(19)国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 109071227 B
(45)授权公告日 2022.12.02

(21)申请号 201780021414.4

(22)申请日 2017.02.06

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 109071227 A

(43)申请公布日 2018.12.21

(30)优先权数据
62/292,026 2016.02.05 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2018.09.28

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2017/016743 2017.02.06

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2017/136846 EN 2017.08.10

(73)专利权人 迈阿密大学
地址 美国佛罗里达州

(72)发明人 李尚浩 R.M.勒布朗 I.斯科罗姆纳 彭智利

(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001
专利代理师 彭昶 周李军

(51)Int.Cl.
C01B 32/15(2006.01)

(56)对比文件
US 2004161428 A1,2004.08.19
WO 2014179708 A1,2014.11.06
Shanghao Li et al..Crossing the blood-brain-barrier with transferrin conjugated carbon dots: A zebrafish model study.《Colloids and Surfaces B: Biointerfaces》.2016,第145卷
Qin Li et al..Photoluminescent Carbon Dots as Biocompatible Nanoprobes for Targeting Cancer Cells in Vitro.《J. Phys. Chem. C》.2010,第114卷
A. Shanti Krishna et al..Functionalized carbon dots enable simultaneous bone crack detection and drug deposition.《J. Mater. Chem. B》.2014,
Huiyang Liu et al..A multifunctional ribonuclease A-conjugated carbon dot cluster nanosystem for synchronous cancer imaging and therapy.《Nanoscale Research Letters》.2014,第9卷

审查员 孙晓妍

权利要求书2页 说明书14页 附图1页

(54)发明名称

用于诊断分析和药物递送的碳量子点

(57)摘要

本公开提供一种形成碳量子点的方法,其包括将碳粉与硫酸和硝酸混合,并将碳粉混合物加热至回流以使所述碳粉氧化。所述方法进一步包括分离和纯化所述碳量子点。本公开进一步提供碳量子点用于诊断分析(例如骨分析)、纤维化抑制以及药物递送的应用。

CN 109071227 B

1.一种形成血脑屏障渗透液的方法,所述方法包括:

用一种或多种有机化合物靶标共价缀合或包覆碳量子点,形成碳量子点-有机化合物靶标缀合物,并将所述缀合物与溶剂混合,形成血脑屏障渗透液,其中所述碳量子点通过以下方法形成:

将碳粉与硫酸和硝酸混合以形成碳粉混合物;

通过回流加热所述碳粉混合物以形成回流碳粉混合物,然后冷却所述回流碳粉混合物;

中和所述回流碳粉混合物以形成包含溶解的碳量子点的中和碳粉混合物;

将所述溶解的碳量子点从所述中和碳粉混合物中分离出以形成碳量子点溶液;

对所述碳量子点溶液进行透析;以及

将所述溶液的溶剂从所述碳量子点溶液中分离出,以获得固体碳量子点。

2.根据权利要求1所述的方法,其中所述有机化合物靶标包含铁传递蛋白、染料标记的铁传递蛋白、荧光素或其任何组合。

3.碳量子点在制备用于将药物递送至骨的药物中的用途,其中所述碳量子点通过以下方法制备:

将碳粉与硫酸和硝酸混合以形成碳粉混合物,其中硫酸和硝酸以大于1:1的体积比(v/v)提供;

通过回流加热所述碳粉混合物以形成回流碳粉混合物,然后冷却所述回流碳粉混合物;

中和所述回流碳粉混合物以形成包含溶解的碳量子点的中和碳粉混合物;

将所述溶解的碳量子点从所述中和碳粉混合物中分离出以形成碳量子点溶液;

对所述碳量子点溶液进行透析;

将所述溶液的溶剂从所述碳量子点溶液中分离出,以获得固体碳量子点;以及

向所述固体碳量子点加载所述药物。

4.根据权利要求3所述的用途,其中所述碳量子点不是表面改性的碳量子点。

5.根据权利要求3所述的用途,其中所述碳量子点包含表面改性的碳量子点。

6.根据权利要求5所述的用途,其中所述表面改性选自由以下组成的群组:中性生物素、带正电荷的胺基、带负电荷的羧基以及上述物质的组合。

7.根据权利要求1所述的方法,其中所述方法还包括向所述碳量子点加载药物。

8.碳量子点-有机化合物靶标缀合物在制备用于将治疗剂跨血脑屏障递送的药物中的用途,其中所述碳量子点通过以下方法制备:

将碳粉与硫酸和硝酸混合以形成碳粉混合物;

通过回流加热所述碳粉混合物以形成回流碳粉混合物,然后冷却所述回流碳粉混合物;

中和所述回流碳粉混合物以形成包含溶解的碳量子点的中和碳粉混合物;

将所述溶解的碳量子点从所述中和碳粉混合物中分离出以形成碳量子点溶液;

对所述碳量子点溶液进行透析;

将所述溶液的溶剂从所述碳量子点溶液中分离出,以获得固体碳量子点;以及

将有机化合物靶标与所述碳量子点缀合,以提供碳量子点-有机化合物靶标缀合物。

9.根据权利要求8所述的用途,其中所述碳量子点-有机化合物靶标缀合物还包含加载在碳量子点上的药物。

10.碳量子点在制备用于骨成像的药物中的用途,其中所述碳量子点通过以下方法制备:

将碳粉与硫酸和硝酸混合以形成碳粉混合物,其中硫酸和硝酸以大于1:1的体积比(v/v)提供;

通过回流加热所述碳粉混合物以形成回流碳粉混合物,然后冷却所述回流碳粉混合物;

中和所述回流碳粉混合物以形成包含溶解的碳量子点的中和碳粉混合物;

将所述溶解的碳量子点从所述中和碳粉混合物中分离出以形成碳量子点溶液;

对所述碳量子点溶液进行透析;以及

将所述溶液的溶剂从所述碳量子点溶液中分离出,以获得固体碳量子点。

11.根据权利要求10所述的用途,其中碳量子点可通过使用荧光显微镜检术使碳量子点可视化来检测。

12.根据权利要求10所述的用途,其中碳量子点包含造影剂。

用于诊断分析和药物递送的碳量子点

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请根据35U.S.C.§119(e)要求于2016年2月5日提交的美国临时专利申请第62/292026号的权益。上述申请的全部公开内容通过引用并入本文。

[0003] 政府支持声明

[0004] 本发明在国家科学基金会的授权1355317的政府支持下完成。政府在本发明中享有一定权利。

技术领域

[0005] 本公开涉及碳量子点的形成，更特别地，涉及碳量子点的形成以及其用于诊断分析(例如骨分析)、纤维化的抑制以及药物递送的用途。

背景技术

[0006] 本文提供的背景描述是出于总体上提供本公开的背景的目的。在所述背景技术部分或者本文它处所描述的现在提及的发明人的工作，以及在提交时不能视作现有技术的说明的各方面，既非明确地也非隐含地被承认为针对本公开的现有技术。

[0007] 碳量子点是量子尺寸的碳纳米颗粒，其最近作为优良的纳米颗粒出现，具有取代含有毒性量子点的重金属的潜力。碳量子点潜在的生物应用由于其独特的特性(例如激发波长依赖性的光致发光、优异的生物相容性、低细胞毒性以及光学稳定性)已经受到极大关注。

[0008] 碳量子点可通过“自顶向下”法或“自底向上”法制备，通常通过化学技术、电化学技术或者物理技术实现。“自顶向下”合成路线是指使用激光消融、电弧放电以及电化学技术将诸如石墨、碳纳米管以及纳米钻石这样的较大的碳结构分解为碳量子点。相比而言，“自底向上”合成路线则涉及通过热液/溶热处理、载体合成以及微波合成路线由诸如碳水化合物、柠檬酸盐以及聚合物-二氧化硅纳米复合材料这样的小前体合成碳量子点。

[0009] 碳量子点可容易地穿过细胞膜，因此在生物成像和治疗诊断中具有潜在的应用。但是，对于生物系统中的任何实际应用，碳量子点都会不可避免地与肽和蛋白接触，并且可能会改变其构象。诸如碳纳米管、二氧化铈纳米颗粒、二氧化钛纳米颗粒以及金纳米颗粒这样的已知纳米颗粒已经被发现可以促进蛋白和肽的纤维化，从而引起蛋白/肽结构的改变。

[0010] 另外，碳量子点具有作为治疗剂来治疗中枢神经系统(CNS)中的神经退化性疾病的潜力。但是，由于高选择性的渗透性屏障(血脑屏障(BBB))的存在，在生物系统中将药物递送至CNS仍然是一个主要的医学挑战。

[0011] 将碳量子点与活骨结合对于提供通用的药物递送系统将是有利的。但是，如“官能化的碳量子点使得能够同时进行骨裂检测和药物沉积(Functionalized carbon dots enable simultaneous bone crack detection and drug deposition)”，《材料化学杂志B(J.Mater.Chem.B)》2014,2,8626-8632和“通过改性碳量子点对骨中的钙进行体外检测(In vitro detection of calcium in bone by modified carbon dots)”，《分析师

(Analyst)》2013,138,7107-7111中所述,根据公开的方案制备的碳量子点只有在与谷氨酸(一种钙结合分子)缀合时才会显示骨结合活性,并且仅存在于提取的骨中,从来不存在于活体动物中。另外,为了向碳量子点加载药物,碳量子点的表面可能需要进行改性,并且这种改性可能会影响碳量子点的结合特性。

[0012] 因此,提供可用于生物应用、并且展现出一种或多种优点(例如抑制蛋白和肽的构象改变、透过血脑屏障的能力以及/或者与活体动物中的骨结合的能力)的非毒性碳量子点将是有利的。

发明内容

[0013] 本公开的一个方面提供一种形成碳量子点的方法,所述方法包括:将碳粉与硫酸和硝酸混合以形成碳粉混合物,将碳粉混合物加热至回流,冷却所述回流碳粉混合物,并中和所述冷却的回流碳粉混合物。所述方法进一步包括分离和纯化所述回流碳粉混合物以形成碳量子点溶液,对碳量子点溶液进行透析,并将溶剂从所述溶液除去,从而获得固体碳量子点。

[0014] 本公开的另一个方面提供一种抑制胰岛素纤维化的方法,所述方法包括在溶液中将胰岛素与本公开的碳量子点组合,以形成浓缩溶液,并将所述浓缩溶液引入人类受试者中以治疗人类受试者。

[0015] 本公开的另一个方面提供一种形成血脑屏障渗透液的方法,所述方法包括将本公开的碳量子点与有机化合物靶标共价缀合,以形成血脑屏障渗透液。

[0016] 本公开的另一个方面提供一种将药物递送至骨中的方法,其包括向本公开的碳量子点加载药物,以形成加载有药物的碳量子点,并向受试者给予所述加载有药物的碳量子点。

[0017] 对于本文所述的组合物和方法,任选的特征(包括但不限于组分、其组成范围、条件以及步骤)考虑选自本文所提供的各种方面、实施例以及实例。

[0018] 参照以下详述并结合附图和实例,本公开进一步的方面和优点对于本领域普通技术人员而言将是显而易见的。尽管碳量子点、其制造方法及其应用易受各种形式的实施例的影响,以下描述包括特定的实施例,但应理解,说明内容是说明性的,并非旨在将本发明限制到本文所述的特定实施例。

附图说明

[0019] 为了进一步帮助理解本发明,附上一个附图。

[0020] 图1是一个图像,其显示根据本公开制备的碳量子点对活体动物中的钙化骨具有结合亲和性,而由其它原料制备的碳量子点则对活体动物中的钙化骨不具有结合亲和性。

具体实施方式

[0021] 本公开的一个方面提供一种形成碳量子点的方法,所述方法包括将碳粉与硫酸和硝酸混合以形成碳粉混合物,通过回流加热碳粉混合物以形成回流碳粉混合物,然后冷却所述回流碳粉混合物,中和所述回流碳粉混合物以形成包含溶解的碳量子点的中和碳粉混合物,将溶解的碳量子点从中和碳粉混合物中分离出以形成碳量子点溶液,透析碳量子点

溶液，并将所述溶液的溶剂从碳量子点溶液中分离出，从而获得固体碳量子点。

[0022] 如本文所使用并且除非另外指出，“碳粉”是指粒径大于100nm的碳粉和粒径为100nm或更小的碳纳米粉。

[0023] 在一些实施例中，碳量子点具有小于约10nm、任选约6nm或更小的平均直径。在一些实施例中，硫酸和硝酸以大于约1:1(v/v)、任选约1.1:1至约5:1(v/v)的比例提供。

[0024] 在各实施例中，中和所述回流碳粉混合物包括向混合物中添加碱，以形成中和碳粉混合物，其包含溶解的碳量子点和硫酸盐和/或硝酸盐中的至少一种。任选地，所述碱为碱金属氢氧化物，例如选自由以下组成的群组：氢氧化钠、氢氧化钾、氢氧化锂以及前述物质的组合。在各实施例中，所述碱可以是碱金属氢氧化物的过饱和溶液。在各实施例中，所述碱可以是氢氧化钠的过饱和溶液。

[0025] 在各实施例中，将可溶碳量子点从中和碳粉混合物中分离出包括使硫酸盐和/或硝酸盐中的至少一种结晶，并将盐从中和碳粉混合物中除去。在各实施例中，使盐结晶包括向中和碳粉混合物中添加硫酸钠晶体以启动盐的结晶。在各实施例中，使盐结晶可包括减小中和碳粉混合物的溶剂的体积。任选地，可通过过滤将盐除去。

[0026] 在各实施例中，将可溶碳量子点从中和碳粉混合物中分离出包括将杂质从中和碳粉混合物中除去。任选地，可通过有机溶剂萃取将杂质除去。在各实施例中，可将中和碳粉混合物过滤以除去未反应的碳粉。任选地，可在使硫酸盐和/或硝酸盐中的至少一种结晶之前过滤所述中和碳粉混合物，以除去未反应的碳粉。

[0027] 在各实施例中，在透析之前离心碳量子点溶液。在各实施例中，碳量子点溶液可使用约4L去离子水透析约5天。在各实施例中，溶剂被从碳量子点溶液中分离出，以便通过蒸发(例如浓缩碳量子点溶液并蒸发残留溶剂)获得固体碳量子点。

[0028] 本公开的另一个方面提供一种抑制胰岛素纤维化的方法，所述方法包括在溶液中将胰岛素与根据本公开的方法形成的碳量子点组合，以形成浓缩溶液并将所述浓缩溶液引入人类受试者以治疗所述人类受试者。

[0029] 在各实施例中，浓缩溶液中碳量子点的浓度为2μg/mL或更大。在各实施例中，浓缩溶液中碳量子点的浓度为10μg/mL或更大。

[0030] 本公开的另一个方面提供一种形成血脑屏障渗透液的方法，所述方法包括将根据本公开的方法形成的碳量子点与有机化合物靶标共价缀合，以形成碳量子点-有机化合物靶标缀合物，并将所述缀合物与溶剂混合，以形成血脑屏障渗透液。

[0031] 在各实施例中，有机化合物靶标选自由以下组成的群组：铁传递蛋白、染料标记的铁传递蛋白及其组合。

[0032] 本公开的另一个方面提供一种将药物递送至骨中的方法，其包括向本公开的碳量子点加载药物，以形成加载有药物的碳量子点，并向受试者给予所述加载有药物的碳量子点。

[0033] 在各实施例中，碳量子点不是表面改性的碳量子点。在各实施例中，碳量子点包含表面改性的碳量子点。任选地，表面改性可选自由以下组成的群组：中性生物素、带正电荷的胺基或带负电荷的羧基。

[0034] 如本文所使用并且除非另外指出，“未表面改性的碳量子点”的碳量子点是根据本公开制备的碳量子点，其在分离固体碳量子点粉之后未有意进一步在碳量子点表面改性。

[0035] 如本文所使用的“包含”是指在实施本公开时可结合采用的各种组分、成分或步骤。因此，术语“包含”包括更限制性的术语“基本上由…组成”和“由…组成”。本发明组合物可包含本文公开的任何必需元素和任选元素、基本上由本文公开的任何必需元素和任选元素组成或者由本文公开的任何必需元素和任选元素组成。本文中说明性地公开的本发明可合适地在不存在本文中未明确公开的任何元素或步骤的情况下实施。

[0036] 本文给出的所有范围包括所有可能的子集范围和此类子集范围的任何组合。在默认情况下，各范围包括所述的端点，除非另外指出。在提供值的范围时，应理解所述范围的上限与下限之间的每个中间值以及所述范围内的任何其它所述值或中间值均包括在本公开中。这些更小范围的上限和下限可独立地包括在所述更小的范围内，并且也包括在本公开中，受限于所述范围中具体排除的界限。在所述范围包括任一个或者两个界限时，排除那些被包括的界限的任一个或两者的范围也考虑为本公开的一部分。

[0037] 制备碳量子点的方法

[0038] 本申请包括使用“自顶向下”法形成碳量子点(本文中也称作“C-Dot”)的技术。更特别地，在一些实例中使用碳粉而在其它实例中使用碳纳米粉成功地制备了荧光C-Dot。碳粉的尺寸不受特别的限制，并且可以是，例如，1000nm或更小。碳粉通常不是水溶性的。

[0039] 总之，制备本公开的碳量子点的方法包括以下步骤：

[0040] (a)将碳粉与酸混合，以形成碳粉混合物；

[0041] (b)加热所述碳粉混合物；

[0042] (c)冷却所述碳粉混合物；

[0043] (d)中和包含所形成的碳量子点的碳粉混合物；

[0044] (e)将溶解的碳量子点从中和反应中形成的盐、溶液中存在的任何杂质以及/或者任何残留原料分离；

[0045] (f)对碳量子点溶液进行透析；以及

[0046] (g)将溶剂从碳量子点溶液中分离出，以形成固体碳量子点。

[0047] 以下将详细描述制备碳量子点的步骤(a)至(g)。

[0048] 为了形成本公开的碳量子点，使用酸将碳粉氧化。所述碳粉首先与酸混合，以形成碳粉混合物。制备碳量子点的合适的酸包括强氧化性酸，包括但不限于硫酸和硝酸的混合物，以及铬酸。硫酸和硝酸可以体积比(v/v)为大于约1:1、或大于约2:1、或大于约3:1以及至多约10:1、或至多约5:1、或至多约4:1的比例提供，例如约1.1:1、约1.2:1、约1.5:1、约2:1、约2.5:1、约3:1、约3:5:1或约4:1(v/v)。不希望受到理论的束缚，据信具有1:1(v/v)的比例或更小的硫酸/硝酸混合物的强度不足以使碳粉氧化以在表面产生足够的羧基，以便提供水溶性碳量子点。

[0049] 例如，在硫酸和硝酸(3:1，v/v)的混合物中，碳纳米粉被氧化为直径在1.5nm与6nm之间的量子尺寸。酸的比例是重要的，这是由于1:1的混合物或者单独的硝酸在相同条件下不能合成C-Dot。制备后原样的C-Dot已经是水溶性的和荧光的。还使用同样的步骤由碳粉制备了类似的C-Dot。

[0050] 酸的量可以是适合于润湿碳粉以提供碳粉悬浮液(混合物)的任何量。例如，所述酸可以某一量提供，所选的量应使得碳粉混合物具有约20mg/mL的碳粉浓度，例如在约10mg/mL至约50mg/mL、或约10mg/mL至约40mg/mL、或约10mg/mL至约30mg/mL、或约20mg/mL

至约40mg/mL的范围内。

[0051] 然后通过回流加热碳粉混合物，以形成回流碳纳米粉混合物。可将碳粉混合物加热至(例如)大于约100℃或大于约110℃以及至多约120℃或至多约115℃的温度。加热可保持适合氧化碳粉的任何时间段。可通过回流将碳粉混合物加热至少1小时、至少3小时、至少6小时、至少9小时、至少12小时或至少15小时，以及至多约72小时、至多约60小时、至多约48小时、至多约36小时、至多约24小时、至多约20小时或至多约16小时。

[0052] 加热之后，在中和之前冷却所述回流碳粉混合物。碳粉混合物的冷却不受特别的限制。可将碳粉混合物冷却至环境温度，然后在中和之前可将反应瓶置于冰浴中。中和步骤通常是高放热的，因此，回流之后将碳粉混合物冷却有利于控制随后的中和反应的放热效应。

[0053] 中和所述回流碳粉混合物，以形成包含溶解的碳量子点的中和碳粉混合物。中和碳粉混合物进一步包含硫酸和/或硝酸的盐。用来中和硫酸和硝酸的碱不受特别的限制。合适的碱可包括碱金属氢氧化物，例如氢氧化钠、氢氧化钾、氢氧化锂以及前述物质的组合。所述碱可作为稀释溶液、饱和溶液或过饱和溶液添加。过饱和溶液可能是有利的，这是由于获得固体碳量子点需要从中和溶液除去的溶剂的量更少。

[0054] 溶解的碳量子点被从中和反应中形成的盐、溶液中存在的任何杂质以及/或者任何残留原料分离。中和过程中形成的盐可根据本领域已知的任何方法除去。例如，所述盐可从中和碳粉混合物结晶析出，并将混合物过滤，以便将固体盐与液体上清液分离。为了促进结晶，中和碳粉混合物可通过减小溶剂体积浓缩，然后将浓缩物冷却，以便开始将盐从混合物沉淀。混合物可通过在任何合适的温度(例如在约70℃至约110℃、或约70℃至约100℃、或约75℃至约95℃、或约75℃至约90℃、或约75℃至约85℃的范围内)下加热来浓缩，从而蒸发掉至少一部分溶剂。另外地或者可替代地，混合物可通过在中和碳粉混合物中包括适当的晶种来浓缩。例如，可添加硫酸钠晶体以启动中和盐的结晶。

[0055] 可通过本领域中已知的任何合适方法将杂质从中和碳粉混合物中除去。除去杂质的常规方法包括但不限于离心和萃取。液/液萃取可通过将中和的水性碳粉混合物与有机溶剂混合来进行(例如使用分液漏斗)。本领域普通技术人员应容易地理解，合适的有机溶剂将是与水相不互溶的溶剂。合适的有机溶剂包括但不限于氯仿、二氯甲烷、四氯化碳以及乙酸乙酯。离心可在中和之后的任何阶段进行。在各实施例中，离心在液/液萃取之后但在透析分离的碳量子点溶液之前进行。

[0056] 残留的原料还可在溶解的碳量子点的分离过程中从中和的碳粉中除去。残留的原料可通过本领域已知的任何方法除去。特别地，由于起始碳粉不是水溶性的，但是所形成的碳量子点是水溶性的，因此残留的未反应的碳粉可通过过滤除去。残留的碳粉可在中和碳粉混合物之后的任何阶段除去，例如在结晶析出中和盐之前或之后或者在将杂质萃取出之前或之后除去。

[0057] 包括分离的溶解的碳量子点的碳量子点溶液可在将溶剂从碳量子点分离之前透析，以除去任何残留的硫酸盐和/或硝酸盐、未反应的酸、未反应的碳粉以及作为反应副产物形成的任何杂质。用来透析碳量子点溶液的去离子水的持续时间和体积不受特别的限制。例如，碳量子点溶液可被透析至少1天、至少3天或至少5天和至多10天、至多8天或至多6天。去离子水可在约2小时、约4小时、约6小时、约8小时或约10小时的间隔之后更换。每个透

析间隔提供的水的体积可以是至少约3L、至少约4L、至少约5L或小于约8L、小于约7L或小于约6L。不希望受到理论的束缚，据信水更换的频率越高，并且总的透析时段越长，所得碳量子点就越纯。

[0058] 固体碳量子点可通过将溶剂从碳量子点溶液除去来获得。可根据本领域已知的任何方法将溶剂除去。例如，可将碳量子点溶液浓缩，然后蒸发掉残留溶剂。浓缩碳量子点溶液可通过将所述碳量子点溶液加热至约70℃至约110℃、或约70℃至约100℃、或约75℃至约95℃、或约75℃至约90℃、或约75℃至约85℃的温度来进行。可使用，例如，旋转蒸发仪(rotovap)将残留溶剂减压蒸发掉。

[0059] 固体碳量子点可具有适合预期应用的任何尺寸。例如如下所述，预期用于血脑屏障渗透膜的固体碳量子点必须足够小，以便通过受体介导的内吞作用穿过BBB。碳量子点合适地具有小于10nm的平均粒径，例如8nm或更小、6nm或更小、4nm或更小、或者2nm或更小，例如约1至约8nm、约2至约6nm、或者约4nm。制备后原样的碳量子点具有碳芯，其在表面上具有丰富的表面羧基以及丰富的sp^2碳，并且在羧基上可带有负电荷。因此，碳量子点可在表面被改性，并且/或者与有机化合物缀合，并且/或者通过在羧基处与具有活性官能团(活性官能团的非限制性实例包括胺、醇、羧基以及巯基)的化合物缀合、或通过非共价相互作用(例如吸附、静电相互作用或π-π相互作用)来加载药物。

[0060] 在一个实例中，将含有硫酸(9mL)和硝酸(3mL)的等份在烧瓶中加入250mg碳纳米粉中。在砂浴中通过回流将混合物加热至约110℃持续15小时。在冷却之后，在冰浴中加入过饱和氢氧化钠溶液将溶液中和。将混合物过滤，以除去未反应的碳粉。然后使用冰浴使所形成的盐结晶。所述溶液可以是超饱和的，并且可能需要硫酸钠晶体来启动结晶。再次将内含物过滤，以获得深棕色上清液溶液。再次重复所述步骤，以进一步除去超饱和的盐。将上清液溶液转移至烧杯中，通过在75℃至85℃下蒸发将其体积减小至约25mL，从而将其浓缩。所述溶液在冰浴中冷却以除去盐的晶体，并获得深棕色上清液溶液。加入氯仿(15mL)，将杂质萃取到有机相中。将水相保留，并将萃取步骤重复2次。然后，将所述溶液在3000rpm下离心30分钟以除去任何沉淀。将所述溶液转移至截留分子量(MWCO)3500透析袋，并用4L去离子水将其透析5天；所述去离子水每4至10小时进行更换。然后，所述溶液通过将其加热至75℃至85℃浓缩，直到留下约25mL为止。最后，使用旋转蒸发仪将水蒸发，得到27.4mg黑色的C-Dot粉末。

[0061] 抑制蛋白/肽纤维化的方法

[0062] 本申请进一步提供通过使用碳量子点来抑制生物操作，例如通过使用碳量子点影响肽或蛋白的纤维化来抑制肽或蛋白的纤维化。组织的细胞外间隙中肽或蛋白的纤维化在几种严重的人类疾病(例如阿尔茨海默病、2型糖尿病以及帕金森病)的产生中起重要的作用。这些肽或蛋白纤维通过天然构象的错误折叠具有明确的交叉-β-折叠结构。纤维化通常遵循成核-生长模式，包括在最开始通过低聚反应形成小的核，然后通过形成初原纤维将纤维伸长。中间低聚物和成熟纤维具有细胞毒性，从而引起相关细胞的死亡。因此，与肽或蛋白的纤维化相关的疾病的预防和治疗策略是抑制或延迟纤维化过程。

[0063] 在胰岛素输注和重复注射之后在患有2型糖尿病的一些患者中发现胰岛素纤维。胰岛素是具有最大的产生体积的治疗蛋白之一，但是其纤维化在蛋白的产生、储存以及递送中仍然是一个极具挑战性的问题。

[0064] 蛋白和肽的纤维化可通过将蛋白或肽与本公开的碳量子点混合来抑制。在各实施例中，将碳量子点与蛋白或肽混合包括向需要抑制蛋白或肽的患者给予碳量子点的浓缩溶液。在各实施例中，在向受试者给予碳量子点之前将碳量子点与蛋白或肽混合。任选地，在溶液中将蛋白或肽与碳量子点混合，以形成浓缩溶液。可向受试者给予所述浓缩溶液以治疗所述受试者。

[0065] 浓缩溶液可包括至少2μg/mL、至少4μg/mL、至少6μg/mL、至少8μg/mL或至少10μg/mL以及至多约20μg/mL、至多约18μg/mL、至多约16μg/mL、至多约14μg/mL或至多约12μg/mL的碳量子点浓度。不希望受到理论的束缚，据信本公开的碳量子点以浓度依赖性的方式抑制蛋白和肽的纤维化。因此，碳量子点可以在65℃的温度下孵育的同时以足以将蛋白或肽的纤维化抑制至少5小时、至少8小时、至少12小时、至少1天、至少3天或至少5天以及至多约30天、至多约25天、至多约20天、至多约15天、至多约10天或至多约8天的量提供。不希望受到理论的束缚，据信由于在65℃的温度下进行孵育对于蛋白或肽是不利的，因此预期抑制纤维化的持续时间对于与等量的碳量子点混合但是在不那么苛刻的条件(例如环境条件)下储存的蛋白或肽而言会增加。

[0066] 例如，C-Dot对肽或蛋白的纤维化的作用被检测。在一个实例中，选择人胰岛素作为模型来研究C-Dot对胰岛素纤维化的作用。尺寸小于6nm的水溶性荧光C-Dot由碳粉制备，并通过UV-VIS光谱、荧光、傅里叶变换红外光谱、X射线光电子谱、透射电子显微术以及原子力显微术进行表征。这些C-Dot能够以浓度依赖性的方式有效抑制胰岛素纤维化。C-Dot的抑制作用甚至在0.2μg/mL下也能观察到。重要的是，在65℃下40μg/mL的C-Dot会防止0.2mg/mL的人胰岛素的纤维化5天，而胰岛素在不具有C-Dot的相同条件下则在3小时内变性。细胞毒性研究显示，这些C-Dot具有很低的细胞毒性。因此，这些C-Dot能够在生物系统中抑制胰岛素纤维化，并且可用于制药工业，用来对胰岛素进行加工和配制。关于碳量子点的形成以及其在肽或蛋白的纤维化的抑制中的用途的更多详情在附件A中给出，并且可在以下实例中找到。

[0067] 如各实例中所示，当在成核早期时添加本公开的碳量子点对人胰岛素纤维化具有更大的抑制作用。不希望受到理论的束缚，据信抑制作用很可能是由于在达到临界成核浓度之前碳量子点与胰岛素物质(单体和低聚物)之间的相互作用。一旦达到，碳量子点便不会改变纤维化的动力学。另外，不希望受到理论的束缚，据信碳量子点与人胰岛素物质的相互作用归因于由于碳量子点复杂的表面性质而具有的弱相互作用，例如氢键、疏水性相互作用以及范德华相互作用。这些相互作用可足够强，以将胰岛素物质吸附到碳量子点的表面上，从而在纤维化早期减慢人胰岛素的自身聚集和成核。预期静电相互作用不会贡献很多。由于在pH 1.6下羧基的质子化，碳量子点在其表面上不具有很多的负电荷。

[0068] 公认的是，肽和蛋白可具有相同的产生纤维的分子机制，不管其来源、顺序以及功能如何。进一步由于其它蛋白和肽由具有胰岛素上存在的相同官能团的氨基酸形成，因此预期碳量子点会以与胰岛素相同的方式通过弱相互作用(例如氢键、疏水性相互作用以及范德华相互作用)与其它蛋白和肽相互作用。因此，本公开的碳量子点抑制胰岛素纤维化预期会类似地抑制其它蛋白和肽的纤维化。

[0069] 血脑屏障渗透组合物

[0070] 本公开进一步提供一种在血脑渗透液中通过血脑屏障输送本公开的碳量子点的

方法。由大脑和脊髓组成的中枢神经系统(CNS)负责整合感官信息并相应地进行响应。CNS由复杂且高度调控的血脑屏障(BBB)保护,所述血脑屏障充当生理学检查点,以容许所选分子从血液循环进入CNS。BBB主要由毛细管内皮细胞构成,所述毛细管内皮细胞通过紧密的细胞间连接紧密互相联系。因此,BBB是将治疗分子从血液递送至CNS中的障碍。研究显示,98%以上的靶向CNS疾病的小分子药物以及实际上100%的靶向CNS疾病的大分子药物不容易穿过BBB,因此,目前针对CNS疾病的治疗仍然非常有限。

[0071] 血脑屏障渗透液通常包含与有机化合物靶标共价缀合的本公开的碳量子点。碳量子点-有机化合物靶标缀合物可通过受体介导的内吞作用透过血脑屏障。因此,在实施例中,有机化合物靶标可以是对血脑屏障中存在的受体具有特异性的配体。对血脑屏障的受体具有特异性的配体包括但不限于对铁传递蛋白受体、胰岛素受体、甘露糖6-磷酸受体(类胰岛素生长因子II)、低密度脂蛋白受体相关的蛋白1受体、低密度脂蛋白受体相关的蛋白2受体、瘦素受体、硫胺素受体、谷胱甘肽受体、阿片类受体、p75神经营养蛋白受体、GT1b多唾液酸神经节苷脂、GPI锚定蛋白受体以及白喉类毒素受体(与表皮生长因子类生长因子结合的肝素)具有特异性的配体。有机化合物靶标可选自由以下组成的群组:铁传递蛋白、胰岛素、人黑素瘤抗原p97、低密度脂蛋白、受体相关的蛋白、聚山梨醇酯80-包覆的纳米颗粒、angiopep(例如angiopep 2)、瘦素、硫胺素、谷胱甘肽、合成阿片样肽、狂犬病毒糖蛋白、破伤风毒素、10-11易位甲基胞嘧啶加双氧酶1(TET1)、G23肽、TAT肽以及白喉类毒素的非毒性突变体(CRM197)。还可将有机化合物靶标标记,以增强受试者体内碳量子点-有机化合物缀合物的成像。作为成像应用的对照介质用于药物的任何化合物都是合适的成像标记。成像标记的非限制性实例可以是荧光染料(例如荧光素、CF™染料系列以及AlexaFluor®染料系列)或者放射造影剂(例如碘、钡、钆)。

[0072] 将有机化合物靶标与碳量子点缀合的方法在本领域中是公知的。将有机化合物靶标与碳量子点共价连接的任何方法都是合适的。例如,可使用典型的碳化二亚胺化学(例如EDC/NHS,使用1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳化二亚胺)(EDC)和N-羟基丁二酰亚胺(NHS)或磺酰基-(NHS)将含有氨基或含有醇的有机化合物与碳量子点缀合。

[0073] 在另一个实例中,本发明技术显示碳量子点(“C-Dot”)的形成以及其在穿过血脑屏障中的用途,特别是与铁传递蛋白缀合的碳量子点的形成以及其在穿过血脑屏障中的用途。申请人已经确定,为了利用C-Dot对蛋白(或肽)纤维化的抑制作用,C-Dot首先应该通过穿过BBB递送到CNS中。尽管C-Dot对一些CNS相关的疾病已经显示出药物递送和治疗的潜力,但是为了进行有效的药物递送和治疗,期望通过穿过血脑屏障(BBB)将C-Dot递送至CNS中,所述血脑屏障会阻碍治疗剂达到CNS中的病理组织。在本发明的工作之前,常规技术无法证实C-Dot或C-Dot缀合物可以穿过BBB进入CNS。使用本发明技术,C-Dot与铁传递蛋白和染料标记的铁传递蛋白共价缀合,并显示会通过铁传递蛋白受体介导的递送穿过BBB。试验使用斑马鱼模型进行,并表明与铁传递蛋白缀合的C-Dot能够通过穿过BBB进入CNS,而单独的C-Dot则不能。斑马鱼、小鼠以及人类中的BBB非常相似,因此预期斑马鱼中的发现可应用于小鼠和人类。

[0074] 骨结合组合物

[0075] 使用荧光显微镜检术进行体内骨成像的材料非常稀少。通过荧光显微镜检术进行体内成像需要荧光基团具有骨特异性,不与其它细胞或器官非特异性结合,或者有限地与

其它细胞或器官的非特异性结合，探针必须能够将大部分软骨与大部分钙化骨区分，荧光基团在目标部位的发射必须足够强以产生信号，所述荧光基团需要是生物相容的并且没有细胞毒性或具有最小的细胞毒性，并且为了在给予后递送时间更短但是染色时间更久目标各荧光基团需要同时被优化。

[0076] 有利地发现本公开的碳量子点会以高亲和性和特异性与活体动物中的钙化骨结合。结合导致发光的强烈增强，其在其它组织中未观察到，包括非钙化的软骨内元素。因此，本公开的碳量子点可用于诊断和/或治疗目的。

[0077] 碳量子点的治疗用途不受特别的限制。总之，本公开的碳量子点可用于将药物递送至骨中的方法，所述方法包括向本公开的碳量子点加载药物以形成加载有药物的碳量子点，并向受试者给予所述加载有药物的碳量子点。

[0078] 加载到纳米颗粒上的药物不受特别的限制。任何可与碳量子点缀合的药物均可被递送至钙化骨中。所述药物可以是用来治疗骨矿化疾病(例如骨质疏松症或异位骨化)的药物。所述药物可以是用来治疗骨源性能量新陈代谢疾病的药物。由于骨骼以及大脑、胰脏、肠道和肝脏是调节能量代谢(从而调节生长和肥胖)的内分泌循环的一部分，因此本公开的碳量子点可用来递送药物，以便通过特异性地靶向内分泌系统的骨组分来治疗能量代谢缺陷和疾病。所述药物还可以是用来治疗骨癌和血癌以及转移至骨的肿瘤的药物。骨癌可在任何类型的骨组织中产生(例如骨肉瘤和尤因氏肉瘤骨样组织、软骨组织中的内生软骨肉瘤)，血癌可在骨髓中产生(例如多发性骨髓瘤)，并且骨是转移癌的常见部位(例如转移乳腺癌)。根据本公开制备的碳量子点可用来将化疗剂和其它药物递送至骨中，以便治疗癌症和其它疾病。所述药物还可以是抗生素，例如，但不限于，青霉素及其衍生物以及环丙沙星及其衍生物。免疫系统已经被疾病或病痛(例如糖尿病、关节炎、AIDS等)削弱或者骨已经暴露于环境(例如开放性骨折或置换手术(例如臀部、膝盖等))的个体中的骨可被细菌(例如金黄色葡萄球菌)感染。碳量子点可用来特异性地治疗骨中的感染。

[0079] 不希望受到理论的束缚，据信丰富的表面羧基会提供对骨的高亲和性和特异性。另外，不希望受到理论的束缚，据信甚至在碳量子点与药物缀合之后仍然会保留足够量的羧基，其容许改性的碳量子点与骨结合。表面未改性的本公开的碳量子点，以及已经与胺、谷氨酸以及生物素缀合的本公开的碳量子点，全部与活体动物中的骨结合，并且特异性地与骨结合而不与诸如非钙化骨基质(细胞外基质)这样的其它组织结合。其它碳量子点表面改性是可能的(例如巯基)，并且改性的碳量子点的类似结合预期会如胺、谷氨酸以及生物素所示发生。

[0080] 药物可与碳量子点官能结合，这是由于碳量子点的可调节表面官能团，以及药物上存在的任何活性官能团。如羧基和胺基所示，碳量子点的表面可在不损失亲和性或特异性的情况下改性。另外，如果药物具有与未改性的碳量子点的表面的官能团化学不相容的官能团，那么碳量子点可由与药物的官能团相容的不同表面基团改性。此外，可通过非共价相互作用将药物加载到本公开的碳量子点上。

[0081] 将药物与碳量子点缀合的方法在本领域中是公知的。例如，可使用典型的EDC/NHS偶合化学。

[0082] 本公开的碳量子点的诊断用途不受特别的限制。本公开的碳量子点可用作骨折和微骨折的显像剂。碳量子点固有的荧光特性允许观察钙化骨。碳量子点还可用作将成像造

影剂递送至骨的载体。碳量子点独特的骨亲和性允许递送造影剂，其可用来针对任何已知检测方法(例如X射线、计算机体层照相术、MRI等)观察骨结构。

[0083] 碳量子点可不具有表面改性。在各实施例中，碳量子点包含表面改性的碳量子点。合适的表面改性可选自由以下组成的群组：中性生物素、带正电荷的胺基或带负电荷的羧基。表面改性可用来促进药物在碳量子点上的加载。

[0084] 令人惊讶地发现，与活体动物中的骨结合不是碳量子点的一般特性。使用斑马鱼模型有利地发现，本公开的方法制备的碳量子点能够与钙化骨结合(图1A(碳粉))，进一步被中性生物素、带正电荷的氨基以及带负电荷的羧基表面改性的本公开的方法制备的碳量子点也是如此(图1B)。发现根据本公开的方法制备和表面改性的碳量子点对于钙化骨具有与未改性的碳量子点相同的亲和性。另外，本公开的碳量子点和改性碳量子点特异性地与钙化骨结合，而不与诸如非钙化骨基质(细胞外基质)这样的其它组织结合。相比而言，根据已知方法制备的碳量子点，即由甘油或柠檬酸制备的碳量子点，如图1A(甘油和柠檬酸)所示不能与钙化骨结合，即使表面被谷氨酸改性而增加与钙结合的羧基的量(图1A柠檬酸+谷氨酸)。而是，在肠道和解毒器官(肝脏、前肾(未充分发展的肾脏))中可观察到根据已知方法制备的碳量子点的荧光。不希望受到理论的束缚，据信本公开的碳量子点对钙化骨的特异性和亲和性归因于碳量子点的纯度与丰富的表面羧基和醇基团的组合。本公开的碳量子点具有纯的碳芯，其表面(通常带负电荷)具有丰富的羧基和醇基。相比而言，取决于制备方法，根据已知方法制备的碳量子点具有纯度更低的碳芯(通过聚合和碳化形成)，表面具有其它不同的官能团。例如，由甘油或柠檬酸形成的碳量子点包括带负电荷的羧基以及带正电荷的胺基。

[0085] 碳量子点可通过本领域已知的任何合适方法给予至骨中。给药的非限制性实例包括注射到血液中、腹腔内注射以及通过将伤口直接暴露于碳量子点进行局部递送。当注射到血流中时，碳量子点在生物体中循环，然后依附于骨。循环的碳量子点随着其依附于骨而从血液清除。当直接注射到体腔中时，碳量子点通过循环系统从腹膜分布到骨。腹腔内注射将适合在人类中进行化疗。当碳量子点被局部递送时，碳量子点会与直接暴露的伤骨结合。

[0086] 本公开的碳量子点在斑马鱼中的保留非常稳定、持久，不具有可检测到的毒性，并且独立于给药方法。

[0087] 可根据以下实例更好地理解根据本公开的碳量子点和方法，以下实例仅仅是说明性的，并非意在以任何方式限制其范围。

[0088] 实例

[0089] 实例1:碳量子点的制备

[0090] 本公开的碳量子点如下制备。硫酸(9mL)和硝酸(3mL)以等份在烧瓶中添加至250mg碳纳米粉或碳粉，以形成碳粉混合物。在砂浴中在约110℃下将所述混合物回流15小时。然后冷却所述回流碳粉混合物。当烧瓶在冰浴中时，添加过饱和氢氧化钠溶液，以便中和所述冷却的回流碳粉混合物。将所述混合物过滤以除去未反应的碳粉。然后将通过中和反应形成的盐如下除去。向混合物中添加硫酸钠晶种，将混合物在冰浴中冷却以促进盐的沉淀/结晶。过滤内含物，以除去所形成的固体盐，并获得包括溶解的碳量子点的深棕色上清液溶液。根据需要重复沉淀/结晶/过滤，以除去所有的盐。将包括溶解的碳量子点的上清液溶液转移至烧杯，通过在75℃至85℃下在大气压力下蒸发将其体积减小至约25mL。使用

液/液萃取从溶解的碳量子点溶液萃取杂质。特别地，添加氯仿(15mL)将杂质萃取到有机相中。收集水相并重复萃取步骤。然后在3000rpm下将溶液离心30分钟，以除去任何沉淀。将所述溶液转移至截留分子量(MWCO)3500透析袋并使用4L去离子水透析5天；去离子水每4至10小时进行更换。所得溶液通过将其加热至75℃至85℃进行浓缩，直到留下约25mL。最后，使用旋转蒸发仪(或等价物)将剩余的水蒸发，得到27.4mg水溶性碳量子点固体黑色粉末。

[0091] 所制备的碳量子点在1cm细胞中使用岛津(Shimadzu)UV-2600光谱仪或等价物通过紫外-可见光谱(US-Vis)进行表征。使用碳量子点固体粉在珀金埃尔默前沿(Perkin Elmer Frontier)或等价物上记录傅里叶变换红外(FTIR)光谱。通过墟场拉曼光谱仪荧光分光光度计3(Horiba Jobin Yvon Fluorolog-3)或等价物(对于激发和发射均使用5nm的狭缝宽度)在水溶液中测量碳量子点的荧光发射光谱。X射线光电子光谱法(XPS)使用珀金埃尔默(Perkin-Elmer)PHI 560ESCA系统或等价物进行，双通道筒镜分析器使用Mg Kα阳极和hυ＝1253.6eV的光子能量在225W和12.5KV下运行。对碳1s轨道和氧1s轨道的核心水平进行扫描，并根据其各自的原子灵敏度因子将各强度归一化。碳量子点的显微图像使用敲击模式和日本电子光学实验室(JEOL)1200X TEM在美国安捷伦(Agilent)5420原子力显微镜或等价物上获得。

[0092] 在200至400nm的范围内发现宽的强UV-Vis吸收峰。碳量子点显示出依赖于激发波长的发射。当在540nm激发时碳量子点的最大发射大约为580nm。当在360nm激发时发射峰迁移至约500nm。FTIR分析显示位于约3380(OH)、1715(C＝O)、1582(C＝C)、1236(C-O-C)以及1085cm^{-1}(C-O)的峰。这些键通过XPS进一步确定，其在碳量子点表面上显示54.6％的碳、43.8％的氧以及其它痕量元素。位于289.7eV的XPS峰被归于羧酸基团，其包含23％的氧信号。285.9eV的峰被归于C-C/C＝C键，532.7eV的峰被归于水的羟基氧，534.0eV的峰被归于羰基氧。TEM图像显示球形碳量子点，其直径分布在1.5与6nm之间，平均为4nm。

[0093] 因此，实例1显示根据本公开的碳量子点的制备和表征。

[0094] 对比例2:碳量子点的尝试制备

[0095] 碳量子点如实例1所述制备，除了在第一次制备中使用1:1(v/v)的硫酸/硝酸混合物替代3:1(v/v)的混合物，在第二次制备中仅使用硝酸。在使用1:1的硫酸/硝酸混合物的制备中或者仅使用硝酸的制备中均未形成碳量子点。因此，对比例2证明在硫酸与硝酸的比例为1:1(v/v)或更小时不会获得本公开的碳量子点。

[0096] 实例3:碳量子点对胰岛素纤维化的作用

[0097] 使用0.1M的氯化钠(NaCl)在盐酸水溶液(pH 1.6)中制备了1mg/mL的人胰岛素(约5.8kDa的分子量)原液。所述溶液通过0.2μm空隙尺寸的过滤器过滤。将根据实例1制备的碳量子点以1mg/mL的浓度溶于水中。在pH 1.6下使用0.1M的NaCl溶液将胰岛素原液与碳量子点溶液混合以制备几个样品，其具有0.2mg/mL的胰岛素浓度，以及0、0.2、2或10μg/mL的碳量子点中的一者。将所述样品在65℃下孵育。每30分钟取等份的样品，使用硫代黄素T(ThT，40μM，pH 1.6，0.1M NaCl)稀释至蛋白为0.1mg/mL，ThT为20μM。在Fluorolog-3荧光分光光度计或等价物上在440nm的激发下在1cm的石英杯中(激发和发射狭缝宽度均为5nm)记录ThT荧光。使用JASCOJ-810分光偏振计或等价物使用圆二色(CD)光谱来表征人胰岛素的构象改变。所述光谱使用在不同孵育时间从人胰岛素或胰岛素/碳量子点混合物溶液抽取的稀释的等份(稀释至胰岛素为0.1mg/mL)来测量。

[0098] ThT是纤维特异性的染料。因此，胰岛素纤维化可通过ThT荧光表征，其中荧光增加表示纤维形成的增加。观察到3个阶段的胰岛素纤维化，分别为停滞阶段、延伸阶段以及饱和阶段。停滞阶段是未观察到荧光(即所形成的Tht-纤维(如果存在的话)的量低于检测极限)的时段。延伸阶段是在发生纤维化时观察到荧光增加的时段。饱和阶段是在所形成的Tht-纤维的量将荧光信号饱和时所检测的荧光的量达到稳定的时段。

[0099] 在不存在碳量子点的情况下，0.2mg/mL的胰岛素经历约2.5小时的停滞阶段，接着是1小时的延伸，并在4小时的孵育后达到饱和。当0.2μg/mL的碳量子点与人胰岛素一起存在时，人胰岛素的停滞阶段时间增加至3.5小时，比不存在碳量子点的胰岛素样品长约1小时。当碳量子点的浓度增加至2μg/mL和10μg/mL时，人胰岛素的停滞阶段分别显著增加至5.5小时和12小时。CD结果与所观察到的荧光一致。单独的人胰岛素在时间0主要显示α-螺旋构象，在5小时的孵育之后显示成熟胰岛素纤维的β-折叠构象，在时间0与时间5之间显示构象变化(例如峰的收缩表示α-螺旋构象，峰的增加表示β-折叠构象)。使用2μg/mL和10μg/mL的碳量子点孵育的胰岛素观察到停滞时间(即观察到α-螺旋构象的时间)的显著增加。

[0100] 因此，实例3证明碳量子点会抑制人胰岛素纤维化，并且人胰岛素纤维化的抑制依赖于碳量子点的浓度。实例3的结果进一步表明，本公开的碳量子点可稳定人胰岛素的构象，并且可解决制药工业中在胰岛素的储存、递送以及给药过程中与构象变化相关的问题。

[0101] 实例4:在停滞阶段对胰岛素纤维化的抑制

[0102] 胰岛素原液如实例3制备。使用胰岛素原液制备了几个胰岛素浓度为0.2mg/mL的样品。为了确定10μg/mL的碳量子点(根据实例1制备)在停滞阶段对胰岛素纤维化的抑制作用，在胰岛素样品在65℃下分别孵育0小时、1小时以及2小时之后添加碳量子点。取等份的样品并在与实例3所述相同的条件下通过ThT荧光进行检查。

[0103] 在不存在碳量子点的情况下，人胰岛素的延迟时间为约2.5小时。当在时间0添加10μg/mL的碳量子点时，延迟时间增加至约12小时。当在1小时和2小时的孵育之后将相同量的碳量子点添加至胰岛素时，延迟时间分别仅增加至5.5小时和3.5小时。

[0104] 因此实例4显示，当在成核的最早阶段添加时，本公开的碳量子点对人胰岛素纤维化具有更大的抑制作用。不希望受到理论的束缚，据信抑制作用很可能是由于在达到临界成核浓度之前碳量子点与胰岛素物质(单体和低聚物)之间的相互作用。一旦达到，碳量子点便不会改变纤维化的动力学。不希望受到理论的束缚，碳量子点与人胰岛素物质的相互作用被归因于由于碳量子点复杂的表面性质而产生的弱相互作用，例如氢键、疏水性相互作用以及范德华相互作用。这些相互作用可足够强，以将胰岛素物质吸附到碳量子点的表面上，从而在纤维化早期减慢人胰岛素的自身聚集和成核。预期静电相互作用不会贡献很多。由于在pH 1.6下羧基的质子化，碳量子点在其表面上不具有很多的负电荷。

[0105] 实例5:血脑屏障的渗透性

[0106] 使用斑马鱼模型来测试血脑屏障对于碳量子点-人类铁传递蛋白缀合物的渗透性。斑马鱼是较复杂的脊椎动物物种，其与人类具有高度的生理同源性和基因同源性。与人类类似，斑马鱼也具有所有的主要神经递质、激素以及受体，包括铁传递蛋白。斑马鱼与人类之间脊髓发育和功能的解剖学和生理学维持已经被展示和证明。因此，斑马鱼模型使得能够体内测试和开发新型治疗剂。斑马鱼模型的另一个优点是身体的透明性，从而允许以下使用无创成像技术的药物治疗。具有成熟BBB的6d.p.f.的幼体斑马鱼被选作体内模型。

[0107] 根据实例1制备的碳量子点与铁传递蛋白、染料标记的铁传递蛋白或荧光素(5-(氨基甲基)荧光素)之中的一种缀合。用来标记铁传递蛋白的染料为CF™594染料(Biotium,加利福尼亚州海沃德(Hayward,CA))。使用由通用电气医疗集团(GE Healthcare)Sephacryl S-300(瑞典乌普萨拉(Uppsala,Sweden))或等价物装填的尺寸排除色谱柱通过排阻色谱将缀合物纯化。使用UV-Vis吸收来确认铁传递蛋白和染料-铁传递蛋白与碳量子点的缀合。铁传递蛋白-碳量子点在约260nm处具有吸收,染料-铁传递蛋白-碳量子点在约594nm处具有吸收。使用圆二色极谱仪来确认缀合是否导致铁传递蛋白或染料-铁传递蛋白的构象变化。在天然铁传递蛋白、染料-铁传递蛋白、铁传递蛋白-碳量子点以及染料-铁传递蛋白-碳量子点中未观察到可察觉的差别,表明铁传递蛋白和染料-铁传递蛋白在与碳量子点缀合之后仍然保持天然构象。

[0108] 选择了铁传递蛋白来与碳量子点共价缀合,以允许碳量子点通过铁传递蛋白受体介导的内吞作用穿过血脑屏障。据信铁传递蛋白受体在BBB上被过度表达,铁传递蛋白受体在幼体斑马鱼中的BBB上的表达在6天龄时是活跃的。在碳量子点的荧光强度太弱以至于在CNS中看不到的情况下使用与荧光素缀合的碳量子点来增加碳量子点的荧光信号。

[0109] 碳量子点或缀合物被血管内注射到斑马鱼的心脏。使用共焦荧光图像来检测碳量子点或缀合物是否穿过血脑屏障并进入CNS。未进行注射的对照斑马鱼的图像显示CNS区并非内在发荧光的。

[0110] 未改性的碳量子点未显示与对照斑马鱼显示的荧光的明显差别(或缺乏荧光)。与荧光素缀合的碳量子点在身体中显示出明亮的荧光,但是在CNS中则未观察到荧光。在与仅注射碳量子点相同的条件下注射铁传递蛋白-碳量子点,并且相对于碳量子点未观察到荧光差别。按照相同的步骤将染料-铁传递蛋白(经荧光染料标记的铁传递蛋白)碳量子点缀合物注射到斑马鱼的心脏。在CNS中以及周围的神经元胞体簇中观察到荧光。

[0111] 因此,实例5显示染料-铁传递蛋白碳量子点缀合系统能够透过血脑屏障并成功地进入CNS。据信铁传递蛋白-碳量子点缀合物也能够透过BBB并进入CNS;但是,碳量子点固有的荧光太弱以至于观察不到。

[0112] 实例6:碳量子点的骨结合

[0113] 碳量子点根据实例1制备(表示为C-Dot)。一些碳量子点的表面进一步使用中性生物素之一改性(表示为碳粉-生物素),使用乙二胺改性以提供带正电荷的胺基(表示为碳粉-胺),或者使用谷氨酸改性以提供带负电荷的羧基(表示为碳粉-谷氨酸)。改性使用典型的EDC/NHS偶合反应进行。特别地,碳量子点的表面羧基连续通过EDC和NHS活化,然后活化的碳量子点与乙二胺和谷氨酸上的氨基基团缀合。这种方法在本领域中是公知的。

[0114] 碳量子点还如“官能化的碳量子点使得能够同时进行骨裂检测和药物沉积(Functionalized carbon dots enable simultaneous bone crack detection and drug deposition)”,《材料化学杂志B(J.Mater.Chem.B)》2014,2,8626-8632和“通过改性碳量子点对骨中的钙进行体外检测(In vitro detection of calcium in bone by modified carbon dots)”,《分析师(Analyst)》2013,138,7107-7111中所述根据公知的方法由甘油和柠檬酸制备(分别表示为甘油和柠檬酸)。使用谷氨酸将柠檬酸碳量子点的样品表面改性(表示为柠檬酸+谷氨酸)。

[0115] 碳量子点被引入活体动物的钙化骨中。含有中性磷酸盐缓冲液盐水中的5μg/μL碳

量子点的5纳升溶液被注射到6天龄的斑马鱼幼体的腹腔中。注射之后将胚胎在荧光显微镜下观察30分钟。碳量子点的检测使用碳量子点固有的荧光特性进行。在复合显微镜中以100X的放大倍数在明场透射光和荧光灯(488纳米)下摄取图像。

[0116] 如图1所示，本公开的方法制备的所有碳量子点(碳粉、碳粉-生物素、碳粉-胺、以及碳粉-谷氨酸)均显示出骨结合，因此证明对钙化骨的亲和性。特别地，各图像在颅骨、鳃盖骨以及匙骨中的脊椎中(平行垂直线)的钙化骨结构中以及颅骨、鳃盖骨以及匙骨中的脊椎之前的钙化骨结构中显示荧光。另外，根据本领域中的已知方法(甘油、柠檬酸、或者柠檬酸-谷氨酸)制备的碳量子点均未显示骨结合。特别地，各图像仅在解毒器官(肝脏、肠道、前肾)中显示荧光。碳量子点与骨的结合通过将碳量子点图像的荧光模式与由已知可排他性地与钙化骨结合的染料(例如茜素红)制备的图像对比来确定。进一步发现，碳量子点不与其中不含钙的组织结合。因此，实例6显示本公开的方法制备的碳量子点对通过其它方法制备的碳量子点未显示特异性亲和性的钙化骨具有特异性亲和性。

[0117] 实例7:碳量子点的细胞毒性

[0118] 从具有成熟生殖腺的成年海胆收集配子。新鲜的卵用冷的过滤后的人造海水洗涤3次，并与精子混合以检查受精率。只有受精率大于95％的卵被用于毒性测试。2mL海水中的100个健康受精卵被沉积到新的清洁的24-孔细胞培养板的每个孔中。将根据实例1制备的浓度为0、5、10、20、50或100μg/mL的碳量子点添加到各孔中。受精卵和碳量子点的板在15℃下孵育16小时，直到它们变为间质囊胚期胚胎。然后采用使用3个单独的雄性-雌性对的3个生物重复。在16小时的孵育之后通过分析胚胎形态确定碳量子点的毒性。

[0119] 海胆胚胎对有毒化学品极其敏感。各结果显示，碳量子点对受精的海胆卵和胚胎具有低细胞毒性。在10μg/mL的碳量子点的存在下，在16小时之后95％以上的海胆胚胎仍保持正常形态。甚至在高碳量子点浓度下(即50μg/mL的碳量子点)，90％以上的胚胎仍保持正常，表明碳量子点对细胞的低细胞毒性。碳量子点在海水中是稳定的，在50μg/mL的浓度下不会形成沉淀，并且在100μg/mL的浓度下，在16小时的孵育之后通过肉眼未观察到沉淀，但是通过光学显微镜可以看到。

[0120] 因此，实例7显示根据本公开的碳量子点在海水中显示出低细胞毒性和高稳定性。

[0121] 提供以上说明仅仅是为了清楚理解的目的，并不应该由此理解为是必要的限制，这是由于在本发明范围内的修改对于本领域普通技术人员而言可以是显而易见的。

[0122] 尽管已经参考特定的实施例描述了各方法，但是本领域普通技术人员应容易地理解，可使用进行与所述方法相关的操作的其它方式。例如，各种步骤的顺序可在不偏离所述方法的范围和精神的情况下进行改变，除非另有说明。另外，一些单独的步骤可以组合、省略或进一步再细分成附加的步骤。

[0123] 本文提及的所有专利、出版物以及参考文献通过引用全部并入本文。在本公开与并入的专利、出版物以及参考文献相冲突的情况下，以本公开为准。

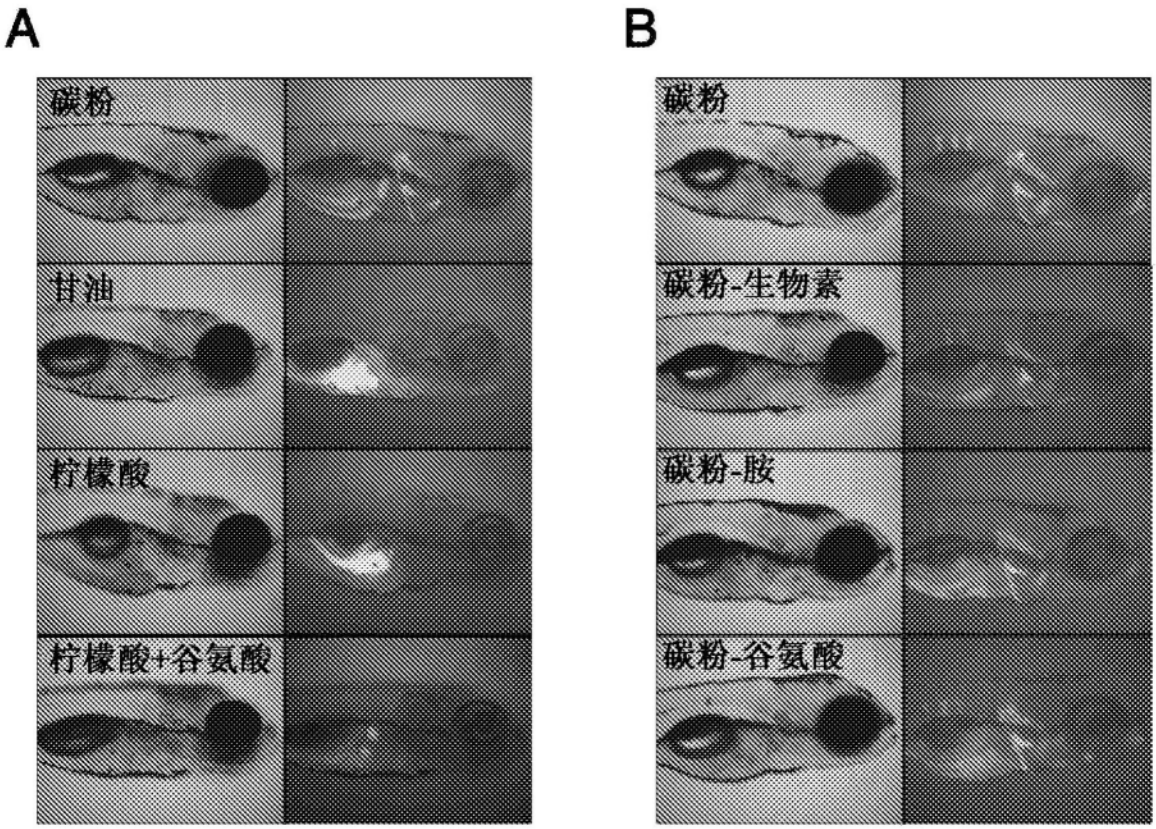


图1