(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7134484号
(P7134484)

(45)発行日　令和4年9月12日(2022.9.12)

(24)登録日　令和4年9月2日(2022.9.2)

(51)国際特許分類

Ａ６１Ｋ　47/04　(2006.01)		Ａ６１Ｋ	47/04
Ａ６１Ｋ　9/08　(2006.01)		Ａ６１Ｋ	9/08
Ａ６１Ｋ　33/44　(2006.01)		Ａ６１Ｋ	33/44
Ａ６１Ｋ　38/28　(2006.01)		Ａ６１Ｋ	38/28
Ａ６１Ｋ　45/00　(2006.01)		Ａ６１Ｋ	45/00

ＦＩ

請求項の数　22　（全24頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2018-540795(P2018-540795)
(86)(22)出願日　平成29年2月6日(2017.2.6)
(65)公表番号　特表2019-511442(P2019-511442A)
(43)公表日　平成31年4月25日(2019.4.25)
(86)国際出願番号　PCT/US2017/016743
(87)国際公開番号　WO2017/136846
(87)国際公開日　平成29年8月10日(2017.8.10)
審査請求日　令和2年2月5日(2020.2.5)
(31)優先権主張番号　62/292,026
(32)優先日　平成28年2月5日(2016.2.5)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(73)特許権者　510250892
ユニバーシティー オブ マイアミ
ＵＮＩＶＥＲＳＩＴＹ ＯＦ ＭＩＡＭＩ
アメリカ合衆国３３１３６フロリダ州マイアミ、ノースウエスト・セブンス・アベニュー１９５１番、サード・フロア、スウィート３１０、オフィス・オブ・テクノロジー・トランスファー
(74)代理人　100106518
弁理士　松谷 道子
(74)代理人　100145403
弁理士　山尾 憲人
(72)発明者　シャンガオ・リ
アメリカ合衆国３３１４３フロリダ州マイアミ、カミノ・リアル７８１０番、ア
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　診断分析及び薬物送達のためのカーボンドット

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

血液脳関門透過溶液を形成する方法であって、

カーボンドットを有機化合物標的に共有結合的にコンジュゲートさせて、カーボンドット－有機化合物標的コンジュゲートを形成することと、前記コンジュゲートを溶媒と混合して、前記血液脳関門透過溶液を形成することとを含み、前記カーボンドットは、

炭素粉末を、硝酸に対する硫酸の体積比が１．１：１から１０：１の範囲内の硫酸及び硝酸と混合して、炭素粉末混合物を形成することと；

前記炭素粉末混合物を還流下で加熱して還流炭素粉末混合物を形成し、次いで前記還流炭素粉末混合物を冷却することと；

前記還流炭素粉末混合物を中和して、可溶化カーボンドットを含む中和炭素粉末混合物を形成することと；

前記可溶化カーボンドットを前記中和炭素粉末混合物から単離して、カーボンドット溶液を形成することと；

前記カーボンドット溶液を透析することと；

前記溶液の溶媒を前記カーボンドット溶液から分離して、固体カーボンドットを得ることとを含む方法を使用して形成され、

前記有機化合物標的が、トランスフェリン、染料標識化トランスフェリン、またはそれらの任意の組み合わせを含む、血液脳関門透過溶液を形成する方法。

【請求項２】

前記カーボンドットが、１０ｎｍ未満のサイズの直径を有する、請求項１に記載の方法。
【請求項３】
前記還流炭素粉末混合物を中和することが、前記混合物に塩基を添加して、可溶化カーボンドットならびに硫酸塩及び／または硝酸塩の少なくとも１つを含む前記中和炭素粉末混合物を形成することを含む、請求項１または請求項２に記載の方法。
【請求項４】
前記塩基が、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化リチウム、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される、請求項３に記載の方法。
【請求項５】
前記可溶化カーボンドットを前記中和炭素粉末混合物から単離することが、硫酸塩及び硝酸塩の少なくとも１つを結晶化させ、前記中和炭素粉末混合物から前記塩を除去することを含む、請求項３または請求項４に記載の方法。
【請求項６】
前記可溶化カーボンドットを前記中和炭素粉末混合物から単離することが、前記中和炭素粉末混合物から不純物を除去することを含む、請求項１から５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項７】
前記分離することが、前記カーボンドット溶液を濃縮し、残留溶媒を蒸発させることを含む、請求項１から６のいずれか一項に記載の方法。
【請求項８】
前記炭素粉末混合物を還流下で加熱することが、前記炭素粉末混合物を砂浴内で１１０℃に１５時間加熱することを含む、請求項１から７のいずれか一項に記載の方法。
【請求項９】
前記還流炭素粉末混合物を中和することが、水酸化ナトリウムの過飽和溶液を添加することを含む、請求項１から８のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１０】
前記可溶化カーボンドットを前記中和炭素粉末混合物から単離することが、前記中和炭素粉末混合物を濾過して、未反応炭素粉末を除去することを含む、請求項１から９のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１１】
前記可溶化カーボンドットを前記中和炭素粉末混合物から単離することが、前記硫酸塩及び／または硝酸塩の少なくとも１つを結晶化させる前に、前記中和炭素粉末混合物を濾過して、未反応炭素粉末を除去することを含む、請求項５に記載の方法。
【請求項１２】
前記塩の結晶化が、硫酸ナトリウム結晶を前記中和炭素粉末混合物に添加して、前記塩の結晶化を開始させることを含む、請求項５または請求項１１に記載の方法。
【請求項１３】
前記塩が、濾過により除去される、請求項５、１１、または１２のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１４】
前記塩の結晶化が、７５℃から８５℃の範囲内の温度で前記溶媒の少なくとも一部を蒸発させることにより、前記中和炭素粉末混合物の前記溶媒の体積を低減し、濃縮溶液を形成することと、前記濃縮溶液を冷却して、固体塩結晶及びカーボンドット溶液を含む混合物を提供することとを含む、請求項５または１１から１３のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１５】
前記不純物が、有機溶媒による抽出により除去される、請求項６に記載の方法。
【請求項１６】
透析の前に、前記カーボンドット溶液を遠心分離することをさらに含む、請求項１から１５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１７】

前記カーボンドット溶液が、５日間４から１０時間のインターバルで交換される４Ｌの脱イオン水で透析される、請求項１から１６のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１８】
前記濃縮することが、前記カーボンドット溶液を７５～８５℃の範囲内の温度に加熱することを含む、請求項７に記載の方法。
【請求項１９】
前記炭素粉末が、炭素ナノ粉末を含む、請求項１から１８のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２０】
薬物を骨に送達するための組成物であって、
前記組成物は、前記薬物が組み込まれているカーボンドットを含み、前記カーボンドットは、
炭素粉末を、硝酸に対する硫酸の体積比が１．１：１から１０：１の範囲内の硫酸及び硝酸と混合して、炭素粉末混合物を形成することと；
前記炭素粉末混合物を還流下で加熱して還流炭素粉末混合物を形成し、次いで前記還流炭素粉末混合物を冷却することと；
前記還流炭素粉末混合物を中和して、可溶化カーボンドットを含む中和炭素粉末混合物を形成することと；
前記可溶化カーボンドットを前記中和炭素粉末混合物から単離して、カーボンドット溶液を形成することと；
前記カーボンドット溶液を透析することと；
前記溶液の溶媒を前記カーボンドット溶液から分離して、固体カーボンドットを得ることとを含む方法によって製造され、
前記カーボンドットは、グルタミン酸で改質されていない、組成物。
【請求項２１】
前記カーボンドットが、中性ビオチン、正電荷アミン基、負電荷カルボキシル基、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される表面改質による表面改質カーボンドットではない、請求項２０に記載の組成物。
【請求項２２】
前記カーボンドットが、表面改質カーボンドットを含み、
前記表面改質が、中性ビオチン、正電荷アミン基、負電荷カルボキシル基、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される、請求項２０に記載の組成物。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
関連出願の相互参照
本出願は、２０１６年２月５日に出願された米国仮特許出願第６２／２９２０２６号の３５ Ｕ．Ｓ．Ｃ． §１１９（ｅ）に基づく利益を主張する。上記出願の全開示が、参照することにより本明細書に援用される。
【０００２】
政府援助の記述
本発明は、全米科学財団により授与された助成金番号１３５５３１７の下での政府援助によりなされた。政府は本発明に対し一定の権利を有する。
【０００３】
本開示は、カーボンドットの形成に関し、より具体的には、カーボンドットの形成ならびに診断分析（例えば骨分析）、フィブリル化阻害、及び薬物送達へのその使用に関する。
【背景技術】
【０００４】
本明細書において記載される背景技術の説明は、本開示の背景を全般的に示すことを目的とする。この背景技術の項または本明細書の別の箇所に記載されている範囲において、本発明の発明者の研究、ならびに出願の時点で別段に先行技術とみなされ得ない説明の態

様は、明示的にも暗示的にも、本開示に対する先行技術として認められない。

【０００５】

カーボンドットは、最近良性のナノ粒子として現れた量子サイズの炭素ナノ粒子であり、重金属含有毒性量子ドットに置き換わる可能性を有する。励起波長依存的光ルミネッセンス、優れた生体適合性、低い細胞毒性、及び光学的安定性等のその独特の特性のために、カーボンドットの潜在的な生物学的用途が大きな注目を集めている。

【０００６】

カーボンドットは、典型的には化学的、電気化学的、または物理的技術により達成される、「トップダウン」または「ボトムアップ」手法により調製され得る。「トップダウン」合成経路は、レーザーアブレーション、アーク放電、及び電気化学的技術を使用して、グラファイト、カーボンナノチューブ、及びナノダイヤモンド等のより大きい炭素構造をカーボンドットに分解することを指す。一方、「ボトムアップ」合成経路は、水熱／溶媒熱処理、支援合成、及びマイクロ波合成経路を介して、炭水化物、シトレート、及びポリマー－シリカナノ複合体等の微小前駆体からカーボンドットを合成することを含む。

【０００７】

カーボンドットは、容易に細胞膜を通過することができ、したがって、生体イメージング及びセラノスティクスにおける潜在的用途を有する。しかしながら、生体系内でのいかなる実用的応用においても、カーボンドットはペプチド及びタンパク質と不可避的に接触し、その構造を変化させる可能性がある。カーボンナノチューブ、酸化セリウムナノ粒子、二酸化チタンナノ粒子、及び金ナノ粒子等の既知のナノ粒子は、タンパク質及びペプチドのフィブリル化を促進し、タンパク質／ペプチド構造に変化をもたらすことが判明している。

【０００８】

さらに、カーボンドットは、中枢神経系（ＣＮＳ）内の神経変性疾患を処置するための治療薬剤としての可能性を有する。しかしながら、生体系内のＣＮＳへの薬物送達は、高選択性透過障壁である血液脳関門（ＢＢＢ）の存在に起因して、大きな医学的課題となっている。

【０００９】

生きた骨へのカーボンドットの結合は、多目的薬物送達システムを提供するのに有利となるだろう。しかしながら、「Ｆｕｎｃｔｉｏｎａｌｉｚｅｄ ｃａｒｂｏｎ ｄｏｔｓ ｅｎａｂｌｅ ｓｉｍｕｌｔａｎｅｏｕｓ ｂｏｎｅ ｃｒａｃｋ ｄｅｔｅｃｔｉｏｎ ａｎｄ ｄｒｕｇ ｄｅｐｏｓｉｔｉｏｎ」，Ｊ．Ｍａｔｅｒ．Ｃｈｅｍ．Ｂ ２０１４，２，８６２６－８６３２及び「Ｉｎ ｖｉｔｒｏ ｄｅｔｅｃｔｉｏｎ ｏｆ ｃａｌｃｉｕｍ ｉｎ ｂｏｎｅ ｂｙ ｍｏｄｉｆｉｅｄ ｃａｒｂｏｎ ｄｏｔｓ」，Ａｎａｌｙｓｔ ２０１３，１３８，７１０７－７１１１において実証されているように、公開されたプロトコルに従って調製されたカーボンドットは、グルタミン酸（カルシウム結合性分子）にコンジュゲートした場合、及び取り出された骨においてのみ骨結合活性を示すだけであり、生きた動物においては示されていない。さらに、カーボンドットに薬物を組み込むためには、カーボンドットの表面を改質することが必要となり得、そのような改質は、カーボンドットの結合特性に影響し得る。

【００１０】

したがって、タンパク質及びペプチド構造の変化の阻害、血液脳関門を透過する能力、ならびに／または生きた動物内の骨に結合する能力等の１つ以上の利点を示す、生物学的用途に有用な非毒性カーボンドットを提供することが有利となるであろう。

【発明の概要】

【００１１】

本開示の一態様は、カーボンドットを形成する方法であって、炭素粉末を硫酸及び硝酸と混合して、炭素粉末混合物を形成することと、炭素粉末混合物を還流加熱することと、還流炭素粉末混合物を冷却することと、冷却された還流炭素粉末混合物を中和することとを含む方法を提供する。方法は、還流炭素粉末混合物を単離及び精製して、カーボンドッ

ト溶液を形成することと、カーボンドット溶液を透析することと、溶媒を溶液から除去して、固体カーボンドットを得ることとをさらに含む。

【００１２】

本開示の別の態様は、インスリンフィブリル化を阻害する方法であって、インスリンを溶液中で本開示のカーボンドットと組み合わせて、濃縮溶液を形成することと、濃縮された溶液をヒト対象に挿入して、ヒト対象を処置することとを含む方法を提供する。

【００１３】

本開示の別の態様は、血液脳関門透過溶液を形成する方法であって、本開示のカーボンドットを有機化合物標的に共有結合的にコンジュゲートさせて、血液脳関門透過溶液を形成することを含む方法を提供する。

【００１４】

本開示の別の態様は、薬物を骨に送達する方法であって、本開示のカーボンドットに薬物を組み込んで、薬物が組み込まれたカーボンドットを形成することと、薬物が組み込まれたカーボンドットを対象に投与することとを含む方法を提供する。

【００１５】

本明細書に記載される組成物及び方法に関して、構成成分、これらの組成範囲、条件、及びステップを含むがこれらに限定されない任意の特徴は、本明細書に提供される様々な態様、実施形態、及び実施例から選択されることが企図される。

【００１６】

さらなる態様及び利点が、図面及び実施例と併せて以下の詳細な説明の調査から当業者には明らかになるであろう。カーボンドット、これらの作成方法、及びこれらの用途は、様々な形態での実施形態が可能な一方で、以下の説明は、本開示が例示的であるという理解のもと特定の実施形態を含み、本発明を本明細書に記載される特定の実施形態に制限することを意図しない。

【図面の簡単な説明】

【００１７】

本発明の理解をさらに促進するために、１つの図面が本明細書に添付される。

【００１８】

【図１】本開示に従って調製されたカーボンドットは、生きた動物内の石灰化骨に対する結合親和性を有し、一方他の出発材料から調製されたカーボンドットは、生きた動物内の石灰化骨に対する結合親和性を有さないことを示す画像である。

【発明を実施するための形態】

【００１９】

本開示の一態様は、カーボンドットを形成する方法であって、炭素粉末を硫酸及び硝酸と混合して、炭素粉末混合物を形成することと、炭素粉末混合物を還流下で加熱して還流炭素粉末混合物を形成し、次いで還流炭素粉末混合物を冷却することと、還流炭素粉末混合物を中和して、可溶化カーボンドットを含む中和炭素粉末混合物を形成することと、可溶化カーボンドットを中和炭素粉末混合物から単離して、カーボンドット溶液を形成することと、カーボンドット溶液を透析することと、溶液の溶媒をカーボンドット溶液から分離して、固体カーボンドットを得ることとを含む方法を提供する。

【００２０】

本明細書において使用される場合、及び別段に指定されない限り、「炭素粉末」は、１００ｎｍ超の粒子サイズを有する炭素粉末、及び１００ｎｍ以下の粒子サイズを有する炭素ナノ粉末を指す。

【００２１】

いくつかの実施形態において、カーボンドットは、約１０ｎｍ未満、任意選択で約６ｎｍ以下の平均直径を有する。いくつかの実施形態において、硫酸及び硝酸は、約１超：１（ｖ／ｖ）、任意選択で約１．１：１から約５：１（ｖ／ｖ）の比で提供される。

【００２２】

実施形態において、還流炭素粉末混合物を中和することは、混合物に塩基を添加して、

可溶化カーボンドットならびに硫酸塩及び／または硝酸塩の少なくとも１つを含む中和炭素粉末混合物を形成することを含む。任意選択で、塩基は、例えば水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化リチウム、及びそれらの組み合わせからなる群から選択されるアルカリ水酸化物である。実施形態において、塩基は、アルカリ水酸化物の過飽和溶液であってもよい。実施形態において、塩基は、水酸化ナトリウムの過飽和溶液であってもよい。

【００２３】

実施形態において、可溶性カーボンドットを中和炭素粉末混合物から単離することが、硫酸塩及び／または硝酸塩の少なくとも１つを結晶化させ、中和炭素粉末混合物から塩を除去することを含む。実施形態において、塩の結晶化は、硫酸ナトリウム結晶を中和炭素粉末混合物に添加して、塩の結晶化を開始させることを含む。実施形態において、塩の結晶化は、中和炭素粉末混合物の溶媒の体積を低減することを含んでもよい。任意選択で、塩は、濾過により除去されてもよい。

【００２４】

実施形態において、可溶性カーボンドットを中和炭素粉末混合物から単離することは、中和炭素粉末混合物から不純物を除去することを含む。任意選択で、不純物は、有機溶媒での抽出により除去されてもよい。実施形態において、中和炭素粉末混合物が濾過されて、未反応炭素粉末が除去されてもよい。任意選択で、中和炭素粉末混合物は、少なくとも１つの硫酸塩及び／または硝酸塩を結晶化させる前に濾過されて、未反応炭素粉末が除去されてもよい。

【００２５】

実施形態において、カーボンドット溶液は、透析の前に遠心分離される。実施形態において、カーボンドット溶液は、約４Ｌの脱イオン水で約５日間透析されてもよい。実施形態において、溶媒は、蒸発により、例えばカーボンドット溶液を濃縮し残留溶媒を蒸発させることにより、カーボンドット溶液から分離されて、固体カーボンドットが得られる。

【００２６】

本開示の別の態様は、インスリンフィブリル化を阻害する方法であって、インスリンを溶液中で本開示の方法に従って形成されたカーボンドットと組み合わせて、濃縮溶液を形成することと、濃縮された溶液をヒト対象に挿入して、ヒト対象を処置することとを含む方法を提供する。

【００２７】

実施形態において、濃縮された溶液中のカーボンドットの濃度は、２μｇ／ｍＬ以上である。実施形態において、濃縮された溶液中のカーボンドットの濃度は、１０μｇ／ｍＬ以上である。

【００２８】

本開示の別の態様は、血液脳関門透過溶液を形成する方法であって、本開示の方法に従って形成されたカーボンドットを有機化合物標的に共有結合的にコンジュゲートさせて、カーボンドット－有機化合物標的コンジュゲートを形成することと、コンジュゲートを溶媒と混合して、血液脳関門透過溶液を形成することを含む方法を提供する。

【００２９】

実施形態において、有機化合物標的は、トランスフェリン、染料標識化トランスフェリン、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される。

【００３０】

本開示の別の態様は、薬物を骨に送達する方法であって、本開示のカーボンドットに薬物を組み込んで、薬物が組み込まれたカーボンドットを形成することと、薬物が組み込まれたカーボンドットを対象に投与することとを含む方法を提供する。

【００３１】

実施形態において、カーボンドットは、表面改質カーボンドットではない。実施形態において、カーボンドットは、表面改質カーボンドットを含む。任意選択で、表面改質は、中性ビオチン、正電荷アミン基、または負電荷カルボキシル基からなる群から選択され得る。

【００３２】
本明細書において使用される場合、及び別段に指定されない限り、「表面改質カーボンドットではない」カーボンドットは、固体カーボンドット粉末の単離後にカーボンドット表面において意図的にさらに改質されない本開示に従って調製されたカーボンドットである。
【００３３】
「含む（備える）」は、本明細書で使用される場合、本開示の実施において相まって用いられ得る様々な構成成分、成分、またはステップを意味する。したがって、用語「含む（備える）」は、より制限的な用語「から本質的になる」及び「からなる」を包含する。本組成物は、本明細書に開示される必須及び任意の要素のうちのいずれかを含み得るか、本質的にそれらからなり得るか、またはそれらからなり得る。本明細書に例示的に開示される発明は、本明細書に具体的に開示されない任意の要素またはステップの非存在下で好適に実施され得る。
【００３４】
本明細書に記載される全ての範囲は、範囲の全ての可能性のあるサブセット及びそのようなサブセット範囲の任意の組み合わせを含む。デフォルトでは、範囲は、特に明記しない限り、記載される終了点を含む。値の範囲が提供されている場合、その範囲の上限と下限との間の各々の間の値、及びその記載される範囲内の任意の他の記載されているかまたは間にある値は、本開示内に包含されることが理解される。これらのより小さい範囲の上限及び下限は独立して、そのより小さい範囲内に含まれ得、また本開示内にも包含され、記載される範囲内の任意の具体的に除外される限度の影響下にある。記載される範囲がこれらの限度のうちの１つまたは両方を含む場合、これらの含まれる限度のいずれかまたは両方を除く範囲も、本開示の一部であることが企図される。
【００３５】
<u>カーボンドットを調製する方法</u>
本出願は、「トップダウン」手法を使用してカーボンドット（本明細書において「Ｃ－ドット」とも呼ばれる）を形成する技術を含む。より具体的には、いくつかの例において炭素粉末を使用して、また他の例において炭素ナノ粉末を使用して、蛍光性Ｃ－ドットの調製に成功した。炭素粉末のサイズは特に限定されず、例えば、１０００ｎｍ以下であってもよい。炭素粉末は、典型的には水溶性ではない。
【００３６】
一般に、本開示のカーボンドットを調製する方法は、
（ａ）炭素粉末を酸と混合して、炭素粉末混合物を形成するステップと；
（ｂ）炭素粉末混合物を加熱するステップと；
（ｃ）炭素粉末混合物を冷却するステップと；
（ｄ）形成されたカーボンドットを含む炭素粉末混合物を中和するステップと；
（ｅ）可溶化されたカーボンドットを、中和反応において形成された塩、溶液中に存在する任意の不純物、及び／または任意の残留出発材料から単離するステップと；
（ｆ）カーボンドット溶液を透析するステップと；
（ｇ）溶媒をカーボンドット溶液から分離して、固体カーボンドットを形成するステップとを含む。
カーボンドットを調製するステップ（ａ）から（ｇ）を、以下で詳細に説明する。
【００３７】
本開示のカーボンドットを形成するために、酸を使用して炭素粉末が酸化される。炭素粉末は、まず酸と混合されて、炭素粉末混合物を形成する。カーボンドットの調製に好適な酸は、これらに限定されないが、硫酸及び硝酸の混合物、ならびにクロム酸を含む強酸化性の酸を含む。硫酸及び硝酸は、体積（ｖ／ｖ）で約１超：１、または約２超：１、または約３超：１、及び最大約１０：１、または最大約５：１、または最大約４：１、例えば約１．１：１、約１．２：１、約１．５：１、約２：１、約２．５：１、約３：１、約３：５：１または約４：１（ｖ／ｖ）の比で提供されてもよい。理論に束縛されることを

意図しないが、１：１（ｖ／ｖ）の比またはそれ未満を有する硫酸及び硝酸の混合物は、炭素粉末を酸化して表面に十分なカルボキシル基を生成して水溶性カーボンドットを提供するのに十分強くないと考えられる。

【００３８】

例えば、硫酸及び硝酸の混合物（３：１、ｖ／ｖ）中において、炭素ナノ粉末は、１．５から６ｎｍの間の直径を有する量子サイズまで酸化された。１：１の混合物または硝酸のみでは、同じ条件下でＣ－ドットを合成することができなかったため、酸の比が重要であった。調製直後のＣ－ドットは、既に水溶性及び蛍光性であった。同じ手順を使用して、炭素粉末からも同様のＣ－ドットが調製された。

【００３９】

酸の量は、炭素粉末を湿潤させて炭素粉末懸濁液（混合物）を提供するのに好適な任意の量であってもよい。例えば、酸は、炭素粉末混合物が約２０ｍｇ／ｍＬ、例えば約１０ｍｇ／ｍＬから約５０ｍｇ／ｍＬ、または約１０ｍｇ／ｍＬから約４０ｍｇ／ｍＬ、または約１０ｍｇ／ｍＬから約３０ｍｇ／ｍＬ、または約２０ｍｇ／ｍＬから約４０ｍｇ／ｍＬの範囲内の炭素粉末濃度を有するように選択される量で提供され得る。

【００４０】

次いで、炭素粉末混合物は、還流下で加熱されて、還流炭素ナノ粉末混合物を形成する。炭素粉末混合物は、例えば、約１００℃超、または約１１０℃超、及び最大約１２０℃または最大約１１５℃の温度まで加熱され得る。加熱は、炭素粉末を酸化するのに好適な任意の期間維持され得る。炭素粉末混合物は、少なくとも１時間、少なくとも３時間、少なくとも６時間、少なくとも９時間、少なくとも１２時間、または少なくとも１５時間、及び最大約７２時間、最大約６０時間、最大約４８時間、最大約３６時間、最大約２４時間、最大約２０時間、または最大約１６時間、還流下で加熱され得る。

【００４１】

加熱後、還流炭素粉末混合物は、中和の前に冷却される。炭素粉末混合物の冷却は、特に限定されない。炭素粉末混合物は、周囲温度まで冷却されてもよく、次いで、中和の前に反応フラスコが氷浴内に設置されてもよい。中和ステップは、一般に極めて発熱性であり、したがって、還流後の炭素粉末混合物の冷却は、その後の中和の発熱を制御するために有利である。

【００４２】

還流炭素粉末混合物は、中和されて、可溶化されたカーボンドットを含む中和炭素粉末混合物を形成する。中和炭素粉末混合物は、硫酸及び／または硝酸の塩をさらに含む。硫酸及び硝酸を中和するために使用される塩基は、特に限定されない。好適な塩基は、アルカリ水酸化物、例えば水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化リチウム、及びそれらの組み合わせを含んでもよい。塩基は、希釈溶液、飽和溶液、または過飽和溶液として添加され得る。過飽和溶液は、固体カーボンドットを得るために中和溶液から除去されるべき溶媒がより少ないため、有利となり得る。

【００４３】

可溶化されたカーボンドットは、中和反応において形成された塩、溶液中に存在する任意の不純物、及び／または任意の残留出発材料から単離される。中和の間に形成される塩は、当技術分野において知られている任意の方法に従って除去され得る。例えば、塩は、中和炭素粉末混合物、ならびに固体塩及び液体上澄みを分離するために濾過された混合物から結晶化され得る。結晶化を促進するために、中和炭素粉末混合物は、溶媒の体積を低減することにより濃縮されてもよく、次いで、混合物からの塩の析出を開始するために濃縮物が冷却されてもよい。混合物は、例えば約７０℃から約１１０℃、または約７０℃から約１００℃、または約７５℃から約９５℃、または約７５℃から約９０℃、または約７５℃から約８５℃の範囲内の任意の好適な温度で加熱して、溶媒の少なくとも一部を蒸発させることにより濃縮され得る。追加的に、または代替的に、混合物は、適切な種晶を中和炭素粉末混合物に含めることにより濃縮され得る。例えば、中和塩の結晶化を開始させるために硫酸ナトリウム結晶が添加されてもよい。

【００４４】
不純物は、当技術分野において知られている任意の好適な手段により、中和炭素粉末混合物から除去され得る。不純物を除去する一般的な方法は、これらに限定されないが、遠心分離及び抽出を含む。水性中和炭素粉末混合物を有機溶媒と混合することにより、液体／液体抽出が（例えば、分液漏斗を使用して）行われてもよい。好適な有機溶媒は、水相と非混和性である溶媒であることが、当業者には容易に理解されるだろう。好適な有機溶媒は、これらに限定されないが、クロロホルム、ジクロロメタン、四塩化炭素、及び酢酸エチルを含む。中和後に任意の段階で遠心分離が実行されてもよい。実施形態において、遠心分離は、液体／液体抽出の後であるが、単離されたカーボンドット溶液の透析の前に行われる。

【００４５】
可溶化されたカーボンドットの単離中に、残留出発材料もまた中和炭素粉末から除去され得る。残留出発材料は、当技術分野において知られている任意の方法により除去され得る。具体的には、出発炭素粉末は水溶性ではないが、形成されたカーボンドットは水溶性であるため、残留未反応炭素粉末は濾過により除去され得る。残留炭素粉末は、炭素粉末混合物の中和後の任意の段階で、例えば、中和塩の結晶化前もしくは後で、または不純物の抽出前もしくは後で除去され得る。

【００４６】
単離された可溶化カーボンドットを含むカーボンドット溶液は、溶媒をカーボンドットから分離して、任意の残留硫酸塩及び／または硝酸塩、未反応酸、未反応炭素粉末、ならびに反応の副生成物として形成された任意の不純物を除去する前に透析されてもよい。カーボンドット溶液を透析するために使用される脱イオン水の期間及び体積は、特に限定されない。例えば、カーボンドット溶液は、少なくとも１日、少なくとも３日、または少なくとも５日、及び最大１０日、最大８日、または最大６日の間透析されてもよい。脱イオン水は、約２時間、約４時間、約６時間、約８時間、または約１０時間のインターバル後に交換されてもよい。各透析インターバルに提供される水の体積は、少なくとも約３Ｌ、少なくとも約４Ｌ、少なくとも約５Ｌ、または約８Ｌ未満、約７Ｌ未満、または約６Ｌ未満であってもよい。理論に束縛されることを意図しないが、水交換の頻度が高いほど、及び全体的な透析期間が長いほど、得られるカーボンドットの純度がより高くなると考えられる。

【００４７】
固体カーボンドットは、溶媒をカーボンドット溶液から除去することにより得ることができる。溶媒は、当技術分野において知られている任意の方法に従って除去され得る。例えば、カーボンドット溶液が濃縮され、次いで残留溶媒が留去されてもよい。カーボンドット溶液の濃縮は、カーボンドット溶液を約７０℃から約１１０℃、または約７０℃から約１００℃、または約７５℃から約９５℃、または約７５℃から約９０℃、または約７５℃から約８５℃の範囲内の温度まで加熱することにより行われてもよい。残留溶媒は、減圧下で、例えばロータリーエバポレータ（ｒｏｔｏｖａｐ）を使用して留去されてもよい。

【００４８】
固体カーボンドットは、意図される用途に好適な任意のサイズを有し得る。例えば、血液脳関門透過性膜における使用が意図される固体カーボンドットは、以下で説明されるように、受容体媒介エンドサイトーシスによりＢＢＢを通過するのに十分小さくなければならない。好適には、カーボンドットは、１０ｎｍ未満、例えば８ｎｍ以下、６ｎｍ以下、４ｎｍ以下、または２ｎｍ以下、例えば約１から約８ｎｍ、約２から約６ｎｍ、または約４ｎｍの平均粒子直径を有する。調製直後のカーボンドットは、表面上に豊富な表面カルボン酸基及び豊富なsp^2炭素を有する炭素コアを有し、またカルボキシル基上に負電荷を有し得る。したがって、カーボンドットは、表面で改質されてもよく、及び／あるいは有機化合物とコンジュゲートされてもよく、及び／あるいはカルボン酸基における活性官能基（活性官能基の限定されない例は、アミン、アルコール、カルボキシル、及びチオールを含む）を有する化合物とのコンジュゲーションを介して、または吸着、静電相互作用

、もしくはπ－π相互作用等の非共有結合的相互作用を介して薬物が組み込まれてもよい。

【００４９】

一例において、硫酸（９ｍＬ）及び硝酸（３ｍＬ）を含有するアリコートを、フラスコ内で２５０ｍｇの炭素ナノ粉末に添加した。混合物を、還流下、砂浴内で約１１０℃に１５時間加熱した。冷却後、氷浴内で過飽和水酸化ナトリウム溶液を添加して、溶液を中和した。混合物を濾過して、未反応炭素粉末を除去した。次いで、氷浴を使用して、形成される塩を結晶化させた。溶液は過飽和されてもよく、結晶化を開始するために硫酸ナトリウム結晶片が必要となり得る。内容物を再び濾過し、暗褐色の上澄み溶液を得た。この手順を再び繰り返して、過飽和塩をさらに除去した。上澄み溶液をビーカーに移し、７５～８５℃で蒸発させることによりその体積を約２５ｍＬに低減させ、濃縮した。氷浴内で溶液を冷却し、塩結晶を除去し、暗褐色の上澄み溶液を得た。クロロホルム（１５ｍＬ）を添加し、有機相中に不純物を抽出した。水相を保存し、抽出手順を２回繰り返した。次いで、溶液を３０００ｒｐｍで３０分間遠心分離し、いかなる析出物も除去した。溶液を分画分子量（ＭＷＣＯ）３５００透析袋に移し、４Ｌの脱イオン水で５日間透析し、脱イオン水は４～１０時間毎に交換した。次いで、約２５ｍＬが残るまで溶液を７５～８５℃に加熱することにより濃縮した。最後に、ｒｏｔｏｖａｐを使用して水を蒸発させ、Ｃ－ドットとして２７．４ｍｇの黒色粉末を生成した。

【００５０】

<u>タンパク質／ペプチドフィブリル化を阻害する方法</u>

本出願は、カーボンドットの使用による生物学的作用の阻害、例えばカーボンドットをそれらに作用させることによるペプチドまたはタンパク質フィブリル化の阻害をさらに提供する。組織の細胞外空間におけるペプチドまたはタンパク質フィブリル化は、アルツハイマー病、２型糖尿病及びパーキンソン病等のいくつかの重篤なヒト疾患の発症において重要な役割を果たす。これらのペプチドまたはタンパク質フィブリルは、元の構造のミスフォールディングによる明確なクロスβシート構造を特徴とする。フィブリル化は、典型的には、オリゴマー化による微小核の初期形成、次いでプロトフィブリル形成を介したフィブリルの伸長を含む、核形成－成長パターンに従う。中間オリゴマー種及び成熟フィブリルは、関連細胞の死滅を惹起する細胞毒性を有する。したがって、ペプチドまたはタンパク質フィブリル化に関連した疾患に対する予防及び治療戦略は、フィブリル化プロセスを阻害または遅延させることである。

【００５１】

インスリンフィブリルは、インスリン注入及び反復注射後の、２型糖尿病に罹患した一部の患者において見られる。インスリンは、生産量が最も多い治療タンパク質の１つであるが、そのフィブリル化は、タンパク質の生産、保存、及び送達において依然として困難な課題となっている。

【００５２】

タンパク質及びペプチドフィブリル化は、タンパク質またはペプチドを本開示のカーボンドットと混合することにより阻害され得る。実施形態において、カーボンドットをタンパク質またはペプチドと混合することは、タンパク質またはペプチドの阻害を必要とする患者へのカーボンドットの濃縮溶液の投与を含む。実施形態において、カーボンドットをタンパク質またはペプチドと混合することは、対象へのカーボンドットの投与の前に行われる。任意選択で、タンパク質またはペプチド及びカーボンドットは、溶液中で混合されて、濃縮溶液を形成する。濃縮溶液は、対象を処置するために対象に投与され得る。

【００５３】

濃縮溶液は、少なくとも２μｇ／ｍＬ、少なくとも４μｇ／ｍＬ、少なくとも６μｇ／ｍＬ、少なくとも８μｇ／ｍＬ、または少なくとも１０μｇ／ｍＬ、及び最大約２０μｇ／ｍＬ、最大約１８μｇ／ｍＬ、最大約１６μｇ／ｍＬ、最大約１４μｇ／ｍＬ、または最大約１２μｇ／ｍＬの濃度のカーボンドットを含んでもよい。理論に束縛されることを意図しないが、本開示のカーボンドットは、濃度依存的にタンパク質及びペプチドフィブリル化を阻害すると考えられる。したがって、カーボンドットは、６５℃の温度でインキ

ュベートされながら、少なくとも５時間、少なくとも８時間、少なくとも１２時間、少なくとも１日、少なくとも３日、または少なくとも５日、及び最大約３０日、最大約２５日、最大約２０日、最大約１５日、最大約１０日、または最大約８日の間タンパク質またはペプチドのフィブリル化を阻害するのに十分な量で提供され得る。理論に束縛されることを意図しないが、６５℃の温度におけるインキュベーションは、タンパク質またはペプチドに不利であるため、等量のカーボンドットと混合されているがより過酷でない条件、例えば周囲条件下で保存されるタンパク質またはペプチドに対しては、フィブリル化の阻害期間が増加することが推定されると考えられる。

【００５４】

例えば、ペプチドまたはタンパク質フィブリル化に対するＣ－ドットの効果が検査される。一例において、インスリンフィブリル化に対するＣ－ドットの効果を調査するためのモデルとして、ヒトインスリンが選択された。６ｎｍ未満のサイズを有する水溶性の蛍光性Ｃ－ドットを炭素粉末から調製し、ＵＶ－ｖｉｓ分光法、蛍光、フーリエ変換赤外分光光度法、Ｘ線光電子分光法、透過型電子顕微鏡、及び原子間力顕微鏡により特性決定した。これらのＣ－ドットは、濃度依存的にインスリンフィブリル化を効率的に阻害することができた。Ｃ－ドットの阻害効果は、０．２μｇ／ｍＬであっても観察された。重要なことに、４０μｇ／ｍＬのＣ－ドットは、０．２ｍｇ／ｍＬのヒトインスリンのフィブリル化を６５℃において５日間防止し、一方Ｃ－ドットがない場合、インスリンは、同じ条件下において６５℃で３時間で変性する。細胞毒性試験は、これらのＣ－ドットが非常に低い細胞毒性を有することを示している。したがって、これらのＣ－ドットは、生体系内のインスリンフィブリル化を阻害することができ、また製薬産業においてインスリンの処理及び製剤化に使用され得る。カーボンドットの形成、及びペプチドまたはタンパク質フィブリル化阻害におけるその使用に関するさらなる詳細は、添付書類Ａにおいて示されており、以下の実施例において見出すことができる。

【００５５】

実施例において実証されるように、本開示のカーボンドットは、核形成のより早期の段階で添加された場合、ヒトインスリンフィブリル化に対するより大きな阻害効果を有する。理論に束縛されることを意図しないが、阻害効果は、核形成臨界濃度に達する前のカーボンドットとインスリン種（モノマー及びオリゴマー）との間の相互作用に起因し得ると考えられる。核形成臨界濃度に達すると、カーボンドットはフィブリル化の動力学を変化させない。さらに、理論に束縛されることを意図しないが、カーボンドットとヒトインスリン種との相互作用は、カーボンドットの複雑な表面の性質に起因する、水素結合、疎水性相互作用、及びファンデルワールス相互作用等の弱い相互作用によるものであると考えられる。これらの相互作用は、カーボンドットの表面上にインスリン種を吸着させ、フィブリル化の初期段階におけるヒトインスリンの自己凝集及び核形成を抑制するのに十分強くてもよい。静電相互作用は、あまり寄与しないと推定される。ｐＨ１．６におけるカルボン酸基のプロトン化に起因して、カーボンドットは、その表面上にあまり負電荷を有さない。

【００５６】

ペプチド及びタンパク質は、その源、配列、及び機能とは無関係に、フィブリルを発達させる共通の分子機構を共有し得ることが十分認められている。さらに、他のタンパク質及びペプチドは、インスリン上に存在する同じ官能基を有するアミノ酸で形成されるため、カーボンドットは、インスリンと同じ様式で、水素結合、疎水性相互作用、及びファンデルワールス相互作用等の弱い相互作用を介して他のタンパク質及びペプチドと相互作用することが推定される。したがって、本開示のカーボンドットによるインスリンフィブリル化の阻害は、他のタンパク質及びペプチドのフィブリル化を同様に阻害することが推定される。

【００５７】

血液脳関門透過組成物

本開示は、血液脳関門透過溶液中で本開示のカーボンドットを血液脳関門を通して輸送

する方法をさらに提供する。脳及び脊髄からなる中枢神経系（ＣＮＳ）は、感覚情報を統合し、それに応じて応答する機能を担う。ＣＮＳは、血液循環からＣＮＳへの選択された分子の進入を許可する生理学的チェックポイントとして機能する、複雑で極めて制御された血液脳関門（ＢＢＢ）により保護されている。ＢＢＢは、主に、密な細胞間結合により密接に相互接続された毛細管内皮細胞で構成される。したがって、ＢＢＢは、血液からＣＮＳへの治療分子の送達に対する障壁である。研究によれば、ＣＮＳ疾患に対して標的化された９８％超の小分子薬物、及び実際には１００％の巨大分子薬物が、ＢＢＢを容易に通過せず、したがって、ＣＮＳ疾患に対する現在の処置は、依然として極めて制限されていることが示されている。

【００５８】

血液脳関門透過溶液は、一般に、有機化合物標的に共有結合的にコンジュゲートされた本開示のカーボンドットを含む。カーボンドット－有機化合物標的コンジュゲートは、受容体媒介エンドサイトーシスにより血液脳関門を透過し得る。したがって、実施形態において、有機化合物標的は、血液脳関門において見られる受容体に特異的なリガンドであってもよい。血液脳関門における受容体に特異的なリガンドは、これらに限定されないが、トランスフェリン受容体、インスリン受容体、マンノース６－リン酸受容体（インスリン様成長因子ＩＩ）、低密度リポタンパク質受容体関連タンパク質１受容体、低密度リポタンパク質受容体関連タンパク質２受容体、レプチン受容体、チアミン受容体、グルタチオン受容体、オピオイド受容体、ｐ７５ニューロトロフィン受容体、ＧＴ１ｂポリシアロガングリオシド、ＧＰＩアンカー型タンパク質受容体、及びジフテリア毒素受容体（ヘパリン結合性上皮成長因子様成長因子）を含む。有機化合物標的は、トランスフェリン、インスリン、ヒト黒色腫抗原ｐ９７、低密度リポタンパク質、受容体関連タンパク質、ポリソルベート８０被覆ナノ粒子、ａｎｇｉｏｐｅｐ（例えばａｎｇｉｏｐｅｐ　２）、レプチン、チアミン、グルタチオン、合成オピオイドペプチド、狂犬病ウイルス糖タンパク質、破傷風毒素、テン－イレブン転位メチルシトシンジオキシゲナーゼ１（ＴＥＴ　１）、Ｇ２３ペプチド、ＴＡＴペプチド及びジフテリア毒素の非毒性突然変異（ＣＲＭ１９７）からなる群から選択され得る。有機化合物標的はまた、対象内のカーボンドット－有機化合物コンジュゲートの画像化を向上させるために標識化されてもよい。画像化用途の造影剤として医薬に使用される任意の化合物が、好適な画像化標識である。画像化標識の限定されない例は、蛍光染料、例えばフルオレセイン、ＣＦ（商標）染料シリーズ、及びＡｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ（登録商標）染料シリーズ、または放射線造影試薬、例えばヨウ素、バリウム、ガンドリニウムであってもよい。

【００５９】

有機化合物標的をカーボンドットにコンジュゲートする方法は、当技術分野において周知である。有機化合物標的をカーボンドットに共有結合させる任意の方法が好適である。例えば、古典的なカルボジイミド化学（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）（ＥＤＣ）及びＮ－ヒドロキシスクシンイミド（ＮＨＳ）またはスルホ－（ＮＨＳ）を使用したＥＤＣ／ＮＨＳ）を使用して、アミノまたはアルコール含有有機化合物をカーボンドットにコンジュゲートさせてもよい。

【００６０】

別の例において、本技術は、カーボンドット（「Ｃ－ドット」）の形成、及び、具体的にはトランスフェリンコンジュゲートカーボンドットによる血液脳関門の通過におけるその使用を示す。出願者は、タンパク質（またはペプチド）フィブリル化に対するＣ－ドットの阻害効果を利用するためには、Ｃ－ドットがまずＢＢＢを通過することによりＣＮＳ内に送達されるべきであることを特定した。Ｃ－ドットは、いくつかのＣＮＳ関連疾患に対する薬物送達及び処置における、効果的な薬物送達及び処置の可能性を示したが、治療薬剤がＣＮＳ内で病理組織に達するのを遮断する血液脳関門（ＢＢＢ）を通過することにより、ＣＮＳにＣ－ドットを送達することが望ましい。本発明の研究以前、従来の技術は、Ｃ－ドットまたはＣ－ドットコンジュゲートがＢＢＢを通過してＣＮＳに進入することを実証できなかった。本発明の技術によって、Ｃ－ドットは、トランスフェリン及び染料

標識化トランスフェリンに共有結合的にコンジュゲートされ、トランスフェリン受容体媒介送達を介してＢＢＢを通過することが実証された。実験は、ゼブラフィッシュモデルを使用して行われ、トランスフェリンにコンジュゲートされたＣ－ドットはＢＢＢを通過することによりＣＮＳに進入し得るが、Ｃ－ドット単独では進入し得ないことが示唆された。ゼブラフィッシュ、マウス及びヒトにおけるＢＢＢは極めて類似しており、したがって、ゼブラフィッシュにおける所見は、マウス及びヒトにも適用され得ると推定される。

【００６１】

骨結合性組成物

蛍光顕微鏡を使用したｉｎ　ｖｉｖｏ骨画像化に使用される材料は、極めて希少である。蛍光顕微鏡によるｉｎ　ｖｉｖｏ画像化には、フルオロフォアが骨特異性を有し、他の細胞または器官への非特異的結合がない、または制限されていること、プローブがほぼ軟骨性の骨とほぼ石灰化した骨とを区別することができなければならないこと、標的部位におけるフルオロフォアの発光が信号を生成するのに十分強くなければならないこと、フルオロフォアが生体適合性で細胞毒性を有さない、または最小限である必要があること、ならびに標的フルオロフォアが投与後のより短い送達時間及びより長い染色時間のために同時に最適化される必要があることが必要である。

【００６２】

本開示のカーボンドットは、有利にも、生きた動物内の石灰化骨に高い親和性及び特異性をもって結合することが判明している。結合は、非石灰化軟骨内要素を含む他の組織において観察されなかった発光の強い向上をもたらした。したがって、本開示のカーボンドットは、診断及び／または治療目的に使用され得る。

【００６３】

カーボンドットの治療的使用は、特に限定されない。一般に、本開示のカーボンドットは、薬物を骨に送達する方法であって、本開示のカーボンドットに薬物を組み込んで、薬物が組み込まれたカーボンドットを形成することと、薬物が組み込まれたカーボンドットを対象に投与することとを含む方法において使用され得る。

【００６４】

ナノ粒子上に組み込まれる薬物は、特に限定されない。カーボンドットにコンジュゲートし得る任意の薬物が、石灰化骨に送達され得る。薬物は、骨石灰化疾患（例えば、骨粗しょう症または異所性骨化）を処置するための薬物であってもよい。薬物は、骨源のエネルギー代謝疾患を処置するための薬物であってもよい。骨格は、脳、膵臓、胃腸及び肝臓と共に、エネルギー代謝（ひいては成長及び肥満）を制御する内分泌回路の一部であるため、本開示のカーボンドットは、内分泌系の骨成分を特異的に標的化することによりエネルギー代謝欠陥及び疾患を処置するための薬物を送達するために使用され得る。薬物はまた、骨及び血液がん、ならびに骨に転移する腫瘍を処置するための薬物であってもよい。骨がんは、任意の種類の骨組織において発症し得（例えば、骨肉腫及びユーイング肉腫類骨組織、軟骨組織における軟骨肉腫）、血液がんは、骨髄において発症し得（例えば多発性骨髄腫）、また骨は、転移がんの一般的な部位である（例えば転移性乳がん）。本開示に従って調製されたカーボンドットは、化学治療薬剤及び他の薬物を骨に送達してがん及び他の疾患を処置するために使用され得る。薬物はまた、これらに限定されないが、ペニシリン及びその誘導体、ならびにシプロフロキサシン及びその誘導体等の抗生物質であってもよい。骨は、免疫系が疾患または病気（例えば、糖尿病、関節炎、ＡＩＤＳ等）により弱まった、または骨が環境に露出した（例えば、開放骨折、または股関節、膝等の置換手術等）個人において、細菌（例えば黄色ブドウ球菌）に感染し得る。カーボンドットは、骨における感染症を特異的に処置するように使用され得る。

【００６５】

理論に束縛されることを意図しないが、カルボン酸基が豊富な表面は、骨に対する高い親和性及び特異性を提供すると考えられる。さらに、理論に束縛されることを意図しないが、カーボンドットと薬物とのコンジュゲーションの後であっても、十分な量のカルボン酸基が残り、改質カーボンドットが骨に結合することが可能になると考えられる。表面が

改質されていない本開示のカーボンドット、ならびにアミン、グルタミン酸、及びビオチンとコンジュゲートした本開示のカーボンドットは、すべて生きた動物内の骨に結合し、骨に特異的に結合して非石灰化骨基質（細胞外基質）等の他の組織には結合しない。他のカーボンドット表面改質が可能であり（例えばチオール）、改質カーボンドットの、アミン、グルタミン酸及びビオチンとの間で示されるものと同様の結合が生じると推定される。

【００６６】

薬物は、カーボンドットの調整可能な表面官能性、及び薬物上に存在する任意の活性官能基により、カーボンドットに官能基を介して結合し得る。カルボキシル及びアミン基により示されるように、カーボンドットの表面は、親和性または特異性の損失なしに改質され得る。さらに、薬物が非改質カーボンドットの表面における官能基と化学的に適合しない官能基を有する場合、カーボンドットは、薬物の官能性に適合する異なる表面基で改質されてもよい。さらに、薬物は、非共有結合的相互作用により本開示のカーボンドット上に組み込まれてもよい。

【００６７】

薬物をカーボンドットにコンジュゲートする方法は、当技術分野において周知である。例えば、古典的なＥＤＣ／ＮＨＳカップリング化学が使用されてもよい。

【００６８】

本開示のカーボンドットの診断的使用は、特に限定されない。本開示のカーボンドットは、骨折及び微小骨折の画像化試薬として使用されてもよい。カーボンドットの固有蛍光特性が、石灰化骨の可視化を可能にする。カーボンドットはまた、骨への画像化造影試薬の送達ビヒクルとして使用されてもよい。カーボンドットの独特な骨親和性は、任意の知られた検出方法（例えば、Ｘ線、コンピュータトモグラフィー、ＭＲＩ等）において骨構造を可視化するために使用され得る造影試薬の送達を可能にする。

【００６９】

カーボンドットは、表面改質を有さなくてもよい。実施形態において、カーボンドットは、表面改質カーボンドットを含む。好適な表面改質は、中性ビオチン、正電荷アミン基、または負電荷カルボキシル基からなる群から選択され得る。表面改質は、カーボンドット上への薬物の組み込みを促進するために使用され得る。

【００７０】

驚くべきことに、生きた動物内での骨結合は、カーボンドットの一般的特性ではないことが判明した。ゼブラフィッシュモデルを使用して、有利にも、本開示の方法に従い調製されたカーボンドットは、中性ビオチン、正電荷アミノ基及び負電荷カルボキシル基でさらに表面改質された本開示の方法に従い調製されたカーボンドット（図１Ｂ）と同様に、石灰化骨に結合することができることが判明した（図１Ａ（Ｃ粉末））。本開示の方法に従って調製され表面改質されたカーボンドットは、石灰化骨に対して、非改質カーボンドットと同じ親和性を有することが判明した。さらに、本開示のカーボンドット及び非改質カーボンドットは、石灰化骨に特異的に結合し、非石灰化骨基質（細胞外基質）等の他の組織には結合しない。一方、知られている方法に従って調製された、すなわちグリセロールまたはクエン酸から調製されたカーボンドットは、カルシウム結合性カルボキシル基の量を増加させるために表面がグルタミン酸で改質された場合であっても（図１Ａ、クエン酸＋Ｇｌｕ）、図１Ａ（グリセロール及びクエン酸）に示されるように石灰化骨に結合することができなかった。むしろ、知られている方法に従って調製されたカーボンドットの蛍光性は、胃腸及び解毒器官（肝臓、前腎（原始腎臓））において観察される。理論に束縛されることを意図しないが、石灰骨に対する本開示のカーボンドットの特異性及び親和性は、カーボンドットの純度、ならびにカルボキシル及びアルコール基が豊富な表面の組み合わせによるものであると考えられる。本開示のカーボンドットは、表面に豊富なカルボキシル及びアルコール基を有する（一般に負電荷である）純粋な炭素コアを有する。一方、知られている方法に従って調製されたカーボンドットは、より純度の低い炭素コア（重合及び炭化により形成された）ならびに調製方法に応じて表面上に他の異なる官能基を有する。例えば、グリセロールまたはクエン酸を有するように形成されたカーボンドット

は、負電荷カルボキシル基及び正電荷アミン基を含む。

【００７１】

カーボンドットは、当技術分野において知られている任意の好適な方法によって骨に投与され得る。投与の限定されない例は、血液への注射、腹腔内注射、及び創傷のカーボンドットへの直接的曝露による局所送達を含む。血流中に注射された場合、カーボンドットは、生物内を循環し、次いで骨に結合する。循環するカーボンドットは、骨に結合する際に血液から排除される。体腔内に直接注射された場合、カーボンドットは、循環系により腹膜から骨に分配される。人間に化学治療薬を送達するには、腹腔内注射が好適だろう。カーボンドットが局所的に送達される場合、カーボンドットは、露出した損傷骨に直接結合する。

【００７２】

ゼブラフィッシュによる本開示のカーボンドットの保持は非常に安定であり、長期持続的であり、検出可能な毒性を有さず、投与方法に依存しなかった。

【００７３】

本開示に従うカーボンドット及び方法は、以下の実施例の観点からよりよく理解され得、これらの実施例は、単に例示することが意図され、カーボンドット及び方法の範囲を限定することを多少なりとも意味しない。

【実施例】

【００７４】

実施例１：カーボンドットの調製

本開示のカーボンドットを以下のように調製した。硫酸（９ｍＬ）及び硝酸（３ｍＬ）をアリコートとしてフラスコ内の２５０ｍｇの炭素ナノ粉末または炭素粉末に添加し、炭素粉末混合物を形成した。混合物を、砂浴内で約１１０℃で１５時間還流加熱した。次いで、還流炭素粉末混合物を冷却した。フラスコが氷浴内にある間、過飽和水酸化ナトリウム溶液を添加して、冷却された還流炭素粉末混合物を中和した。混合物を濾過して、未反応炭素粉末を除去した。次いで、中和反応により形成された塩を、以下のように除去した。硫酸ナトリウム種晶を混合物に添加し、混合物を氷浴内で冷却して、塩の析出／結晶化を促進した。内容物を濾過して形成された固体塩を除去し、可溶化カーボンドットを含む暗褐色の上澄み溶液を得た。必要に応じて析出／結晶化／濾過を繰り返し、塩の全てを除去した。可溶化カーボンドットを含む上澄み溶液をビーカーに移し、周囲圧力下で７５～８５℃で蒸発させることによりその体積を約２５ｍＬに低減させた。液体／液体抽出を使用して、可溶化カーボンドット溶液から不純物を抽出した。特に、クロロホルム（１５ｍＬ）を添加して、有機相中に不純物を抽出した。水相を回収し、抽出手順を繰り返した。次いで、溶液を３０００ｒｐｍで３０分間遠心分離し、いかなる析出物も除去した。溶液を分画分子量（ＭＷＣＯ）３５００透析袋に移し、４Ｌの脱イオン水で５日間透析し、脱イオン水は４～１０時間毎に交換した。約２５ｍＬが残るまで、得られた溶液を７５～８５℃に加熱することにより濃縮した。最後に、ｒｏｔｏｖａｐ（または同等のもの）を使用して残りの水を蒸発させ、水溶性カーボンドットとして２７．４ｍｇの固体黒色粉末を得た。

【００７５】

調製されたカーボンドットを、Ｓｈｉｍａｄｚｕ ＵＶ－２６００分光器または同等のものを使用して、紫外－可視分光法（ＵＳ－Ｖｉｓ）により１ｃｍセル内で特性決定した。カーボンドットの固体粉末を使用して、Ｐｅｒｋｉｎ Ｅｌｍｅｒ Ｆｒｏｎｔｉｅｒまたは同等のものでフーリエ変換赤外（ＦＴＩＲ）スペクトルを記録した。Ｈｏｒｉｂａ Ｊｏｂｉｎ Ｙｖｏｎ Ｆｌｕｏｒｏｌｏｇ－３または同等のものにより、励起及び発光の両方に対して５ｎｍのスリット幅を用いてカーボンドットの蛍光発光スペクトルを水溶液中で測定した。Ｐｅｒｋｉｎ－Ｅｌｍｅｒ ＰＨＩ ５６０ ＥＳＣＡシステムまたは同等のものを使用し、２２５Ｗ及び１２．５ＫＶで動作する複光路方式円筒鏡型分析器により、Ｍｇ Ｋαアノード及びｈυ＝１２５３．６ｅＶの光子エネルギーを用いて、Ｘ線光電子分光法（ＸＰＳ）を行った。炭素１ｓ軌道及び酸素１軌道の内殻準位を走査し、それぞ

れの原子感度因子に従って強度を正規化した。Ａｇｉｌｅｎｔ　５４２０原子間力顕微鏡または同等のものでタッピングモードを使用して、及びＪＥＯＬ　１２００Ｘ　ＴＥＭで、カーボンドットの顕微鏡画像を得た。

【００７６】

幅広い強いＵＶ－Ｖｉｓ吸収ピークが、２００～４００ｎｍの範囲内に見られた。カーボンドットは、励起波長に依存的な発光を示した。カーボンドットの最大発光は、５４０ｎｍで励起された場合、約５８０ｎｍであった。発光ピークは、３６０ｎｍで励起されると約５００ｎｍにシフトした。ＦＴＩＲ分析は、約３３８０（ＯＨ）、１７１５（Ｃ＝Ｏ）、１５８２（Ｃ＝Ｃ）、１２３６（Ｃ－Ｏ－Ｃ）及び１０８５ｃｍ$^{-1}$（Ｃ－Ｏ）にピークを示した。これらの結合は、ＸＰＳによりさらに確認され、カーボンドット表面上の５４．６％の炭素、４３．８％の酸素、及び他の微量元素が示された。２８９．７　ｅＶでのＸＰＳピークは、カルボン酸基に起因し、これは２３％の酸素信号を含んでいた。２８５．９ｅＶのピークは、Ｃ－Ｃ／Ｃ＝Ｃ結合に起因し、５３２．７ｅＶのピークは、水からのヒドロキシル酸素に起因し、５３４．０ｅＶのピークは、カルボニル酸素に起因した。ＴＥＭ画像は、１．５から６ｎｍの間に分布し、平均４ｎｍである直径を有する球状カーボンドットを示した。

【００７７】

したがって、実施例１は、本開示によるカーボンドットの調製及び特性決定を示す。

【００７８】

<u>比較例２：カーボンドットの調製の試行</u>

実施例１に記載のようにカーボンドットを調製したが、但し、１つの調製においては、硫酸及び硝酸の１：１（ｖ／ｖ）混合物を３：１（ｖ／ｖ）混合物の代わりに使用し、第２の調製においては、硝酸のみを使用した。カーボンドットは、硫酸及び硝酸の１：１混合物を使用した調製、または硝酸のみを使用した調製のいずれにおいても形成しなかった。したがって、比較例２は、本開示のカーボンドットが硫酸対硝酸の比が１：１（ｖ／ｖ）以下である場合には得られないことを実証している。

【００７９】

<u>実施例３：インスリンフィブリル化に対するカーボンドットの効果</u>

１ｍｇ／ｍＬのヒトインスリン（約５．８ｋＤａ分子量）原液を、０．１Ｍ塩化ナトリウム（ＮａＣｌ）を含む塩酸水溶液（ｐＨ１．６）中で調製した。０．２μｍ細孔サイズフィルタを通して溶液を濾過した。実施例１に従って調製されたカーボンドットを、１ｍｇ／ｍＬの濃度で水に溶解した。インスリン原液をカーボンドット溶液と混合して、ｐＨ１．６の０．１Ｍ　ＮａＣｌ溶液を使用して０、０．２、２、または１０μｇ／ｍＬのカーボンドットを含む０．２ｍｇ／ｍＬのインスリン濃度を有するいくつかの試料を調製した。試料を６５℃でインキュベートした。３０分毎に試料のアリコートを採取し、チオフラビンＴ（ＴｈＴ、ｐＨ　１．６で４０μＭ、０．１Ｍ　ＮａＣｌ）で０．１ｍｇ／ｍＬのタンパク質及び２０μＭのＴｈＴまで希釈した。Ｆｌｕｏｒｏｌｏｇ－３蛍光光度計または同等のものにより、１ｃｍ石英キュベット内で、４４０ｎｍの励起で、５ｎｍの励起及び発光スリット幅でＴｈＴ蛍光を記録した。ＪＡＳＣＯ　Ｊ－８１０分光偏光計または同等のものを使用して、円偏光二色性（ＣＤ）スペクトルを用いてヒトインスリンの構造変化を特性決定した。ヒトインスリンまたはインスリン／カーボンドット混合物溶液から異なるインキュベーション時間で採取した希釈アリコート（０．１ｍｇ／ｍＬのインスリンまで）を使用して、スペクトルを測定した。

【００８０】

ＴｈＴは、フィブリル特異的染料である。したがって、インスリンフィブリル化は、ＴｈＴ蛍光により特性決定され得、蛍光の増加は、フィブリル形成の増加を示す。誘導期、伸長期、及び飽和期の、インスリンフィブリル化の３つの段階が観察される。誘導期は、蛍光が観察されない（すなわち、該当する場合には形成するＴｈｔ－フィブリルの量が検出限界未満である）期間である。伸長期は、フィブリル化が生じるにつれて蛍光の増加が観察される期間である。飽和期は、形成されるＴｈｔ－フィブリルの量がが蛍光信号を飽

和状態にするにつれて検出される蛍光の量が横ばい状態になる期間である。

【００８１】

カーボンドットが存在しない場合、０．２ｍｇ／ｍＬのインスリンは約２．５時間の誘導期、続いて１時間の伸長期を示し、４時間のインキュベーション後に飽和に達した。０．２μｇ／ｍＬのカーボンドットがヒトインスリンと共に存在する場合、ヒトインスリンの誘導期時間は３．５時間に増加し、カーボンドットが存在しないインスリン試料よりも約１時間長かった。カーボンドットの濃度が２及び１０μｇ／ｍＬに増加すると、ヒトインスリンの誘導期は、それぞれ５．５及び１２時間まで大幅に増加した。ＣＤの結果は、観察された蛍光と一致していた。時間０におけるヒトインスリン単独は、主にα－螺旋構造を示し、５時間のインキュベーション後には成熟インスリンフィブリルのβ－シート構造を示し、時間０と時間５との間の構造変化が示された（例えば、ピークの収縮は、α－螺旋構造を示し、ピークの増加はβ－シート構造を示す）。２及び１０μｇ／ｍＬのカーボンドットと共にインキュベートされたインスリンに対して、誘導期（すなわち、α－螺旋構造が観察された時間）の大幅な増加が観察された。

【００８２】

したがって、実施例３は、カーボンドットがヒトインスリンフィブリル化を阻害すること、及びヒトインスリンフィブリル化の阻害がカーボンドット濃度依存的であることを実証している。実施例３の結果は、本開示のカーボンドットがヒトインスリンの構造を安定化させること、ならびに、インスリンの保存、送達、及び投与中の構造変化に関連した製薬産業における問題に対応し得ることをさらに示唆している。

【００８３】

実施例４：誘導期におけるインスリンフィブリル化の阻害

実施例３のようにインスリン原液を調製した。インスリン原液を使用して、０．２ｍｇ／ｍＬのインスリン濃度を有するいくつかの試料を調製した。誘導期におけるインスリンフィブリル化に対する１０μｇ／ｍＬのカーボンドット（実施例１に従って調製される）の効果の阻害を決定するために、インスリン試料を６５℃で０、１、及び２時間インキュベートした後に、それぞれカーボンドットを添加した。試料のアリコートを採取し、実施例３に記載のものと同じ条件下で、ＴｈＴ蛍光によりチェックした。

【００８４】

カーボンドットが存在しない場合、ヒトインスリンの誘導期は、約２．５時間であった。１０μｇ／ｍＬのカーボンドットが時間０において添加された場合、誘導時間は約１２時間に増加した。１時間及び２時間のインキュベーション後に同じ量のカーボンドットがインスリンに添加された場合、誘導時間は、それぞれ５．５時間及び３．５時間に増加するのみであった。

【００８５】

したがって、実施例４は、本開示のカーボンドットが、核形成のより早期の段階で添加された場合、ヒトインスリンフィブリル化に対するより大きな阻害効果を有することを示している。理論に束縛されることを意図しないが、阻害効果は、核形成臨界濃度に達する前のカーボンドットとインスリン種（モノマー及びオリゴマー）との間の相互作用に起因し得ると考えられる。核形成臨界濃度に達すると、カーボンドットはフィブリル化の動力学を変化させない。理論に束縛されることを意図しないが、カーボンドットとヒトインスリン種との相互作用は、カーボンドットの複雑な表面の性質に起因する、水素結合、疎水性相互作用、及びファンデルワールス相互作用等の弱い相互作用によるものである。これらの相互作用は、カーボンドットの表面上にインスリン種を吸着させ、フィブリル化の初期段階におけるヒトインスリンの自己凝集及び核形成を抑制するのに十分強くてもよい。静電相互作用は、あまり寄与しないと推定される。ｐＨ１．６におけるカルボン酸基のプロトン化に起因して、カーボンドットは、その表面上にあまり負電荷を有さない。

【００８６】

実施例５：血液脳関門透過性

血液脳関門のカーボンドット－ヒトトランスフェリンコンジュゲートに対する透過性を

試験するために、ゼブラフィッシュモデルを使用した。ゼブラフィッシュは、比較的複雑な脊椎動物種であり、ヒトに対する高度の生理学的及び遺伝的相同性を有する。ゼブラフィッシュはまた、ヒトと同様に、全ての主要な神経伝達物質、ホルモン、及びトランスフェリンを含む受容体を有する。ゼブラフィッシュとヒトとの間の脊髄発達及び機能における解剖学的及び生理学的保存は、実証及び証明されている。したがって、ゼブラフィッシュモデルは、ｉｎ　ｖｉｖｏでの新規治療薬剤の試験及び開発を可能にする。ゼブラフィッシュモデルの別の利点は、体の透明性であり、これによって非侵襲的画像化技術を使用した薬理学的処置の追跡が可能となる。成熟ＢＢＢを有する６　ｄ．ｐ．ｆ．の幼生ゼブラフィッシュを、ｉｎ　ｖｉｖｏモデルとして選択した。

【００８７】

実施例１に従って調製されたカーボンドットを、トランスフェリン、染料標識化トランスフェリン、またはフルオレセイン（５－（アミノメチル）　フルオレセイン）の１つとコンジュゲートさせた。トランスフェリンを標識化するために使用された染料は、ＣＦ（商標）５９４　Ｄｙｅ（Ｂｉｏｔｉｕｍ、Ｈａｙｗａｒｄ、ＣＡ）であった。ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ　Ｓｅｐｈａｃｒｙｌ　Ｓ－３００（Ｕｐｐｓａｌａ、Ｓｗｅｄｅｎ）または同等のものからの充填されたサイズ排除クロマトグラフィーカラムを使用して、コンジュゲートをサイズ排除クロマトグラフィーにより精製した。ＵＶ－Ｖｉｓ吸収を使用して、トランスフェリン及び染料－トランスフェリンのカーボンドットへのコンジュゲーションを確認した。トランスフェリン－カーボンドットは、約２６０ｎｍに吸収を有し、染料－トランスフェリン－カーボンドットは、約５９４ｎｍに吸収を有する。円偏光二色性分光法を使用して、コンジュゲーションがトランスフェリンまたは染料－トランスフェリンに構造変化をもたらしたか否かを決定した。元のトランスフェリン、染料－トランスフェリン、トランスフェリン－カーボンドット及び染料－トランスフェリン－カーボンドットの間には認められ得る差は観察されなかったが、これは、トランスフェリン及び染料－トランスフェリンが、カーボンドットとのコンジュゲーション後にまだ元の構造を維持していたことを示している。

【００８８】

トランスフェリンは、カーボンドットに共有結合的にコンジュゲートして、カーボンドットがトランスフェリン受容体媒介エンドサイトーシスにより血液脳関門を通過するのを可能にするために選択された。トランスフェリン受容体はＢＢＢ上で過剰発現し、幼生ゼブラフィッシュにおけるＢＢＢ上のトランスフェリン受容体の発現は６日齢において活性であると考えられる。カーボンドットの蛍光強度がＣＮＳにおいて観察するには弱すぎる場合に、カーボンドットの蛍光信号を増加させるために、フルオレセインがコンジュゲートしたカーボンドットを使用した。

【００８９】

カーボンドットまたはコンジュゲートを、ゼブラフィッシュの心臓に経脈管的に注射した。カーボンドットまたはコンジュゲートが血液脳関門を通過しＣＮＳに進入するかどうかを検出するために、共焦点蛍光画像を使用した。注射なしの対照ゼブラフィッシュの画像は、ＣＮＳゾーンが本来蛍光性ではないことを示した。

【００９０】

非改質カーボンドットは、対照ゼブラフィッシュにより示された蛍光性からの明確な差（またはその欠如）を示さなかった。フルオレセインがコンジュゲートしたカーボンドットは、体内では明るい蛍光性を示したが、ＣＮＳ内では蛍光性は観察されなかった。トランスフェリン－カーボンドットは、カーボンドットのみの注射と同じ条件下で注射したが、カーボンドットに比べて蛍光性の差は観察されなかった。染料－トランスフェリン（蛍光染料で標識化されたトランスフェリン）カーボンドットコンジュゲートは、同じ手順に従ってゼブラフィッシュの心臓に注射した。ＣＮＳ及び周囲の神経細胞体において蛍光が観察された。

【００９１】

したがって、実施例５は、染料－トランスフェリンカーボンドットのコンジュゲーショ

ン系が、血液脳関門を透過し、成功裏にＣＮＳに進入することができたことを実証している。トランスフェリン－カーボンドットコンジュゲートもまた、ＢＢＢを透過してＣＮＳに進入することができたと考えられるが、カーボンドットの固有蛍光性は観察するには弱すぎた。

【００９２】

実施例６：カーボンドットの骨結合

実施例１に従ってカーボンドットを調製した（Ｃ－ドットで指定される）。カーボンドットのいくつかの表面を、中性ビオチン（Ｃ粉末－ビオチンで指定される）、正電荷アミン基を提供するためのエチレンジアミン（Ｃ粉末－アミンで指定される）、または負電荷カルボキシル基を生成するためのグルタミン酸（Ｃ粉末－Ｇｌｕで指定される）の１つでさらに改質した。古典的なＥＤＣ／ＮＨＳカップリング反応を使用して改質を行った。具体的には、カーボンドットの表面カルボン酸基をＥＤＣ及びＮＨＳにより順次活性化し、次いで活性化されたカーボンドットをエチレンジアミン及びグルタミン酸上のアミノ部分とコンジュゲートした。そのような方法は、当技術分野において周知である。

【００９３】

また、「Ｆｕｎｃｔｉｏｎａｌｉｚｅｄ ｃａｒｂｏｎ ｄｏｔｓ ｅｎａｂｌｅ ｓｉｍｕｌｔａｎｅｏｕｓ ｂｏｎｅ ｃｒａｃｋ ｄｅｔｅｃｔｉｏｎ ａｎｄ ｄｒｕｇ ｄｅｐｏｓｉｔｉｏｎ.」Ｊ．Ｍａｔｅｒ．Ｃｈｅｍ．Ｂ ２０１４，２，８６２６－８６３２及び「Ｉｎ ｖｉｔｒｏ ｄｅｔｅｃｔｉｏｎ ｏｆ ｃａｌｃｉｕｍ ｉｎ ｂｏｎｅ ｂｙ ｍｏｄｉｆｉｅｄ ｃａｒｂｏｎ ｄｏｔｓ」，Ａｎａｌｙｓｔ ２０１３，１３８，７１０７－７１１１において説明されているような周知の方法に従って、カーボンドットをグリセロール及びクエン酸から調製した（それぞれグリセロール及びクエン酸で指定される）。クエン酸カーボンドットの試料を、グルタミン酸で表面改質した（クエン酸＋Ｇｌｕで指定される）。

【００９４】

カーボンドットを生きた動物の石灰化骨内に導入した。中性リン酸干渉生理食塩水中に５μｇ／μＬのカーボンドットを含有する５ナノリットルの溶液を、６日齢の幼生ゼブラフィッシュの腹腔内に注射した。注射から３０分後、蛍光顕微鏡下で胚を可視化した。カーボンドットの固有蛍光特性を使用して、カーボンドットの検出を行った。明視野透過光及び蛍光（４８８ナノメートル）下、複合顕微鏡で１００倍の倍率で画像を撮影した。

【００９５】

図１に示されるように、本開示の方法に従って調製された全てのカーボンドット（Ｃ粉末、Ｃ粉末－ビオチン、Ｃ粉末－アミン、及びＣ粉末－Ｇｌｕ）が骨結合を示し、したがって石灰化骨に対する親和性を示した。特に、画像は、脊髄内（平行垂直線）及び頭蓋骨内の脊髄前方における石灰化骨構造、えら蓋ならびに擬鎖骨において蛍光を示している。さらに、当技術分野において知られている方法に従って調製されたカーボンドット（グリセロール、クエン酸、またはクエン酸－Ｇｌｕ）はいずれも、骨結合を示さなかった。特に、画像は、解毒器官（肝臓、胃腸、前腎）においてのみ蛍光性を示している。カーボンドットの骨への結合は、カーボンドット画像の蛍光パターンを、石灰化骨にのみ結合することが知られている染料（例えばＡｌｉｚａｒｉｎ Ｒｅｄ）から作成された画像と比較することにより確認された。さらに、カーボンドットは、中にカルシウムを有さない組織には結合しないことが判明した。したがって、実施例６は、本開示の方法に従って調製されたカーボンドットが、他の方法により調製されたカーボンドットにより示されない石灰化骨に対する特異的親和性を有することを実証している。

【００９６】

実施例７：カーボンドットの細胞毒性

成熟した生殖腺を有する成体ウニから配偶子を採取した。低温濾過された人工セーターにより新鮮な卵を３回洗浄し、精子と混合して受精率を検査した。９５％超の受精率を有する卵のみを、毒性試験に使用した。２ｍＬの海水中の１００の健康な受精卵を、新しい清浄な２４ウェル細胞培養プレートのそれぞれのウェル内に堆積させた。実施例１に従っ

て０、５、１０、２０、５０、または１００μｇ／ｍＬの濃度で調製されたカーボンドットをウェルに添加した。受精卵及びカーボンドットのプレートを、１５℃で１６時間、間充組織胞胚期胚に達するまでインキュベートした。次いで、３つの個々の雌雄対を使用した３つの生物学的複製を採用した。１６時間のインキュベーション後の胚の形態を分析することにより、カーボンドットの毒性を決定した。

【００９７】

ウニ胚は、有毒化学物質に対して極めて敏感である。結果は、カーボンドットがウニ受精卵及び胚に対して低い細胞毒性を有することを示した。１０μｇ／ｍＬのカーボンドットの存在下では、１６時間後に９５％超のウニ胚が正常な形態を保持した。高濃度のカーボンドット（すなわち、５０μｇ／ｍＬのカーボンドット）であっても、９０％超の胚が正常のままであり、細胞に対するカーボンドットの低い細胞毒性を示した。カーボンドットは、５０μｇ／ｍＬの濃度において析出物を形成することなく海水中で安定であり、１００μｇ／ｍＬの濃度では、１６時間のインキュベーション後、析出物は肉眼では観察されなかったが、光学顕微鏡を用いると観察することができた。

【００９８】

したがって、実施例７は、本開示によるカーボンドットが、海水中で低い細胞毒性及び高い安定性を示すことを実証している。

【００９９】

前述の説明は、理解の明確さのためだけに示され、本発明の範囲内の変更形態は当業者には明白であり得るため、不必要な制限が前述の説明から理解されるべきではない。

【０１００】

プロセスが特定の実施形態を参照して記載されているが、当業者には、その方法に関連する行為を行う他の方法が使用されてもよいことが容易に理解される。例えば、様々なステップの順序は、別段記載がない限り、その方法の範囲または趣旨から逸脱することなく変更されてもよい。さらに、個々のステップの一部は、組み合わせられ得るか、省略され得るか、または追加のステップへとさらに分割され得る。

【０１０１】

本明細書に引用される全ての特許、文献、及び参考文献は、参照により本明細書に完全に組み込まれる。本開示と組み込まれている特許、文献、及び参考文献との間に矛盾がある場合、本開示が優先されるべきである。

本明細書の開示内容は、以下の態様を含み得る。

（態様１）

カーボンドットを形成する方法であって、

炭素粉末を硫酸及び硝酸と混合して、炭素粉末混合物を形成することと；

前記炭素粉末混合物を還流下で加熱して還流炭素粉末混合物を形成し、次いで前記還流炭素粉末混合物を冷却することと；

前記還流炭素粉末混合物を中和して、可溶化カーボンドットを含む中和炭素粉末混合物を形成することと；

前記可溶化カーボンドットを前記中和炭素粉末混合物から単離して、カーボンドット溶液を形成することと；

前記カーボンドット溶液を透析することと；

前記溶液の溶媒を前記カーボンドット溶液から分離して、固体カーボンドットを得ることとを含む方法。

（態様２）

前記カーボンドットが、１０ｎｍ未満のサイズの直径、好ましくは６ｎｍ以下の直径を有する、態様１に記載の方法。

（態様３）

硝酸に対する硫酸の比が、１超：１である、態様１または態様２に記載の方法。

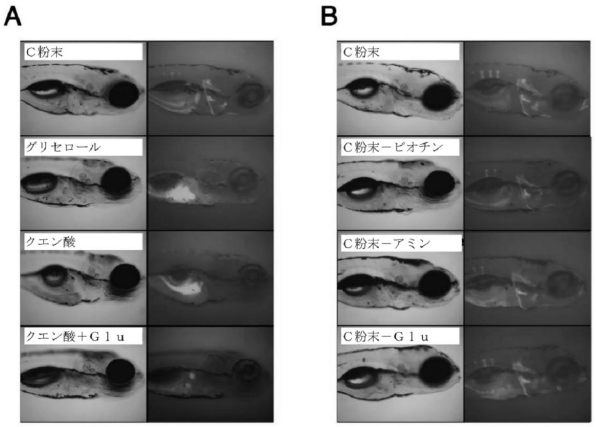
（態様４）

硝酸に対する硫酸の比が、約１．１：１から約１０：１の範囲内である、態様１から３

のいずれかに記載の方法。
（態様５）
前記還流炭素粉末混合物を中和することが、前記混合物に塩基を添加して、可溶化カーボンドットならびに硫酸塩及び／または硝酸塩の少なくとも１つを含む前記中和炭素粉末混合物を形成することを含む、態様１から４のいずれかに記載の方法。
（態様６）
前記塩基が、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化リチウム、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される、態様５に記載の方法。
（態様７）
前記可溶性カーボンドットを前記中和炭素粉末混合物から単離することが、硫酸塩及び硝酸塩の少なくとも１つを結晶化させ、前記中和炭素粉末混合物から前記塩を除去することを含む、態様５または態様６に記載の方法。
（態様８）
前記可溶性カーボンドットを前記中和炭素粉末混合物から単離することが、前記中和炭素粉末混合物から不純物を除去することを含む、態様１から７のいずれかに記載の方法。
（態様９）
前記分離することが、前記カーボンドット溶液を濃縮し、残留溶媒を蒸発させることを含む、態様１から８のいずれかに記載の方法。
（態様１０）
インスリンフィブリル化を阻害する方法であって、インスリンを溶液中で態様１から９のいずれか一項に記載の方法を使用して形成された前記カーボンドットと組み合わせて、濃縮溶液を形成することと、前記濃縮された溶液をヒト対象に挿入して、前記ヒト対象を処置することとを含む方法。
（態様１１）
前記濃縮溶液中のカーボンドットの濃度が、２μｇ／ｍＬ以上である、態様１０に記載の方法。
（態様１２）
前記濃縮溶液中のカーボンドットの前記濃度が、１０μｇ／ｍＬ以上である、態様１０または態様１１に記載の方法。
（態様１３）
血液脳関門透過溶液を形成する方法であって、
カーボンドットを有機化合物標的に共有結合的にコンジュゲートさせて、カーボンドット－有機化合物標的コンジュゲートを形成することと、前記コンジュゲートを溶媒と混合して、前記血液脳関門透過溶液を形成することとを含み、前記カーボンドットは、態様１から９のいずれかに記載の方法を使用して形成される方法。
（態様１４）
前記有機化合物標的が、トランスフェリン、染料標識化トランスフェリン、フルオレセイン、またはそれらの任意の組み合わせを含む、態様１３に記載の方法。
（態様１５）
前記炭素粉末混合物を還流下で加熱することが、前記炭素粉末混合物を砂浴内で１１０℃に１５時間加熱することを含む、態様１から１４のいずれかに記載の方法。
（態様１６）
前記還流炭素粉末混合物を中和することが、水酸化ナトリウムの過飽和溶液を添加することを含む、態様１から１５のいずれかに記載の方法。
（態様１７）
前記可溶化カーボンドットを前記中和炭素粉末混合物から単離することが、前記中和炭素粉末混合物を濾過して、未反応炭素粉末を除去することを含む、態様１から１６のいずれかに記載の方法。
（態様１８）
前記可溶カーボンドットを前記中和炭素粉末混合物から単離することが、前記硫酸塩及

び／または硝酸塩の少なくとも１つを結晶化させる前に、前記中和炭素粉末混合物を濾過して、未反応炭素粉末を除去することを含む、態様７に記載の方法。
（態様１９）
前記塩の結晶化が、硫酸ナトリウム結晶を前記中和炭素粉末混合物に添加して、前記塩の結晶化を開始させることを含む、態様７または態様１８に記載の方法。
（態様２０）
前記塩が、濾過により除去される、態様７、１８、または１９のいずれかに記載の方法。
（態様２１）
前記塩の結晶化が、約７５℃から８５℃の範囲内の温度で前記溶媒の少なくとも一部を蒸発させることにより、前記中和炭素粉末混合物の前記溶媒の体積を低減し、濃縮溶液を形成することと、前記濃縮溶液を冷却して、固体塩結晶及びカーボンドット溶液を含む混合物を提供することとを含む、態様７または１８から２０のいずれかに記載の方法。
（態様２２）
前記不純物が、有機溶媒による抽出により除去される、態様８に記載の方法。
（態様２３）
透析の前に、前記カーボンドット溶液を遠心分離することをさらに含む、態様１から２２のいずれかに記載の方法。
（態様２４）
前記カーボンドット溶液が、５日間約４から１０時間のインターバルで交換される４Ｌの脱イオン水で透析される、態様１から２３のいずれかに記載の方法。
（態様２５）
前記濃縮することが、前記カーボンドット溶液を約７５～８５℃の範囲内の温度に加熱することを含む、態様９に記載の方法。
（態様２６）
前記炭素粉末が、炭素ナノ粉末を含む、態様１から２５のいずれかに記載の方法。
（態様２７）
薬物を骨に送達する方法であって、
態様１から９または１５から２６のいずれか一項に従って調製されたカーボンドットに薬物を組み込んで、前記薬物が組み込まれたカーボンドットを形成することと、前記薬物が組み込まれた前記カーボンドットを対象に投与することとを含む方法。
（態様２８）
前記カーボンドットが、表面改質カーボンドットではない、態様２７に記載の方法。
（態様２９）
前記カーボンドットが、表面改質カーボンドットを含む、態様２７に記載の方法。
（態様３０）
前記表面改質が、中性ビオチン、正電荷アミン基、負電荷カルボキシル基、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される、態様２９に記載の方法。

【図面】
【図１】



フロントページの続き

(51)国際特許分類			FI		
A61K	*47/22*	*(2006.01)*	A61K	47/22	
A61K	*47/52*	*(2017.01)*	A61K	47/52	
A61K	*47/54*	*(2017.01)*	A61K	47/54	
A61K	*47/64*	*(2017.01)*	A61K	47/64	
A61K	*49/00*	*(2006.01)*	A61K	49/00	
A61P	*3/10*	*(2006.01)*	A61P	3/10	
A61P	*19/00*	*(2006.01)*	A61P	19/00	
A61P	*25/28*	*(2006.01)*	A61P	25/28	
A61P	*43/00*	*(2006.01)*	A61P	43/00	121
B82Y	*40/00*	*(2011.01)*	B82Y	40/00	
C01B	*32/15*	*(2017.01)*	C01B	32/15	

パートメント１１０
(72)発明者 ロジャー・エム・ルブラン
アメリカ合衆国３３１４９フロリダ州キー・ビスケイン、クランドン・ブールバード７１３番、スウィート２０３
(72)発明者 アイザック・スクロム
アメリカ合衆国３３１５６フロリダ州パインクレスト、サウスウエスト１０５テラス７６５０番
(72)発明者 ジーリー・ペン
アメリカ合衆国３３１３６フロリダ州マイアミ、ノースウエスト・セブンス・アベニュー１９５１番、サード・フロア、スウィート３１０、ユニバーシティ・オブ・マイアミ、オフィス・オブ・テクノロジー・トランスファー内
審査官 磯部 香

(56)参考文献 国際公開第２０１５／０７０３５１（WO，Ａ１）
Chemistry of Materials，2015年，Vol. 27，pp. 1764-1771
G. LIU et. al.，Transferrin Modified Graphene Oxide for Glioma-Targeted Drag Delivery: In Vitro and in Vivo Evaluations，ACS Applied Materials & Interfaces，米国，2013年08月14日，Vol.5, No.15，p.6909-6914
Journal of Materials Chemistry B，2014年，Vol. 2，pp. 8626-8632

(58)調査した分野 (Int.Cl.，ＤＢ名)
Ａ６１Ｋ ４７／０４
Ａ６１Ｋ ９／０８
Ａ６１Ｋ ３３／４４
Ａ６１Ｋ ３８／２８
Ａ６１Ｋ ４５／００
Ａ６１Ｋ ４７／２２
Ａ６１Ｋ ４７／５２
Ａ６１Ｋ ４７／５４
Ａ６１Ｋ ４７／６４
Ａ６１Ｋ ４９／００
Ａ６１Ｐ ３／１０
Ａ６１Ｐ １９／００
Ａ６１Ｐ ２５／２８
Ａ６１Ｐ ４３／００
Ｂ８２Ｙ ４０／００
Ｃ０１Ｂ ３２／１５
ＪＳＴＰｌｕｓ（ＪＤｒｅａｍＩＩＩ）
ＪＳＴ７５８０（ＪＤｒｅａｍＩＩＩ）
ＪＳＴＣｈｉｎａ（ＪＤｒｅａｍＩＩＩ）