有する溶液（例えば、水および極性溶媒（例えば、THF）の混合溶液のごとき水溶液）中に分散させる。次いで、溶液の温度を攪拌しつつ数時間（例えば、70 まで）上昇させ、2つのイオンをビーズ表面上の官能基と相互作用させることができる。いくらかの Fe^{3+} イオンおよび Fe^{2+} イオンはビーズのポリマーマトリックスに浸透し、一方、いくらかは、（形成されたままのビーズの表面、すなわち、第1のシェル表面上の官能基との相互作用を介して）ビーズの表面上に吸着されるであろう。次いで、アンモニア水を加え、 Fe^{3+} イオンおよび Fe^{2+} イオンをインサイツにて Fe_3O_4 NPに変換（または、転換：transform）させる。アンモニア水を添加する前に、ポリアクリル酸または酒石酸またはクエン酸のごとき Fe_3O_4 NPを安定化させるリガンドを溶液に添加して、超常磁性 Fe_3O_4 NPの形成を補助し得る。得られた超常磁性ポリマービーズ（図2のC参照）を遠心により分離し、水およびメタノールで洗浄して、緩んだ Fe_3O_4 NPを除去する。

20

【0108】

Fe_3O_4 NPの形成を安定化させるのを助ける添加リガンドは、ポリアクリル酸、酒石酸、クエン酸、またはそれらの混合物であることができる。

【0109】

ステップ4：コーティング層は、 Fe_3O_4 NPの周囲に高分子ネットワークをグラフトすることにより、超常磁性ポリマービーズ上に作製する。ポリマーのグラフト化を達成するために、第1のシェル表面上の官能基と反応できる1以上の化合物を使用する。この材料は、第1のシェル表面上の官能基と反応できる第1官能基および、重合反応に参加できる第2官能基を有するため、2官能性である。この化合物をビーズ表面上に固定すると、バルクモノマーおよび、任意選択で架橋剤を用いてフリーラジカル重合条件に付される。次いで、引き続いて、下流プロセスのための望ましい官能基または望ましい最終官能性を有する1以上のモノマーを重合混合物に添加して、第2のシェルの最終部分を提供する。

30

【0110】

上記プロセスのステップ4において、ステップ2の表面からグラフトした機能性高分子ネットワークによって、超常磁性 Fe_3O_4 NPと一緒に結合される。ポリマーのグラフト化を達成するために、ステップ2のビーズ表面上に残された官能基、例えば、過剰なヒドロキシル基またはアミン基との反応を介して、モノマーを表面上で改変する。このステップでは無水溶媒を用い、これは、1,4-ジオキサン、テトラヒドロフラン、ジグライム、酢酸エチル、酢酸ブチル、アセトン、メチルエチルケトンの1以上から選択し得る。本明細書の後記のこのステップで用い得る具体的な溶媒は、テトラヒドロフランおよびジグライムで有り得る。反応時間は、不活性ガスパーズをしつつ、12~36時間で有り得る。得られたビーズを有機溶媒で洗浄して、過剰なモノマーを除去する。

40

【0111】

必要に応じて、開始剤を上記のプロセスにおいて使用し得る。開始剤は、AIBN、AMB Nのごときアゾ開始剤から選択し得る。また、開始剤は、ターシャリ-アミルヒドロ

50

ペルオキシド、過硫酸カリウム、過硫酸ナトリウムおよび過硫酸アンモニアを含めた過酸化開始剤および過硫酸塩から選択し得る。

【0112】

バルクモノマーに対する架橋剤の重量パーセンテージは、5～70重量%、好ましくは10～50重量%で有り得る。ステップ4において、重合時間は、10～30時間、例えば、16～24時間で有り得る。ステップ4において、フリーラジカル重合は、40～80、例えば、50～70の温度で実施することができる。

【0113】

かくして、コア-シェル構造を有する、単分散超常磁性ビーズを調製する方法も開示され、該方法は、

(a) ポリスチレン高分子マトリックス材料から形成されたコア部を含む、単分散超常磁性前駆体ビーズを提供すること、ポリスチレン高分子マトリックス材料が第1のバッチの超常磁性 Fe_3O_4 ナノ粒子を封入し；

コア部の頂部上に直接的に位置し、スチレンモノマー、架橋性モノマー、および官能基を有する第1の官能性モノマーから形成された架橋高分子マトリックス材料から形成された第1のシェル部であって、コポリマーマトリックス材料が第2のバッチの超常磁性 Fe_3O_4 ナノ粒子を封入する、第1のシェル部；および

第1のシェル部の頂部上に直接的に位置する第2のシェル部であって、超常磁性 Fe_3O_4 ナノ粒子および高分子前駆体アンカーポイントを含み、その双方は第1のシェル部の表面上の官能基に結合する、第2のシェル部；ならびに

(b) 単分散超常磁性前駆体ビーズ上に、ワンポットフリーラジカル重合によって機能性コーティング層を形成すること、

(i) 第1のステップにおいて、バルクモノマーを使用し；および

(ii) 第2のステップにおいて、官能基を有する第2の官能性モノマーを用いて単分散超常磁性ビーズを形成し、

機能性コーティング層が、高分子前駆体アンカーポイントにより第1のシェル部に結合する、ことを含む。

【0114】

バルクモノマーは、ポリエーテルモノマー、ポリエステルモノマー、ポリアクリルアミドモノマー、およびポリアシッドモノマーよりなる群の1以上から選択し得る。例えば、バルクモノマーは、メタクリル酸メチル、アクリル酸、メタクリル酸、2-カルボキシエチルアクリレート、2-カルボキシエチルアクリレートオリゴマー、アクリルアミド、メタクリルアミド、ア릴アミン、(ヒドロキシエチル)メタクリレート、ヒドロキシプロピルメタクリレート、4-ヒドロキシブチルアクリレート、グリシジルメタクリレート、アリルグリシジルエーテル、1,2-エポキシ-5-ヘキセン、無水マレイン酸よりなる群の1以上から選択でき、任意選択で、バルクモノマーは、メタクリル酸および/または2-ヒドロキシエチルメタクリレートから選択される。

【0115】

直上に記載の方法において、第1のステップは、バルクモノマーおよび開始剤を含む混合物を使用し得る。この場合、開始剤は、ターシャリ-アミルヒドロペルオキシド、過硫酸カリウム、過硫酸ナトリウム、過硫酸アンモニア、4,4'-アゾビス(4-シアノ吉草酸)、2,2'-アゾビス[2-メチル-N-(2-ヒドロキシエチル)プロピオンアミド]水和物、2,2'-アゾビス[N-(2-カルボキシエチル)-2-メチルプロピオンアミジン]水和物、2,2'-アゾビス(2-メチルプロピオンアミジン)二塩酸塩、2,2'-アゾビス[2-(2-イミダゾリン-2-イル)プロパン]、および2,2'-アゾビス[2-(2-イミダゾリン-2-イル)プロパン]二塩酸塩よりなる群の1以上から選択し得る。また、この混合物は、以下のものを含み得る：

(a) 架橋剤。例えば、架橋剤は、ジビニルベンゼン、エチレングリコールジメチルアクリレート、ビスフェノールAジメタクリレート、N,N'-メチレンビス(アクリルアミド)、ビスフェノールAエポキシアクリレート、ビスフェノールジアクリレート、トリ

10

20

30

40

50

プロピレングリコールジアクリレート、プロポキシ化ネオペンチルジアクリレート、プロポキシ化グリセロールジアクリレート、ペンタエリスリトールプロポキシレートトリアクリレート、ブタンジオールジメタクリレート、トリシクロデカンジメタノールジアクリレート、ペンタエリスリトールトリアクリレート、ジトリメチロールプロパンテトラアクリレート、ジペンタエリスリトールペンタ/ヘキサアクリレート、トリプロピレンジアクリレート、トリメチロールプロパンエトキシレートトリアクリレート、トリメチロールプロパンプロポキシレートトリアクリレート、ジ(トリメチロールプロパン)テトラアクリレート、グリセロールプロポキシレートトリアクリレート、ポリ(エチレングリコール)ジアクリレート、ポリ(プロピレングリコール)ジアクリレート、およびトリ(プロピレングリコール)ジアクリレートよりなる群の1以上から選択でき、例えば、架橋性モノマーは、ジビニルベンゼン、エチレングリコールジメチルアクリレート、ビスフェノールAジメタクリレートおよびN, N'-メチレンビス(アクリルアミド)よりなる群の1以上から選択され、および/または

(b) 溶媒。例えば、溶媒は、1, 4-ジオキサソラン、テトラヒドロフラン、ジグライム、酢酸エチル、酢酸ブチル、アセトン、メチルエチルケトン、および水よりなる群の1以上から選択し得る。

【0116】

上述した第2の官能性モノマーは、アクリル酸、メタクリル酸、2-カルボキシエチルアクリレート、アクリルアミド、メタクリルアミド、アリルアミン、(ヒドロキシエチル)メタクリレート、ヒドロキシプロピルメタクリレート、4-ヒドロキシブチルアクリレート、グリシジルメタクリレート、アリルグリシジルエーテル、1, 2-エポキシ-5-ヘキセン、無水マレイン酸、2-ヒドロキシエチルメタクリレートおよび2-カルボキシエチルアクリレートオリゴマーよりなる群の1以上よりなる群の1以上から選択し得る。

【0117】

上記のプロセスにおいて：

(a) 第1のステップおよび/または第2のステップの重合は、30~80、例えば、50~70の温度で実施し得る；および/または

(b) 第1のステップおよび第2のステップの総重合時間は、10時間~30時間、例えば、16時間~24時間で有り得る。

【0118】

上記のプロセスを実施するために、単分散超常磁性前駆体ビーズを提供する必要がある。これらのビーズは：

(i) ネイキッド単分散超常磁性ビーズを提供すること、ビーズが、ポリスチレン高分子マトリックス材料から形成されたコア部であって、ポリスチレン高分子マトリックス材料が第1のバッチの超常磁性Fe₃O₄ナノ粒子を封入する、コア部；

コア部の頂部上に直接的に位置し、スチレンモノマー、架橋性モノマー、および官能基を有する第1の官能性モノマーから形成された架橋高分子マトリックス材料から形成された第1のシェル部であって、コポリマーマトリックス材料が第2のバッチの超常磁性Fe₃O₄ナノ粒子を封入する、第1のシェル部；および

第1のシェル部の頂部上に直接的に位置する第2のシェル部であって、第1のシェル部の表面上の官能基に結合する超常磁性Fe₃O₄ナノ粒子を含む、第2のシェル部を含み；ならびに

(ii) ネイキッド単分散超常磁性ビーズを、メタクリロイルクロリド、3-エトキシ-アクリロイルクロリド、アクリロイルクロリド、4-ペンテノイルクロリド、無水メタクリル酸、無水4-ペンテン酸、無水クロトン酸、無水吉草酸、10-ウンデセノイルクロリド、グリシドールメタクリレート、グリシドールおよびアリルグリシジルエーテルよりなる群の1以上から選択されるアンカー材料と反応させることにより、第1のシェル部上で高分子前駆アンカーポイントを形成させることにより、単分散超常磁性前駆体ビーズを形成することを含むプロセスにより形成し得る。

【0119】

ネイキッド単分散超常磁性ビーズは、

(a i) 単分散ビーズを提供すること、単分散ビーズが、ポリスチレン高分子マトリックス材料から形成されたコア部；および

コア部の頂部上に直接的に位置し、スチレンモノマー、架橋性モノマー、および官能基を有する第1の官能性モノマーから形成された架橋高分子マトリックス材料から形成された第1のシェル部を含み；ならびに

(a i i) 単分散ビーズを、Fe(III)塩およびFe(II)塩を含む溶液に入れ、塩基を加えることによって、ネイキッド単分散超常磁性ビーズを形成すること、を含むプロセスによって形成し得る。

10

【0120】

直上に記載のプロセスにおいて、

(a) 鉄(III)塩が、FeCl₃および/またはFe₂(SO₄)₃から選択し得る；および/または

(b) 鉄(II)塩が、FeCl₂、FeSO₄、Fe(OAC)₂よりなる群の1以上から選択し得る；および/または

(c) 塩基が、水酸化アンモニア、NaOH、KOH、およびアミンよりなる群の1以上から選択し得る；および/または

(d) 溶液が、CoCl₂および/またはMnCl₂をさらに含み得る。

【0121】

上記の単分散ビーズは、「ワンポット3段階」連続プロセスによって形成でき、このプロセスが、

(a) 第1の段階において、水とアルコールとの混合物中でスチレンモノマーを開始剤およびポリマー安定剤で分散重合することによりポリスチレンコアを生成して、核となる(nucleated)ポリスチレンコアを形成する；

(b) 第2の段階において、核形成されたポリスチレンコアを含む混合物に架橋性モノマーを添加する；および

(c) 第3の段階において、第2の段階から得られた材料に第1の官能性モノマーを加えて単分散ビーズを提供し、任意選択で、ポリスチレンビーズはインサイツにて生成され、架橋剤および官能性モノマーの引き続いての添加が、第2の核生成を起こさないため、表面上に官能基を担う(スチレン/架橋剤/官能性モノマー)の球状単分散コポリマービーズに導く、ことを含む。

20

30

【0122】

直上に記載のプロセスにおいて、

(a) 開始剤が、アゾ開始剤から選択され、任意選択で、アゾ開始剤が、2,2'-アゾビス(2-メチルプロピオニトリル)(AIBN)、および2,2'-アゾビス(2-メチルブチロニトリル)(AMBN)よりなる群の1以上から選択され；および/または

(b) ポリマー安定剤が、ポリ(ビニルピロリドン)(PVP)、ポリエチレンイミン(PEI)、ポリアクリル酸(PAA)、ポリビニルアルコール(PVA)、ヒドロキシプロピルメチルセルロース(HPC)およびキトサンよりなる群の1以上から選択でき；および/または

(c) スチレンモノマーが、スチレン、およびスチレン誘導体よりなる群の1以上から選択でき、任意選択で、スチレン誘導体が、4-メチルスチレン、3-メチルスチレン、および4-tert-ブチルスチレンよりなる群の1以上から選択され；および/または

(d) アルコールが、メタノール、エタノール、イソプロパノール、またはそれらの混合物よりなる群の1以上から選択でき；および/または

(e) アルコール-対-水の体積比が、1:1~40:1、例えば、2:1~20:1で有り得る。

40

【0123】

上記で用いられる架橋性モノマーは、ジビニルベンゼン、エチレングリコールジメチル

50

アクリレート、ビスフェノール A ジメタクリレート、ブタンジオールジメタクリレート、トリシクロデカンジメタノールジアクリレート、ペンタエリスリトールトリアクリレート、トリプロピレングリコールジアクリレート、プロポキシ化ネオペンチルジアクリレート、ペンタエリスリトールトリアクリレート、ジトリメチロールプロパンテトラアクリレート、ジペンタエリスリトールペンタアクリレート、ジペンタエリスリトールペンタノヘキサアクリレート、トリプロピレンジアクリレート、トリメチロールプロパンエトキシレートトリアクリレート、トリメチロールプロパンプロポキシレートトリアクリレート、ジ(トリメチロールプロパン)テトラアクリレート、グリセロールプロポキシレートトリアクリレート、ペンタエリスリトールプロポキシレートトリアクリレート、ポリ(エチレングリコール)ジアクリレート、ポリ(プロピレングリコール)ジアクリレート、およびトリ(プロピレングリコール)ジアクリレートよりなる群の 1 以上から選択でき、任意選択で、前記架橋性モノマーが、ジビニルベンゼン、エチレングリコールジメチルアクリレート、ビスフェノール A ジメタクリレート、および N, N' - メチレンビス(アクリルアミド)よりなる群の 1 以上から選択される。

10

【0124】

第 1 の官能基を有するモノマーの官能基は、独立して、アミノ、カルボキシル、エポキシ、およびヒドロキシルの 1 以上から選択し得る。例えば、第 1 のシェル部、および第 2 のシェル部の第 2 の層の官能性モノマー上の官能基は、独立して、ヒドロキシル基およびカルボキシル基の組合せ、またはアミノ基およびカルボキシル基の組合せから選択し得る。より詳細には、第 1 の官能性モノマーは、アクリル酸、メタクリル酸、2 - カルボキシエチルアクリレート、アクリルアミド、メタクリルアミド、アリルアミン、(ヒドロキシエチル)メタクリレート、ヒドロキシプロピルメタクリレート、4 - ヒドロキシブチルアクリレート、グリシジルメタクリレート、アリルグリシジルエーテル、1, 2 - エポキシ - 5 - ヘキセン、無水マレイン酸、2 - ヒドロキシエチルメタクリレートおよび 2 - カルボキシエチルアクリレートオリゴマーよりなる群の 1 以上から選択し得る。

20

【0125】

直上のプロセスにおいて、スチレンモノマー - 対 - 架橋剤の重量比は、20 : 1 ~ 1 : 2、例えば、10 : 1 ~ 1 : 1 で有り得る。例えば、スチレンモノマー - 対 - 第 1 の官能性モノマーの重量比は、20 : 1 ~ 1 : 2 であり、好ましくは 10 : 1 ~ 1 : 1 である。

【0126】

単分散ビーズを使用する前に、それらは、1 以上の溶媒で洗浄した後、引き続いてのプロセスステップにおいて使用する。洗浄に用いる溶媒は、水、メタノール、エタノール、イソプロパノール、および THF よりなる群の 1 以上から選択し得る。

30

【0127】

上記のプロセスにおいて、得られる単分散超常磁性ビーズは、

(a) 15 % 未満、例えば、10 % 未満、例えば、5 % 未満、例えば、2 % 以下のそれらの直径に基づく変動係数；および/または

(b) 0.2 ~ 5.0 ミクロン、例えば、0.5 ~ 4.0 ミクロンの平均直径を有し得る。

【0128】

本発明は、体外診断 (IVD) アッセイおよび他の適用に有用な単分散超常磁性ビーズに関する。これらの単分散超常磁性ビーズは、スチレン - 架橋剤 - 官能性モノマーの架橋層で覆われ、さらに超常磁性 Fe₃O₄ ナノ粒子層で覆われ、ポリマーマトリックス内に分散した部分が少ない、ポリスチレンコアを有する。最後に、機能性コーティングがビーズ表面上に作製され、超常磁性 Fe₃O₄ ナノ粒子を結合および被覆し、ならびに IVD アッセイ用の官能基を提供する。

40

【0129】

かくして、理解されるごとく、本明細書に記載される超常磁性ビーズは、IVD アッセイに使用し得る。

【0130】

50

本発明の有利さについて以下に説明する。

【0131】

・高度単分散超常磁性ビーズを製造する。

・3種のモノマー〔スチレン、架橋剤（例えば、DVB）、官能性モノマー〕を含む高度単分散コポリマービーズは、「ワンポット3段階」重合手順により製造される。この手順は、煩雑な操作を含み、非常に長い重合時間を消費する多段階の合成プロセスを必要とする最先端（state-of-the-art）の方法と比較して、簡便でかつ実用的である。

・「ワンポット3段階」重合手順において、各モノマーが役割を担っている。（a）スチレンが核生成テンプレートを提供し、球状単分散ビーズに導く；（b）DVBのごとき架橋剤が架橋を提供し、ビーズをより剛性および有機溶媒に耐性にする；および（c）官能性モノマーが超常磁性ナノ粒子（NP）のアップロードを促進させる。

10

・3種のモノマー（スチレン、架橋剤、官能性モノマー）の得られたコポリマービーズは球状高度単分散性であり、ビーズ直径は、重合開始剤濃度、PVP濃度、モノマーの負荷量（または、添加量）のごとき重合因子を調節することにより変調することができる。

・ビーズに種々の官能性モノマーを共重合でき、ビーズ表面上に官能基を導入できる。かかる官能性モノマーは、2-カルボキシエチルアクリレート、アクリル酸、アリルアミン、1-ビニルイミダゾール、4-ビニルピリジンを含む。加えて、第3の段階で1種類を超える官能性モノマーと一緒に添加し、1プロセスで複数の官能基を導入し得る。

・ビーズ表面上の官能性基の密度は、官能性モノマーの負荷量（または、添加量：loading amount）を調整することにより微調整できる。

20

・ポリスチレンの核生成完了後、架橋剤（例えば、DVB）および官能性モノマーの引き続きの添加は、2次核生成が生じさせず、これは、高度単分散ビーズを製造する理由の一つである。

・ビーズへの超常磁性 Fe_3O_4 NP（例えば、30～50重量%）の高負荷（または、高担持）は、NPのオンサイト生成により達成できる。

・表面上に形成された Fe_3O_4 NPのサイズは、PSコアへのよく制御された官能基のグラフト化により、よく制御される。

【0132】

本発明のさらなる態様および実施形態は、以下の非限定例を参照することによって説明される。

30

【実施例】

【0133】

（実施例）

本発明は、コア-シェル構造を有する単分散超常磁性ビーズに関する。ビーズは、図2に概略を示した4ステップのプロセスで製造でき、これは単分散超常磁性ビーズの製造についての従来の合成方法とは根本的に異なる。

【0134】

4ステップの詳細については、図2を参照して、以下にさらに詳しく説明される。

【0135】

ステップ1：3種のモノマー（スチレン、架橋剤、官能性モノマー）からの「ワンポット3段階」重合手順を介する高度単分散ターポリマー（terpolymer）ビーズの合成

40

（a）第1の段階は、0～20v%の水を含有するエタノール中でのスチレンの分散重合である。このステップで核形成が完了し、ポリスチレンコア20を得る。スチレンモノマーの大部分（例えば、60～80重量%）が消費され、かくして、この段階でビーズ数は固定される。重合時間は、2～12時間、好ましくは4～10時間である。

（b）第2の段階は、架橋剤の添加による架橋である。架橋剤と残存するスチレンとの共重合により、コア-シェル構造（A）を形成する。重合時間は、1～8時間、好ましくは2～6時間である。

（c）第3の段階において、官能性モノマーを添加して、残存する少量の架橋剤とスチレンとを共重合させる。得られたターポリマーシェル40は、ビーズ表面上に親水性官能

50

基を含む。加えて、この段階で1を超える官能性モノマー（例えば、2つまたは3つの官能性モノマー）を一緒に添加でき、1回の実行で複数の官能基を導入できる。重合時間は、8～24時間、好ましくは10～20時間である。

【0136】

この「ワンポット3段階」連続プロセスが、3種のモノマー（スチレン、DVB、官能性モノマー）から球状高度単分散ターポリマービーズを製造できることを、驚くべきことに見出した。この「ワンポット3段階」連続プロセスは、3つの優れた特徴を有する。

(a) スチレンが核生成テンプレートを提供し、球状単分散ビーズに導く。

(b) 架橋剤（例えば、DVB）が、架橋を提供し、ビーズの剛性および有機溶媒への耐性を決定する。

(c) 官能性モノマーが、親水性官能基、例えば、 $-COOH$ 、 $-NH_2$ 、エポキシ基、酸無水物基を導入し、さらに改変して、超常磁性 Fe_3O_4 N Pのアップロードを促進できる。

【0137】

また、驚くべきことには、架橋剤および官能性モノマーの添加が、2次核生成を生じないことを見出した。加えて、この段階での官能性モノマーの添加は、表面上に高い官能基密度を達成し、超常磁性 Fe_3O_4 N Pのインサイツにての沈殿（または、析出）を可能にする。

【0138】

ステップ2：合成したままのターポリマービーズの有機溶媒での洗浄および表面改質。

ステップ1で合成したままのターポリマービーズ（A）を、有機溶媒で十分に洗浄する。洗浄の目的は、溶液中の未反応のスチレン、架橋剤、官能性モノマー、ならびにPVPのごとき安定剤を除去することである。加えて、極性溶媒での洗浄（以下の例）は、ポリマーマトリックスに存在する線状ポリスチレンのいくらかを除去することもでき、これによりビーズを緩め、超常磁性 Fe_3O_4 N Pのオンサイトローディングに有利ないくつかの孔（30として示される）を生成できる。洗浄したビーズを再分散させ、水中に保存して、（B）を得る。

【0139】

洗浄または浸漬プロセス中に、ビーズ表面上の官能基をさらに改変して、超常磁性 Fe_3O_4 N Pのアップロードを促進できる。ビーズ表面上にエポキシ基を導入した場合、エポキシ基は開環加水分解、開環アミノ分解、開環重合を受けて、ビーズ表面をさらに改変し得る。

【0140】

ステップ3：超常磁性 Fe_3O_4 N Pのターポリマービーズのオンサイト生成およびアップロード。

洗浄したビーズ（B）を、 Fe^{3+} および Fe^{2+} を2：1のモル比で含む水溶液（水およびTHFのごとき極性溶媒の混合物）に分散させ、分散液を数時間攪拌しつつ加熱（例えば、70℃まで）して、2つのイオンがビーズの官能基と相互作用するのを可能にする。理論に拘束されることなく、このプロセス中にいくらかの Fe^{3+} イオンおよび Fe^{2+} イオンはビーズのポリマーマトリックスに浸透し、いくらかはビーズ表面上に吸着されると考えられる。次いで、アンモニア水を加えて、 Fe^{3+} イオンおよび Fe^{2+} イオンを Fe_3O_4 ナノ粒子（ Fe_3O_4 N P；60）に変換させる。アンモニア水の添加後、ポリアクリル酸または酒石酸またはクエン酸のごとき Fe_3O_4 N Pを安定化するリガンドをビーズ溶液に添加して、超常磁性 Fe_3O_4 N Pの形成を補助し得る。得られた超常磁性ポリマービーズ（C）を遠心により分離し、水およびメタノールで洗浄して、緩い Fe_3O_4 N P 60を除去する。

【0141】

ステップ4：超常磁性ビーズ上への機能性コーティングの作製。

超常磁性ポリマービーズ（C）上にコーティング層80を作製する。コーティング層は、アンカー材料を（C）と反応させた後、バルクモノマー、第2の官能性モノマー、およ

10

20

30

40

50

び任意の架橋剤のフリーラジカル重合によって達成される。さらに、ヒドロキシル基、カルボキシル基のごとき官能基を必要な密度で表面上に導入できる。

【0142】

具体的な例において、超常磁性 Fe_3O_4 NP 40 は、ステップ 2 から形成された機能性ポリマーネットワーク内に封入される。ポリマーのグラフト化を達成するために、ステップ 2 のビーズ表面上に残存する官能基、例えば、ヒドロキシル基またはアミン基との反応を介してアンカー材料を導入する。アンカー材料は、詳細な説明にリストされているものから選択できる。無水溶媒は、1,4-ジオキサン、テトラヒドロフラン、ジグライム、酢酸エチル、酢酸ブチル、アセトン、メチルエチルケトンから選択される。好ましくは、テトラヒドロフランおよびジグライムである。反応時間は不活性ガスパージで 12 ~ 36 時間である。得られたビーズを有機溶媒で洗浄して、過剰なモノマーを除去する。

10

【0143】

さらに、コーティング層は、ビーズ表面上のアンカー基（例えば、不飽和基）を、第 1 の段階ではバルクモノマー、第 2 の段階では第 2 の官能性モノマー、任意には架橋剤と反応させることによりグラフトされる。具体的な材料は詳細な説明にリストしている。この段階において、重合時間は 10 ~ 30 時間、好ましくは 16 ~ 24 時間である。フリーラジカル重合は、40 ~ 80、好ましくは 50 ~ 70 の温度で実施することができる。

【0144】

材料：

材料は、以下に示す供給元から購入した。

20

スチレン：東京化成工業（TCI）、TBC（4-tert-ブチルカテコール）で安定化、>99.0%（GC）。

アゾビスイソブチロニトリル（AIBN）：Sigma-Aldrich（アセトン中 12 重量%）。

過硫酸ナトリウム（ $Na_2S_2O_8$ 、SPS）：Alfa Aesar、結晶性、98%。

ポリビニルピロリドン（PVP, K30, MW = 40,000）：TCI、合計窒素 12.0% ~ 12.8%（無水物質で計算）；水 最大 7.0%、K 値 26.0 ~ 34.0。

ジビニルベンゼン（DVB, m-および p-混合物）：TCI, 50.0%（GC）（エチルビニルベンゼン、ジエチルベンゼンを含む）（4-tert-ブチルカテコールで安定化）。

30

アクリル酸：TCI, >99.0%（GC）（モノメチルエーテルハイドロキノンで安定化）。

メタクリル酸グリシジル：Sigma-Aldrich, 97.0%（GC）。

2-ヒドロキシエチルメタクリレート：Sigma-Aldrich, 99.0% 以上

2-カルボキシエチルアクリレートオリゴマー：Sigma-Aldrich、阻害剤として 2000 ppm の MEHQ。

エタノール：99%。

40

クエン酸：シグマ・アルドリッチ、98%。

トリメチロールプロパントリアクリレート：Sigma-Aldrich

メタクリル酸メチル：TCI

2-(2-アミノエトキシ)エタノール：Sigma-Aldrich, 98%。

脱イオン水：ELGA Ultrapure Water Treatment Systems (PURELAB Option) から入手。

走査型電子顕微鏡（SEM）撮影は JEOL JSM6700F で行った。

透過型電子顕微鏡（TEM）撮影は JEOL 2100F で行った。

メカニカルスターラー：Wiggen, WB2000-M オーバーヘッドスターラー

【0145】

50

熱重量分析 (TGA) は、Shimadzu、DTG-60 を用いて行った。約 15 mg (乾燥質量) のビーズを含む試料を 70 のオープンで乾燥させた。基準 (または、参照: reference) ルツボおよび試料ルツボを含む空ルツボをホルダー上に並列に配置した。基準ルツボと試料ルツボの重量差を解消した。次いで、ビーズ試料を試料ルツボに充填した。温度プロフィールは、室温から 700 まで 20 / 分間の刻みで、100 にて 10 分間の保持時間で設定した。全プロセスを N₂ パージ下で行った。磁性含有量は、以下の式で算出した。

【0146】

【数2】

$$Fe\% = W_2 / W_1 \times 100\%$$

10

【0147】

(式中、W₁ は 10 分間保持後の 100 での重量、W₂ は 700 での重量である。)

【0148】

超常磁性特性の測定は、Quantum Design の 6000 PPMS (Physical Property Measurement System) を用いて実施した。約 15 mg (乾燥質量) のビーズを含む試料を、室温下、真空オープンで乾燥させた。磁化曲線 [M - H] は、振動試料型磁力計 (P525) および振動試料型磁力計 (Micro Sense, EV9) を備えた物性測定システム (Quantum Design, PPMS 6000) を用いて得た。M - H は 300 K にて適切な強さの電界の印加で測定した。

20

【0149】

ポリスチレンビーズの変動係数 (CV) % は、SEM 像 (10,000 倍) 測定から算出した。IMAGE J を使用して 100 個のビーズを測定し、平均直径および CV を算出した。

【0150】

一般的な考慮事項

すべての重合プロセスについて機械的攪拌 (200 rpm) を使用した。使用前に DI 水およびエタノールを窒素で 20 分間パブリングして、酸素を除去した。すべての薬品 (AIBN、SPS、PVP、アクリル酸、アリルアミン、DVB、スチレン、グリシドール、グリシジルメタクリレート、ビスフェノール A ジグリシジルエーテルおよび 2-ヒドロキシエチルメタクリレートを含む) は精製なくして受け取ったままで使用した。すべての重合および反応は、窒素保護下で、標準的なシュレンク線の技法を用いて実施した。

30

【0151】

実施例 1 :

- COOH 基および -OH 基を担持する単分散ビーズの合成
- COOH 基および -OH 基を担持する単分散ビーズを合成するための「ワンポット 3 段階」重合プロセスについて、以下に説明する。

40

【0152】

メカニカルスターラーを備えた 250 mL の三口丸底ガラス製反応器に、AIBN 溶液 (2 g、アセトン中 12 重量%) を加え、一側の口から窒素を導入してアセトン溶媒を除去した。10 分間の窒素流の後、反応器の底に乾燥した AIBN 粉末を観察した。次いで、PVP (0.2 g)、エタノール (80 mL)、および DI 水 (20 mL) を加えた。この混合物を室温にて 5 分間攪拌して透明な溶液を得、次いで、これをオイルバスで 60 に加熱した後、スチレン (7.5 mL) を加えた。4 時間後に白色コロイド溶液が生成し、スチレンの重合を示した。次いで、DVB (7 mL のエタノール中の 3 mL の DVB) の溶液を定圧滴下ロートで 30 分間かけて徐々に添加した。DVB 溶液の添加完了後、3 時間反応 (架橋重合) を続けた。次いで、2-ヒドロキシエチルメタクリレート (5

50

m Lのエタノール中0.75 g)および2-カルボキシエチルアクリレートオリゴマー(5 mLのエタノール中0.75 g、アンモニア水で中和、25% W/W)のモノマー溶液をシリンジを用いて添加した。反応(重合)を6時間続け、ミルク状のコロイド溶液を得た。SEM像は、合成したままのビーズが球状単分散であり、約1.0ミクロンの直径を有することを示した(図3)。得られたビーズを「A-1」と命名した。

【0153】

実施例2:

ビーズA-1の洗浄および表面改質

A-1のビーズ(50 mL分散液、質量濃度 約8重量%)を遠心により分離し、超音波処理によりエタノールに再分散させた。ビーズをエタノール(50 mL×2)、THF および水の混合物(1:1の体積比; 50 mL×2)で洗浄した。得られたビーズを遠心分離し、THF(50 mL)に再分散させ、B-1を得た。SEM像は、ビーズが球状単分散であり、約1.0ミクロンの直径を有することを示した。

10

【0154】

実施例3:

ビーズB-1の磁化

メカニカルスターラーを備えた250 mLの三口丸底ガラス製反応器に、FeCl₃(8.0 g)および水100 mLを加えて攪拌し、茶色溶液を形成した後、FeCl₂(3.1 g)およびTHF(20 mL)を加えた。この混合物を30分間攪拌して溶液を形成し、これにビーズB-1の水溶液(50 mL、質量濃度 約8重量%)を加えて、70 で3時間攪拌した。混合物を室温まで冷却した後、激しい攪拌下でアンモニア水(25重量%, 30 mL)を加え、直ちに黒色スラリーを得た。クエン酸溶液(0.5 g、10 mLの水中)を反応器に加え、黒色スラリーを70 に1時間加熱し、反応を完了させた。この超常磁性ビーズは、数回の遠心シフトにより精製して、未結合の超常磁性NPを除去し、最後にDI水(100 mL、約4重量%)に再分散させた。得られた黒褐色超常磁性ビーズを「C-1」と命名した。TGAの結果は、ビーズが43重量%のNPを含むことを示した。得られた磁性ビーズは単分散で、いくらかのFe₃O₄ NPがコア内に均一に散在し、表面上には非常に厚い層のふわふわした(fluffy) Fe₃O₄ NPを有した。Fe₃O₄ NP層の厚さは、ビーズの周囲で約70~100 nmである(図4)。超常磁性特性はQuantum Designの6000 PPMS(Physical Property Measurement System)を用いて測定した。飽和磁化(MS)値は、原子吸光法により測定したビーズの質量を用いて正規化(または、規格化: normalized)した。図5は、試料C-1の室温での典型的なヒステリシス曲線を示す。ヒステリシスループは、磁化ループ上のゼロの保磁力および残留磁化(remanence)により明らかのように、超常磁性的な挙動を示している。

20

30

【0155】

実施例4:

機能性コーティングの作製

結合ステップ:メカニカルスターラーを備えた250 mL三口丸底ガラス製反応器に、超常磁性ビーズC-1(30 mL, 無水THF中の4重量%)、メタクリロイルクロリド(100 mg、10 mLの無水THFに溶解)を添加した。混合物を窒素パージ下で60 に加熱し18時間維持した後、室温に冷却した。ビーズをTHFで洗浄し、過剰なメタクリロイルクロリドを除去し、次に水で洗浄した。ビーズは窒素保護下で水中に保存した。

40

【0156】

乳化重合によるコーティングステップ:前のステップの改質超常磁性ビーズ(10 mL、水中の4重量%)を、30 mLのDI水を含む50 mL遠心分離管に加えた。次いで、この混合物を、メカニカルスターラーを備えた250 mLの三口丸底ガラス製反応器に加えた。反応器を窒素でフラッシュして酸素を除去し、次いで、SPS(30 mg、2 mLの水に溶解)を添加した。混合分散液を60 に加熱し、10分間攪拌した。引き続き

50

て、メチルメタクリレート（400 mg）、トリメチロールプロパントリアクリレート（200 mg）を含むモノマーの混合物を、1時間にわたり4バッチに分けて（したがって、20分間隔にて）添加した。モノマー混合物の添加完了後、60℃にて6時間反応（コーティング重合）を続けた。室温まで冷却後、コーティングされた超常磁性ビーズを磁気分離器で分離し、エタノール（50 mL × 2）およびDI水（50 mL × 2）で洗浄した。コーティングされた超常磁性ビーズをD-1と命名した。図6のTEM像は、ビーズの構造が図2（D）で提唱したものに对应していることを明確に示した。ビーズの端は、磁性粒子の溶出を防ぐことができるポリマーの層で十分に覆われていた。

【0157】

実施例5：

エポキシ基を担持する単分散ビーズの合成

3種類のモノマー（スチレン、DVB、GMA）から作製された単分散ビーズを合成する「ワンポット3段階」重合プロセス、エポキシ基を担持するビーズについて、以下に説明する。

【0158】

メカニカルスターラーを備えた250 mL三口丸底ガラス製反応器に、AIBN溶液（2.0 g、アセトン中12重量%）を加え、一側の口から窒素を導入して、アセトン溶媒を除去した。10分間の窒素流の後、反応器の底に乾燥したAIBN粉末を観察した。次いで、PVP（0.3 g）、エタノール（80 mL）、およびDI水（16 mL）を加えた。この混合物を室温にて5分間攪拌して透明な溶液を得、次いで、これをオイルバスで60℃に加熱した後、スチレン（7.5 mL）を加えた。

【0159】

6時間後に白色コロイド溶液が生成し、スチレンの重合を示した。次いで、DVB（1.5 mL、エタノール8.5 mLに溶解）の溶液を、定圧滴下ポートで30分かけて徐々に添加した。DVB溶液の添加完了後、2時間反応（架橋重合）を続けた。次いで、グリジルメタクリレート（GMA）（2.0 g、10 mLのエタノールに溶解）の溶液をシリンジで加えた。24時間反応（重合）を継続し、ミルク状のコロイド溶液を得た。SEM像は、合成したままのビーズが球状単分散であり、約1.0ミクロンの直径を有することを示した（図7）。得られたビーズを「A-2」と命名した。

【0160】

実施例6：

A-2の洗浄および表面改質

A-2のビーズ分散液（50 mL、質量濃度 約8重量%）を遠心により分離し、超音波処理によりエタノールに再分散させた。ビーズをエタノール（50 mL × 2）ならびにTHFおよび水の混合物（1：1の体積比；50 mL × 2）で洗浄し、ビーズを1 gの2-（2-アミノエトキシ）エタノールを含むTHF溶液に再分散させ、室温にて20時間攪拌した。次いで、ビーズを水で5回洗浄し、水に再分散させ、B-2を得た。SEM像は、ビーズが約1.0ミクロンの直径を有する球状単分散であることを示した。

【0161】

実施例7：

B-2ビーズの磁化

メカニカルスターラーを備えた250 mLの三口丸底ガラス製反応器に、FeCl₃（8.0 g）および水100 mLを加えて攪拌し、茶色溶液を形成した後、FeCl₂（3.1 g）、THF（20 mL）を加えた。この混合物を30分間攪拌して溶液を形成し、これにビーズB-2の溶液（50 mL、水中質量濃度 約8重量%）を加えて、65℃で3時間攪拌した。混合物を室温まで冷却した後、激しい攪拌下でアンモニア水（25重量%、25 mL）を加え、直ちに黒色スラリーを得た。クエン酸溶液（0.5 g、10 mLの水中）を反応器に加え、黒色スラリーを70℃に1時間加熱し、反応を完了させた。この超常磁性ビーズは、数回の遠心シフトにより精製して、未結合の超常磁性NPを除去し、最後にDI水（100 mL、約4重量%）に再分散させた。得られた黒褐色超常磁性

10

20

30

40

50

ビーズを「C - 2」と命名した。TGAの結果は、ビーズが41重量%のNPを含むことを示した。C - 2のTEM像を図8に示す。

【0162】

実施例8：

機能性コーティングの作製

結合ステップ：メカニカルスターラーを備えた250mL三口丸底ガラス反応器に、超常磁性ビーズC - 2（10mL、無水THF中の4重量%）、無水メタクリル酸（120mg、30mLの無水THFに溶解）およびトリエチルアミン（TEA）（20μL、10mL無水THFに溶解）を添加した。混合物を窒素パージ下で65℃に加熱し3時間維持した後、室温に冷却した。ビーズをTHFで洗浄し、過剰な無水メタクリル酸を除去し、次いで、水で洗浄した。ビーズは窒素保護下で水中に保存された。

10

【0163】

グラフト重合によるコーティングステップ：前のステップの改質超常磁性ビーズ（10mL、水中の4重量%）を、30mLのDI水を含む50mL遠心分離管に加えた。この混合物を、メカニカルスターラーを備えた250mLの三口丸底ガラス製反応器に加えた。反応器を窒素でフラッシュして酸素を除去し、次いで、SPS（30mg、2mLの水に溶解）を添加した。混合分散液を60℃に加熱し、10分間攪拌した。引き続き、メチルメタクリレート（400mg）、ビスフェノールA型エポキシアクリレート（150mg）を含むモノマーの混合物を、4時間にわたり4バッチ（間隔1時間）で添加した。モノマー混合物の添加完了後、60℃にて4時間反応（コーティング重合）を続けた。アクリル酸モノマー（100mg、水で希釈し、さらにアンモニア水で中和した、25%（w/w））を加え、反応を60℃にて16時間続けた。室温に冷却後、コーティングされた超常磁性ビーズを磁気分離器で分離し、エタノール（50mL×2）、DI水（50mL×2）で洗浄した。コーティングされた超常磁性ビーズをD - 2と命名した。図9のTEM像は、C - 1と比較して滑らかな外層を示し、ナノ粒子が高分子ネットワーク内に効果的に封入されていることを示した。

20

【0164】

比較例1：

官能基を有さない単分散ビーズの合成

官能基を有さない2つのモノマー（スチレン - DVB）から単分散ビーズを合成する「ワンポット2段階」重合プロセスについて、以下に説明する。

30

【0165】

メカニカルスターラーを備えた250mL三口丸底ガラス製反応器に、AIBN溶液（2.2g、アセトン中12重量%）を加え、一側の口から窒素を導入してアセトンを除去した。10分間の窒素流の後、反応器の底に乾燥したAIBN粉末を観察した。次いで、PVP（0.9g）、エタノール（90mL）、およびDI水（10mL）を加えた。混合物を室温にて5分間攪拌して透明な溶液を得、これをオイルバスで70℃に加熱した後、スチレン（7.5mL）を加えた。

【0166】

6時間後に白色コロイド溶液が生成し、スチレンの重合を示した。次いで、DVB（1.5mL、エタノール8.5mLに溶解）の溶液を、定圧滴下ポートで30分かけて徐々に添加した。DVB溶液の添加完了後、20時間反応（架橋重合）を続けてミルク状のコロイド溶液を得た。SEM像は、合成したままのビーズが球状単分散であり、約0.8ミクロンの直径を有することを示した（図10）。得られたビーズを「CE - 1」と命名した。官能性モノマーを添加していないため、ビーズCE - 1は表面上に官能基を有さず、ビーズは疎水性である。

40

【0167】

比較例2：

CE - 1の洗浄および浸漬

CE - 1の合成したままのポリ（スチレン - DVB）ビーズ（50mL分散液、質量濃

50

度 約 8 重量 %) を遠心により分離し、超音波処理によりエタノールに再分散させた。ビーズをエタノール (5 0 m L × 2)、THF および水の混合物 (1 : 1 の体積比 ; 5 0 m L × 2)、THF (5 0 m L × 2) で洗浄した。洗浄したビーズを「CE - 2」と命名した。SEM 像は、ビーズが球状単分散であり、約 0 . 8 ミクロンの直径を有することを示した。

【 0 1 6 8 】

比較例 3 :

CE - 2 ビーズの磁化

メカニカルスターラーを備えた 2 5 0 m L の三口丸底ガラス製反応器に、FeCl₃ (8 . 0 g) および水 1 0 0 m L を加えて攪拌し、茶色溶液を形成した後、FeCl₂ (3 . 1 g)、クエン酸 (8 . 5 g) および THF (2 0 m L) を加えた。この混合物を 3 0 分間攪拌して溶液を形成し、これに THF 中のビーズ CE - 2 の溶液 (5 0 m L、質量濃度 約 8 重量 %) を加えて、6 0 °C で 3 時間攪拌した。混合物を室温まで冷却した後、激しい攪拌下でアンモニア水 (2 5 重量 % , 3 0 m L) を加え、直ちに黒色スラリーを得た。黒色スラリーを 6 0 °C に 1 時間加熱し、反応を完了させた。この超常磁性ビーズを数回の遠心シフトにより精製して、未結合の超常磁性 NP を除去し、最後に DI 水 (1 0 0 m L、約 4 重量 %) に再分散させた。

【 0 1 6 9 】

得られたビーズは依然として白色であり、「CE - 3」と命名した。TGA の結果は、ビーズが 1 重量 % の NP を含むことを示した。この比較実験は、ポリ (スチレン - DVB) ビーズが十分な量の超常磁性 Fe₃O₄ NP を結合できないことを示した。これは、TEM 像 (図 1 1) によりさらに確認され、CE - 3 の表面上には少量の磁性 NP が形成されるにすぎないことを示した。磁性ナノ粒子は、マイクロスフェアの隙間にのみ凝集する。

【 図面 】

【 図 1 】

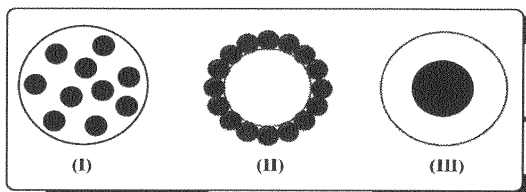


FIG. 1

【 図 2 】

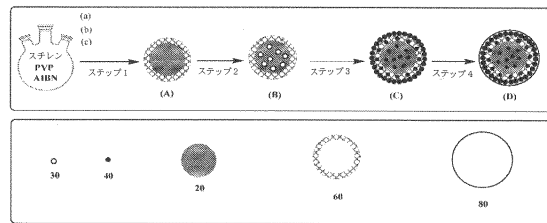


FIG. 2

10

20

30

40

50

【 図 3 】

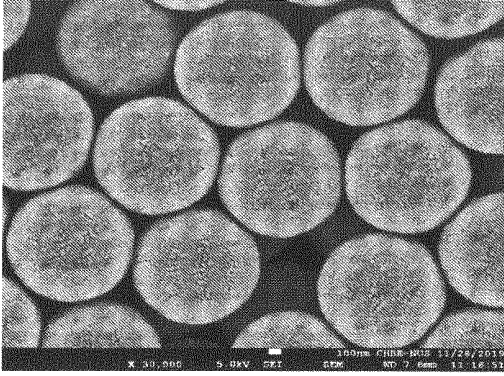


FIG. 3

【 図 4 】

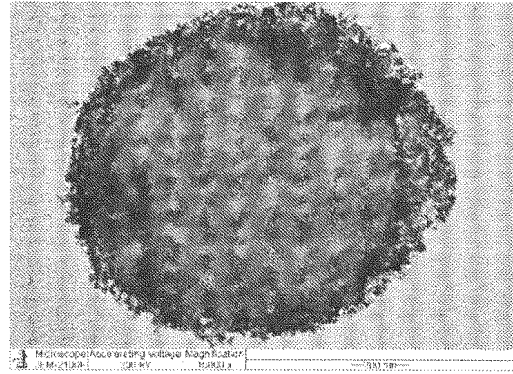


FIG. 4

10

【 図 5 】

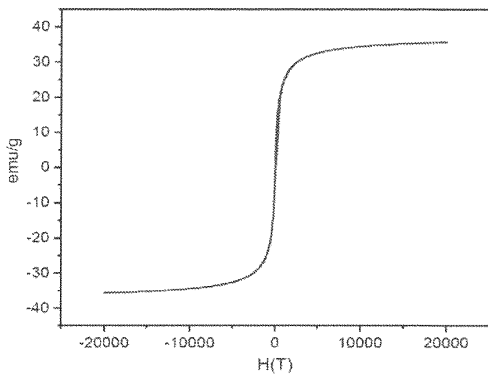


FIG. 5

【 図 6 】

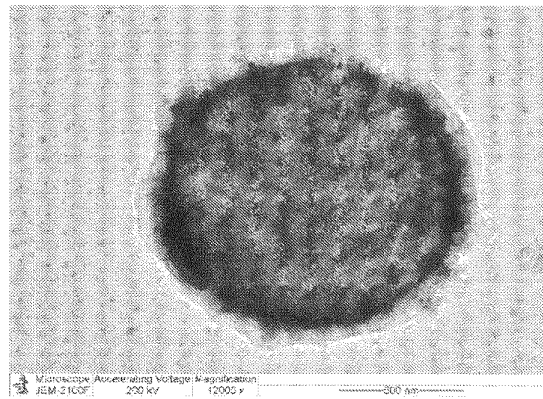


FIG. 6

20

30

40

50

【 図 7 】

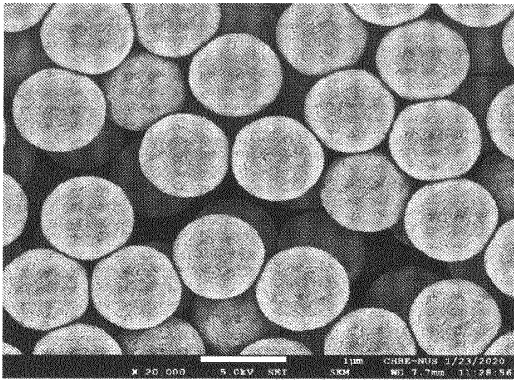


FIG. 7

【 図 8 】

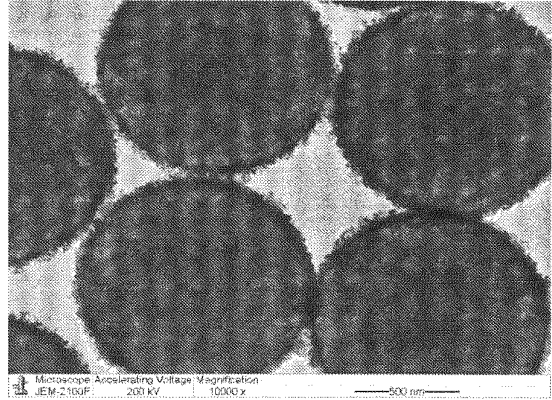


FIG. 8

10

【 図 9 】

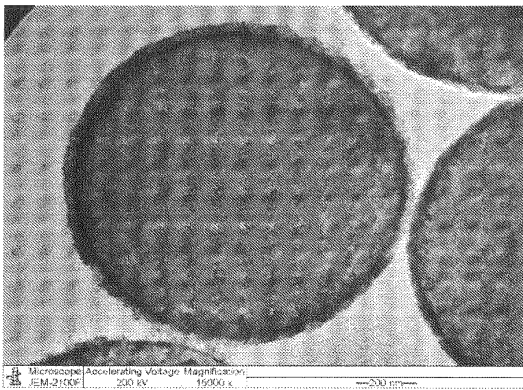


FIG. 9

【 図 10 】

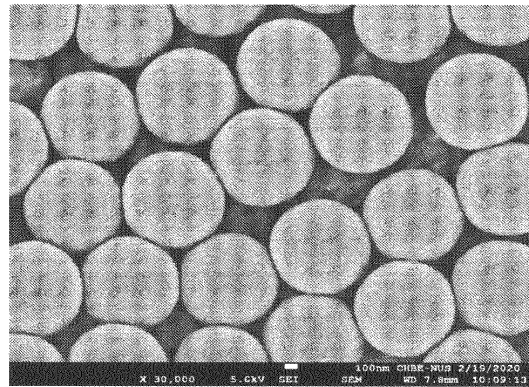


FIG. 10

20

30

40

50

【 1 1 】

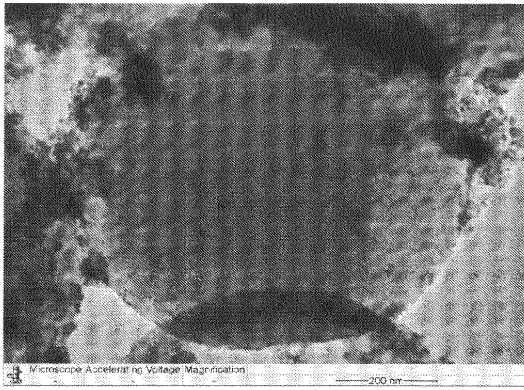


FIG. 11

【 1 2 】

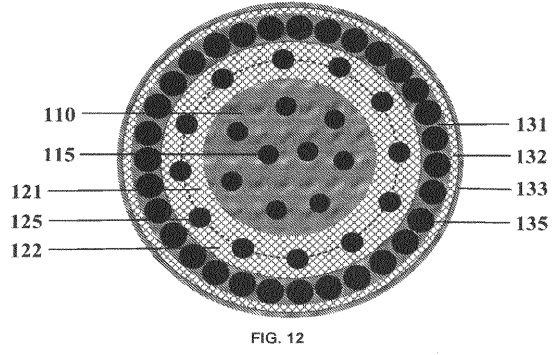


FIG. 12

10

20

30

40

50

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/SG2021/050236

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. B01J13/14 A61K9/50 B01J13/22 ADD.		
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) B01J 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 practicable, 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.
A	WO 2017/164822 A1 (UNIV NANYANG TECH [SG]) 28 September 2017 (2017-09-28) claims 1, 17, 23 -----	1-41
A	DATABASE WPI Week 201974 Thomson Scientific, London, GB; AN 2019-75944D XP002803595, -& CN 110 187 116 A (LANZHOU BAIYUAN GENE TECHNOLOGY CO LTD) 30 August 2019 (2019-08-30) abstract -----	1-41
A	US 2004/101564 A1 (RIOUX ROBERT F [US] ET AL) 27 May 2004 (2004-05-27) the whole document ----- -/--	1-41
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.
* Special categories of cited documents : *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier application or patent but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art *&* document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report	
9 July 2021	23/07/2021	
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Tarallo, Anthony	

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/SG2021/050236

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 2005/129775 A1 (LANPHERE JANEL [US] ET AL) 16 June 2005 (2005-06-16) the whole document	1-41
A	----- YAN XINGRU ET AL: "Magnetic Polystyrene Nanocomposites Reinforced with Magnetite Nanoparticles : Magnetic Polystyrene Nanocomposites", MACROMOLECULAR MATERIALS AND ENGINEERING., vol. 299, no. 4, 1 April 2014 (2014-04-01) , pages 485-494, XP055822699, DE ISSN: 1438-7492, DOI: 10.1002/mame.201300208 the whole document	1-41
A	----- DATABASE WPI Week 201714 Thomson Scientific, London, GB; AN 2016-683709 XP002803596, -& CN 106 040 309 A (GUO Y) 26 October 2016 (2016-10-26) abstract	1-41
A	----- MIAO LEI ET AL: "Superparamagnetic-Oil-Filled Nanocapsules of a Ternary Graft Copolymer", LANGMUIR, vol. 30, no. 14, 15 April 2014 (2014-04-15), pages 3996-4004, XP055822698, US ISSN: 0743-7463, DOI: 10.1021/la500415u the whole document	1-41

10

20

30

40

1

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No PCT/SG2021/050236

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date	
WO 2017164822	A1	28-09-2017	CN 109311662 A	05-02-2019
			SG 10201913384Q A	30-03-2020
			SG 11201805965W A	30-08-2018
			US 2019079014 A1	14-03-2019
			WO 2017164822 A1	28-09-2017

CN 110187116	A	30-08-2019	NONE	

US 2004101564	A1	27-05-2004	EP 1658049 A2	24-05-2006
			US 2004101564 A1	27-05-2004
			US 2011280947 A1	17-11-2011
			WO 2005034912 A2	21-04-2005

US 2005129775	A1	16-06-2005	NONE	

CN 106040309	A	26-10-2016	NONE	

10

20

30

40

50

フロントページの続き

MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,IT,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

、イノビス、フュージョノポリス・ウェイ 2、ナンバー 08 - 03

(72)発明者

ワン, ホンレイ

シンガポール 609917 シンガポール、ザ・シナジー、インターナショナル・ビジネス・パーク
1、ナンバービー 1 - 20 ビー

(72)発明者

チェン, ケレイ

シンガポール 609917 シンガポール、ザ・シナジー、インターナショナル・ビジネス・パーク
1、ナンバービー 1 - 20 ビー

F ターム (参考)

4G005 AA01 AB01 AB15 BA01 DA12X DC29Y DC34Y DC43Y DD03Z DD09Z
DD12X DD53X EA03
4J026 AA17 BA05 BA07 BA25 BA27 BA28 DB03 DB12 DB22 DB24
DB32 EA08 FA02 FA07 GA09