

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2019-529341

(P2019-529341A)

(43) 公表日 令和1年10月17日 (2019. 10. 17)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C07K 17/00 (2006.01)	C O 7 K 17/00	4 B O 6 3
C07K 16/18 (2006.01)	C O 7 K 16/18	4 H O 4 5
C12Q 1/6804 (2018.01)	C 1 2 Q 1/6804	Z
G01N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53	M

審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 24 頁)

(21) 出願番号	特願2018-568968 (P2018-568968)	(71) 出願人	509295262
(86) (22) 出願日	平成29年7月4日 (2017. 7. 4)		ナノコ テクノロジーズ リミテッド
(85) 翻訳文提出日	平成31年2月27日 (2019. 2. 27)		イギリス国 エム13 9エヌティーマン
(86) 国際出願番号	PCT/GB2017/051968		ンチェスター、グラフトン ストリート
(87) 国際公開番号	W02018/007800		4 6
(87) 国際公開日	平成30年1月11日 (2018. 1. 11)	(74) 代理人	110001438
(31) 優先権主張番号	62/358, 326		特許業務法人 丸山国際特許事務所
(32) 優先日	平成28年7月5日 (2016. 7. 5)	(72) 発明者	ナーサニ, イマド
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)		イギリス国 エム20 2ユーエル マン
(31) 優先権主張番号	15/637, 890		チェスター, マージー ロード, ラーク
(32) 優先日	平成29年6月29日 (2017. 6. 29)		ライズ 3, フラット 10
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)	F ターム (参考)	4B063 QA01 QA07 QA11 QQ02 QQ42
			QR48 QR66 QR82 QS02 QS24
			QS33 QX01

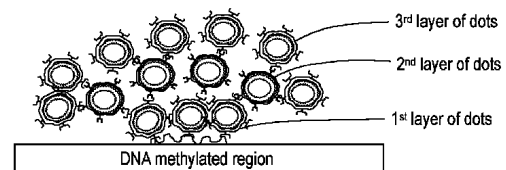
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 リガンドコンジュゲート量子ドットナノ粒子及びこれを用いてDNAメチル化を検出する方法

(57) 【要約】

本開示は、コンジュゲート量子ドットナノ粒子に、そのようなコンジュゲート量子ドットナノ粒子を製造する方法に、そしてそのようなコンジュゲート量子ドットナノ粒子を用いてDNAメチル化を検出する方法に関する。一実施形態において、量子ドットは、メチル化されたDNA塩基、例えば、抗5 - メチルシトシン抗体、抗5 - ヒドロキシメチルシトシン抗体、抗5 - ホルミルシトシン抗体、抗5 - カルボキシルシトシン抗体、又は抗N 6 - メチルアデニン抗体を認識する抗体に結合される。

【選択図】 図 1

**Fig. 1**

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

ナノ粒子が DNA メチル化特異的結合リガンドに連結されている、ナノ粒子コンジュゲート。

【請求項 2】

ナノ粒子は、DNA メチル化特異的結合リガンドに、アミド結合を介して共有結合的に連結されている、請求項 1 に記載のナノ粒子コンジュゲート。

【請求項 3】

ナノ粒子が、コア半導体材料及び外層を含む量子ドットであり、
外層は、メチル化特異的結合リガンドに連結されている官能化有機コーティングを含む、ナノ粒子コンジュゲート。

10

【請求項 4】

メチル化特異的結合リガンドは、5 - メチルシトシン及び / 又は 5 - ヒドロキシメチルシトシンに特異的に結合する、請求項 3 に記載のリガンドナノ粒子コンジュゲート。

【請求項 5】

メチル化特異的結合リガンドは、抗 5 - メチルシトシン抗体、抗 5 - ヒドロキシメチルシトシン抗体、抗 5 - ホルミルシトシン抗体、抗 5 - カルボキシルシトシン抗体、抗 N 6 - メチルアデニン抗体、及びそれらの任意の組合せから選択される、請求項 4 に記載のリガンドナノ粒子コンジュゲート。

【請求項 6】

メチル化特異的結合リガンドは、抗 5 - メチルシトシン抗体である、請求項 5 に記載のリガンドナノ粒子コンジュゲート。

20

【請求項 7】

ナノ粒子は、II - VI 族材料、III - V 族材料、若しくは I - III - IV 族材料、又はそれらの任意の合金を含む、請求項 6 に記載のリガンドナノ粒子コンジュゲート。

【請求項 8】

細胞吸収促進剤、組織浸透促進剤、又はそれらの組合せを更に含む、請求項 7 に記載のリガンドナノ粒子コンジュゲート。

【請求項 9】

リガンドナノ粒子コンジュゲートを調製するプロセスであって、ナノ粒子を、DNA メチル化特異的結合リガンドに結合させる工程を含み、ナノ粒子は、コア半導体材料及び外層を含む量子ドットを含み、外層は、カルボキシル基を含む、プロセス。

30

【請求項 10】

DNA メチル化特異的結合リガンドナノ粒子コンジュゲートを精製する工程を更に含む、請求項 9 に記載のプロセス。

【請求項 11】

DNA メチル化特異的結合リガンドナノ粒子コンジュゲートを単離する工程を更に含む、請求項 10 に記載のプロセス。

【請求項 12】

カップリング工程が、カップリング剤の存在下で行われる、請求項 11 に記載のプロセス。

40

【請求項 13】

カップリング剤は、1 - (3 - ジメチルアミノプロピル) - 3 - エチルカルボジイミド塩酸塩である、請求項 12 に記載のプロセス。

【請求項 14】

DNA メチル化を検出する方法であって、
i) 請求項 1 に記載のリガンド - ナノ粒子コンジュゲートを、メチル化 DNA 領域と接触させる工程と、
ii) リガンド - ナノ粒子コンジュゲートを光源によって励起させる工程と、
iii) リガンド - ナノ粒子コンジュゲートによる光放射又は光吸収を検出する工程と

50

、
を含む方法。

【請求項 15】

サンプルは、固定された組織サンプル、又は細胞培養において培養された生細胞中のサンプルである、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 16】

検出は、リアルタイムに実行される、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 17】

検出シグナルが増幅される、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 18】

請求項 1 に記載のリガンドナノ粒子コンジュゲートの、DNA サンプルのメチル化された領域を検出するための免疫アッセイにおける試薬としての使用。

【請求項 19】

サンプルは、固定された組織サンプル、又は細胞培養において培養された生細胞中のサンプルである、請求項 18 に記載の使用。

【請求項 20】

検出は、リアルタイムに実行される、請求項 18 に記載の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本明細書で開示される実施形態は、リガンドにコンジュゲートされた (conjugated) 量子ドットナノ粒子に、特に、メチル化特異的結合リガンドにコンジュゲートされた量子ドットナノ粒子に関する。実施形態はまた、そのようなコンジュゲート量子ドットナノ粒子 (conjugated quantum dot nanoparticle) を製造する方法と、そのようなコンジュゲート量子ドットナノ粒子を用いて DNA メチル化を検出する方法とを含む。

【背景技術】

【0002】

DNA メチル化は、遺伝子発現を制御するために細胞によって用いられるエピジェネティックプロセスであり、通常の生物学及び疾患生物学の双方において重要な機能を有する。DNA メチル化が、例えば、加齢及び疾患によって変化すると、不規則なメチル化が生じ得、哺乳類において多くの複合病、例えば心臓病、糖尿病、神経障害、及び癌をもたらす虞がある。例えば、Okhov - Mitsel et al, Cancer Medicine, 237 - 260, 2012 総説参照。例えば、DNA メチル化は、癌抑制遺伝子をサイレンシングさせることによって、発癌に寄与する。例えば、Jones et al, Nat. Rev. Genet., 3, 415 - 428, 2002 参照。

【0003】

DNA メチル化を検出する現在の方法は、時間を浪費するものであり、複数の時間浪費工程 (ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 及び配列決定法の実行工程が挙げられる) を必要とする。例えば、Okhov - Mitsel et al, Cancer Medicine, 237 - 260, 2012 総説参照。更に、特異的抗メチル化 DNA 抗体の利用可能性は、通例の蛍光色素から生じるシグナルが弱いこと、そしてシグナル増幅方法を欠くことに起因して、検出プロセスを簡単化できなかった。また、既知の分析方法は、信頼性を欠いており、そしてプローブ設計、ハイブリダイゼーション効率、及びアーチファクトによって、制限されている。同文献参照。結果として、異常な DNA メチル化の検出は、達成するのが困難であった。このことが、特定の疾患、例えば癌における DNA メチル化の役割及びパターンの理解を制限している。Suzuki et al, Asian Pac. J. Cancer Prev., 2006 Apr - Jun; 7 (2): 177 - 185 参照。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

10

20

30

40

50

【 0 0 0 4 】

例えば、加齢、発癌、老化、及び他の細胞活性を、インビボ且つインビトロの双方で監視するのに有用な、DNAメチル化を検出する新しい方法が必要とされている。

【課題を解決するための手段】

【 0 0 0 5 】

開示される実施形態は、量子ドットナノ粒子を含み、これは、量子ドットナノ粒子の無機表面上の直接の、又はナノ粒子を水溶性且つ生体適合性にするのに用いられる有機コロナ層上にあるアミド、エステル、チオエステル、又はチオール固定基によって、リガンド（例えば、メチル化特異的結合リガンド）に結合される（例えば、共有結合される、又は（イオンペアリング又はファン・デル・ワールス相互作用によって）物理的に結合される）。そのような実施形態は、例えばリアルタイムに、DNAメチル化を検出するのに有用である。

10

【 0 0 0 6 】

一実施形態において、量子ドットナノ粒子は、メチル化特異的結合リガンドに連結されている。量子ドットナノ粒子は、メチル化特異的結合リガンドに、共有結合的に連結されていてもよい。共有結合は、量子ドットナノ粒子の無機の表面上の直接的な、又はナノ粒子を水溶性にするのに用いられる有機コロナ層上の間接的な、アミド、エステル、チオエステル、又はチオール固定基によるものであってよい。特定の実施形態における水溶性QDナノ粒子は、一半導体材料のコア、及び一部の実施形態における異なる半導体材料の少なくとも1つのシェルを含む一方、他の実施形態において、水溶性QDナノ粒子は、バンドギャップ値が組成傾斜合金化（compositionally graded alloying）によって外向きに増大している、合金化された半導体材料を含む。

20

【 0 0 0 7 】

幾つかの実施形態では、光応答性（light responsive）量子ドット（QD）は、リガンド相互作用剤（ligand interactive agent）及び表面修飾リガンド（surface modifying ligand）を有する水溶性QDナノ粒子を含む。水溶性QDナノ粒子は、ヘキサメトキシメチルメラミンを含む溶液中のQDにリガンド相互作用剤及び表面修飾リガンドを化学的添加することによって形成できる。幾つかの実施形態では、リガンド相互作用剤は、 $C_8 - C_{20}$ 脂肪酸及びそのエステルであり、表面修飾リガンドは、モノメトキシポリエチレンオキシドである。

30

【 0 0 0 8 】

幾つかの実施形態では、水溶性ナノ粒子は、メチル化特異的結合リガンドに結合することができるキャッピングリガンドを含む。幾つかの実施形態では、キャッピングリガンドは、チオール基、カルボキシル基、アミン基、ホスフィン基、ホスフィンオキシド基、ホスホン酸基、ホスフィン酸基、イミダゾール基、OH基、チオエーテル基、及びカリックスアレーン基からなる群から選択される。

【 0 0 0 9 】

一実施形態において、ナノ粒子は、メチル化特異的結合リガンドに、アミド結合を介して共有結合的に連結されている。

【 0 0 1 0 】

一実施形態において、本発明は、コア半導体材料、官能化有機コーティング、及び外層を含む量子ドットを含むリガンドナノ粒子コンジュゲートを提供し、外層は、メチル化特異的結合リガンドを含む。

40

【 0 0 1 1 】

一実施形態において、メチル化特異的結合リガンドは、メチル化されたDNA塩基に結合することができる（例えば、特異的に結合する）リガンド（例えば合成リガンド）である。メチル化されたDNA塩基として、メチル化シトシン、例えば、5 - メチルシトシン、5 - ヒドロキシメチルシトシン、5 - ホルミルシトシン、及び/又は5 - カルボキシルシトシンが挙げられる。メチル化アデニンとしては、 N^6 - メチルアデニンが挙げられる。

50

【0012】

メチル化特異的結合リガンドは、抗体、アプタマー、ペプチド、又は他の合成リガンドをベースにしてよい。適切なメチル化特異的結合リガンドとして、以下に限定されないが、抗5-メチルシトシン抗体、抗5-ヒドロキシメチルシトシン抗体、抗5-ホルミルシトシン抗体、抗5-カルボキシルシトシン抗体、及び/又は抗N⁶-メチルアデニンが挙げられる。一実施形態において、メチル化特異的結合リガンドは、抗5-メチルシトシン抗体、例えば、diagenodeによって販売されている5-mCモノクローナル抗体33D3(cat.No.C1520)又はその同等物である。一実施形態において、メチル化特異的結合リガンドは、抗5-ヒドロキシメチルシトシン抗体、例えば、RM236、317、並びにThermoFisherによってカタログ番号MA5-24695、MA5-23525、PA5-60876、PA5-40097及び/又はPA5-24476で販売されているHMCE5ポリクローナル抗体が挙げられ得る。別の実施形態において、メチル化特異的結合リガンドは、抗5-ホルミルシトシン抗体、例えば、EMD Millipore Corporationによってカタログ番号MABE1092で販売されているEDLFC-5が挙げられ得る。別の実施形態において、メチル化特異的結合リガンドは、抗5-カルボキシルシトシン抗体、例えば、GeneTexによって販売されている5-caC抗体(カタログ番号GTX60801)が挙げられ得る。

10

【0013】

別の態様において、本発明は、本明細書に記載される実施形態の何れかに従うリガンドナノ粒子コンジュゲートを調製するプロセスを提供する。一実施形態において、プロセスは、i)量子ドットナノ粒子をメチル化特異的結合リガンドに結合させて、リガンド-ナノ粒子コンジュゲートを与える工程を含み、ナノ粒子は、コア半導体材料及び外層で構成される量子ドットを含み、外層は、カルボキシル基を含んでいる。

20

【0014】

一実施形態において、カップリング工程は、カップリング剤の存在下で行われる。一実施形態において、カップリング工程i)は、a)外層中のカルボキシル基をカルボジイミドリンカー(linker)と反応させて、カルボキシル基を活性化する工程と、b)活性化されたカルボキシル基を、メチル化特異的結合リガンドと(例えば、リガンド上のアミン末端と)反応させる工程とを含む。カップリング剤は、1-(3-ジメチルアミノプロピル)-3-エチルカルボジイミド塩酸塩であるのが好ましい。

30

【0015】

更なる実施形態において、プロセスは更に、ii)リガンドナノ粒子コンジュゲートを精製する工程を含む。追加の実施形態において、プロセスは更に、iii)リガンドナノ粒子コンジュゲートを単離する工程を含む。一実施形態において、プロセスは、工程i)、ii)、及びiii)を含む。

【0016】

本明細書に記載されるリガンドナノ粒子コンジュゲートの何れかの一実施形態において、ナノ粒子は、II-V族材料、III-V族材料、若しくはI-III-V族材料、又はそれらの任意の合金を含む。

【0017】

更なる実施形態において、本明細書に記載されるリガンド-ナノ粒子コンジュゲートの何れかは、蛍光リガンド-ナノ粒子コンジュゲートである。

40

【0018】

追加の実施形態において、本明細書で記載されるリガンド-ナノ粒子コンジュゲートの何れかが、細胞吸収促進剤、組織浸透促進剤、又はそれらの組合せを更に含む。細胞吸収促進剤の例として、トランス活性化転写アクティベータ(TAT)、Arg-Gly-Asp(RGD)トリペプチド、又はポリアルギニンペプチドが挙げられる。リガンド-ナノ粒子コンジュゲートは更に、他の既知の剤、例えば、サポニン、カチオン性リポソーム、又はストレプトリジンOを含んでよく、これらは細胞吸収を増強することができる。

【0019】

50

別の実施形態において、例えばリアルタイムに、DNAメチル化を検出する方法が提供される。一実施形態において、本方法は、i) 本明細書に記載される実施形態の何れかに従うリガンドナノ粒子コンジュゲートを、メチル化DNA領域（例えばヒト又は動物のDNAサンプル）と接触させる工程と、ii) ナノ粒子コンジュゲートによる光放射又は光吸収を検出する工程とを含む。実施形態の追加の態様において、量子ドットナノ粒子は、光源によって励起される。

【0020】

一実施形態において、サンプルは、固定された組織サンプルである。別の実施形態において、サンプルは、細胞培養において培養された生細胞である。別の実施形態において、リガンド-ナノ粒子コンジュゲートは、生組織に導入される。別の実施形態において、リガンド-ナノ粒子コンジュゲートは、哺乳類に、DNAメチル化のリアルタイム監視のために導入される。

10

【0021】

別の態様において、本発明は、DNAサンプル（例えば、固定された組織サンプル、又は細胞培養において培養された生細胞中のサンプル）のメチル化された領域/メチル化領域を検出するための免疫アッセイにおいて、本明細書に記載される実施形態の何れかに基づくリガンド-ナノ粒子コンジュゲートの試薬としての使用を提供する。

【0022】

本明細書に記載される方法及び/又は使用の何れかの一実施形態において、検出シグナルは、例えば、本明細書に記載される実施形態の何れかに従うリガンド-ナノ粒子コンジュゲートの1又は複数の追加の層を、メチル化DNA領域に加えることによって、増幅される。

20

【0023】

本明細書に記載される方法及び/又は使用の何れかの一実施形態において、DNAメチル化は、インビボで監視されてリアルタイム撮像に用いられる。

【図面の簡単な説明】

【0024】

【図1】図1は、一実施形態に基づいた、3層の量子ドットナノ粒子を用いたメチル化DNA領域の例示的な検出の概略を示す。

【0025】

30

【図2】図2は、水溶性量子ドット生成の一実施形態を示す。

【発明を実施するための形態】

【0026】

本明細書で開示されるのは、メチル化DNA特異的結合リガンドにコンジュゲートされた量子ドット(QD)であり、当該リガンドは、QDによる光子放射が生じる条件下で、QDの刺激直後に検出される能力を有する。また、本明細書で開示されるのは、高い安全性プロフィール及び生体適合性プロフィールを備え、且つDNAメチル化特異的リガンドに結合されている量子ドットナノ粒子(QD)を提供する特定の実施形態である。幾つかの実施形態では、QDは、生体適合性の、無毒性の蛍光量子ドットナノ粒子(QD)の結合体として加工される。

40

【0027】

省略形：以下の省略形は、本願を通じて使用される。

DCC：ジシクロヘキシルカルボジイミド

DCM：ジクロロメタン

DIC：ジイソプロピルカルボジイミド

EDC：1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩

HMMM：ヘキサメトキシメチルメラミン

In(MA)₃：ミリスチン酸インジウム

QD：量子ドット

sulfo-NHS：N-ヒドロキシスクシンイミドのスルホ誘導体

50

S M C C : スクシンイミジル 4 - (N - マレイミドメチル) シクロヘキサン - 1 - カルボキシレート

(T M S)₃ P : トリス (トリメチルシリル) ホスフィン

【 0 0 2 8 】

本発明の理解を促進するために、そして、本明細書で特許請求の範囲を解釈する際の疑義の回避のために、幾つかの用語を以下で定義する。本明細書で定義される用語は、本発明に関連する分野の当業者によって一般的に理解される意味を有する。本発明の特定の実施形態を説明するのに仕様される用語は、特許請求の範囲で述べられる場合を除いて本発明を限定するものではない。

【 0 0 2 9 】

「ある」、「その」などの用語は、明示的に定義されていない限り、特異的な実体を示すことを意図したものではなく、一般的な種類を含んでおり、その種類の一般的な特定の例が、説明のために使用され得る。特許請求の範囲及び / 又は明細書中の「含む」と共に使用される場合における用語「ある」の使用は、1つを意味することもあるが、1つ以上、少なくとも1つ、及び / 又は2つ以上と矛盾し得ない。

【 0 0 3 0 】

特許請求の範囲における用語「又は」使用は、相互に排他的であるとして選択肢を示すことを明示的に示されていない限り、「及び / 又は」を意味するために使用される。故に、特に明記されていない限り、一群の選択肢における用語「又は」は、その群のメンバーの任意の1つ又は任意の組合せを意味する。更に、相互に排他的であるとして選択肢を指すことが明示的に示されていない限り、「A、B、及び / 又はC」なる言い回しは、要素A単独、要素B単独、要素C単独、又はA、B及びCの任意の組合せをまとめて含んだ実施形態を意味する。

【 0 0 3 1 】

同様に、疑義を避けるために、そして、別に相互排他的に選択肢に言及することを明示的に示さない限り、項目のリストと組み合わせられた「少なくとも1つ」なる言い回しは、リストからの単一の項目、又はリスト内の項目の任意の組合せを意味する。例えば、そして別に定義されない限り、「A、B及びCの少なくとも1つ」なる言い回しは、A、B、C又はA、B及びCの任意の組合せからなる群からの少なくとも1つを意味する。従って、他に定義されない限り、この言い回しは、列挙された項目のうちの1又は複数を必要としているが、必ずしも全てではない。

【 0 0 3 2 】

「備えている」（及びその任意の形態、例えば「備える」）、「有している」（及びその任意の形態、例えば「有する」）、「含んでいる」（及びその任意の形態、例えば「含む」）、「含有している」（及びその任意の形態、例えば「含有する」）は、包括的又はオープンエンドであって、列挙されていない更なる要素又は工程を除外しない。

【 0 0 3 3 】

本明細書及び特許請求の範囲で使用される「有効な」という用語は、所望の、予想される、又は意図された結果をもたらす又は達成するのに適切なことを意味する。

【 0 0 3 4 】

「約」又は「ほぼ」なる用語は、当業者によって理解されるように「近い」と定義され、ある1つの非限定的な実施形態においては、この用語は、10%以内、5%以内、1%以内、幾つかの態様では、0.5%以内と規定される。

【 0 0 3 5 】

幾つかの実施形態では、メチル化DNA特異的結合リガンドは、メチル化されたDNA塩基を認識する抗体である。本明細書で使用されるように、用語「抗体」は、無傷の免疫グロブリン分子と、その部分、フラグメント、及び誘導体とを含んでおり、例えば、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、Fsc、CDR、又は、キメラ抗体を含む抗原又はエピトープに結合できる抗体の任意の部分が含まれ、キメラ抗体は、二重特異性であるか、又は、抗体に由来する抗原結合ドメインと、別のタイプのポリペプチドとを組み合わせ

10

20

30

40

50

せる。用語「抗体」は、モノクローナル抗体 (mAb) と、キメラ抗体と、ヒト化抗体と、公知技術によって提供されるそれらのフラグメント、部分、領域又は誘導体とを含んでおり、当該公知技術には、酵素的開裂及び組換え技術が含まれるが、これらに限定されない。本明細書では、用語「抗体」は、重鎖抗体の単一のモノマー可変抗体ドメイン (monomeric variable antibody domain) (VH) を有する単一ドメイン抗体 (sdAb) 及びそのフラグメントも含んでいる。sdAb は、可変軽鎖 (VL) ドメイン及び定常軽鎖 (CL) ドメインを欠いており、ラクダ科動物 (VHH) 及び軟骨魚類 (VNAR) に天然に見られ、ラマで sdAb に結合する特異的抗原を開発した製薬会社 Ablynx によって、時にナノボディ (Nanobody) と称される。修飾語「モノクローナル」は、実質的に均質な抗体の集団から得られるものとしての抗体の特徴を示しており、特定の方法による抗体の生成を要するものと解釈されるべきではない。

10

【0036】

他の実施形態において、メチル化 DNA 特異的結合リガンドは、メチル化された DNA 塩基を認識するアプタマーである。アプタマーは、構造的に異なる RNA 又は DNA オリゴヌクレオチド (ODN) であって、タンパク質結合分子を模倣することができ、ペアワイズな核酸結合によるのではなく、それらの独特の二次の三次元構造立体配座に基づいて、高い (nM) 結合親和性を示すことができる。アプタマーは、ターゲット分子を結合するハイスループットインビトロ法によって選択することができる。アプタマーは通常、抗体の分子量の約 1/10 であるが、それにも拘わらず、抗体に匹敵する十分な認識表面積を有する複雑な三次の折り畳み構造をもたらす。

20

【0037】

QD は、独特の光学特性を有する蛍光半導体ナノ粒子である。QD は、サイズが非常に小さい特定の形態の半導体材料を意味しており、粒子のサイズ及び形状が光励起に対して量子力学的効果をもたらす。一般的に、半径が 5 乃至 6 nm であるような大きい QD は、発光色がオレンジ色又は赤色であるより長い波長を放射し、半径が 2 乃至 3 nm であるような小さい QD は、青色及び緑色で短い波長を放射するが、具体的な色及びサイズは QD の構成によって異なる。量子ドットは、従来の蛍光色素 (インドシアニングリーン (ICG) など) よりも約 20 倍明るく輝き、光安定性が何倍も高い。重要なことであるが、QD の滞留時間は、それらの化学的性質及びナノサイズに起因して長い。QD は、遙かに強い光強度を吸収及び放出できる。幾つかの実施形態では、QD は、2 つ以上の結合タグを備えてよく、二重又は三重特異性ナノデバイスを形成する。QD の独自の特性により、満たされていないニーズに応える幾つかの医療用途が可能になる。

30

【0038】

本明細書に示される実施形態では、QD は、親水性外層又はコロナを示すように機能化されており、例えば、生細胞におけるインビボ及びインビトロの用途のような水性環境での QD の使用を可能にしている。このような QD は、水溶性 QD と呼ばれる。

【0039】

ある実施形態では、QD は、コンジュゲーション可能な官能基 (COOH、OH、NH₂、SH、アジド、アルキン) を表面に備えていてよい。例示的なある実施形態では、水溶性非毒性 QD は、カルボキシル官能化されているか又はカルボキシル官能化される。例えば、COOH-QD は、水溶性 1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩 (EDC) を用いるカルボジイミド連結技術を用いてターゲティング抗体のアミン末端に連結することができる。カルボキシル官能化 QD は、EDC と混合して、活性 O-アシルイソ尿素中間体を形成し、当該中間体は、その後、反応混合物中のモノクローナル抗体上の第一級アミノ基からの求核攻撃によって置換される。所望であれば、N-ヒドロキシスクシンイミドのスルホ誘導体 (sulfo-HS) が、第一級アミン含有抗体との反応中に加えられる。sulfo-HS の添加により、EDC は、NHS をカルボキシルに結合し、NHS エステルを形成する。当該 NHS エステルは、O-アシルイソ尿素中間体よりも安定である一方で、生理学的 pH で第一級アミンへの効率的なコンジュゲーションを可能にする。何れの場合でも、結果は、QD と抗体との間の共有結合

40

50

である。鈴木 - 宮浦クロスカップリング、(スクシンイミジル 4 - (N - マレイミドメチル)シクロヘキサン - 1 - カルボキシレート)(SMCC)のような他の化学反応、又はアルデヒドベースの反応が代わりに使用されてよい。

【0040】

コア及びコア - シェルナノ粒子を合成する方法は、例えば、所有者を同じくする米国特許第 7, 867, 556 号、第 7, 867, 557 号、第 7, 803, 423 号、第 7, 588, 828 号、及び第 6, 379, 635 号に開示されている。前述の特許の各々の内容は、その全体が参照により本明細書の一部となる。米国特許第 9, 115, 097 号、第 8, 062, 703 号、第 7, 985, 446 号、第 7, 803, 423 号、及び第 7, 588, 828 号、並びに米国特許公開第 2010/0283005 号、第 2014/0264196 号、第 2014/0277297 号、及び第 2014/0370690 号は、それらの各々の全体が本明細書の一部となる。これら引用文献には、大量の高品質単分散量子ドットを製造する方法が記載されている。

10

【0041】

ある実施形態では、コア/シェル粒子が利用され、コア/シェル粒子は、少なくとも 1 つの半導体組成の中心領域又はコアを有しており、コアは、半導体組成が明確に異なる 1 又は複数の外層又はシェル内に埋め込まれて、又は覆われている。一例として、コアは、In、P、Zn 及び S の合金で構成されてよく、例えば、ZnS 分子クラスタ上へのインジウム系 QD の分子シーディングとそれに続く ZnS のシェルの形成とを含む実施例 1 の説明に基づいて形成される。

20

【0042】

更に別の実施形態では、使用される水溶性 QD ナノ粒子は、コア/シェル QD を作製する代わりに、合金化半導体材料を含んでおり、当該合金化半導体材料は、組成傾斜合金化によって外向きに増加するバンドギャップ値又はエネルギー (E_g) を有する。バンドギャップエネルギー (E_g) は、基底状態の価電子エネルギーバンドから空いている伝導エネルギーバンドに電子を励起するのに要する最小エネルギーである。

【0043】

傾斜合金 QD 組成は、粒子の中心又はその近くから、QD の最も外部の表面まで、元素傾斜合金 QD 組成は、別個のシェル層によって覆われた別個のコアとして形成されるのではなく、粒子の中心又はその近傍から QD の最外面まで元素組成が傾斜しているものと考えられる。1 つの例は、x 及び y が QD の中心から表面に向かって 0 から 1 まで次第に増加する $In_{1-x}P_{1-y}Zn_xS_y$ 傾斜合金 QD であろう。そのような例では、QD のバンドギャップは、中心近くの純粋な InP のバンドギャップから表面における純粋な ZnS のより大きいバンドギャップまで次第に変化するであろう。バンドギャップは粒子サイズに依存するが、ZnS のバンドギャップは InP のバンドギャップよりも広いので、傾斜合金のバンドギャップは、QD の内側から表面に向かって徐々に増加する。

30

【0044】

本明細書の実施例 1 において説明されている分子シーディング法の変形として、ワンポット合成法が使用されてよい。これは、実施例 1 におけるコア粒子の生成について記載するように、プロセス中に量を増加しつつ亜鉛及び硫黄前駆体を添加しながら、粒子成長を維持するために反応溶液に添加されるミリスチン酸インジウム及び $(TMS)_3P$ の量を徐々に減少させることによって達成されてよい。故に、ある例では、ジブチルエステル及び飽和脂肪酸が反応フラスコに入れられて、加熱しながら脱気される。窒素が導入されて、昇温される。例えば、ZnS 分子クラスタ $[Et_3NH]_4[Zn_{10}S_4(SPh)_{16}]$ のような分子クラスタが、攪拌しながら加えられる。濃度を徐々に減少させた第 1 の半導体材料と濃度を徐々に減少させた第 2 の半導体材料の添加を含む傾斜プロトコルに従って傾斜合金前駆体溶液が加えられるにつれて、昇温される。例えば、ランピング (ramping) プロトコルは、ジカルボン酸エステル (例えば、ジ - n - ブチルセバケートエステルなど) に溶解したミリスチン酸インジウム ($In(MA)_3$) 及びトリメチルシリルホスフィン ($(TMS)_3P$) の添加で開始でき、添加される $In(MA)_3$ 及び $(TMS)_3P$

40

50

）₃ P の量は、経時的に徐々に減少して、徐々に濃度が増加する硫黄及び亜鉛化合物、例えば (TMS)₂ S 及び酢酸亜鉛で置き換えられる。In (MA)₃ 及び (TMS)₃ P の添加量が減少するにつれて、酢酸亜鉛と共に加えられる飽和脂肪酸（例えば、ミリスチン酸又はオレイン酸）及びジカルボン酸エステル（例えば、ジ - n - ブチルセバケートエステル）に溶解した (TMS)₂ S の量は徐々に増加する。次に続く反応は、ZnS 化合物の生成を増加させるであろう。添加が続くにつれて、所望のサイズの QD 粒子が形成され、発光極大波長は徐々に増加する。InP 及び ZnS の濃度は傾斜しており、QD 粒子の中心近くで InP の濃度が最も高く、QD 粒子の外側で、ZnS の濃度が最も高い。所望の発光極大が得られると、反応への更なる添加が停止され、得られた傾斜合金粒子をアニールした後、沈殿及び洗浄によって粒子の単離が行われる。

10

【0045】

媒体に対するナノ粒子の適合性と、凝集、光酸化及び / 又はクエンチングについてのナノ粒子の受け易さとは、主にナノ粒子の表面組成によって媒介される。任意のコア、コア - シェル又はコア - マルチシェルナノ粒子の最終的な無機表面原子の周りの配位は不完全なことがあり、表面に反応性が高いダングリングボンドを有し、これは粒子の凝集をもたらし得る。この問題は、本明細書でキャッピングリガンド又はキャッピング剤と呼ばれる保護有機基で、ペアな表面原子を不動態化する（キャッピングする）ことによって克服される。粒子のキャッピング又は不動態化は、粒子の凝集を防ぐだけでなく、周囲の化学的環境から粒子を保護し、コア材料の場合には、粒子に電子的安定化（不動態化）をもたらす。キャッピングリガンドは、粒子の最も外側の無機層の表面金属原子に結合したルイス塩基であってよいが、これに限定されない。キャッピングリガンドの性質は、特定の媒体に対するナノ粒子の適合性を大きく左右する。キャッピングリガンドは、所望の特性に応じて選択されてよい。使用可能なキャッピングリガンドの種類には、チオール基、カルボキシル基、アミン基、ホスフィン基、ホスフィンオキシド基、ホスホン酸基、ホスフィン酸基、イミダゾール基、OH 基、チオエーテル基、及びカリックスアレーン基が挙げられる。カリックスアレーンを除いて、これらのキャッピングリガンドは全て、キャッピングリガンドのための固定中心を粒子の表面に形成できる頭部基を有する。キャッピングリガンドの本体は、直鎖であっても、環状であっても、芳香族であってよい。キャッピングリガンド自体は、大きく、小さく、オリゴマー状又は多座状であってよい。リガンドの本体の性質と、粒子に結合していない突出側部とは一緒になって、リガンドが親水性、疎水性、両親媒性、負性、陽性、又は双性イオン性であるか否かを決定する。

20

30

【0046】

多くの量子ドット材料では、キャッピングリガンドは疎水性である（例えば、アルキルチオール、脂肪酸、アルキルホスフィンやアルキルホスフィンオキシドなど）。故に、ナノ粒子は通常、ナノ粒子の合成及び単離後に、トルエンなどの疎水性溶媒中に分散される。このようにキャッピングされたナノ粒子は通常、極性がより高い媒体には分散しない。QD の表面修飾が望まれる場合に最も広く使用されている手法は、リガンド交換として知られている。親油性リガンド分子は、コア合成及び / 又はシェル形成手順中にナノ粒子の表面に配位し、続いて、極性 / 荷電リガンド化合物と交換されてよい。別の表面修飾戦略は、極性 / 荷電分子又はポリマー分子を、ナノ粒子の表面に既に配位しているリガンド分子とインターカレートさせることである。しかしながら、ある種のリガンド交換及びインターカレーション手法は、水性媒体に対してナノ粒子をより相溶性にする一方で、対応する未修飾ナノ粒子よりも量子収率 (QY) が低い、及び / 又はサイズが実質的に大きい材料をもたらすことがある。

40

【0047】

インビボ及びインビトロ用途においては、必要とされない場合には、低毒性プロフィールを有する QD が望ましい。故に、幾つかの用途では、量子ドットナノ粒子は、カドミウム、鉛やヒ素などの有毒な重金属を実質的に含まないこと（例えば、カドミウム、鉛、ヒ素などの重金属が 5 重量 % 未満、具体的には、4 重量 % 未満、3 重量 % 未満、2 重量 % 未満、1 重量 % 未満、0.5 重量 % 未満、0.1 重量 % 未満、0.05 重量 % 未満、0.0

50

1 重量%未満)、或いは、カドミウム、鉛、ヒ素などの重金属を含まないことが好ましい。ある実施形態では、カドミウム、鉛、ヒ素などの重金属を含まない低毒性 Q D がもたらされる。

【0048】

Q D に特有の性質は、未だになされていない生細胞におけるインビトロ及びインビボ診断を含む幾つかの潜在的な医学的用途を可能にする。Q D の医療応用に関する大きな懸念の 1 つは、カドミウム、鉛、ヒ素などの有毒な重金属を含む Q D に研究の大部分が集中しているということである。本明細書に記載の、生物学的に適合した重金属フリーの水溶性 Q D は、インビトロ及びインビボの両方で医療用途に安全に使用することができる。幾つかの実施形態では、(完全 Ig G 2 抗体の寸法サイズの範囲内である) 10 乃至 20 nm の水力学的サイズを有する、インビボ適合性でカドミウムフリーな水分散性 Q D がもたらされる。ある実施形態では、インビボ適合性でカドミウムフリーな水分散性 Q D は、本明細書の実施例 1 及び実施例 2 に記載の手順に従って製造される。幾つかの実施形態では、インビボ適合性でカドミウムフリーな水分散性 Q D は、カルボキシル官能化されており、更にリガンド結合部で誘導体化されている。

10

【0049】

カドミウム、鉛及びヒ素を含まないナノ粒子の例には、例えば、ZnS、ZnSe、ZnTe、InP、InSb、AlP、AlS、AlSb、GaN、GaP、GaSb、PbS、PbSe、AgInS₂、CuInS₂、Si、Ge などの半導体材料、それらの合金及びドーブされた誘導体を含むナノ粒子、特に、これらの材料のうちの 1 つのコアと、これらの材料のうちの別の材料の 1 又は複数のシェルとを含むナノ粒子が挙げられる。

20

【0050】

幾つかの実施形態では、非毒性 Q D ナノ粒子は表面修飾されて、水溶性にされて、且つ、それらをリガンド相互作用剤に曝すことによって誘導体化する表面部分を有しており、リガンド相互作用剤と Q D の表面との会合をもたらすことを可能にする。リガンド相互作用剤は、以下に記載するように、鎖部分と、連結/架橋剤に対して特異的な親和性又はそれとの反応性を有する官能基とを含んでよい。鎖部分は、例えば、アルカン鎖であってよい。官能基の例には、チオ基、ヒドロキシル基、カルボキサミド基、エステル基やカルボキシル基などの求核基が挙げられる。リガンド相互作用剤はまた、Q D の表面に対して親和性を有する部分を含んでも含まなくてもよい。そのような部分の例には、チオール、アミン、カルボキシル基やホスフィンが挙げられる。リガンド相互作用基がそのような部分を含まない場合、リガンド相互作用基は、キャッピングリガンドとインターカレートすることによってナノ粒子の表面と会合してよい。リガンド相互作用剤の例には、例えばミリスチン酸イソプロピルのような C₈-₂₀ 脂肪酸及びそのエステルが含まれる。

30

【0051】

リガンド相互作用剤は、単にナノ粒子の合成に使用されるプロセスの結果として Q D ナノ粒子と会合してよく、ナノ粒子を更なる量のリガンド相互作用剤に曝す必要性を無くすことに留意のこと。このような場合、更なるリガンド相互作用剤をナノ粒子と会合させる必要はないかもしれない。代替的に又は追加で、ナノ粒子が合成及び単離された後に、Q D ナノ粒子をリガンド相互作用剤に曝してもよい。例えば、ナノ粒子は、リガンド相互作用剤を含む溶液中にて、一定期間インキュベートされてよい。そのようなインキュベーション、又はインキュベーション期間の一部は、高温であってよく、リガンド相互作用剤とナノ粒子の表面との会合が促進する。リガンド相互作用剤をナノ粒子の表面と会合させた後に、Q D ナノ粒子は、連結/架橋剤及び表面修飾リガンドに曝される。連結/架橋剤は、リガンド相互作用剤の基に対して、また、表面修飾リガンドに対して特異的な親和性を有する官能基を含む。リガンド相互作用剤-ナノ粒子会合複合体は、連結/架橋剤及び表面修飾リガンドに順次曝される。例えば、ナノ粒子は、架橋/架橋剤にある期間曝されて架橋をもたらし、その後、表面修飾リガンドに曝されて、それをナノ粒子のリガンドシェルへと組み込んでよい。或いは、ナノ粒子は、結合/架橋剤と表面修飾リガンドとの混合物に曝されてよく、よって、単一の工程で架橋されて、表面修飾リガンドが組み込まれる

40

50

。

【 0 0 5 2 】

ある実施形態では、量子ドット前駆体は、分子クラスタ化合物の存在下で、分子クラスタの完全性が維持される条件下で与えられて、十分に分離した (well-defined) 予め作製されたシード又はテンプレートとして作用し、化学前駆体と反応する核形成中心をもたらして、工業的用途に十分な規模で高品質のナノ粒子が生成される。

【 0 0 5 3 】

しかしながら、開示された方法は、分子クラスタ法に限定されない。量子ドットを調製するための更なる方法としては、例えば、二重注入法、水ベース法 (aqueous based method)、ホットインジェクション法及びシーディング法が挙げられる。

10

【 0 0 5 4 】

本発明において有用な量子ドットナノ粒子の適切な種類には、以下の種類を含むコア材料 (それらの任意の組合せ又は合金を含む) が挙げられるが、これらに限定されない。

【 0 0 5 5 】

周期律表の第 2 族からの第 1 元素と、周期律表の第 16 族からの第 2 元素とを含んでいる I I A - V I B (2 - 1 6) 族材料であって、三元材料、四元材料及びドーブされた材料も含まれる。適切なナノ粒子材料としては、M g S、M g S e、M g T e、C a S、C a S e、C a T e、S r S、S r S e、S r T e、B a S、B a S e、及び B a T e が挙げられるが、これらに限定されない。

【 0 0 5 6 】

周期律表の第 12 族からの第 1 元素と周期律表の第 15 族からの第 2 元素とを含んでいる I I - V 族材料であって、三元材料、四元材料、及びドーブされた材料も含まれる。適切なナノ粒子材料としては、Z n ₃ P ₂、Z n ₃ A s ₂、C d ₃ P ₂、C d ₃ A s ₂、C d ₃ N ₂、及び Z n ₃ N ₂ が挙げられるが、これらに限定されない。

20

【 0 0 5 7 】

周期律表の第 12 族からの第 1 元素と、周期律表の第 16 族からの第 2 元素とを含む I I - V I 族材料であって、三元材料、四元材料及びドーブされた材料も含まれる。適切なナノ粒子材料としては、C d S e、C d T e、Z n S、Z n S e、Z n T e、Z n O、H g S、H g S e、H g T e、C d S e S、C d S e T e、C d S T e、Z n S e S、Z n S e T e、Z n S T e、H g S e S、H g S e T e、H g S T e、C d Z n S、C d Z n S e、C d Z n T e、C d H g S、C d H g S e、C d H g T e、H g Z n S、H g Z n S e、H g Z n T e、C d Z n S e S、C d Z n S e T e、C d H g S e S、C d H g S e T e、C d H g S T e、H g Z n S e S、及び H g Z n S e T e が挙げられるが、これらに限定されない。

30

【 0 0 5 8 】

周期律表の第 13 族からの第 1 元素と周期律表の第 15 族からの第 2 元素とを含んでいる I I I - V 族材料であって、三元材料、四元材料及びドーブされた材料も含まれる。適切なナノ粒子材料には、B P、A l P、A l A s、A l S b ; G a N、G a P、G a A s、G a S b、I n N、I n P、I n A s、I n S b、A I N、及び B N が挙げられるが、これらに限定されない。

40

【 0 0 5 9 】

周期律表の第 13 族からの第 1 元素と周期律表の第 14 族からの第 2 元素とを含んでいる I I I - V 族材料であって、三元材料、四元材料及びドーブされた材料も含まれる。適切なナノ粒子材料には、B ₄ C、A l ₄ C ₃、G a ₄ C、S i、及び S i C が挙げられるが、これらに限定されない。

【 0 0 6 0 】

周期律表の第 13 族からの第 1 元素と周期律表の第 16 族からの第 2 元素とを含んでいる I I I - V I 族材料であって、三元材料及び四元材料も含まれる。適切なナノ粒子材料には、A l ₂ S ₃、A l ₂ S e ₃、A l ₂ T e ₃、G a ₂ S ₃、G a ₂ S e ₃、G e T e ; I n ₂ S ₃、I n ₂ S e ₃、G a ₂ T e ₃、I n ₂ T e ₃、及び I n T e が挙げられる

50

が、これらに限定されない。

【0061】

周期律表の第14族からの第1元素と周期律表の第16族からの第2元素とを含んでいるIV-V族材料であって、三元材料、四元材料及びドーブされた材料も含まれる。適切なナノ粒子材料には、PbS、PbSe、PbTe、Sb₂Te₃、SnS、SnSe、SnTeが挙げられるが、これらに限定されない。

【0062】

周期律表の遷移金属の任意の族からの第1元素と、周期律表の第16族からの第2元素とを含んでいるナノ粒子材料であって、三元材料、四元材料及びドーブされた材料も含まれる。適切なナノ粒子材料としては、NiS、CrS、AgS、並びに、CuInSe₂、CuGaS₂、CuGaS₂、及びAgInS₂などのI-II-V族材料が挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0063】

好ましい実施形態において、ナノ粒子材料は、II-V族材料、III-V族材料、I-II-V族材料、及びそれらの合金又はドーブされた誘導体を含む。

【0064】

本明細書及び特許請求の範囲の意図するものとしては、「ドーブされたナノ粒子」という用語は、上記と、大抵の場合には遷移金属又は希土類元素である1又は複数の主族元素又は希土類元素を含むドーバントとからなるナノ粒子を指しており、例えば、Mn⁺でドーブされたZnSナノ粒子のようなマンガンを含む硫化亜鉛であるが、これに限定されない。

20

【0065】

ある実施形態では、量子ドットナノ粒子は、カドミウムなどの重金属を実質的に含まない（例えば、カドミウムなどの重金属が5重量%未満、具体的には、4重量%未満、3重量%未満、2重量%未満、1重量%未満、0.5重量%未満、0.1重量%未満、0.05重量%未満、0.01重量%未満）、或いは、カドミウムなどの重金属を含んでいない。

【0066】

インビボ用途では、重金属フリー半導体ナノ粒子、例えばインジウムベースの量子ドット、例えばInP及びそのドーブされた誘導体又は合金化された誘導体が好ましい。

30

【0067】

一実施形態において、本明細書に記載のナノ粒子の何れも、ナノ粒子コア上に設けられた第1の半導体材料を含む第1の層を含んでいる。第2の半導体材料を含む第2の層が、第1の層の上に設けられてよい。量子ドットナノ粒子は、メチル化特異的結合リガンドに（例えば共有結合的に）連結されている。共有結合は、量子ドットナノ粒子の無機表面上の直接的な、アミド、エステル、チオエステル、チオエステル、又はチオール固定基によるものであってよい。一実施形態において、ナノ粒子は、メチル化特異的結合リガンドに、アミド結合を介して共有結合的に連結されている。

【0068】

以下の合成工程が、コンジュゲーションに用いられてよい。リンカーが使用されて、ナノ粒子上のカルボキシル官能基とメチル化特異的結合リガンド上のアミン末端基との間にアミド基が形成されてよい。既知のリンカー、例えば、量子ドットナノ粒子の無機表面上に直接存在するチオール固定基などが使用できる。当業者には知られているであろう標準的なカップリング条件が用いられてよい。適切なカップリング剤としては、例えば、ジシクロヘキシルカルボジイミド（DCC）、ジイソプロピルカルボジイミド（DIC）、及び1-（3-ジメチルアミノプロピル）-3-エチルカルボジイミド塩酸塩（EDC）などのカルボジイミドが挙げられるが、これらに限定されない。ある実施形態では、カップリング剤はEDCである。

40

【0069】

ある実施例では、カルボキシル末端基とメチル化特異的結合リガンドとを有する量子ド

50

ットナノ粒子が、溶媒に混合されてよい。カップリング剤、例えば EDC が、混合物に加えられてよい。反応混合物は、インキュベートされてよい。粗の (crude) メチル化特異的結合リガンドナノ粒子コンジュゲートは、精製されてよい。

【0070】

一般的な固相精製法が使用されてよい。過剰な未反応のメチル化特異的結合リガンド及び / 又は EDC を除去するために、濾過及び適切な溶媒での洗浄が、数サイクル必要とされることがある。

【0071】

記載される方法及び / 又は使用の何れかの一実施形態において、バイサルファイト修飾及び PCR 増幅の後に、量子ドット蛍光共鳴エネルギー移動 (MS - qFRET) を用いて、DNA メチル化が検出され得る。例えば、Bailey et al, Genome Res., 19, 1455 - 1461, 2009 参照。

10

【0072】

以下の実施例は、開示を完全にするため、本発明の組成物及び複合物を製造する方法を説明するため、並びに組成物の特定の特徴を示すために記載されている。これらの実施例は、本発明の範囲又は教示を限定することを意図するものではない。

【実施例】

【0073】

[実施例 1 無毒性量子ドットの合成]

分子シーディングプロセスを使用して、無毒性量子ドット (QD) を生成した。概要を説明すると、500 乃至 700 nm の範囲で発光する非官能化インジウム系量子ドットの調製を以下のようにして行った。ジブチルエステル (約 100 ml) 及びミリスチン酸 (MA) (10.06 g) を三口フラスコに入れて、真空下で約 70 °C で 1 時間脱気した。この期間の後、窒素を導入し、そして温度を約 90 °C に上げた。約 4.7 g の ZnS 分子クラスター [Et₃NH]₄[Zn₁₀S₄(SPh)₁₆] を加え、混合物を約 45 分間攪拌した。次に、温度を約 100 °C に上げて、続いて In(MA)₃ (1 M、15 ml) を滴下し、続いてトリメチルシリルホスフィン (TMS)₃P (1 M、15 ml) を滴下した。反応混合物を攪拌しながら温度を約 140 °C に上げた。140 °C で、ジ - n - ブチルセバケートエステルに溶解させたミリスチン酸インジウム (In(MA)₃) (1 M、35 ml) (5 分間攪拌したままにした) と、ジ - n - ブチルセバケートエステルに溶解させた (TMS)₃P (1 M、35 ml) を更に滴下した。その後、温度をゆっくりと 180 °C に上げて、In(MA)₃ (1 M、55 ml)、続いて (TMS)₃P (1 M、40 ml) を更に滴下した。このようにして前駆体を添加することで、発光極大が 500 nm から 720 nm まで徐々に増加するインジウム系粒子を作製した。所望の発光極大が得られた時点で反応を停止し、反応温度で半時間攪拌し続けた。この期間の後、混合物を約 4 日間 (反応温度よりも約 20 乃至 40 °C 低い温度で) アニールした。この段階で UV ランプも使用して、アニーリングを促進した。

20

30

【0074】

カニユーレ法を用いて、乾燥脱気メタノール (約 200 ml) の添加により粒子を単離した。沈殿物を沈殿させ、次に、フィルタスティックを用いてカニユーレを介してメタノールを除去した。乾燥脱気クロロホルム (約 10 ml) を加えて固体を洗浄した。真空下で 1 日間固体を乾燥させた。この手法により、ZnS 分子クラスターにインジウム系ナノ粒子が形成された。更なる処理において、結果として得られたインジウム系ナノ粒子の量子収率は、希フッ酸 (HF) 中で洗浄することによって更に増加した。インジウム系コア材料の量子収率は、約 25 % 乃至 50 % の範囲であった。この組成物は、In、P、Zn 及び S を含む合金構造と考えられる。

40

【0075】

ZnS シェルの成長: HF エッチングしたインジウム系コア粒子の 20 ml 部を三口フラスコ内で乾燥させた。1.3 g のミリスチン酸及び 20 ml のジ - n - ブチルセバケートエステルを添えて、30 分間脱気した。溶液を 200 °C に加熱して、2 ml の 1 M

50

(TMS)₂Sを(7.93 ml / 時の速度で)滴加した。この添加が完了した後、溶液を2分間放置し、次に1.2 gの無水酢酸亜鉛を加えた。200 で1時間溶液を保持して、次に室温に冷却した。40 mlの無水脱気メタノールを添加して遠心分離することで、得られた粒子を単離した。上澄み液を捨てて、残った固体に30 mlの無水脱気ヘキサンを加えた。溶液を5時間静置し、次に再度遠心分離した。上澄み液を集めて、残った固体を捨てた。最終的な非官能化インジウム系ナノ粒子材料の量子収率は、有機溶媒中で約60%乃至90%の範囲であった。

【0076】

[実施例2 水溶性の表面修飾QD]

メラミンヘキサメトキシシメチルメラミン(HMMM)修飾蛍光ナノ粒子を、薬物送達ビヒクルとして生成及び使用するための方法の一実施形態が、本実施例で提供される。独特なメラミンベースのコーティングは、優れた生体適合性と、低毒性と、非常に低い非特異的結合とを示す。これらの独特の作用により、インビトロとインビボの両方で幅広い生物医学的用途が可能になる。

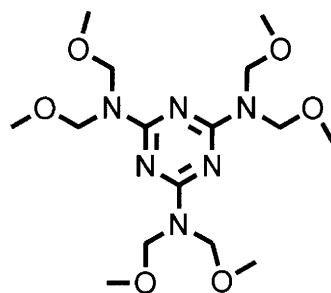
【0077】

適切な水溶性ナノ粒子の調製の一例を以下に示す。実施例1に記載されており、コア材料としてインジウム及びリンを含む合金と、Zn含有シェルとを有しており、608 nmで赤色発光する200 mgのカドミウムフリー量子ドットナノ粒子を、ミリスチン酸イソプロピル(100マイクロリットル)と共にトルエン(1 ml)中に分散させた。ミリスチン酸イソプロピルは、リガンド相互作用剤として含まれる。50 で約1乃至2分間混合物を加熱し、次に室温で15時間ゆっくりと振とうした。ヘキサメトキシシメチルメラミン(HMMM)(CYMEL 303、Cytec Industries, Inc.、ニュージャージー州ウェストパターソン)(400 mg)、モノメトキシポリエチレンオキシド(CH₃-O-PEG₂₀₀₀-OH)(400 mg)、及びサリチル酸(50 mg)のトルエン溶液(4 ml)をナノ粒子分散系に加えた。サリチル酸は、官能化反応に用いられ、触媒、架橋剤、及びCOOHの供給源として3つの役割を果たす。OH基に関するHMMMの選好性に部分的に起因して、サリチル酸によって提供される多くのCOOH基は、架橋後もQD上で利用可能なままである。

【0078】

HMMMは、以下の構造を有するメラミンベースの連結剤 / 架橋剤である。

【化1】



【0079】

HMMMは、酸触媒反応で反応して、アミド、カルボキシル基、ヒドロキシル基、及びチオールなどの様々な官能基を架橋できる。

【0080】

混合物を脱気し、電磁攪拌機で300 rpmで攪拌しながら、最初の1時間は130 で、次に140 で3時間還流した。最初の1時間の間、窒素流をフラスコに通過させて、HMMMと求核基の反応によって発生した揮発性副生成物を確実に除去した。混合物を室温に冷却して、不活性ガス下で保存した。表面修飾ナノ粒子は、未修飾ナノ粒子と比較して、蛍光量子収率がほとんど又は全く損なわれず、発光ピーク又は半値全幅(FWHM

）値の変化がないことを示した。表面修飾ナノ粒子のアリコートを実験下で乾燥させて、脱イオン水を残留物に添加した。表面修飾ナノ粒子は、水性媒体によく分散し、常に分散したままであった。対照的に、未修飾ナノ粒子は水性媒体中に懸濁しなかった。上記手順による表面修飾ナノ粒子の蛍光量子収率は、40乃至50%である。典型的なバッチでは、47%±5%の量子収率が得られる。

【0081】

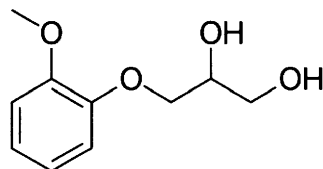
別の実施形態では、608nmで赤色発光するカドミウムフリー量子ドットナノ粒子（200mg）を、コレステロール（71.5mg）と共にトルエン（1ml）に分散させた。50℃で約1乃至2分間混合物を加熱し、次に室温で15時間ゆっくりと振とうした。HMMM（Cymel 303）（400mg）、モノメトキシポリエチレンオキシド（CH₃O-PEG₂₀₀₀-OH）（400mg）、グアイフェネシン（100mg）、ジクロロメタン（DCM）（2mL）及びサリチル酸（50mg）のトルエン溶液（4ml）を、ナノ粒子分散系に加えた。

10

【0082】

ここで用いられる化合物グアイフェネシンは、以下の化学構造を有する。

【化2】

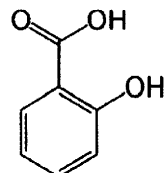


20

【0083】

ここで用いられる化合物サリチル酸は、以下の化学構造を有する。

【化3】



30

【0084】

混合物を脱気して、磁気攪拌機で300rpmで攪拌しながら、140℃で4時間還流した。先の手順と同様に、最初の1時間の間に窒素流をフラスコに通過させて、HMMMと求核基の反応によって発生した揮発性副生成物を確実に除去した。混合物を室温に冷却し、不活性ガス下で保存した。表面修飾ナノ粒子のアリコートを実験下で乾燥させ、脱イオン水を残留物に加えた。100mMのKOH溶液を用いて、溶液のpHを6.5に調整し、Amiconフィルタ（30kD）を用いた3サイクルの限外濾過により、過剰な未反応物質を除去した。使用するまで最終水溶液を冷蔵保存した。図2は、生成プロセスと生じた表面修飾QDを示す。

40

【0085】

水溶性を増大させるようにナノ粒子を修飾する伝統的な方法（例えば、メルカプト官能化水溶性リガンドとのリガンド交換）は、ナノ粒子を水溶性にする温和な条件下では効果がないことに注目すべきである。熱及び超音波処理などの過酷な条件下では、フラクシオンは水溶性になり、非常に低い量子収率（QY<20%）を有する。対照的に、本方法は、高い量子収率を有する水溶性ナノ粒子を提供する。本明細書で規定されるように、高い量子収率は40%以上である。幾つかの実施形態において、45%以上の高い量子収率が得られる。この実施例のように調製された表面修飾ナノ粒子はまた、エタノール、プロパ

50

ノール、アセトン、メチルエチルケトン、ブタノール、トリプロピルメチルメタクリレート、メチルメタクリレートを含む他の極性溶媒によく分散し、常に分散したままである。

【0086】

[実施例3 標的化リガンドを含む水溶性QD]

特定の実施形態では、水溶性QDは、QDに付された標的化リガンドを含むように修飾される。故に、ある実施形態では、非毒性且つ水溶性（生体適合性）であり、コンジュゲーション可能な基（COOH、OH、NH₂、SH、アジド、アルキン）を表面に備えた量子ドットナノ粒子が合成される。例えば本明細書の実施例2で与えられたCOOH官能基のような、QDに付加できる官能基を用いて、サンプル、細胞及び組織中のメチル化されたDNAを選択的に同定することを可能にする標的化リガンドを含むように、QDを修飾できる。標的化リガンド修飾QDは、照射されると、検出用の光を発光する。

10

【0087】

例示的なある実施形態では、水溶性の非毒性QDはカルボキシル官能化されているか、カルボキシル官能化される。水溶性1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩(EDC)を用いるカルボジイミド結合法のような化学的方法を使用して、COOH-QDを、特異的抗体などのメチル化DNAの標的部のアミン末端に結合する。カルボキシル官能化QDをEDCと混合して、活性O-アシルイソ尿素中間体を形成し、次に、当該中間体を、反応混合物中でモノクローナル抗体の第一級アミノ基からの求核攻撃によって置換する。必要であれば、第一級アミン含有抗体(primary amine bearing antibody)との反応中に、N-ヒドロキシスクシンイミドのスルホ誘導体(sulfonamide-HS)を加える。スルホ-NHSの添加により、EDCは、カルボキシルにNHSを結合し、O-アシルイソ尿素中間体よりも安定なNHSエステルを形成する一方で、生理学的pHで第一級アミンへの効率的なコンジュゲーションを可能にする。何れの場合でも、結果は、QDと抗体の間の共有結合となる。鈴木-宮浦クロスカップリング、スクシンイミジル4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシレート(SMCC)、又はアルデヒドを用いた反応のような他の化学反応が、代わりに用いられてもよい。

20

【0088】

ある実施形態において、無毒性の水溶性量子ドットを、メチル化特異的結合部位、例えば、5-メチルシトシン、5-ヒドロキシメチルシトシン、5-ホルミルシトシン、5-カルボキシルシトシン、及び/又はN⁶-メチルアデニンに向けられる抗体に化学的に取り付ける。適切なメチル化特異的結合リガンドとして、以下に限定されないが、抗5-メチルシトシン抗体、抗5-ヒドロキシメチルシトシン抗体、抗5-ホルミルシトシン抗体、抗5-カルボキシルシトシン抗体、及び/又は抗N⁶-メチルアデニン抗体、並びにそれらのあらゆる組合せが挙げられる。一実施形態において、メチル化特異的結合リガンドは、抗5-メチルシトシン抗体、例えば、diagencodeによって販売されている5-mCモノクローナル抗体33D3(カタログ番号C15200081)又はその同等物である。一実施形態において、メチル化特異的結合リガンドは、抗5-ヒドロキシメチルシトシン抗体、例えば、RM236、317、並びにThermoFisherによってカタログ番号MA5-24695、MA5-23525、PA5-60876、PA5-40097及び/又はPA5-24476で販売されているHMCEsポリクローナル抗体が挙げられ得る。別の実施形態において、メチル化特異的結合リガンドは、抗5-ホルミルシトシン抗体、例えば、EMD Millipore Corporationによってカタログ番号MABE1092で販売されているEDLFC-5が挙げられ得る。別の実施形態において、メチル化特異的結合リガンドは、抗5-カルボキシルシトシン抗体、例えば、GeneTexによって販売されている5-cac抗体(カタログ番号GTX60801)が挙げられる。

30

40

【0089】

メチル化特異的結合リガンドとのインピボ適合水分散性カドミウムフリーQDの共有結合コンジュゲーション：エッペンドルフ(Eppendorf)チューブにおいて、1mgのカル

50

ボキシル官能化水溶性量子ドットを、 $100\mu\text{l}$ のMES活性化緩衝液と混合する（つまり、 $40\text{mg}/\text{ml}$ ストックの $25\mu\text{l}$ を $100\mu\text{l}$ のMESに入れる）。MES緩衝液は、 $\text{pH}4.5$ の脱イオン（DI）水の 25mM 溶液（2-（N-モルフォリノ）エタン
スルホン酸ヘミナトリウム塩（MES）、Sigma Aldrich）として調製される。これに、 $33\mu\text{l}$ の新しいEDC溶液（脱イオン水の $30\text{mg}/\text{ml}$ ストック、1-
エチル-3-（3-ジメチルアミノプロピル）カルボジイミド塩酸塩（EDC）、Fisher Scientific）を加えて、その溶液を混合する。 $4\mu\text{l}$ の新しいsul-
fo-HS（ $100\text{mg}/\text{ml}$ ストック、ThermoFisher Scientific、DI水中）を加えて、混合する。NanoSep 300Kフィルタ（PALL
NanoSep 300K Omegaウルトラフィルタ）を、 $100\mu\text{l}$ のMESで予
め湿らせる。MES/EDC/Sulfo-HS/QD溶液を、NanoSep 300
Kフィルタに添加し、十分なMESで満たす。 $5000\text{rpm}/15$ 分で、フィルタを遠
心分離する。ドットを、 $50\mu\text{l}$ の活性化緩衝液に再度分注して、 $10\mu\text{l}$ のメチル化特
異的リガンドを含んでいるエッペンドルフチューブに移す。溶液をよく混ぜて、室温で一
晩（約16乃至18時間）インキュベートする。 $16\mu\text{l}$ の6-アミノカプロン酸（6AC）（ $19.7\text{mg}/100\text{mM}$ ）で、溶液をクエンチする。クエンチングは、第一級ア
ミンを有する他の化合物を用いて代替的に行えるが、6ACは、COOHを有しており、
生成物のコロイド安定性を維持することができるので、6ACがこの実施態様に対して選
択されていることに留意のこと。予め濡らしたNanoSep 300Kフィルタ（ $100\mu\text{l}$
 $1\times\text{PBS}$ ）に溶液を移し、 $500\mu\text{l}$ のラインまで $1\times\text{PBS}$ で満たした。N
anoSep 300Kフィルタと $1\times\text{PBS}$ 緩衝液とを用いた3サイクルの限外濾過に
よって、過剰なSAVを除去した。遠心分離の各サイクルは、 5000rpm で20分間
行われて、各サイクル後に約 $400\mu\text{l}$ の $1\times\text{PBS}$ を用いて再分散した。 $100\mu\text{l}$ の
PBS中に最終濃縮物を再分散した。

【0090】

[実施例4 リガンド-ナノ粒子コンジュゲートを用いた、細胞上での5-メチルシトシ
ンのインサイチュ検出]

ガラススライドを用いて、染色体スプレッドを、標準的なプロトコルを用いて調製する。
スライドを、適切なブロッキング剤で処理してから、615放射QDに結合されたマウ
スモノクローナル抗5-メチルシトシン（PBS中に1：1000の希釈）中で、湿性チャン
バ内で37℃にて1時間インキュベートした。スライドを、必要に応じてPBSで1
回又は複数回洗浄する。

【0091】

対比染色を、4',6-ジアミジノ-2-フェニルインドール（DAPI）で実行してから、
マウントして、UV/青色励起源で励起された際の615nmの放射を検出することが
できる蛍光顕微鏡又は蛍光検出器を用いて観察する。

【0092】

或いは、スライドを、615放射QDに結合されたマウスモノクローナル抗5-メチル
シトシン（PBS中で1：1000の希釈）中で、湿性チャンバ内で37℃にて1時間更
にインキュベートする工程を含む複数の染色手順を使用して、シグナルを増幅させてよい
。洗浄の後、スライドを、615放射QDに結合されたウサギ抗マウスIgG（PBS中
で1：500の希釈）中で、湿性チャンバ内で37℃にて1時間インキュベートする。更
に所望であれば、PBSで洗浄した後に、スライドを、615放射QDに結合されたマウ
ス抗ウサギIgG（PBS中で1：500の希釈）と、湿性チャンバ内で37℃にて1時
間インキュベートする。更に所望であれば、PBSで洗浄した後に、スライドを、615
放射QDに結合されたマウス抗ウサギIgG（PBS中で1：500の希釈）と、湿性チ
ャンバ内で37℃にて1時間インキュベートする。代替的な実施形態においては、それら
工程の抗体の1又は複数は、QDに結合されていない。

【0093】

[実施例5 リガンド-ナノ粒子コンジュゲートを用いた、細胞中でのDNAメチル化の

10

20

30

40

50

検出]

別の実施形態において、リガンド・ナノ粒子コンジュゲートを、生組織サンプル、又は細胞培養において培養した生細胞培養体に導入する。リガンド・ナノ粒子コンジュゲートの適切なメチル化特異的結合リガンドとして、以下に限定されないが、抗メチル化ベースの特異的抗体が挙げられる。リガンド・ナノ粒子コンジュゲートを、メチル化DNA領域、又は活性DNAメチル化領域（メチル化されたシトシン又はアデノシン、例えば5 - メチルシトシン、5 - ヒドロキシメチルシトシン、5 - ホルミルシトシン、5 - カルボキシルシトシン、及び/又はN⁶ - メチルアデニンを示す）に接触させる。リガンド・ナノ粒子コンジュゲートを、光源によって励起させる。リガンド・ナノ粒子コンジュゲートによる光放射又は光吸収を測定して、定量化する。検出を、リアルタイムに実行することができる。

10

【0094】

[実施例6 リガンド・ナノ粒子コンジュゲートを用いた、細胞内でのDNAメチル化のインビボ検出]

別の実施形態において、リガンド・ナノ粒子コンジュゲートを、生物にインビボ導入する。そのような生物として、原核生物、又は哺乳類を含む真核生物が挙げられる。リガンド・ナノ粒子コンジュゲートの適切なメチル化特異的結合リガンドとして、以下に限定されないが、抗5 - メチルシトシン抗体、抗5 - ヒドロキシメチルシトシン抗体、抗5 - ホルミルシトシン抗体、抗5 - カルボキシルシトシン抗体、及び/又は抗N⁶ - メチルアデニン抗体が挙げられる。リガンド・ナノ粒子コンジュゲートを、メチル化DNA領域又は活性DNAメチル化領域（5 - メチルシトシン、5 - ヒドロキシメチルシトシン、5 - ホルミルシトシン、5 - カルボキシルシトシン、及び/又はN⁶ - メチルアデニンを示す）に接触させる。リガンド・ナノ粒子コンジュゲートを、光源によって、インビボで、又は組織サンプルを検出のために生物から取り出したならばエクスピボで励起する。リガンド・ナノ粒子コンジュゲートによる光放射又は光吸収を測定して、定量化する。検出は、リアルタイムに実行することができる。

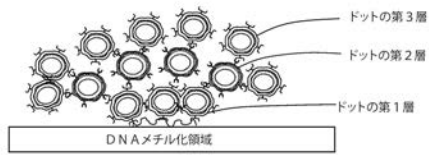
20

【0095】

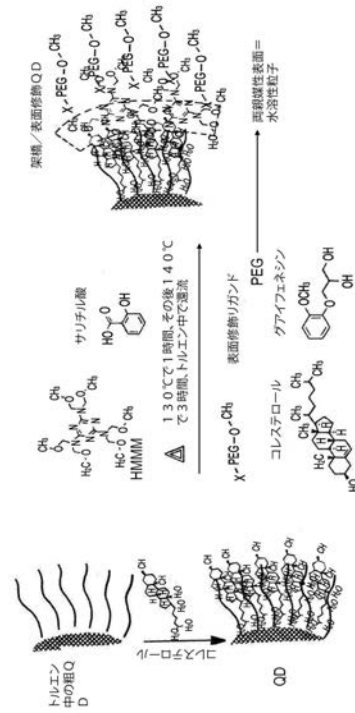
本明細書で引用した全ての刊行物、特許及び特許出願は、その全体が本明細書に記載されているものとして、参照により本明細書の一部となる。本発明のこれら及び他の利点は、前述の明細書から当業者には明らかであろう。故に、本発明の広範な発明概念から逸脱することなく、上述の実施形態に変更又は修正を加えられ得ることを当業者は理解すべきである。本発明は、本明細書に記載の特定の実施形態に限定されず、本発明の範囲及び思想内にあるすべての変更及び修正を含むことを意図していることを理解のこと。

30

【図 1】



【図 2】



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/GB2017/051968

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. A61K49/00 G01N33/53 G01N33/58 B82Y15/00 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) A61K G01N B82Y		
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) EP0-Internal, WPI Data, EMBASE, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y A	KR 2016 0009357 A (UNIV KOREA RES & BUS FOUND [KR]) 26 January 2016 (2016-01-26) examples 5, 6 -----	1,2, 14-20 2 3-13
X Y A	CN 104 513 862 A (GUANGZHOU INST BIOMED & HEALTH) 15 April 2015 (2015-04-15) paragraph [0025] - paragraph [0034] paragraph [0019] - paragraph [0020] ----- -/--	1,14-20 2 3-13
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ 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
22 September 2017		02/10/2017
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
		Monami, Amélie

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/GB2017/051968

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CHENCHEN GE ET AL: "A simple colorimetric detection of DNA methylation", ANALYST, vol. 137, no. 9, 1 January 2012 (2012-01-01), page 2032, XP055408736, ISSN: 0003-2654, DOI: 10.1039/c2an35043b abstract scheme 1 page 2035, column 1, paragraph 3 -----	1-20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/GB2017/051968

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
KR 20160009357 A	26-01-2016	NONE	

CN 104513862 A	15-04-2015	NONE	

フロントページの続き

(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, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, 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, 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, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT

Fターム(参考) 4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 BA60 BA63 DA76 EA50 FA50
FA81

专利名称(译)	配体缀合的量子点纳米粒子和使用其检测DNA甲基化的方法		
公开(公告)号	JP2019529341A	公开(公告)日	2019-10-17
申请号	JP2018568968	申请日	2017-07-04
[标]申请(专利权)人(译)	纳米技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	Nanoko科技有限公司		
[标]发明人	ナーサニイマド		
发明人	ナーサニ,イマド		
IPC分类号	C07K17/00 C07K16/18 C12Q1/6804 G01N33/53		
CPC分类号	A61K49/0058 A61K49/0067 B82Y15/00 G01N33/00 G01N33/5308 G01N33/588 C12Q1/6804 G01N33/54346 G01N33/54353 C12Q1/00 G01N33/533 G01N33/582		
FI分类号	C07K17/00 C07K16/18 C12Q1/6804.Z G01N33/53.M		
F-TERM分类号	4B063/QA01 4B063/QA07 4B063/QA11 4B063/QQ02 4B063/QQ42 4B063/QR48 4B063/QR66 4B063/QR82 4B063/QS02 4B063/QS24 4B063/QS33 4B063/QX01 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA60 4H045/BA63 4H045/DA76 4H045/EA50 4H045/FA50 4H045/FA81		
优先权	62/358326 2016-07-05 US 15/637890 2017-06-29 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本公开涉及共轭量子点纳米粒子，制备这种共轭量子点纳米粒子的方法以及使用这种共轭量子点纳米粒子检测DNA甲基化的方法。

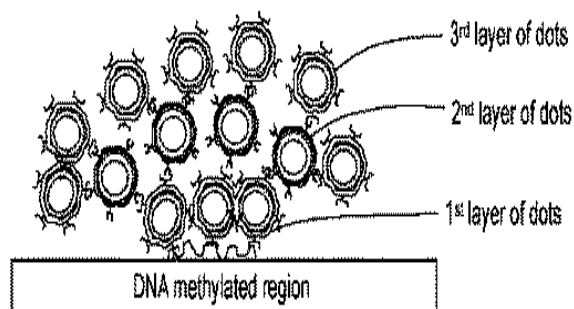


Fig. 1