

(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2016-509016

(P2016-509016A)

(43) 公表日 平成28年3月24日 (2016. 3. 24)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C07D 487/22 (2006.01)	C07D 487/22	CSP 4C050
A61K 49/00 (2006.01)	A61K 49/00	A 4C085
C07F 5/00 (2006.01)	C07F 5/00	H 4H048
C07F 5/06 (2006.01)	C07F 5/06	E

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 40 頁)

(21) 出願番号 特願2015-557213 (P2015-557213)
 (86) (22) 出願日 平成26年2月12日 (2014. 2. 12)
 (85) 翻訳文提出日 平成27年9月30日 (2015. 9. 30)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2014/015951
 (87) 国際公開番号 W02014/126968
 (87) 国際公開日 平成26年8月21日 (2014. 8. 21)
 (31) 優先権主張番号 61/764, 127
 (32) 優先日 平成25年2月13日 (2013. 2. 13)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 508032284
 カリフォルニア インスティテュート オブ テクノロジー
 アメリカ合衆国, カリフォルニア州 91125, パサデナ, イースト・カリフォルニア・ブールヴァード 1200, エムシー 6-32
 (71) 出願人 513177543
 チルドレンズ ホスピタル ロサンゼルス
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 90027 ロサンゼルス サンセット ブールヴァード 4650 エムエス84
 (74) 代理人 100147485
 弁理士 杉村 憲司

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 金属酸化物のスルホン酸エステル及びその使用の方法

(57) 【要約】

本発明は、式I及びIIで表されるものを含む金属酸化物のスルホン酸エステル類を対象とする。

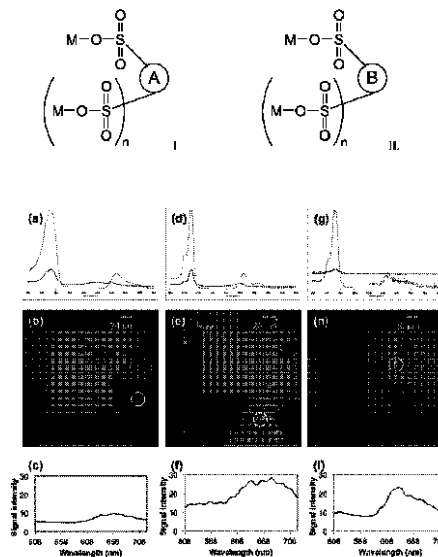
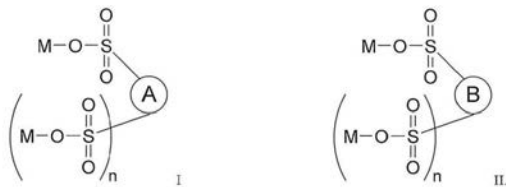


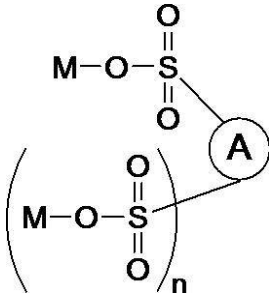
FIGURE 1

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

式 I

【化 1】



10

に記載の物質であって、

式中Aはコロリル又は金属化コロリルであり；

MはTiO₂、BaTiO₃、SnO₂、Al₂O₃、Fe₂O₃、Fe₃O₄、ZrO₂、CeO₂、CdO、Cr₂O₃、CuO、MnO、Mn₂O₃、MnO₂、NiO、SnO、SnO₂、SiO₂、又はZnOが含まれる表面であり；及び

nは0又は1である、

物質。

【請求項 2】

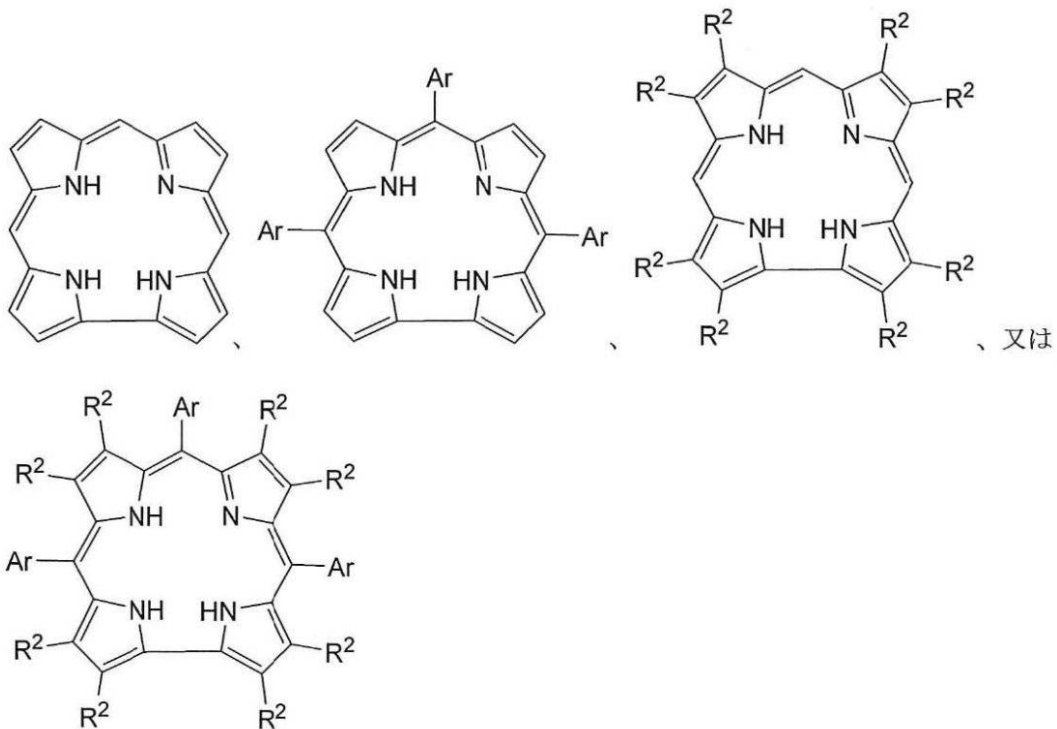
表面はナノ粒子表面である、請求項 1 に記載の物質。

20

【請求項 3】

コロールは

【化 2】



30

40

であって；

式中、

Arはフェニル又はナフチルであり、フェニル又はナフチルはハロゲン及び-NR³R⁴からなる群より無関係に選択される1以上の置換基で随意に置換され、R³及びR⁴はそれぞれ無関係にH、C₁₋₁₀アルキル、C₁₋₁₀アルケニル、若しくは-アルカリール(-alkaryl)であり；

50

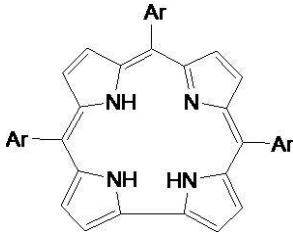
又は R^3 及び R^4 は、それらが結合している窒素原子と共に、 C_{1-6} アルキルで随意に置換されるヘテロシクロアルキル環を形成し；及び

各 R^2 は無関係にH、 C_{1-6} アルキル、ハロゲン、又はM-O-SO₂-である、請求項1又は請求項2に記載の物質。

【請求項4】

コロールは

【化3】



10

である、請求項1～3のいずれか一項に記載の物質。

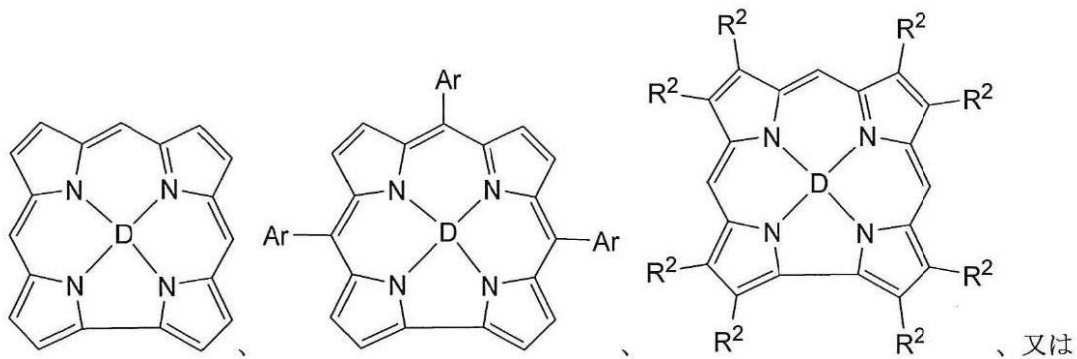
【請求項5】

各Arはペンタフルオロフェニルである、請求項4に記載の物質。

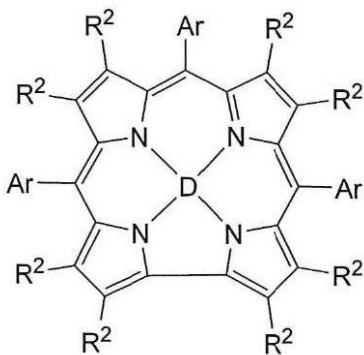
【請求項6】

金属化コロールは

【化4】



20



30

であり；

式中、

DはAl、Ga、Fe、Mn、Sb、Co、Cr、Rh、Ru、Ro、Ir、V、Re、Cu、Sn、Ge、Ti、又はMoであり、それぞれ随意に1以上の配位子が配位する、請求項1又は請求項2に記載の物質。

【請求項7】

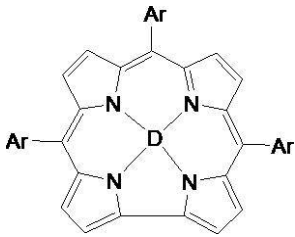
DはAl又はGaである、請求項6に記載の物質。

【請求項8】

金属化コロールは

40

【化 5】



である、請求項 6 又は 7 に記載の物質。

【請求項 9】

各Arはペンタフルオロフェニルである、請求項 8 に記載の物質。

10

【請求項 10】

DはAl(配位子)₂又はGa(配位子)である、請求項 6 ~ 8 のいずれか一項に記載の物質。

【請求項 11】

配位子はピリジンである、請求項 10 に記載の物質。

【請求項 12】

nは0である、請求項 1 ~ 11 のいずれか一項に記載の物質。

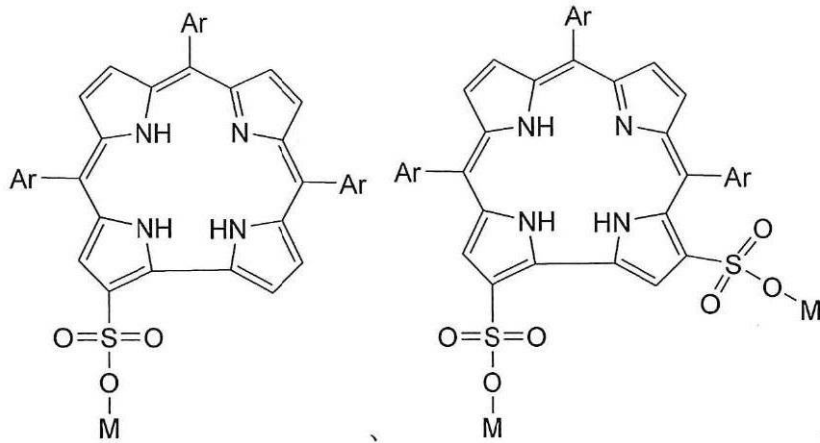
【請求項 13】

nは1である、請求項 1 ~ 12 のいずれか一項に記載の物質。

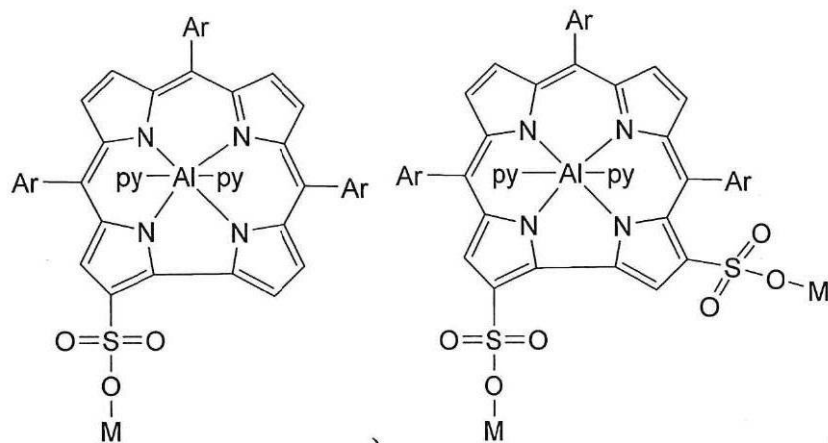
【請求項 14】

20

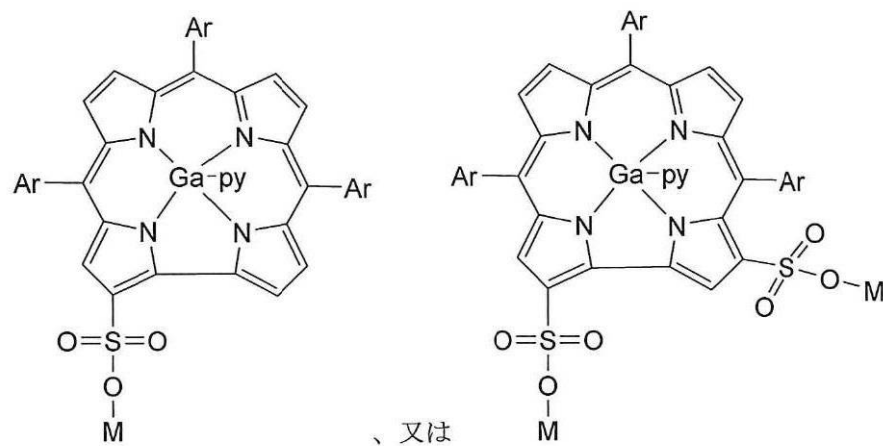
【化 6】



10



20



30

40

である、請求項 1 ~ 13 のいずれか一項に記載の物質。

【請求項 15】

各Arはペンタフルオロフェニルである、請求項 14 に記載の物質。

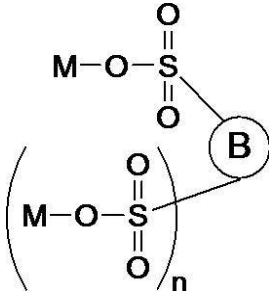
【請求項 16】

MはTiO₂である、請求項 14 又は請求項 15 に記載の物質。

【請求項 17】

式II

【化7】



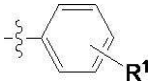
11

10

に記載の物質であって、

式中Bは-NCO、C₁₋₁₀アルキル、又は

【化8】



であり；R¹は-COOH、-COO-C₁₋₆アルキル、C₁₋₆アルキル、又はハロゲン若しくはC₁₋₆アルキルで随意に置換されるアリールであり；

MはTiO₂、BaTiO₃、SnO₂、Al₂O₃、Fe₂O₃、Fe₃O₄、ZrO₂、CeO₂、CdO、Cr₂O₃、CuO、MnO、Mn₂O₃、MnO₂、NiO、SnO、SnO₂、SiO₂、BaTiO₃、又はZnOが含まれる表面であり；及びnは0又は1である、

20

物質。

【請求項18】

表面はナノ粒子表面である、請求項17に記載の物質。

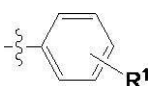
【請求項19】

Bは-NCOである、請求項17又は請求項18に記載の物質。

【請求項20】

Bは

【化9】



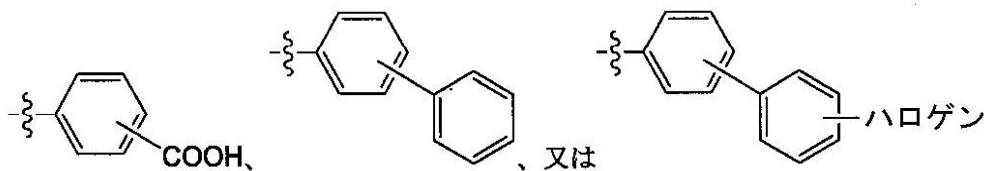
である、請求項17又は請求項18に記載の物質。

30

【請求項21】

Bは

【化10】



40

である、請求項20に記載の物質。

【請求項22】

nは0である、請求項17～21のいずれか一項に記載の物質。

【請求項23】

nは1である、請求項17～21のいずれか一項に記載の物質。

【請求項24】

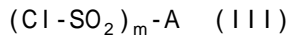
請求項1に記載の物質の製造方法であって、

TiO₂、BaTiO₃、SnO₂、Al₂O₃、Fe₂O₃、Fe₃O₄、ZrO₂、CeO₂、CdO、Cr₂O₃、CuO、MnO、Mn₂O₃、MnO₂、NiO、SnO、SnO₂、SiO₂、又はZnOが含まれ、及び少なくとも1つの-OH基を有す

50

る表面を、

式 III :



で表され、

式中Aはコロリル又は金属化コロリルであり；及び

式中mは1又は2である化合物と接触させること

を含む方法。

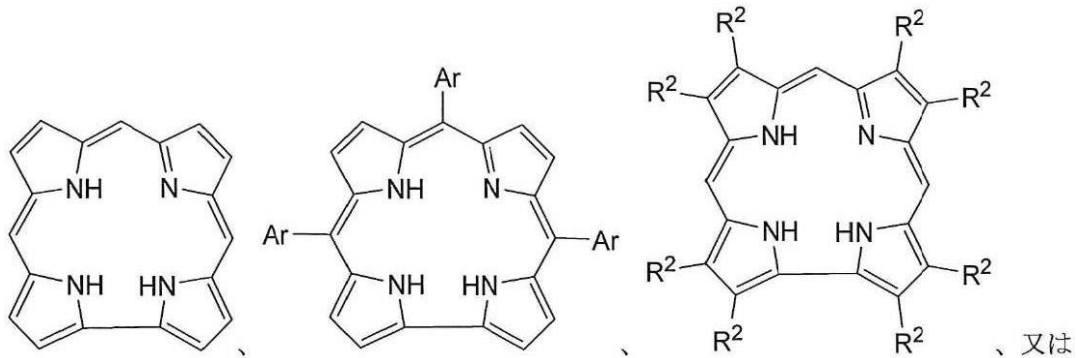
【請求項 2 5】

表面はナノ粒子表面である、請求項 2 4 に記載の方法。

【請求項 2 6】

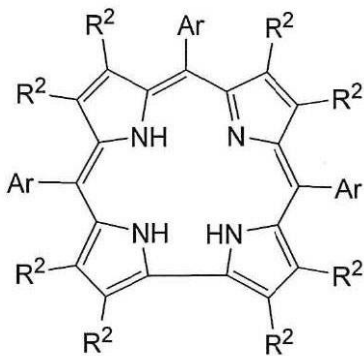
コロールは

【化 1 1】



10

20



30

であり；

式中

Arはフェニル又はナフチルであり、フェニル又はナフチルはハロゲン及び-NR³R⁴からなる群より無関係に選択される1以上の置換基で随意に置換され、R³及びR⁴はそれぞれ無関係にH、C₁₋₁₀アルキル、C₁₋₁₀アルケニル、若しくは-アルカリールであり；又はR³及びR⁴は、それらが結合している窒素原子と共にヘテロシクロアルキル環を形成し；及び

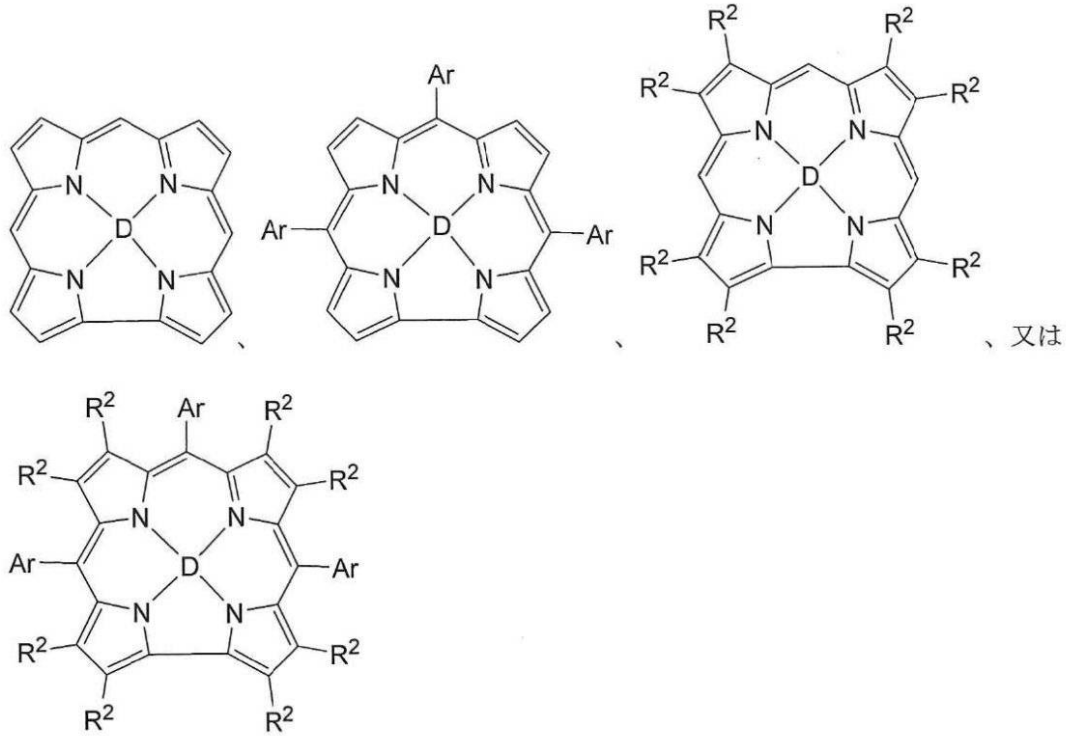
各R²は無関係にH、C₁₋₆アルキル、ハロゲン、又はM-O-SO₂-である、請求項 2 4 又は請求項 2 5 に記載の方法。

40

【請求項 2 7】

金属化コロールは

【化 1 2】



であり；

式中、

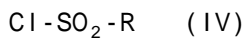
DはAl、Ga、Fe、Mn、Sb、Co、Cr、Rh、Ru、Ro、Ir、V、Re、Cu、Sn、Ge、Ti、又はMoであり、それぞれ随意に1以上の配位子が配位する、請求項 2 4 又は請求項 2 5 に記載の方法。

【請求項 2 8】

請求項 1 7 に記載の物質の製造方法であって、

TiO₂、BaTiO₃、SnO₂、Al₂O₃、Fe₂O₃、Fe₃O₄、ZrO₂、CeO₂、CdO、Cr₂O₃、CuO、MnO、Mn₂O₃、MnO₂、NiO、SnO、SnO₂、SiO₂、又はZnOが含まれ、及び少なくとも1つの-OH基を有する表面を、

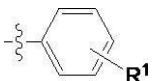
式 IV：



で表され、

式中Rは-NCO、C₁₋₆アルキル、又は

【化 1 3】



であり；R¹は-C(O)OH、-C(O)O-C₁₋₆アルキル、C₁₋₆アルキル、又はハロゲン若しくはC₁₋₆アルキルで随意に置換されるアールである化合物と接触させることを含む方法。

【請求項 2 9】

表面はナノ粒子表面である、請求項 2 8 に記載の方法。

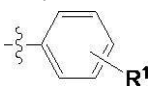
【請求項 3 0】

Bは-NCOである、請求項 2 8 又は請求項 2 9 に記載の方法。

【請求項 3 1】

Bは

【化 1 4】



10

20

30

40

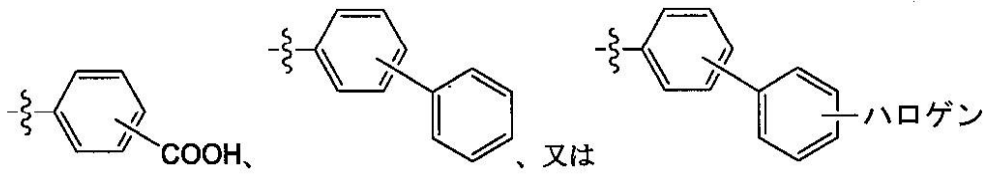
50

である、請求項 2 8 又は請求項 2 9 に記載の方法。

【請求項 3 2】

Bは

【化 1 5】



10

である、請求項 3 1 に記載の方法。

【請求項 3 3】

nは0である、請求項 2 8 ~ 3 2 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 4】

Nは1である、請求項 2 8 ~ 3 2 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 5】

ペイシェントにおけるがんのイメージング方法であって、

ペイシェントに、Aが金属化コロリルである請求項 1 に記載の物質を施与することと；

光学イメージングを用いてがん細胞をイメージングすること

20

を含む方法。

【請求項 3 6】

光学イメージングは蛍光イメージングである、請求項 3 5 に記載の方法。

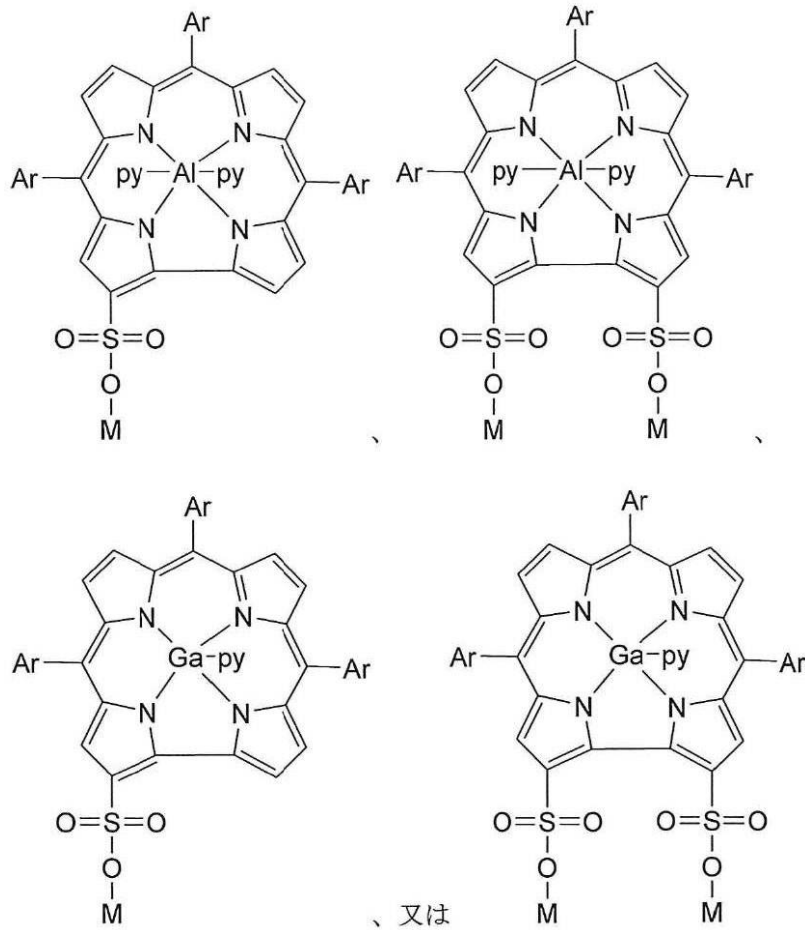
【請求項 3 7】

がんは膠芽（細胞）腫、黒色腫、乳癌、肝臓癌、又は結腸癌である、請求項 3 5 又は 3 6 に記載の方法。

【請求項 3 8】

請求項 1 に記載の物質は

【化 1 6】



10

20

である、請求項 35 ~ 37 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 39】

Ar はペンタフルオロフェニルである、請求項 38 に記載の方法。

【請求項 40】

M は TiO₂ である、請求項 37 又は請求項 38 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本願は、2013年2月13日に出願された米国仮出願第61/764,127号の優先権の利益を主張し、その開示全体は参照によりここに組み込まれる。

【0002】

本発明は、金属酸化物のスルホン酸エステル及びそれらの使用を対象とする。

【背景技術】

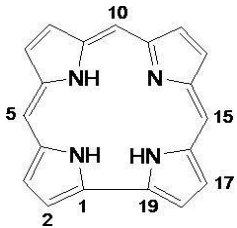
【0003】

コロールはテトラピロール大環状化合物である。

30

40

【化1】



コロール

【先行技術文献】

【非特許文献】

10

【0004】

【非特許文献1】Aviv, I., Gross, Z., Chem. Commun., 2007, 1987-1999

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

コロールは、酸化、ヒドロキシル化、ヒドロペルオキシ化、エポキシ化、スルホキシド化、還元、及び基転移反応などの化学合成の分野における触媒として、ますます有用となっている。Aviv (アビブ), I.; Gross (グロス), Z. 著、Chem. Commun. (ケミカル・コミュニケーションズ)、2007年、1987頁～1999頁を参照。それらの物理化学的特性に基づき、コロールはセンサー分野及び生物医学分野で有用である可能性があると想定される。同文献。化学合成、センサー、生物医学、及びその他の分野で有用なコロール系物質が必要とされている。

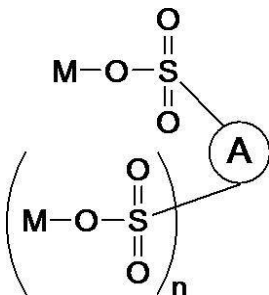
20

【課題を解決するための手段】

【0006】

本発明は式Iで表される物質を対象とし、

【化2】



I

式中Aはコロール (corrolyl) 又は金属化コロール (metallated corrolyl) であり; MはTiO₂、BaTiO₃、SnO₂、Al₂O₃、Fe₂O₃、Fe₃O₄、ZrO₂、CeO₂、CdO、Cr₂O₃、CuO、MnO、Mn₂O₃、MnO₂、NiO、SnO、SnO₂、SiO₂、又はZnOが含まれる表面であり; 及びnは0又は1である。

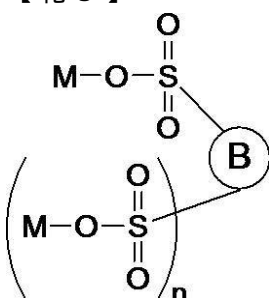
30

【0007】

40

本発明は式IIに記載の物質をも対象とし、

【化3】

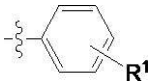


50

II

式中Bは-NCO、 C_{1-10} アルキル、又は

【化4】



であり； R^1 は-COOH、-COO- C_{1-6} アルキル、 C_{1-6} アルキル、又はハロゲン若しくは C_{1-6} アルキルで随意に置換されるアリールであり；Mは TiO_2 、 $BaTiO_3$ 、 SnO_2 、 Al_2O_3 、 Fe_2O_3 、 Fe_3O_4 、 ZrO_2 、 CeO_2 、 CdO 、 Cr_2O_3 、 CuO 、 MnO 、 Mn_2O_3 、 MnO_2 、 NiO 、 SnO 、 SnO_2 、 SiO_2 、 $BaTiO_3$ 、又は ZnO が含まれる表面であり；及びnは0又は1である。

【0008】

式I及びIIで表される物質の製造方法がここに記載されている。光学イメージングなどの用途に本発明の物質を使用する方法も記載されている。

【図面の簡単な説明】

【0009】

【図1】1- TiO_2 [(a), (b), (c)]、1-Al- TiO_2 [(d), (e), (f)]、及び1-Ga- TiO_2 [(d), (e), (f)]の共焦点蛍光顕微鏡画像を示す。

【図2】染料機能化前後の本発明の TiO_2 ナノ粒子の透過電子顕微鏡(TEM)画像を示す。(a及びd)最初の TiO_2 ナノ粒子の画像。(b及びe)過酸化エッチング後のナノ粒子の画像。(c及びf)染料機能化後のナノ粒子の画像。スケールバーは、画像の上段では25 nm、下段では100 nmである。

【図3】リン酸緩衝生理食塩水pH 7.4中での両親媒性コロール($H_3tpfc(SO_2OH)_2$)及び本発明のコロール- TiO_2 ナノ複合体の電子吸収スペクトルを示す。

【図4】0.2 $\mu g/mL$ の本発明の好適な実施態様(1-Al- TiO_2)で処理してから(a)24時間後、(b)48時間後、及び(c)72時間後の、U87-Luc細胞の共焦点蛍光顕微鏡画像を示す。

【図5】0.2 $\mu g/mL$ の本発明の好適な実施態様(1-Al- TiO_2)で処理してから(a)48時間後及び(b)72時間後の、0.5- μm のスライス間隔で採取した個々のU87-Luc細胞のZスタック共焦点蛍光顕微鏡画像を示す。

【図6】生物発光アッセイを用いた、様々な濃度(2 ng/mL~2 mg/mL)の本発明の好適な実施態様(1-Al- TiO_2)で処理したU87-Luc細胞の細胞生存率プロットを示す。

【図7】様々な濃度(0.3 ng/mL~0.3 mg/mL)の本発明の好適な実施態様(1-Al- TiO_2)で、24時間及び48時間処理したマウス初代肝細胞(MPH)の結果を示す。

【図8】 TiO_2 ナノ粒子及び本発明の好適な物質のATR-IRスペクトルを示す。

【図9】 TiO_2 ナノ粒子及び本発明の好適な物質の正規化ATR-IRスペクトルを示す。

【図10】F(1s)バンドを呈する1- TiO_2 、1-Al- TiO_2 、及び1-Ga- TiO_2 のナノ複合体のX線光電子スペクトルを示す。

【発明を実施するための形態】

【0010】

本発明は、- SO_2 -結合を介してコロール又は金属化コロールに共有結合している金属酸化物を含む物質、好適にはナノ粒子物質に関する。本発明の物質の製造に用いる金属酸化物は、少なくとも1つの-OH基を有するものを含む。そのような金属酸化物は当該分野で知られており、以下でさらに詳細に記載されている。

【0011】

本発明の一実施態様は式Iに記載の物質に関し、

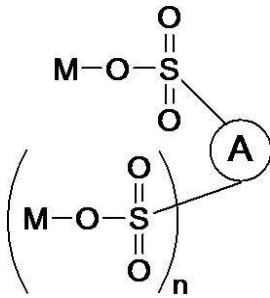
10

20

30

40

【化5】



I

10

式中Aはコロリル又は金属化コロリルであり；

MはTiO₂、BaTiO₃、SnO₂、Al₂O₃、Fe₂O₃、Fe₃O₄、ZrO₂、CeO₂、CdO、Cr₂O₃、CuO、MnO、Mn₂O₃、MnO₂、NiO、SnO、SnO₂、SiO₂、又はZnOが含まれる表面であり；及び

nは0又は1である

【0012】

本発明の範囲内で、Mは、少なくとも1つの-OH基を有する金属酸化物などの金属酸化物が含まれる表面である。-OH基は、表面に固有に存在していてもよい。あるいは、少なくとも1つの-OH基が、過酸化水素などの試薬で表面を酸化することにより組み込まれてもよい。本発明で用いる好適な表面には、TiO₂、BaTiO₃、SnO₂、Al₂O₃、Fe₂O₃、Fe₃O₄、ZrO₂、CeO₂、CdO、Cr₂O₃、CuO、MnO、Mn₂O₃、MnO₂、NiO、SnO、SnO₂、SiO₂、及びZnOなどの金属酸化物が含まれる。諸実施態様において、表面にはTiO₂が含まれる。諸実施態様において、表面にはBaTiO₃が含まれる。諸実施態様において、表面にはSnO₂が含まれる。諸実施態様において、表面にはAl₂O₃が含まれる。諸実施態様において、表面にはFe₂O₃が含まれる。諸実施態様において、表面にはFe₃O₄が含まれる。諸実施態様において、表面にはZrO₂が含まれる。諸実施態様において、表面にはCeO₂が含まれる。諸実施態様において、表面にはCdOが含まれる。諸実施態様において、表面にはCr₂O₃が含まれる。諸実施態様において、表面にはCuOが含まれる。諸実施態様において、表面にはMnOが含まれる。諸実施態様において、表面にはMn₂O₃が含まれる。諸実施態様において、表面にはMnO₂が含まれる。諸実施態様において、表面にはNiOが含まれる。諸実施態様において、表面にはSnOが含まれる。諸実施態様において、表面にはSnO₂が含まれる。諸実施態様において、表面にはSiO₂が含まれる。諸実施態様において、表面にはZnOが含まれる。

20

30

【0013】

好適な実施態様において、表面はナノ粒子表面である。

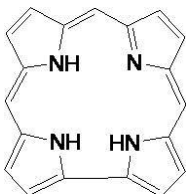
【0014】

諸実施態様において、nは0である。他の実施態様において、nは1である。

【0015】

本発明で用いるコロールは当該分野で知られており、以下の一般的で表される。

【化6】



40

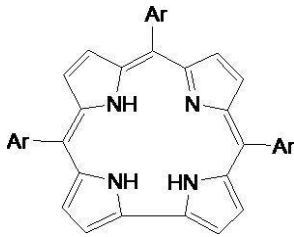
【0016】

ここに記載される本発明のコロールは、利用可能な炭素を介して、本発明のM-OSO₂-部分（複数含む）に結合することができる。

【0017】

本発明で用いる特に好適なコロールは、以下の一般的で表されるものを含む：

【化7】



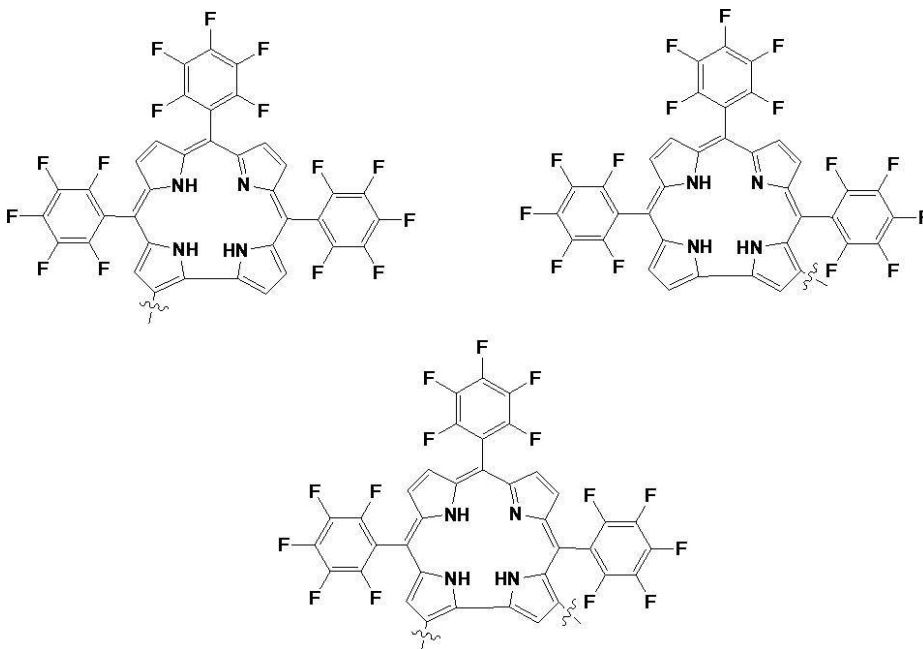
式中、Arはアリール基、例えばフェニル基又はナフチル基である。本発明の諸実施態様において、アリール基は置換されていない。他の実施態様において、アリール基は置換されている。例えば、アリール基がフェニルである場合、フェニルは随意にハロゲンで置換されていてもよく、例えば、1~5のハロゲン、すなわち1以上のF、Cl、Br、又はIで置換されていてもよく、Fは特に好適なハロゲンである。例示的な実施態様において、アリール基はペンタフルオロフェニルである。他の実施態様において、アリール基がナフチルである場合、ナフチルは1~7のハロゲンで随意に置換されていてもよく、Fは特に好適なハロゲンである。

10

【0018】

本発明で用いる特に好適なコロールは、Arがペンタフルオロフェニルであって、

【化8】



20

30

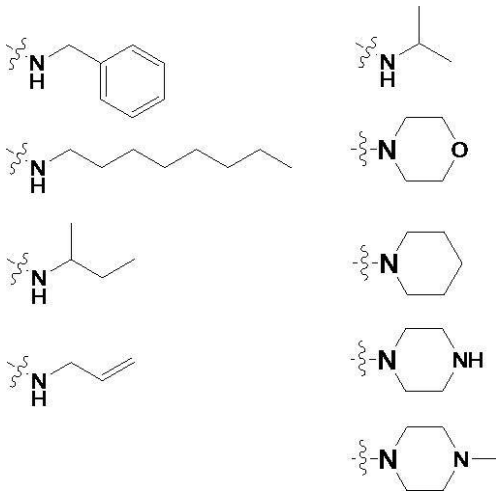
を含む。

【0019】

1以上のハロゲンで置換されていることに加え、アリール基は更に-NR³R⁴で置換することができ、R³及びR⁴は無関係にH、C₁₋₁₀（炭素数1~10の）アルキル、C₁₋₁₀アルケニル、若しくはアルカニルであり；又はR³及びR⁴は、それらが結合している窒素原子と共に、メチル若しくはエチルなどのC₁₋₆アルキルで随意に置換されるヘテロシクロアルキル環を形成する。-NR³R⁴部分の例は、

40

【化9】



10

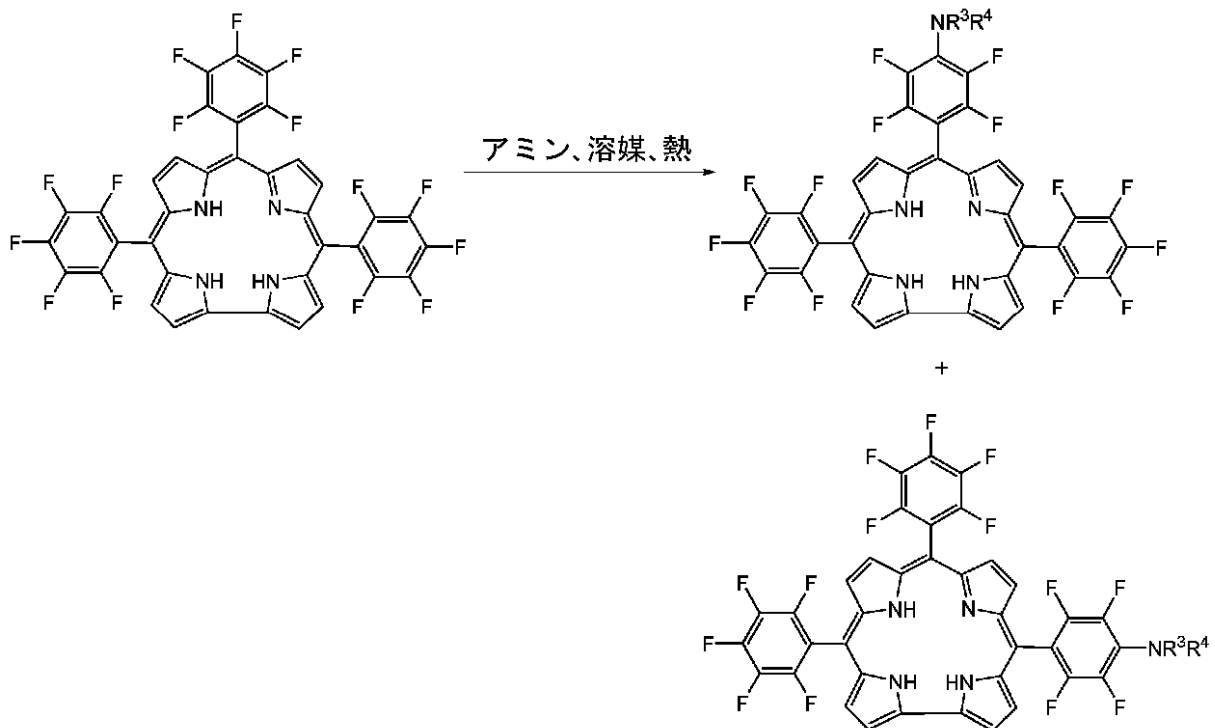
を含む。

【0020】

-NR³R⁴置換アリアル基を含有するコロールは、当技術分野で既知の方法を用いて、例えば求核置換反応を用いて得られる。例えば、Hori (ホリ), T.; Osuka (オツカ), A. 著、Eur. J. Org. Chem. (ヨーロッパ・ジャーナル・オブ・オーガニック・ケミストリー)、2010年、2379頁~2386頁を参照。例えば、-NR³R⁴置換アリアル基を含有するコロールは、以下の合成スキームを用いて得られる。

20

【化10】



30

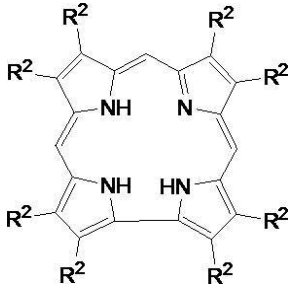
40

求核置換反応で使用され得るアミンは、例えば、ベンジルアミン、オクチルアミン、sec-ブチルアミン、アリルアミン、ジメチルアミン、モルフィリン、ピペリジン、及びN-メチルピペラジンを含む。

【0021】

本発明で用いる別の好適なコロールは、以下の一般的：

【化 1 1】



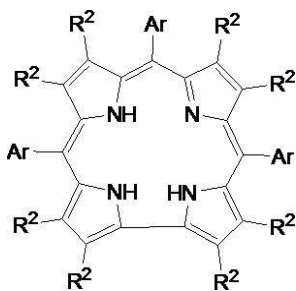
で表され、式中各R²は無関係にH、C₁₋₆アルキル、ハロゲン、又はM-O-SO₂-であり、Mは、
上記の通りである。

10

【0 0 2 2】

本発明で用いる更に別の好適なコロールは、以下の一般的：

【化 1 2】



20

で表され、式中Ar及びR²は前述の通りである。

【0 0 2 3】

本発明で用いるコロールは、金属化されていてもよい。コロールの金属化において、コロールの窒素は金属に配位している。本発明の金属化コロールで用いる金属は、コロールに配位するのに有用であることが当技術分野で既知の金属を含む。コロールの機能及び使用は、配位金属を変えることにより変更され得ることを当業者は理解する。

【0 0 2 4】

例えば、本発明のコロールの金属化で用いる金属は、Al、Ga、Fe、Mn、Sb、Co、Cr、Rh、Ru、Ro、Ir、V、Re、Cu、Sn、Ge、Ti、及びMoを含む。特に好適な金属はAl及びGaを含む。別の好適な金属はFeである。更に別の好適な金属はMnである。本発明で用いる別の金属はSbである。本発明で用いる別の金属はCoである。本発明で用いる別の金属はCrである。本発明で用いる別の金属はRhである。本発明で用いる別の金属はRuである。本発明で用いる別の金属はRoである。本発明で用いる別の金属はIrである。本発明で用いる別の金属はVである。本発明で用いる別の金属はReである。本発明で用いる別の金属はCuである。本発明で用いる別の金属はSnである。本発明で用いる別の金属はGeである。本発明で用いる別の金属はTiである。本発明で用いる別の金属はMoである。

30

【0 0 2 5】

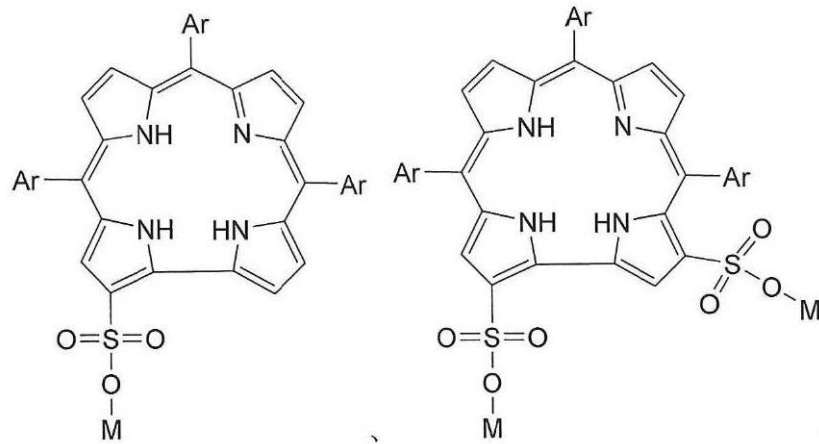
本発明のコロールの金属化で用いる金属は、1以上の配位子に随意に配位していてもよい。そのような配位子は当技術分野で知られており、例えば、ピリジン、ニトロシル、イミド、ニトリド、オキソ、エーテル、ヒドロキシル、クロリド、カルボニル、フルオロ、プロモ、フェニル、ヨード、ホスフィン、アルシンなどを含む。当業者なら、いかなる特定の金属にも適当な配位子を容易に決定することができるであろう。本発明での使用に特に好適な配位子は、ピリジンである。好適な金属-配位子部分はAl(配位子)₂及びGa(配位子)を含み、Al(ピリジン)₂及びGa(ピリジン)は特に好適である。

40

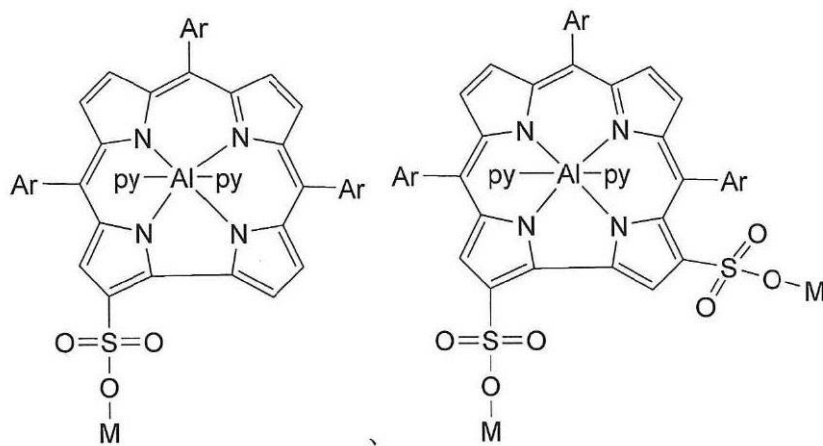
【0 0 2 6】

本発明による式Iで表される例示的な物質は、

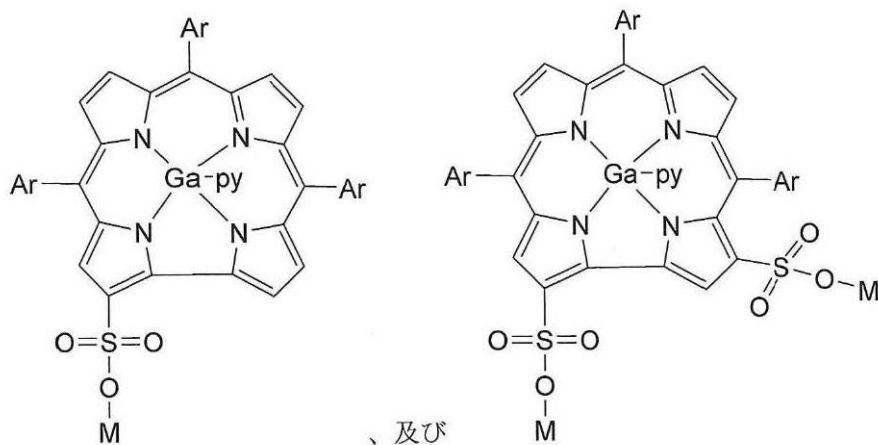
【化 1 3】



10



20



30

、及び

を含み、式中Arはペンタフルオロフェニルである。特に好適な実施態様において、Arはペンタフルオロフェニルであり、MはTiO₂である。

40

【0027】

2,17置換コロールをここに記載してきたが、これらの例は単なる例示であり、本発明を限定するものではない。コロール又は金属化コロールのいかなる位置における置換も、本発明の範囲内であると想定される。

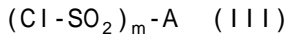
【0028】

式Iで表される物質は、以下の方法により製造され得る：

TiO₂、BaTiO₃、SnO₂、Al₂O₃、Fe₂O₃、Fe₃O₄、ZrO₂、CeO₂、CdO、Cr₂O₃、CuO、MnO、Mn₂O₃、MnO₂、NiO、SnO、SnO₂、SiO₂、又はZnOが含まれ、及び少なくとも1つの-OH基を有する表面を、

50

式III:



で表され、

式中Aはコロール又は金属化コロールであり；及び

式中mは1又は2である

化合物と接触させること。

好適には、本発明の合成方法は、ピリジンなどの有機溶媒中で加熱して実施される。

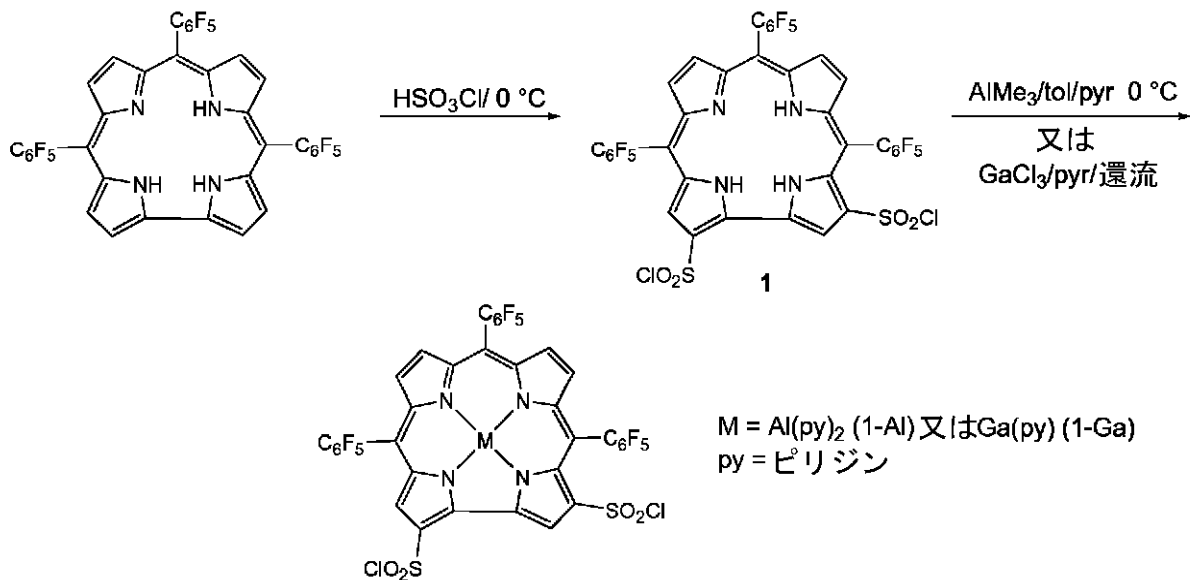
【0029】

式IIIで表される化合物は、当技術分野で知られる方法により製造され得る。例えば、
 (a) Mahammed (マハムド), A.; Goldberg (ゴールドバーグ), I.; Gross (グロス), Z. 著、Org. Lett. (オーガニック・レター)、2001年、3巻、3443頁、(b) Saltsman (ソルツマン), I.; Mahammed, (マハムド) A.; Goldberg (ゴールドバーグ), I.; Tkachecko (トカチェコ), E.; Botoshansky (ボトシャンスキー), M.; Gross (グロス), Z. 著、J. Am. Chem. Soc. (ジャーナル・オブ・アメリカン・ケミカル・ソサエティ)、2002年、124巻、7411頁を参照。Blumenfeld (ブルーメンフェルド), C. M.; Grubbs (グラブス), R. H.; Moats (モーツ), R. A.; Gray (グレイ), H. B.; Sorasaenee (ソラサエネ), K. 著、Inorg. Chem. (インオーガニック・ケミストリー)、2013年、52巻、4774頁も参照。式IIIで表される化合物を製造する方法の一例は、スキーム1に示されている。

10

20

スキーム1



30

40

【0030】

式Iで表される物質のいずれかの製造方法に使用されるコロール又は金属化コロールは、ここに記載されているいずれかのコロール又は金属化コロールであってもよい。

【0031】

好適な本発明の方法において、表面はナノ粒子表面である。他の好適な本発明の方法において、表面はTiO₂を含む。

【0032】

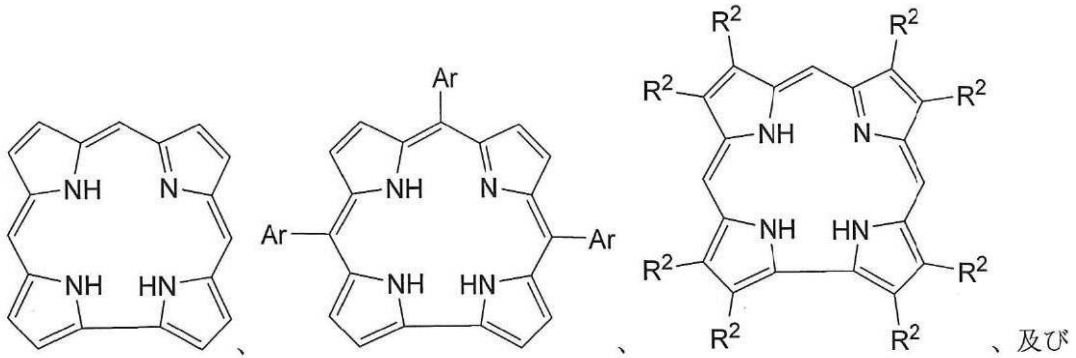
本発明の金属酸化物表面へのコロールのカップリングは、ヒドロキシル化表面を有し、好適にはナノ結晶の形態である本発明の金属を、コロール溶液と混合して加熱、好適には加熱還流することにより実施可能である。大量の溶媒、例えばCH₂Cl₂、アセトン、及び水などで繰り返し洗浄し、真空下で乾燥させた後、粉末が得られる。

50

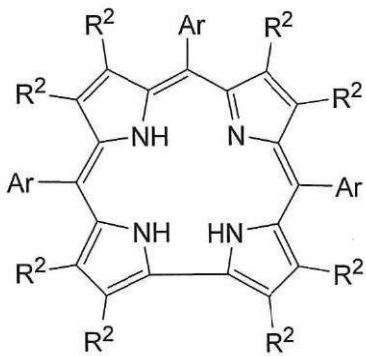
【 0 0 3 3 】

式Iで表される物質の製造方法に使用される好適なコロールは、

【 化 1 5 】



10



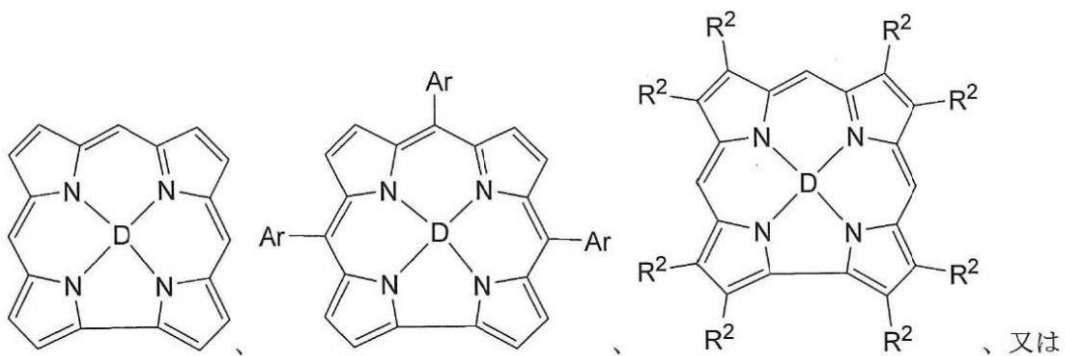
20

を含み、式中Ar及びR²は上述の通りである。

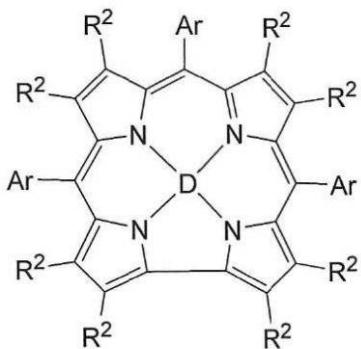
【 0 0 3 4 】

本発明の方法に使用される好適な金属化コロールは、

【 化 1 6 】



30



40

を含み；

50

式中Ar及びR²は上述の通りであり、DはAl、Ga、Fe、Mn、Sb、Co、Cr、Rh、Ru、Ro、Ir、V、Re、Cu、Sn、Ge、Ti、又はMoであり、それぞれ1以上の配位子が随意に配位する。好適な実施態様において、DはAl(ピリジン)₂又はGa(ピリジン)である。

【0035】

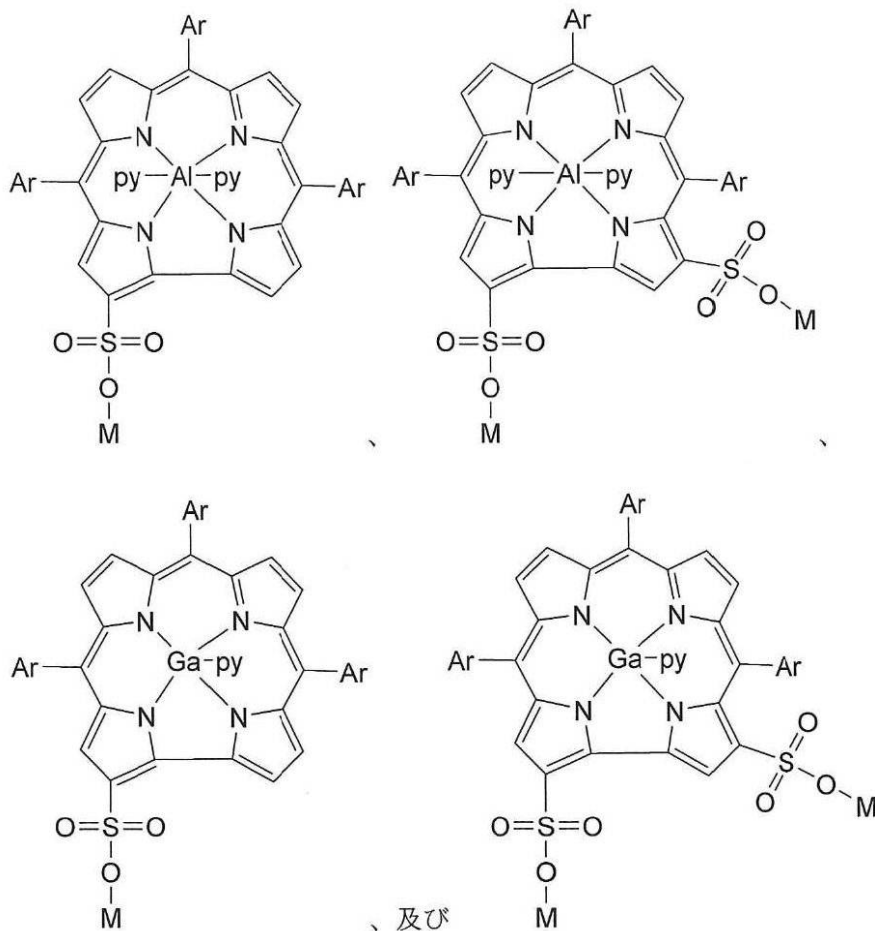
本発明の物質は合成用途、生物医学的用途、および光学イメージング用途に使用することができる。本発明の好適な実施態様において、式Iで表される物質は、ペイシェント(患者を含む)におけるがん(癌を含む)のイメージングに使用される。例えば、式Iに記載の、Aが金属化コロリルである物質がペイシェントに投与される。物質が全てのがん細胞に取り込まれるのに十分な時間がたった後、光学イメージングを用いて、好適には蛍光イメージングを用いて、ペイシェントのがん細胞をイメージングする。本発明の方法を用いてイメージングすることができるがんには、膠芽細胞腫、黒色腫、乳癌、肝臓癌、及び結腸癌が含まれる。

10

【0036】

好適には、本発明のイメージング方法に用いられる物質は、

【化17】



20

30

40

を含み、式中Arはペンタフルオロフェニルであり、Mは好適にはTiO₂である。

【0037】

式Iで表される本発明の物質は、金属化コロールの配位金属を変えることで、力を入れている他分野にも有用となり得る。例えば、本発明の物質は、アルカンのヒドロキシル化及びヒドロペルオキシ化に有用であり得る。本発明の物質は、エポキシ化及びスルホキシド化反応にも有用である。本発明の物質は、例えば還元及び基転移触媒反応などの触媒反応にも有用である。

【0038】

他の実施態様において、式Iで表される本発明の物質は、コロールベースのセンシング

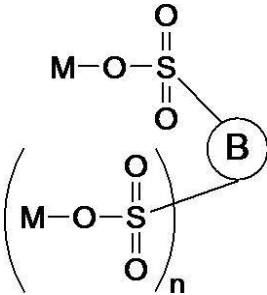
50

アプリケーションや色素増感太陽電池に有用である。他の実施態様において、式Iで表される本発明の物質は抗がん活性を有するか、又は細胞死を防ぐ。他の実施態様において、本発明の物質は、一重項酸素増感に有用である。他の実施態様において、本発明の物質は、リポタンパク質保護と神経保護に有用である。

【0039】

本発明は式IIに記載の物質をも対象とし、

【化18】



10

II

式中Bは-NCO、 C_{1-10} アルキル、又は

【化19】



20

であり； R^1 は-COOH、-COO- C_{1-6} アルキル、 C_{1-6} アルキル、又はハロゲン若しくは C_{1-6} アルキルで随意に置換されるアールであり；

【0040】

Mは TiO_2 、 $BaTiO_3$ 、 SnO_2 、 Al_2O_3 、 Fe_2O_3 、 Fe_3O_4 、 ZrO_2 、 CeO_2 、 CdO 、 Cr_2O_3 、 CuO 、 MnO 、 Mn_2O_3 、 MnO_2 、 NiO 、 SnO 、 SnO_2 、 SiO_2 、又は ZnO が含まれる表面であり；及び
nは0又は1である。

【0041】

本発明の範囲内で、Mは、少なくとも1つの-OH基を有する金属酸化物などの金属酸化物が含まれる表面である。-OH基は、表面に固有に存在していてもよい。あるいは、少なくとも1つの-OH基が、過酸化水素などの試薬で表面を酸化することにより組み込まれてもよい。本発明で用いる好適な表面には、 TiO_2 、 $BaTiO_3$ 、 SnO_2 、 Al_2O_3 、 Fe_2O_3 、 Fe_3O_4 、 ZrO_2 、 CeO_2 、 CdO 、 Cr_2O_3 、 CuO 、 MnO 、 Mn_2O_3 、 MnO_2 、 NiO 、 SnO 、 SnO_2 、 SiO_2 、及び ZnO が含まれる。諸実施態様において、表面には TiO_2 が含まれる。諸実施態様において、表面には $BaTiO_3$ が含まれる。諸実施態様において、表面には SnO_2 が含まれる。諸実施態様において、表面には Al_2O_3 が含まれる。諸実施態様において、表面には Fe_2O_3 が含まれる。諸実施態様において、表面には Fe_3O_4 が含まれる。諸実施態様において、表面には ZrO_2 が含まれる。諸実施態様において、表面には CeO_2 が含まれる。諸実施態様において、表面には CdO が含まれる。諸実施態様において、表面には Cr_2O_3 が含まれる。諸実施態様において、表面には CuO が含まれる。諸実施態様において、表面には MnO が含まれる。諸実施態様において、表面には Mn_2O_3 が含まれる。諸実施態様において、表面には MnO_2 が含まれる。諸実施態様において、表面には NiO が含まれる。諸実施態様において、表面には SnO が含まれる。諸実施態様において、表面には SnO_2 が含まれる。諸実施態様において、表面には SiO_2 が含まれる。諸実施態様において、表面には ZnO が含まれる。

30

40

【0042】

好適な実施態様において、表面はナノ粒子表面である。

【0043】

諸実施態様において、nは0である。他の実施態様において、nは1である。

【0044】

特定の実施態様において、Bは-NCOである。

【0045】

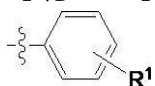
50

他の実施態様において、Bは C_{1-10} アルキルであり、例えばメチル、エチル、プロピル、ブチル、*sec*-ブチル、*tert*-ブチル、ペンチルなどである。

【0046】

更に他の実施態様において、Bは

【化20】



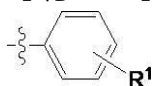
であり； R^1 は $-COOH$ 、 $-COO-C_{1-6}$ アルキル、 C_{1-6} アルキル；又はハロゲン若しくは C_{1-6} アルキルで随意に置換されるアリールである。

10

【0047】

諸実施態様において、Bは

【化21】

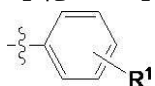


であり； R^1 は $-COOH$ である。

【0048】

他の実施態様において、Bは

【化22】



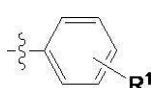
20

であり； R^1 は $-COO-C_{1-6}$ アルキルであり、例えば $-COOMe$ 、 $-COOEt$ 、 $-COOPr$ 、 $-COOBu$ などである。

【0049】

他の実施態様において、Bは

【化23】



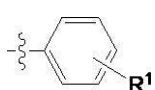
30

であり； R^1 は C_{1-6} アルキルであり、例えばメチル、エチル、プロピル、ブチル、*sec*-ブチル、*tert*-ブチル、ペンチルなどである。

【0050】

更に他の実施態様において、Bは

【化24】



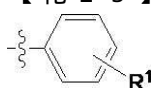
であり； R^1 はアリールであり、例えばフェニル又はナフチルである。これらの実施態様において、アリールはハロゲン又は C_{1-6} のアルキルからなる群より選択される1以上の置換基で随意に置換される。

40

【0051】

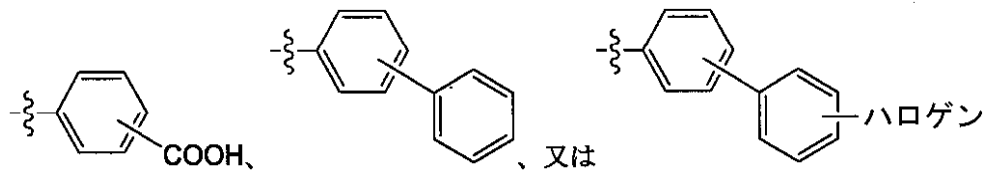
Bが

【化25】



であるこれらの実施態様において、Bは好適には

【化26】



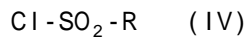
である。

【0052】

式IIで表される物質の製造方法も本発明の範囲内である。本発明によれば、式IIで表される物質は、

TiO₂、BaTiO₃、SnO₂、Al₂O₃、Fe₂O₃、Fe₃O₄、ZrO₂、CeO₂、CdO、Cr₂O₃、CuO、MnO、Mn₂O₃、MnO₂、NiO、SnO、SnO₂、SiO₂、又はZnOが含まれ、及び少なくとも1つの-OH基を有する表面を、

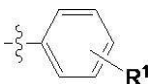
式IV：



で表され、

式中Rは-NCO又は

【化27】



であり；R¹は-C(O)OH、-C(O)O-C₁₋₆アルキル；C₁₋₆アルキル；又はハロゲン若しくはC₁₋₆アルキルで随意に置換されるアリアルである化合物と接触させることにより製造され得る。

【0053】

式IVで表される化合物は、当技術分野で既知の方法を用いて製造することができる。

【0054】

式IIで表される物質は、化学合成の分野において、例えば触媒として有用である。式IIで表される物質は、物質化学の分野においも有用である。

【0055】

ここで用いられる場合、「ハロゲン」という用語はF、Cl、Br、又はIを意味する。

【0056】

ここで用いられる場合、「アルキル」は、特定数の炭素原子を有する分枝鎖又は直鎖脂肪族飽和炭化水素基を意味する。例えば、C₁₋₁₀アルキルは、1~10の炭素原子を有するアルキル基を意味する。好適なアルキル基は、メチル、エチル、プロピル、ブチル、sec-ブチル、tert-ブチル、ペンチル、ヘキシルなどを含む。

【0057】

ここで用いられる場合、「アルケニル」は1以上の二重結合を含む炭化水素鎖を意味する。

【0058】

ここで用いられる場合、「アリアル」はフェニル又はナフチルを意味する。

【0059】

ここで用いられる場合、「アルカリアル」は、アルキレン基を介して結合したアリアル部分、例えばベンジル(-CH₂-フェニル)などを意味する。

【0060】

ここで用いられる場合、「ヘテロシクロアルキル」は、N、O、若しくはSであるヘテロ原子を少なくとも1つ含む5~7員の単環式又は二環式飽和環を意味する。例としては、ピペリジニル、ピペラジニル、モルホリニル、及びピロリジニルが含まれる。

【0061】

10

20

30

40

50

ここで用いられる場合、「コロリル」はコロール部分を意味する。

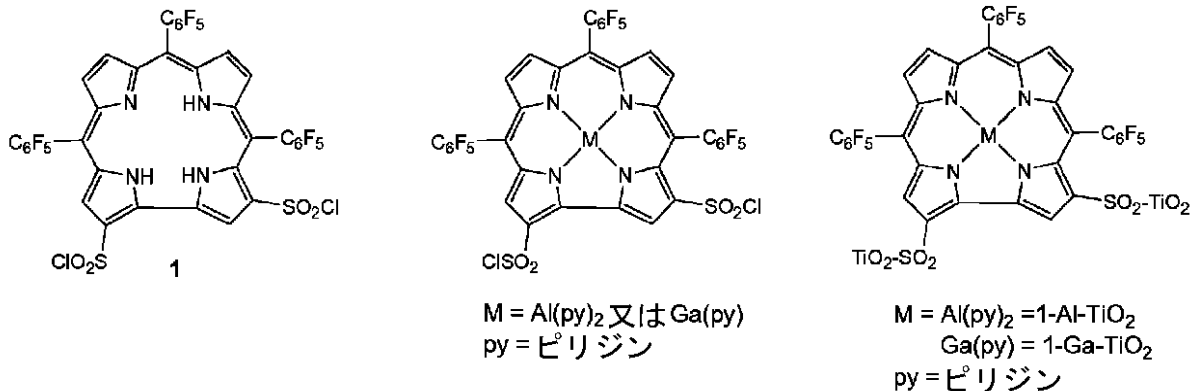
【実施例】

【0062】

以下の例は、本発明の好適な実施態様をより詳細に説明するために提示されている。しかし、これらは決して広範にわたる本発明の範囲を限定するものとして解釈されるべきではない。

実験項

【化28】



10

20

【0063】

原料：2 M AlMe₃トルエン溶液〔Aldrich（アルドリッチ）〕、GaCl₃〔Aldrich〕、HSO₃Cl〔Aldrich〕、21 nmナノパウダー-TiO₂〔Aldrich〕、30% H₂O₂（EMD）を商業的に入手し、そのまま使用した。出発物質5,10,15-トリス（ペンタフルオロフェニル）コロール（H₃tpfc）は文献の方法に基づいて調製した。溶剤ピリジン及びトルエンを、カラム上で乾燥させた。アセトン及びジクロロメタンは、用途に応じて試薬及び分光グレードの両方を使用した。D-ルシフェリンカリウム塩〔Promega（プロメガ）〕、Hoechst（ヘキスト）34580〔Invitrogen™（インビトロゲン）（トレードマーク）〕、Hoechst 33258〔Invitrogen™〕、Sytox Green（シトックス・グリーン）〔Invitrogen™〕、及びFM^(R)（商標）1-43FX〔Invitrogen™〕は、供給元の指示に従いそのまま使用した。

30

【0064】

化学的調製：特に断りのない限り、全ての調製をAr（g）雰囲気下で行った。

【0065】

1. コロールの製造：2,17-ビスクロロスルホネート-5,10,15-トリス（ペンタフルオロフェニル）コロール（H₃tpfc(SO₂Cl)₂；1）の製造を、文献の手順に従い実施した。この研究論文に記載の金属化コロールは以下の方法で製造した。

【0066】

1. 1.1-Alの製造：丸底フラスコ内の0.32 gの1（0.32 mmol）のトルエン溶液20-mLに、2 M AlMe₃（1.6 mmol）のトルエン溶液0.8 mLを、氷浴温度で加えた。溶液を10分間攪拌し、続いて無水ピリジン1mLを添加した。溶液を氷上で更に10分間攪拌した。氷片を加えて反応をクエンチした。その後暗緑色溶液をCH₂Cl₂で抽出し、水で洗浄した。溶媒を真空除去し、乾燥した濃緑色固体をCH₂Cl₂に再び溶解させ、続いて濾過を行なった。濾液を乾燥させ、暗緑色固体を得た（0.098 g、収率26%）。

40

ESI-MS（CH₂Cl₂）：m/z：1014.87 [M-H]⁻（C₃₇H₆N₄F₁₅Cl₂S₂O₄Alの計算値：1015.88）；

¹H-NMR（400 MHz，アセトン-d₆，ppm）：= 9.76（s，1 H），9.25（s，1 H），8.97（d，1 H），8.85（d，1 H），8.70（d，1 H），8.58（d，1 H）；

¹⁹F-NMR（376 MHz，アセトン-d₆，ppm）：-138.7（d，4 F），-140.0（d，2 F），-156.9（t，1 F），-157.5（t，1 F），-158.1（t，1 F），-164.9（m，2 F），-165.3（m，2 F），-167.0（m，2 F）；

50

UV-Vis (トルエン:ピリジン, 95:5): $\max (M^{-1} \text{ cm}^{-1}) = 436 (4.08 \times 10^4), 625 (7.66 \times 10^3) \text{ nm}.$

【 0 0 6 7 】

1 . 2 . 1-Gaの製造: 厚肉シュレンクフラスコに、0.20 gの1 (0.20 mmol) と0.57 gのGaCl₃ (3.3 mmol) とをAr(g)下で加えた。フラスコをN₂(l)で冷却し、排気した。15 mLの脱気無水ピリジン (15mL) を、真空供給を介してフラスコに添加した。続いてフラスコを密封し、室温まで温めた。反応容器を1時間かけて120 °Cに加熱した。ピリジン溶液をCH₂Cl₂で希釈し、水で3回洗浄した。その後溶液をガラスウールに通して濾過し、ヘキサンで一晩再結晶化するためある程度濃縮した。その後生成物を濾過して乾燥させ、アセトン、CH₂Cl₂、及びトルエンの組み合わせで洗浄した。収集した濾液を真空乾燥させ、暗緑色固体を得た (0.092 g、収率38%)。

ESI-MS (CH₂Cl₂:ピリジン): m/z: 1056.81 [M-H]⁻ (C₃₇H₈N₄F₁₅Cl₂S₂O₄Gaの計算値: 1057.82);

¹H-NMR (500 MHz, CD₂Cl₂, ppm): $\delta = 9.99 (s), 8.82 (m), 8.73 (m), 8.57 (m);$

¹⁹F-NMR (376 MHz, アセトン-d₆, ppm): $\delta = -138.7 (d), -140.0 (d), -156.9 (t), -157.5 (t), -158.1 (t), -164.9 (m), -165.3 (m), -167.0 (m);$

UV-Vis (トルエン:ピリジン, 95:5): $\max (M^{-1} \text{ cm}^{-1}) = 429 (1.65 \times 10^4), 611 (5.61 \times 10^3) \text{ nm}.$

【 0 0 6 8 】

2 . TiO₂表面活性化: 2.0-L丸底フラスコ中の固体TiO₂ナノ粒子 (10 g) に、30%H₂O₂溶液1.2 Lを加えた。乳白色コロイド懸濁液を、還流しながら5時間攪拌した。冷却後、4での超遠心分離によりオフホワイト固体をH₂O₂溶液から分離し、多量の水で洗浄した。収集した活性化TiO₂ナノ粒子 (TiO₂-OH) を12時間真空乾燥させ、使用前に乾燥させたバイアルに保管した。

【 0 0 6 9 】

3 . 表面複合: コロール1、1-Al、及び1-Gaを活性化TiO₂ナノ粒子表面と複合させるために、以下の一般的手順を利用した: 25-mL丸底フラスコ中の活性化TiO₂とコロールを含む混合固体に無水ピリジンを添加した。懸濁液は直ちに緑色に変わり、反応を停止する前に、還流しながら攪拌した。得られた緑色固体を遠心分離により緑色溶液から分離し、ジクロロメタン、アセトン、及び脱イオン水で、遠心上清が無色になるまで複数回洗浄した。固体は緑色のままであり、真空乾燥させ、さらに使用する時まで保管した。各コロールナノ複合体の詳細な製造手順を以下に示す:

【 0 0 7 0 】

3 . 1 . 1-TiO₂の製造: 25mL丸底フラスコに0.32 gのTiO₂-OHと0.028 gの1 (28.1 μmol) とを加え、その後アルゴン及び真空で循環させた。不活性雰囲気を形成した後、無水ピリジン8mLをフラスコに添加し、反応物を2時間還流した。得られた緑色固体を、一般的な遠心分離と上記の洗浄手順とに従った方法で収集した。

【 0 0 7 1 】

3 . 2 . 1-Al-TiO₂の製造: 40mLのバイアルに1.18 gのTiO₂-OHを加え、その後アルゴン及び真空で循環させた。このフラスコに無水ピリジン5mLを添加し、均一に分散させるために超音波処理をした。別のフラスコに、0.03 gの1-Al (25.5 μmol) と無水ピリジン7 mLとをAr(g)下で加えた。この溶液を攪拌し、その後、シリンジを用いてTiO₂-OH前駆体に添加した。反応物を密封して2時間還流させ、その後、得られた緑色固体を、一般的な遠心分離と上記の洗浄手順とに従った方法で収集した。

【 0 0 7 2 】

3 . 3 . 1-Ga-TiO₂の製造: 40mLのバイアルに0.84 gのTiO₂-OHと0.04 gの1-Ga (32.8 μmol) とを加え、その後アルゴン及び真空で循環させた。不活性雰囲気を形成した後、無水ピリジン8mLをフラスコに添加し、反応物を2時間還流した。得られた緑色固体を、一般的な遠心分離と上記の洗浄手順とに従った方法で収集した。

【 0 0 7 3 】

10

20

30

40

50

分光法：UV-Vis（紫外可視）スペクトルは、室温で、種々の溶媒中のサンプルから、Cary 50（キャリー50）分光光度計又はHewlett-Packard 8453（ヒューレット・パカード8453）ダイオードアレイ分光光度計のどちらかに記録した。IR（赤外）スペクトルは、SensIR Durascope ATR（センスIRデュラスコープATR）アクセサリプレートを用い、Nicolet Magna-IR（ニコレットマグナ-IR）分光計、非冷却焦電型重水素化硫酸トリグリシン（DTGS）検出器、及びKBrビームスプリッターに記録した。¹Hおよび¹⁹F NMRスペクトルは、Varian Mercury 300（バリアンマーキュリー300）（¹Hでは300 MHz、¹⁹Fでは288 MHz）分光計に記録した。NMRスペクトルは、MestReNova（メストレノヴァ）（v. 6.1.1）を用いて分析した。¹H NMR測定は内部溶媒を参照した。蛍光スペクトルは、浜松R928 PMTを備えるJobin-Yvonne/SPEX Fluorolog（ジョバン・イヴォンヌ/SPEXフルオロログ）分光計（モデルFL3-11）を用いて測定した。サンプルは ex = 405 ~ 430 nm（ソーレー帯）、514 nm、及び600 ~ 630 nm（Q帯）で励起され、2 nmの帯域通過があった。蛍光は、2 nm間隔、0.5秒の積分時間、室温にて、励起波長に応じて、em = 500 ~ 800 nmの間で観測された。

10

【0074】

相対蛍光量子収率の測定：1、1-Al、1-Ga、及びテトラフェニルポルフィリン（標準として）の脱気トルエン溶液を用いて、em測定を行なった。サンプルは ex = 355 nmで励起され、発光は em = 500 ~ 800 nmで観測された。標準テトラフェニルポルフィリンは ex = 514 nmで励起され、発光は em = 500 ~ 800 nmで観測された。テトラフェニルポルフィリンの emは0.11.3である。全ての相対蛍光量子収率は、対応するサンプル及び標準の蛍光スペクトルに基づき、以下の式に従って計算した。

20

【数1】

$$\Phi_{em}(x) = \frac{A_s \cdot F_x \cdot \eta_x^2 \Phi_{em}(s)}{A_x \cdot F_s \cdot \eta_s^2}$$

【0075】

em(s)及び em(x)がそれぞれ標準及びサンプルの相対蛍光量子収率である場合；As及びAxはそれぞれ標準及びサンプルの励起波長での吸光度であり；Fs及びFxはそれぞれ標準及びサンプルの補正発光曲線下面積であり；並びに s及び xはそれぞれ標準及びサンプルで使用される溶媒の屈折率である。

30

【0076】

質量分析：Wコンフィギュレーションで操作されるLCT Premier XE（LCTプレミアXE）〔Waters〕ESI-TOF質量分析計を使用した負イオンモード直接導入ESIによりサンプルを分析した。サンプル 10 μMをCH₂Cl₂：イソプロパノール（9：1 v/v）中に調製し、外部シリンジポンプを用いて25 μL/minとなるように注入した。いくつかのサンプルはをCH₂Cl₂：イソプロパノール混合液1 mL中にピリジン50 μLを含んでいた。

【0077】

表面特性評価：ESCA2005〔Service Physics（サービスフィジックス）〕ソフトウェアを実行しているコンピュータにインタフェースされたM-Probe（M・プローブ）分光計でX線光電子分光法を実施した。単色X線源は1486.6 eVのAl K 線であり、サンプル表面に対して35°で向けられていた。放出された光電子を、サンプル表面に対して35°の角度で設置した半球型分析器により収集した。低解像度概略スペクトルを、1 ~ 1100 eVの結合エネルギーの間に得た。0.8 eVの分解能の高解像度精密スキャンを、F(1s) XPS線で収集した。全ての結合エネルギーは、電子ボルトで説明されている。

40

【0078】

粉末コロール-TiO₂ナノ複合体サンプルの減衰全反射（ATR）赤外スペクトルを、SensIR Durascope ATRアクセサリプレートを用い、Nicolet Magna-IR分光計、KBr窓付き（400 ~ 4000 cm⁻¹）非冷却焦電型重水素化硫酸トリグリシン（DTGS）検出器、及びKBrビームス

50

ブリッターに収集した。スペクトル分解能は 4 cm^{-1} であり、64スキャンをスペクトルごとに収集した。KBrバックグラウンドスペクトルをナノ複合体の測定スペクトルから差し引き、所望のFTIR特性データを得た。図8及び9を参照。

【0079】

共焦点顕微鏡検査：ファントムイメージング実験を、Zeiss LSM 710（ツァイスLSM 710）共焦点顕微鏡（Carl Zeiss〔カールツァイス〕、ウェイクフォレスト、ノースカロライナ州）を用いて行った。顕微鏡システムは、Zeiss 710共焦点スキャナ、63x/1.4プランアポクロマート油浸レンズ〔Zeiss〕、Axio Observer Z1（アクシオオブザーバーZ1）顕微鏡及びダイオードポンプ固体レーザーからなる。2つの可視励起線（405及び561 nm）を実験に使用した。顕微鏡は9.7 nmのスペクトル分解能を持つQUASAR 32チャンネルスペクトル検出器（2つの標準PMTと32チャンネルPMTアレイ）を備える。ZEN2009ソフトウェアをハードウェア制御のために使用した。実験で使用されるレーザーパワーは、総利用可能電力（25 MW）の10%である。ImageJ（イメージJ）ソフトウェアを使用し、得られたデータを処理した。

10

【0080】

透過電子顕微鏡法：表面機能化の前後の TiO_2 ナノ粒子の形態を、300 kVの加速電圧で操作されるFEI Tecnai F30ST（FEIテクナイF30ST）透過電子顕微鏡（TEM）を用いてイメージングした。画像はGatan CCD（ガタンCCD）カメラを用いて記録した。TEM分析のために、超音波処理により、少量の TiO_2 粒子をIPA中に分散させた。Electron Microscopy Sciences（エレクトロンマイクロコピーサイエンス）から購入した200メッシュCu TEMグリッドのC-flat（Cフラット）TM多孔性カーボン膜上に分散液ドロップキャストした。

20

【0081】

TiO_2 表面への1-Alローディングの概算： TiO_2 表面へのコロール1-Alのローディングの計算は、以下のように記載の積分球電子吸収測定から得られた吸光度に基づいていた。

【0082】

吸光分光法：薄膜トランスフレクタンズ測定を、 TiO_2 ナノ粒子への染料のローディングを計算するために使用した。過酸化エッチングした及び染料機能化したナノ粒子の両方を、ポリジメチルシロキサン（PDMS）ポリマーマトリクス中に分散させた。 TiO_2 ナノ粒子、PDMSベース（Sylgard（シルガード）^{（R）} 184シリコンエラストマーベース、Dow Corning〔ダウコーニング〕）、及び硬化剤（Sylgard^{（R）} 184シリコンエラストマー硬化剤、Dow Corning）の重量を下記表1に示す。ナノ粒子を、超音波処理により最小量のイソプロパノール（IPA）中に最初に分散させた。IPA中の TiO_2 ナノ粒子の分散液を、ボルテックスミキサーを使用して、PDMSベース及び硬化剤と混合した。混合液を石英基板上のフィルムに流し込み、空気中で12時間硬化させ、続いて60 の乾燥オープン中で2時間硬化させた。

30

【0083】

【表 1】

TiO₂ ナノ粒子の重量、PDMS ベース及び PDMS フィルムを被覆するために使用される硬化剤の重量、フィルム中の TiO₂ の重量%、フィルムの重量、及び PDMS の体積当たりの TiO₂ の質量。

サンプル	TiO ₂ 質量(mg)	IPA 質量(g)	PDMS ベース 質量(g)	PDMS 硬化剤 質量(g)	合計重量(g)	推定乾燥フィルム重量(g) ^a	TiO ₂ の重量%	フィルム重量 (g)	TiO ₂ 質量 /PDMS 容量 (g/L) ^b
エッチングした TiO ₂	3.35	3.683	0.9266	0.1220	1.4203	1.0593	0.32	0.2901	3.3
1-Al-TiO ₂	3.25	3.234	0.9425	0.1154	1.3846	1.0676	0.30	0.3384	3.2

^a 個々の測定は、IPA の 98% は PDMS フィルムの硬化中に蒸発することを示した。

^b PDMS の密度として、0.965 g/cm³ の値を使用した。

【 0 0 8 4 】

エッチングした及び染料機能化した TiO₂ ナノ粒子フィルムのトランスフレクタンススペクトルを、積分球（外部 DRA 1800）、PMT 検出器、可視領域（350～800 nm）用石英・ヨウ素ランプ、及び紫外領域（300～350 nm）用重水素ランプを備える Cary 5000 UV-Vis-NIR（紫外可視近赤外）分光計〔Agilent Technologies（アジレント・テクノロジー）〕を用いて測定した。TiO₂ ナノ粒子は、入射照明の散漫散乱を引き起こすため、透過光（T）、及び反射光（R）（スペクトルで反射した光及び拡散散乱した光を含む）の両方が PMT 検出器により収集されるように、PDMS フィルムを積分球の中心に配置した。トランスフレクタンス測定により、フィルムの吸光度（A）を $A = -\log(T + R)$ により決定することができる。そして、PDMS フィルム内の染料の濃度（C）を、ランベルト・ベールの法則を用いて計算した： $A = Cl$ 、ここで、 C は染料の吸光係数であり、 l は膜厚である（膜厚測定により決定、以下参照）。染料機能化した TiO₂ ナノ粒子を含む PDMS フィルムの 426 及び 595 nm（それぞれ染料のソーレー帯および Q 帯に相当）での吸光度、これらの波長での染料の推定吸光係数及びフィルムの厚さを下記表 2 に示す。これらの波長で機能化されていない、過酸化エッチングされた TiO₂ ナノ粒子を含む PDMS フィルムの吸光度も示し、これらを染料機能化された TiO₂ ナノ粒子の吸光度から差し引いた。染料ローディングを、TiO₂ のグラム当たり 2.3～3.5 μmole の間とすると決定した（染料濃度を決定するためにソーレー帯又は Q 帯を使用したかどうかに基づく）。

【 0 0 8 5 】

【表 2】

染料機能化した及び過酸化エッチングした TiO₂ ナノ粒子を含む PDMS フィルムの、426 及び 595 nm での吸光度と厚さ、並びに吸収測定に基づく TiO₂ ナノ粒子の推定染料ローディング。

波長(nm)	染料機能化 TiO ₂ 吸光度	フィルム厚(cm)	推定染料吸光係数 (M ⁻¹ cm ⁻¹) ^a	エッチングした TiO ₂ の吸光度	フィルム厚(cm)	染料濃度 (M)	染料ローディング (TiO ₂ のグラム当たりの染料の μmol)
426	0.170	0.054	4.08×10^4	0.005	0.054	7.5×10^{-5}	2.3
595	0.048	0.054	7.66×10^3	0.002	0.054	1.1×10^{-4}	3.5

^a トルエン：ピリジン（95：5）混合液で測定した吸光係数。

10

20

30

40

50

【 0 0 8 6 】

プロフィロメトリー (Profilometry、膜厚測定) : PDMSフィルムの厚さプロファイルを、Bruker DektakXT (ブルーカーデクタクXT) スタイラス表面膜厚計を用いて測定した。ダイヤモンドが先端に付いたスタイラスの直径は2 μm であり、1mgの量をフィルムそれぞれに塗布した。スタイラスを、2250 $\mu\text{m/s}$ の速度でスキャンした。厚さプロファイルは、トランスフレクタンズ測定の間PDMSフィルムの平均経路長を測定するために使用した。

【 0 0 8 7 】

細胞培養および細胞生存率アッセイ : 無菌U87-LUC細胞株 [TSRI Small Animal Imaging and Research Laboratory (TSRI小動物イメージング研究所)] を、75 mLフラスコ中のダルベッコ最小必須培地 (DMEM) にて5% CO_2 、37 $^{\circ}\text{C}$ で培養した。細胞培養培地に10%ウシ胎仔血清 (FBS) 及び1%抗菌性プリモシン (primocin) を補充した。細胞培養培地を2日ごとに補充し、80%コンフルエンスに達したら、細胞を継代した。初代マウス肝細胞 (PMH) を単離し、前述のように培養した。

10

【 0 0 8 8 】

U87-Luc細胞培養実験 : 細胞を8チャンバースライド (培養スライド、BD) に播種し、2 ng/mL ~ 2 mg/mLにわたりPBSに懸濁した1-Al-TiO₂で処理した。一次ストック溶液 (PBS 1mL中に1-Al-TiO₂ 6.3 mg) を調製した。一次ストック溶液を、第二及び第三ストック溶液を調製するためにさらに希釈した。様々な量のストック溶液を、細胞播種した8ウェルスライドガラスに添加し、上記範囲の濃度を得た。各ウェルの最終用量は300 μL である。処理後、処理済み細胞及び対照を、暗所で5% CO_2 下、37 $^{\circ}\text{C}$ で24、48、及び72時間インキュベートした。Microsoft (R) Windows (R) 2000 (マイクロソフト (R) ウィンドウズ (R) 2000) の下で、IGOR [Wavemetrics (ウェーブメトリックス)、シアトル、ワシントン州、米国] と共にLiving Image™ (リビングイメージ™) ソフトウェア [Xenogen (ゼノジェン)] で実行するPCにリンクされている冷却IVIS (R) 動物イメージングシステム [Xenogen、アラメダ、カリフォルニア州、米国] を用いて、細胞をイメージングした。このシステムでは、細胞から発生するルシフェラーゼシグナルの、高い信号対ノイズ比の画像が得られる。イメージングの前に、ルシフェリン150 mg/mLの生理食塩水0.5 mLを各ウェルに添加した。最初の5分での1分間の積分時間を、発光画像収集のために利用した。Living Imageソフトウェアパッケージを使用し、シグナル強度を、各ウェル内の全ての検出された光子数のフラックスとして定量化した。全ての実験を3回行った。

20

30

【 0 0 8 9 】

PMH細胞培養実験のために、細胞を6チャンバースライド (培養スライド、BD) に播種した。3時間後、培地を交換し (DMEM-F12)、細胞を0.3 ng/mL ~ 0.3 mg/mLにわたりPBSに懸濁した1-Al-TiO₂で処理した。一次ストック溶液 (PBS 1mL中に1-Al-TiO₂ 6.3 mg) を調製した。一次ストック溶液を、第二及び第三ストック溶液を調製するためにさらに希釈した。様々な量のストック溶液を、細胞播種した8ウェルスライドガラスに添加し、上記範囲の濃度を得た。各ウェルの最終用量は2000 μL である。処理してから24又は48時間後、細胞をHoechst 33258 (8 mg/mL) 及びSytox Green (1 mmol/L) で二重染色した。全細胞及び壊死細胞 (Sytox Greenポジティブ) の定量化を、前述のようにImageJを使用し、少なくとも5つの異なる領域の細胞を計数することにより行なった。全ての実験を3回行った。

40

【 0 0 9 0 】

In vitro共焦点蛍光顕微鏡法 : U87-Luc細胞を、ウェル当たり20,000個の細胞を8チャンバースライドに播種し (培養スライド、BD)、一晚増殖した。細胞をPBSで洗浄し、1-Al-TiO₂と1:1で混合した無血清培地中で24、48、及び72時間、37 $^{\circ}\text{C}$ で、U87-Lucの細胞生存率アッセイと同様の濃度範囲 (2 ng/mL ~ 2 mg/mL) にわたりインキュベートした。その後、細胞をPBSで3回洗浄し、Hoechst 33258とFM (R) 1-43FX染料で染色した。細胞を氷上で冷却し、固定することなく、Zeiss LSM 710倒立共焦点顕微鏡を用いてイメージングした。

【 0 0 9 1 】

50

1、1-Al、及び1-Gaの電子吸収スペクトルを、脱気トルエン中で得た。ソリューションは、これらテトラピロール大環状化合物に特徴的なソーレー帯及びQ帯を明らかにした(図1)。クロロスルホン化コロールの電子吸収データも表3に示す。

【0092】

【表3】

トルエン溶液中のクロロスルホン化コロール1、1-Al、及び1-Gaの電子分光分析データ。

コロール	電子吸収 ^a	蛍光発光 ^a		
	λ_{\max}^b (nm)	λ_{ex} (nm)	λ_{em} (nm)	Φ_{em}^c
1	430 (S)	426	670	0.094
	580 (Q)			
1-Al	424 (S)	420	611	0.127
	592 (Q)			
1-Ga	426 (S)	427	609	0.099
	588 (Q)			

^a測定は脱気トルエン中で行なった。

^b最大吸収波長は、ソーレー帯(S)及びQ帯(Q)の両方について説明されている。

^c相対発光量子収率は、標準としてテトラフェニルポルフィリンを用いて決定した。

【0093】

PBS中、pH 7.4の、1-TiO₂、1-Al-TiO₂、及び1-Ga-TiO₂ナノ複合体のコロイド懸濁液の電子吸収スペクトルでは、ソーレー帯とQ帯の、それぞれ425~600 nmを中心とする最大吸収が明らかになった(表4)。

【0094】

【表4】

コロールTiO₂ナノ複合体1-TiO₂、1-Al-TiO₂、及び1-Ga-TiO₂の電子吸収、振動、及びX線光電子分光分析データ

複合体	電子吸収	SO ₂ 振動周波数 (cm ⁻¹)		F(1s) 結合エネルギー (eV)
	λ_{\max} (nm)	Sym	Asym	
1-TiO ₂	415, 430 (S)	1153	1410	691
	591, 621 (Q)			
1-Al-TiO ₂	427 (S)	1244	1431	690
	576, 610 (Q)			
1-Ga-TiO ₂	423 (S)	1160	1450	688
	589, 610 (Q)			

【0095】

これらのピークの最大値は、対応する分子コロールの分光学的特性と一致している(表3)。1-TiO₂でのソーレー帯の分裂は、生理的pHの水溶液中のその対応両親媒性分子であって、TiO₂表面に固定されているコロールのスルホン結合を支えている2,17-ビススルホナト-5,10,15-トリス(ペンタフルオロフェニル)コロールで観測された分裂と似ている。しかしながら、金属複合体1-Al-TiO₂及び1-Ga-TiO₂では分裂パターンは観測されず、これは脱プロトン化窒素原子に結合した金属の存在のためである。

【0096】

FT-IR分光法による1-TiO₂、1-Al-TiO₂、及び1-Ga-TiO₂の微細緑色粉末の特性評価によ

り、SO₂基の対称伸縮に帰属される1180~1250 cm⁻¹あたりの振動吸収帯と、それと同時に共有結合性スルホン酸のSO₂基の非対称伸縮に帰属される1400~1450 cm⁻¹あたりの振動吸収帯とが明らかになった。これら振動特性の存在は、コロールがスルホン結合を介してTiO₂の表面に共有結合していることを示唆している。これらTiO₂-コロールナノ複合体の振動周波数は、表2に記載されている。X線光電子分光法を、ナノ粒子複合体表面の元素の存在を調べるために行った(表4)。複合体スペクトルの高解像度スキャンは、F(1s)結合エネルギーが688及び691 eVの間でピークを示し、TiO₂表面に結合している対応するペンタフルオロフェニルコロールの存在を示唆することを明らかにした。図10を参照。

【0097】

固体状態のナノ複合体1-TiO₂、1-Al-TiO₂、及び1-Ga-TiO₂の凝集体の共焦点蛍光顕微鏡画像(図1)を、ex = 405 nmの光を照らしたサンプル及び508~722 nmから記録したexの光を照らしたサンプルで撮影した。1-Al-TiO₂及び1-Ga-TiO₂の画像(図1e及び1h)は、1-TiO₂の比較的暗い画像と比較すると、ナノ粒子上で蛍光領域を示す。1-Al-TiO₂及び1-Ga-TiO₂のTiO₂サンプルにおいて様々な強度で観察された蛍光シグナルは、物質の凝集のためにTiO₂表面が均一に機能化されていないことも示唆する。3つ全ての画像で選択された蛍光領域(白丸)、ナノ複合体1-TiO₂、1-Al-TiO₂、及び1-Ga-TiO₂を表すスペクトルプロファイルを得た(図1c、1f、及び1i)。これらのスペクトルプロファイルと蛍光シグナル強度は、分子コロール1、1-Al及び1-Gaから得られた蛍光スペクトル(図1a、1d、及び1g)と一致している。

【0098】

ナノ複合体1-Al-TiO₂を、細胞取り込み及び細胞毒性効果研究の候補として選択した。TiO₂のTEM画像(図2)は、平均粒径が29nmであり、コロール機能化後であるが、それらが凝集しているように見られることを示す。表面機能化の前後両方、及びH₂O₂エッチングの前後両方で画像を撮影した。透明なポリマーマトリクス中に埋め込まれた粒子の吸収測定は、積分球の使用で容易となり、分子と複合種でほぼ同一の吸収特性を示す。これらの実験により、約10~40 mg/gのTiO₂という、表面への1-Alローディングの概算を得た。(図2)

【0099】

ルシフェラーゼをトランスフェクトされた膠芽腫細胞U87-Lucの、広範な濃度範囲(2 ng/mL~2 mg/mL)の1-Al-TiO₂での処理は、共焦点蛍光顕微鏡(CFM)画像で示すように、これらナノ複合体の24、48、及び72時間にわたる内部移行を明らかにする(図4)。

【0100】

CFM画像は、細胞を核及び細胞膜染料で染色し、培地溶液で数回洗浄して過剰の染料および1-Al-TiO₂ナノ複合体を除去した後に撮影した。Hoechst染料で標識した核は青紫色に見える(ex = 405 nm、em = 460 nm)。染料FM^(R)1-43FXで標識した膜は緑色に見える(ex = 488 nm、em = 580 nm)。ナノ複合体1-Al-TiO₂は赤色に見える(ex = 405 nm、em = 634 nm)。

【0101】

同様の濃度の1-Al-TiO₂(2 ng/mL~2 mg/mL)で48及び72時間処理されたU87-Luc細胞の、異なる3つの角度からのZスタック共焦点蛍光顕微鏡(CFM)画像(図5)も示す(図5)。

【0102】

1-Al-TiO₂ナノ構造体はまた、エンドサイトーシスを介して内部移行する可能性もある。共焦点蛍光画像に基づくと、ナノ物質1-Al修飾TiO₂はサイトゾル中に懸濁し、HeLa細胞において核周囲の局在化を示したアリザリンレッドSで標識された修飾TiO₂とは対照的である。これらの知見は、他の研究と同様の、細胞内のTiO₂ナノ複合体の分布パターンである、1-D TiO₂ナノロッド及びフルオレセインイソチオシアネートで標識されたナノ粒子は、一定時間後にHeLa細胞内に内部移行するというを示唆する。膠芽腫細胞への1-Al-TiO₂の内部移行もまた、非常に低い濃度範囲でも観測することができる(< μg/mL)。

【0103】

10

20

30

40

50

TiO₂ ナノ粒子は、活性酸素種の形成をもたらすUV-可視光による光活性化での様々な細胞傷害活性を示す。TiO₂の光触媒特性とは関連のない、1-Al-TiO₂複合体の細胞毒性の細胞死への効果を良く研究し理解するために、細胞内移行研究のように、膠芽腫細胞U87-Lucを、UV-可視光照射なしで、同じ濃度範囲の1-Al-TiO₂ (2 ng/mL ~ 2 mg/mL) で処理した。生物発光細胞生存率アッセイの前に、細胞を24、48、及び72時間かけて培養した。細胞ATPのレベルに関連する、生きているU87-Luc細胞からのホタルルシフェリン生物発光シグナルに基づき、細胞毒性アッセイでは、ナノ複合体1-Al-TiO₂は、本質的に処理の24時間後の膠芽腫細胞には細胞毒性効果がなく(図6)、そのため、生体適合性を有すると考えられ得ることが示される。一方、細胞は長時間、高濃度(> 200 µg/mL)でコロール-TiO₂ ナノ粒子にさらされていたので、細胞毒性効果はより明らかとなる。例えば、生細胞からの生物発光シグナルの約65%及び約30%は、2 mg/mLで処理してからそれぞれ48時間後及び72時間後に観測された。1-Al-TiO₂処理したU87-Luc細胞のこの生存率研究は、マウス線維芽細胞で実施した研究とも一致しており、MTTアッセイを用いて、種々の濃度(3~600 µg/mL)のTiO₂の細胞毒性効果は、処理の24時間後は無視できる程度であるが、これらの細胞のナノ粒子での48時間の処理は、より高い濃度において、細胞生存率の減少を示したことを明らかにしている。非修飾1-D及び3-D TiO₂のHeLa細胞への細胞毒性効果に関する別の研究はまた、これらのナノ粒子が光のない状態で、最大125 µg/mLまでの濃度で比較的毒性がないことを示す。

10

【0104】

さらに、1-Al-TiO₂ ナノ複合体のがん細胞と正常細胞への細胞毒性効果を比較するために、マウス初代肝細胞(MPH)を様々な濃度の1-Al-TiO₂ (0.3 ng/mL ~ 0.3 mg/mL) で24及び48時間処理した(図7)。1-Al-TiO₂はまた、処理の24及び48時間後の両方で、3 µg/mLまでは基本的に毒性がないことが観測された。高濃度においてのみ、生細胞の比率が80%未満に低下した。MPHは、様々な用量の1-Al-TiO₂での処理の24時間後と48時間後に同様に振るまい、低い1-Al-TiO₂濃度はこれら正常細胞の生存率に対して最小限の細胞毒性効果を有するというを示唆している。1-Al-TiO₂で処理された膠芽腫細胞U87-Lucでは高濃度における傾向は見られなかったが、正常細胞、特に初代細胞は、外因性の非ネイティブ因子に対してあまり寛容ではないことが予想される。それでもなお、1-Alが示す強い蛍光は、ナノ複合体1-Al-TiO₂を、本研究で観測されたがん細胞及び正常細胞の両方への細胞毒性閾値より低い濃度(20~200 ng/mL)においても共焦点蛍光顕微鏡で観測可能な光学イメージング剤として使用することを可能にするであろう。

20

30

【0105】

4-(クロロスルホニル)安息香酸 + TiO₂ (アナターゼ)

【0106】

シンチレーションバイアルにTiO₂ (0.1099 g)と4-(クロロスルホニル)安息香酸(0.0171 g)とを加え、ドライボックスに投入した。無水ピリジン(3mL)を加え、不活性雰囲気下で1時間かけて120℃にまで加熱した。室温まで冷却させ、その後H₂O 2 mLを加え、次いで遠心分離した。アセトン、アセトン、水、及びアセトンで洗浄及び遠心分離した。高真空ラインでポンプダウンし、赤外分光用の生成物を得た。

40

【0107】

塩化ビフェニル-4-スルホニル + TiO₂ (アナターゼ)

【0108】

シンチレーションバイアルにTiO₂ (0.1253 g)と塩化ビフェニル-4-スルホニル(0.0208 g)とを加え、ドライボックスに投入した。無水ピリジン(3mL)を加え、不活性雰囲気下で1時間かけて120℃にまで加熱した。室温まで冷却させ、その後H₂O 2 mLを加え、次いで遠心分離した。アセトン、アセトン、水、及びアセトンで洗浄及び遠心分離した。高真空ラインでポンプダウンし、赤外分光用の生成物を得た。

【0109】

塩化4'-クロロビフェニル-4-スルホニル + TiO₂ (アナターゼ)

【0110】

50

シンチレーションバイアルにTiO₂ (0.1205 g) と塩化4'-クロロピフェニル-4-スルホン
 ニル (0.0210g) とを加え、ドライボックスに投入した。無水ピリジン (3mL) を加え、不
 活性雰囲気下で1時間かけて120 にまで加熱した。室温まで冷却させ、その後H₂O 2 mLを
 加え、次いで遠心分離した。アセトン、アセトン、水、及びアセトンで洗浄及び遠心分離
 した。高真空ラインでポンプダウンし、赤外分光用の生成物を得た。

【 0 1 1 1 】

イソシアン酸クロルスルホンニル + TiO₂ (アナターゼ)

【 0 1 1 2 】

シンチレーションバイアルにTiO₂ (0.1205 g) を加え、ドライボックスに投入した。イ
 ソシアン酸クロルスルホンニル100 μLを加えた。無水ピリジン (3mL) を加え、不活性雰
 囲気下で1時間かけて120 にまで加熱した。室温まで冷却させ、その後H₂O 2 mLを加え、次
 いで遠心分離した。アセトン、アセトン、水、及びアセトンで洗浄及び遠心分離した。高
 真空ラインでポンプダウンし、赤外分光用の生成物を得た。

10

【 0 1 1 3 】

イソシアン酸クロルスルホンニル + TiO₂ (アナターゼ)

【 0 1 1 4 】

シンチレーションバイアルにTiO₂ (0.1269 g) を加え、ドライボックスに投入した。イ
 ソシアン酸クロルスルホンニル400 μLを加えた。不活性雰囲気下で1時間かけて120 にま
 で加熱した。室温まで冷却させ、その後H₂O 4 mLを加え、次いで遠心分離した。アセトン
 、アセトン、水、及びアセトンで洗浄及び遠心分離した。高真空ラインでポンプダウンし
 、赤外分光用の生成物を得た。

20

【 0 1 1 5 】

ここに記載の方法によれば、他のCl-SO₂含有物質、例えば、塩化スルホンニル2-ペンチル
 、塩化3,3,3-トリフルオロプロパン-1-スルホンニル、酢酸メチル(クロルスルホンニル)など
 を使用することもできる。

【 図 2 】

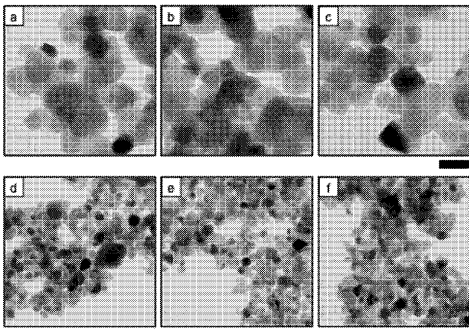
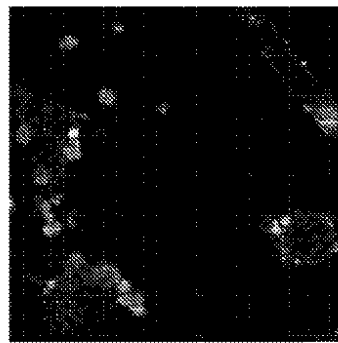


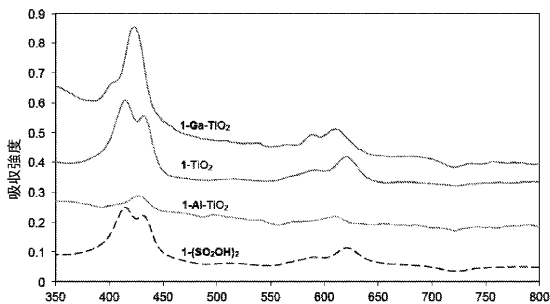
FIGURE 2

【 図 4 (a) 】

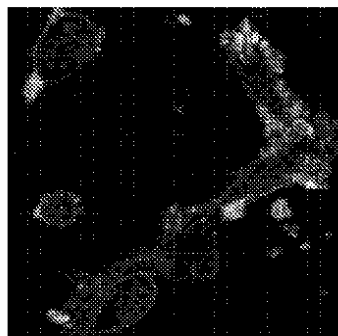


(a)

【 図 3 】

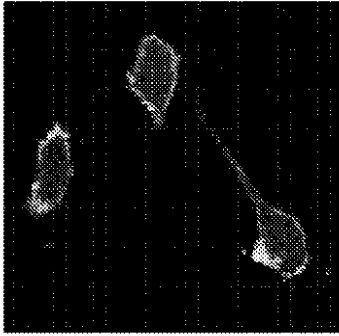


【 図 4 (b) 】



(b)

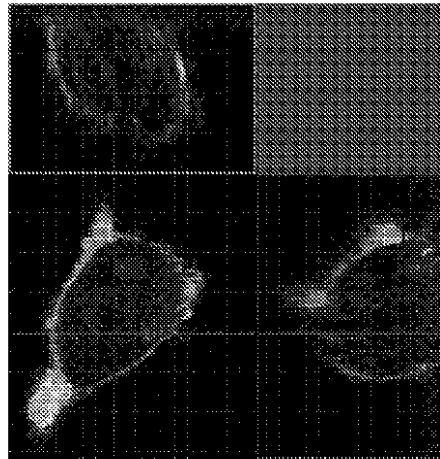
【 図 4 (c) 】



(c)

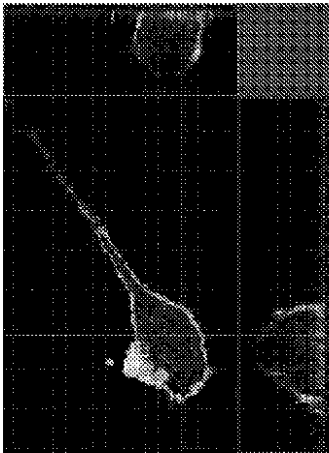
【 図 5 (a) 】

(a)

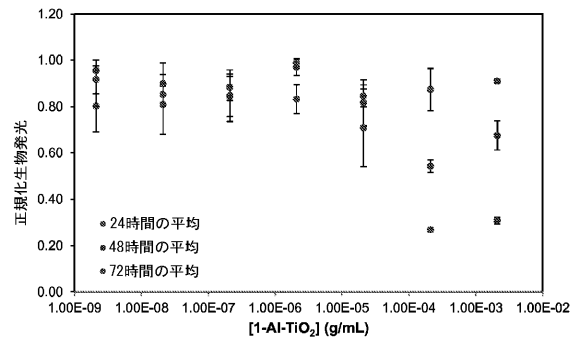


【 図 5 (b) 】

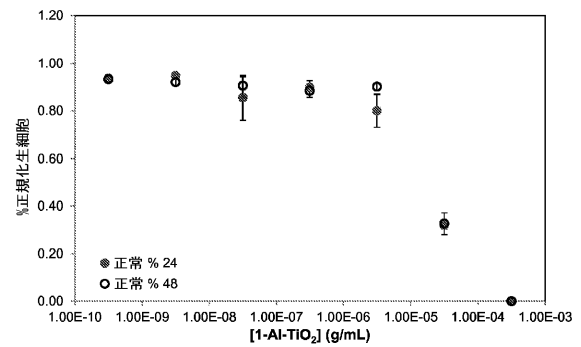
(b)



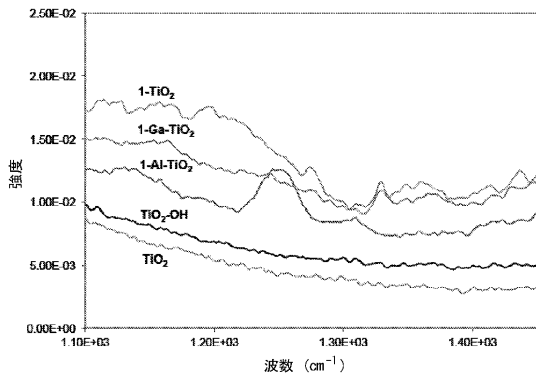
【 図 6 】



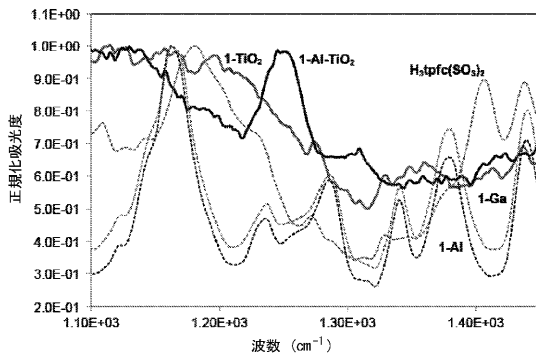
【 図 7 】



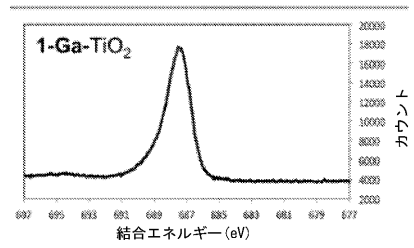
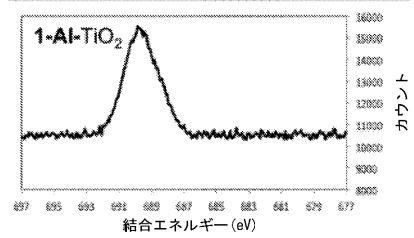
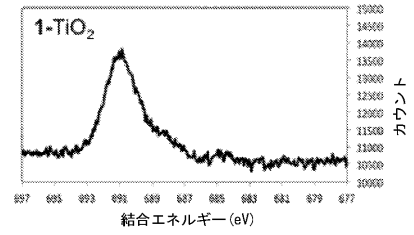
【 図 8 】



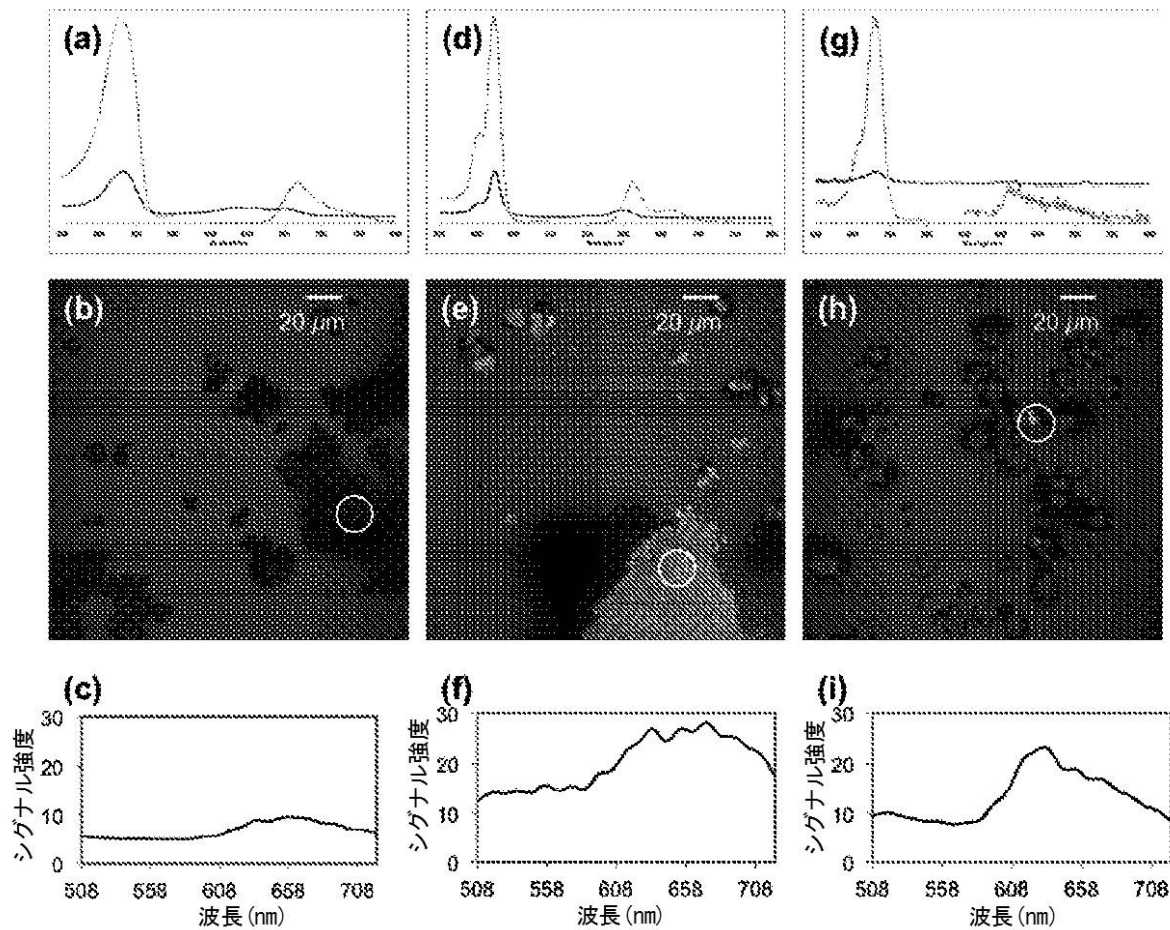
【 図 9 】



【 図 10 】



【 図 1 】



【 手続補正書 】

【 提出日 】 平成27年11月27日 (2015.11.27)

【 手続補正 1 】

【 補正対象書類名 】 特許請求の範囲

【 補正対象項目名 】 請求項 3 5



【 補正方法 】 変更

【 補正の内容 】

【 請求項 3 5 】

患者におけるがんのイメージング方法であって、
 患者に施与された請求項 1 に記載の物質に関して光学イメージングを用いてがん細胞をイメージングすること
 を含み、Aは金属化コロリルである、方法。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US2014/015951
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
C07F 7/28(2006.01)i, C07F 3/00(2006.01)i, A61K 49/04(2006.01)i		
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) C07F 7/28; C07F 3/00; A61K 49/04		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean utility models and applications for utility models Japanese utility models and applications for utility models		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) eKOMPASS(KIPO internal) & Keywords: corrol, metal oxide, sulfonated		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	Carl M. Blumenfeld et al., 'Decorating Metal Oxide Surfaces with Fluorescent Chlorosulfonated Corroles', Inorg. Chem. 2013, 52, 4774-4776, Publication Date (Web): April 23, 2013 See page 4775.	1-3,6,7,17-21 ,24-32
A	Iris Aviv et al., 'Corrole-based applications', Chem. Commun., 2007, 1987-1999 See page 1989.	1-3,6,7,17-21 ,24-32
A	Akiyasu Kanamori et al., 'Neuroprotection against superoxide anion radical by metalloporphyrins in cellular and murine models of optic neuropathy', Journal of Neurochemistry, Volume 114, Issue 2, pages 488-498, July 2010 See fig 1.	1-3,6,7,17-21 ,24-32
A	Joana F. B. Barata et al., 'Corrole-silica hybrid particles: synthesis and effects on singlet oxygen generation', RSC Adv., 2013, 3, 274-280, Published on the web 24th October 2012 See page 275 and table 1.	1-3,6,7,17-21 ,24-32
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 28 May 2014 (28.05.2014)		Date of mailing of the international search report 29 May 2014 (29.05.2014)
Name and mailing address of the ISA/KR  International Application Division Korean Intellectual Property Office 189 Cheongsa-ro, Seo-gu, Daejeon Metropolitan City, 302-701, Republic of Korea Facsimile No. +82-42-472-7140		Authorized officer KIM, Su Mi Telephone No. +82-42-481-8132 

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/US2014/015951

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: 35-38
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 35-38 are directed to diagnostic methods of the human body(PCT Article 17(2)(a)(i) and Rule 39.1(v)).
2. Claims Nos.: 5,9,11,15,38
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
These claims are dependent on claims which do not comply with PCT Rule 6.4(a), and thus these claims are not searchable.
3. Claims Nos.: 4,8,10,12-14,16,22,23,33,34
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of any additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

- Remark on Protest**
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/US2014/015951

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
None			

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, 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, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, 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, TZ, UA, UG, US

(74)代理人 100119530
弁理士 富田 和幸

(74)代理人 100136858
弁理士 池田 浩

(72)発明者 カール エム ブルーメンフェルト
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 1 1 0 1 パサデナ エス エル モリーノ アベニュー
2 3 4 ナンバー 1 4

(72)発明者 カーン ソラサエナー
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 1 0 0 1 アルタデナ ウッドグレン レーン 1 6 0 4

(72)発明者 ハリー ビー グレイ
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 1 1 0 6 パサデナ イー カリフォルニア ブルーパード
1 4 1 5

(72)発明者 ロバート エイチ グラブズ
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 1 0 3 0 サウス パサデナ スプルース ストリート
1 7 0 0

Fターム(参考) 4C050 PA01
4C085 HH11 KA09 KA27 KB05 KB07 KB08 KB15 KB56 LL18
4H048 AA01 AA02 AA03 AB20 AC61 VA80 VA85 VB10