

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2010年4月22日(22.04.2010)

PCT

(10) 国際公開番号

WO 2010/044465 A1

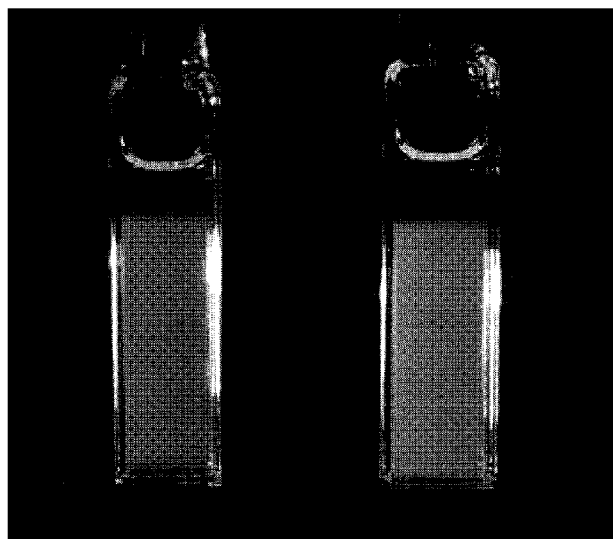
- (51) 国際特許分類:
G01N 31/22 (2006.01) G01N 31/00 (2006.01)
G01N 21/78 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2009/067919
- (22) 国際出願日: 2009年10月16日(16.10.2009)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2008-269005 2008年10月17日(17.10.2008) JP
- (71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 国立大学法人 群馬大学(NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION GUNMA UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒3718510 群馬県前橋市荒牧町四丁目2番地 Gunma (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 飛田 成史 (TOBITA, Seiji) [JP/JP]; 〒3768515 群馬県桐生市天神町一丁目5番1号 国立大学法人 群馬大学内 Gunma (JP). 吉原 利忠(YOSHIHARA, Toshitada) [JP/JP]; 〒3768515 群馬県桐生市天神町一丁目5番1号 国立大学法人 群馬大学内 Gunma (JP). 穂坂 正博(HOSAKA, Masahiro) [JP/JP]; 〒3718512 群馬県前橋市昭和町三丁目39番15号 国立大学法人群馬大学内 Gunma (JP). 竹内 利行 (TAKEUCHI, Toshiyuki) [JP/JP]; 〒3718510 群馬県前橋市荒牧町四丁目2番地 国立大学法人群馬大学内 Gunma (JP).
- (74) 代理人: 川口 嘉之, 外(KAWAGUCHI, Yoshiyuki et al.); 〒1030004 東京都中央区東日本橋3丁目4番10号 アクロポリス2 1ビル6階 Tokyo (JP).
- (81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, 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, IS,

[続葉有]

(54) Title: NOVEL COMPOUND AND FUNCTIONAL LUMINESCENT PROBE COMPRISING SAME

(54) 発明の名称: 新規化合物およびそれを含む機能性発光プローブ

[図4]



空気飽和

アルゴン置換

A

(青)

B

(紫)

A SATURATED WITH AIR (BLUE)
B REPLACED BY ARGON (PURPLE)

(57) Abstract: Disclosed is a compound characterized by comprising a linker, an oxygen-concentration-responsive phosphorophore which is linked to a first end of the linker, and a fluorophore which is linked to a second end of the linker. In the compound, it is preferred that the triplet level of the phosphorophore be lower than that of the fluorophore. The compound can be used as an oxygen-responsive luminescent probe.

(57) 要約: リンカーと、該リンカーの第1の端に結合した酸素濃度応答性りん光団と、該リンカーの第2の端に結合したけい光団とを含む化合物であって、好ましくはりん光団の三重項準位がけい光団の三重項準位よりも小さいことを特徴とする化合物を酸素応答性発光プローブとして用いる。

WO 2010/044465 A1



JP, KE, KG, KM, 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, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (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, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア

添付公開書類:

— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

明 細 書

発明の名称：新規化合物およびそれを含む機能性発光プローブ 技術分野

[0001] 本発明は新規化合物およびそれを含む酸素濃度に依存して発光色が変わる機能性発光プローブに関する。

背景技術

[0002] イリジウム(III)錯体(非特許文献1~4)はりん光を発することが知られており、有機ELディスプレイなどへの応用が期待されている。

一方、本発明者らは、イリジウム錯体((btp)₂Ir(acac))が酸素濃度に依存してりん光を発することを発見し、イリジウム錯体((btp)₂Ir(acac))の室温りん光(強度、寿命)を用いた生体組織中における酸素濃度計測方法を開発した(特許文献1)。また、(btp)₂Ir(acac)のりん光強度、寿命の測定から、リポソーム膜中の酸素濃度の定量、癌細胞中の酸素濃度の可視化、担癌マウス中の腫瘍の可視化に成功した(特許文献1)。

さらに、酸素濃度に依存して近赤外領域にりん光を発する化合物も開発した(特許文献2)。さらに、水溶性を持たせたりん光化合物も開発した(特許文献3)。

[0003] 細胞のようなマイクロな構造体の特定の部位の酸素濃度を非侵襲的かつ高感度に計測する方法として、上記のようなイリジウム錯体を用いた発光プローブ法は非常に有効である。一般に発光プローブを用いた酸素濃度計測法は、プローブ分子の発光が酸素分子との衝突によって消光を受けること、すなわち、発光プローブの発光強度が酸素濃度に依存して変化することを利用する。しかしながら、発光強度の変化から酸素濃度を求める方法は、プローブ分子の濃度と励起光強度分布が均一な場合には正確な値を与えるが、細胞内酸素濃度計測のように、プローブ分子の濃度分布が均一でない場合には、濃度の影響を受けてしまい、解析が困難になるという問題点もあった。

そこで、濃度の影響を受けない方法として、発光寿命の変化を利用する方

法が考えられているが、一般に発光寿命の測定にはパルスレーザーのような高価な光源と高度な光計測技術が必要なため、装置が大掛かりになってしまうという欠点を有する。

先行技術文献

特許文献

- [0004] 特許文献1：飛田成史、吉原利忠、竹内利行、穂坂正博、特開2008-281467
特許文献2：吉原利忠、飛田成史、穂坂正博、竹内利行、特願2008-185151
特許文献3：吉原利忠、飛田成史、穂坂正博、竹内利行、特願2008-239660

非特許文献

- [0005] 非特許文献1：S. Lamansky, P. Djurovich, D. Murphy, F. Abdel-Razzaq, H. Lee, G. Adachi, P. E. Burrows, S. R. Forrest, and M. E. Thompson, *J. Am. Chem. Soc.*, 123, 4303 (2001).
非特許文献2：H. Konno, *Chem. Times*, 199, 13 (2006).
非特許文献3：M. Nonoyama, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 47, 767 (1974).
非特許文献4：S. Sprouse, K. A. King, P. J. Spellane, and R. J. Watts, *J. Am. Chem. Soc.*, 106, 6647 (1984).

発明の概要

- [0006] 本発明は、プローブ濃度に影響されることなく酸素濃度を簡便に測定することのできる酸素応答性発光プローブを提供することを課題とする。
- [0007] 本発明者は上記課題を解決すべく鋭意検討を行った。その結果、リンカーと、該リンカーの第1の端に結合した酸素濃度応答性りん光団と、該リンカーの第2の端に結合したけい光団とを含む新規化合物の合成に成功し、該化合物が自身の濃度に影響されることなく、酸素濃度に依存して発光色が変化することを見出し、本発明を完成するに至った。
- [0008] すなわち、本発明は以下の通りである。
- [1] リンカーと、該リンカーの第1の端に結合した酸素濃度応答性りん光団と、該リンカーの第2の端に結合したけい光団とを含む化合物。

[2] 酸素濃度応答性りん光団の三重項準位が、けい光団の三重項準位よりも小さいことを特徴とする、[1]に記載の化合物。

[3] 酸素濃度応答性りん光団がイリジウム錯体を含む基である、[1]または[2]に記載の化合物。

[4] イリジウム錯体が下記一般式(1)で表される構造を有する、[3]に記載の化合物。

[5] イリジウム錯体が下記(1)~(4)のいずれかの構造を有する、[3]に記載の化合物。

[6] けい光団が下記(5)~(7)のいずれかの基を含む、[1]~[5]のいずれかに記載の化合物。

[7] リンカーが下記(8)の構造を含む、[1]~[6]のいずれかに記載の化合物。

[8] リンカーがポリプロリンである、[1]~[6]のいずれかに記載の化合物。

[9] 下記化合物(9)または(13)である、[1]~[8]のいずれかに記載の化合物。

[10] [1]~[9]のいずれかに記載の化合物を含む酸素応答性発光プローブ。

図面の簡単な説明

[0009] [図1]酸素応答性発光プローブにおける、けい光団とりん光団の励起状態緩和過程における好ましいエネルギー関係を示す図。

[図2] C343-Chol-BTPの励起状態緩和過程におけるエネルギー関係を示す図。

[図3] C343-Chol-BTPのアセトニトリル中の発光スペクトルを示す図。

[図4] アセトニトリル中のC343-Chol-BTPについて、空気飽和条件およびアルゴン置換条件での発色像を示す図(写真)。キセノンランプで励起し、430nmのバンドパスフィルターを用いた。

[図5] アセトニトリル中のC343-Chol-BTPについて、溶存酸素分圧を変えて測定した発光スペクトルを示す図。

[図6]アセトニトリル中のC343-Chol-BTP について、479nmでモニターした蛍光強度 (I_f) と614nmでモニターしたりん光強度 (I_p) の比を酸素分圧に対してプロットした結果を示す図。

[図7]C343-Pro4-BTPのアセトニトリル中、空気飽和条件 (aerated) およびアルゴン置換条件 (Ar) での発光スペクトルを示す図。

[図8]DMPC (dimyristoyl phosphatidylcholine) 脂質二分子膜中のC343-Pro4-BTPについて、溶存酸素分圧を変えて測定した発光スペクトルを示す図。

[図9]DMPC脂質二分子膜中のC343-Pro4-BTP について、479nmでモニターした蛍光強度 (I_f) と614nmでモニターしたりん光強度 (I_p) の比を酸素分圧に対してプロットした結果を示す図。

発明を実施するための形態

[0010] 以下に本発明を詳しく説明する。

[0011] 本発明の化合物は、酸素濃度応答性りん光団と酸素非感受性であるけい光団とが、それぞれリンカーの第1及び第2の端に結合して連結されたものである。けい光団の三重項準位がりん光団の三重項準位よりも低いとりん光団からけい光団にエネルギー移動が起こり、りん光強度の著しい低下をきたすことがあるので、酸素濃度に依存して発光色が変化する発光プローブを設計するには、図1に示すように、けい光団の励起三重項 (T_1) 準位が、りん光団の励起三重項 (T_1') 準位よりも高くなるように発光団を組み合わせることが好ましい。

[0012] りん光団としては、酸素濃度に依存したりん光を発する基であれば特に制限されないが、イリジウム錯体を含む基であることが好ましい。

イリジウム錯体は、Ir(III)を中心金属とし、芳香族系分子を配位子とする金属錯体を意味するが、例えば、下記文献1)～4)に開示されたようなものが例示される。配位子の芳香族系分子としては、当該配位子を含むイリジウム錯体がりん光を発するものであれば特に制限されないが、窒素原子、酸素原子、硫黄原子などのヘテロ原子を含む芳香族系配位子が好ましい。

1) S. Lamansky, P. Djurovich, D. Murphy, F. Abdel-Razzaq, H. Lee, C

. Adachi, P. E. Burrows, S. R. Forrest, and M. E. Thompson, J. Am. Chem. Soc., 123, 4303 (2001).

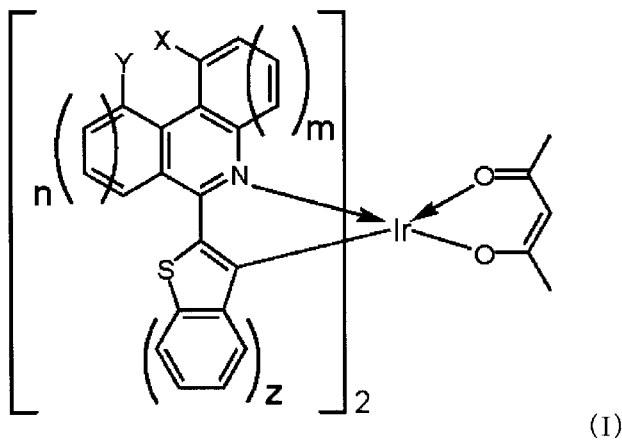
2) H. Konno, Chem. Times, 199, 13 (2006).

3) M. Nonoyama, Bull. Chem. Soc. Jpn., 47, 767 (1974).

4) S. Sprouse, K. A. King, P. J. Spellane, and R. J. Watts, J. Am. Chem. Soc., 106, 6647 (1984)

[0013] 好ましいイリジウム錯体として、下記のもの挙げられる。

[化1]



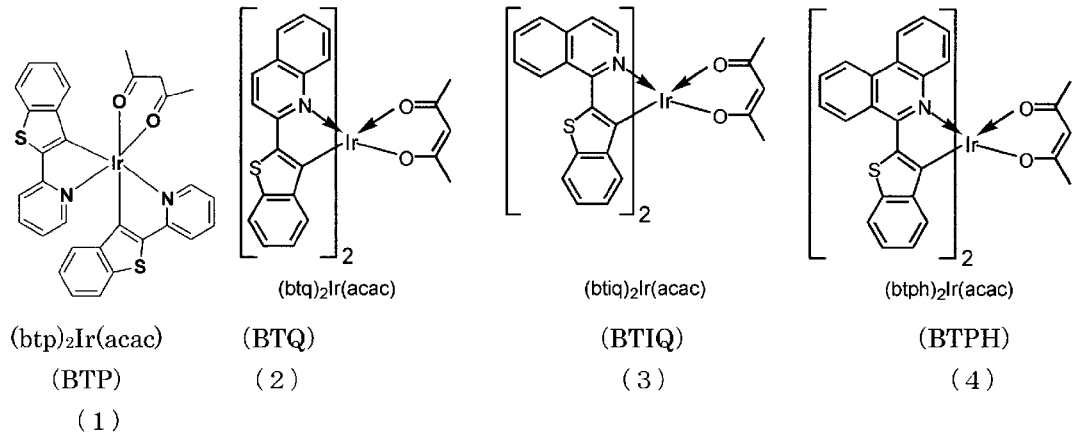
m、n、zが0～3の整数である。

XおよびYは 水素、またはアルキル基、アルコキシ基、アミノ基、ジメチルアミノ基、トリフルオロメチル基、シアノ基、アセチル基、カルボキシル基、アルキルエステル基、およびアルキルアミド基から選択される置換基を示す。

。

[0014] 特に好ましいイリジウム錯体として、下記のもの挙げられる。

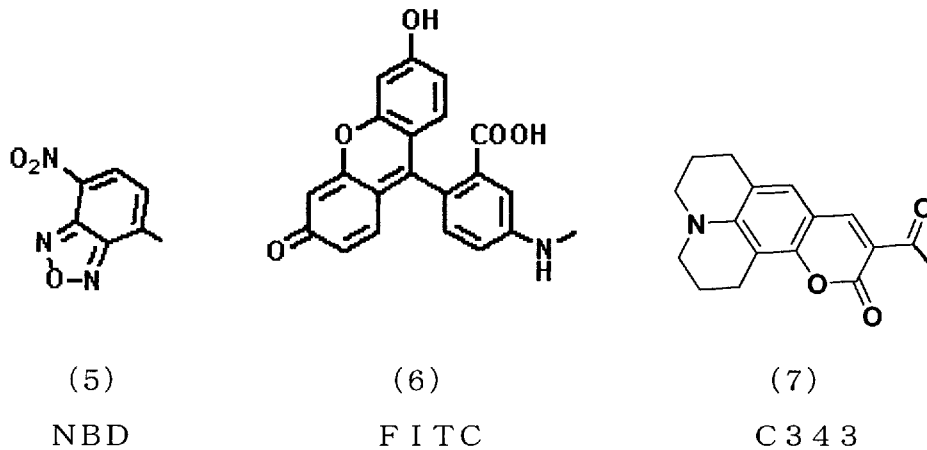
[化2]



なお、これらりん光団の励起三重項 (T_1') 準位はそれぞれ、198, 182, 172, 170 kJ/molである。

[0015] けい光団は上記りん光団に応じて適宜選択することができ、NBD (4-Nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole)、FITC、またはクマリン系色素、ローダミン類、BODIPY、シアニン系色素などが例示されるが、下記のNBD、FITC、またはC343が好ましい。

[化3]



なお、これらけい光団の励起三重項 (T_1) 準位はそれぞれ181, 197, 206 kJ/molである。

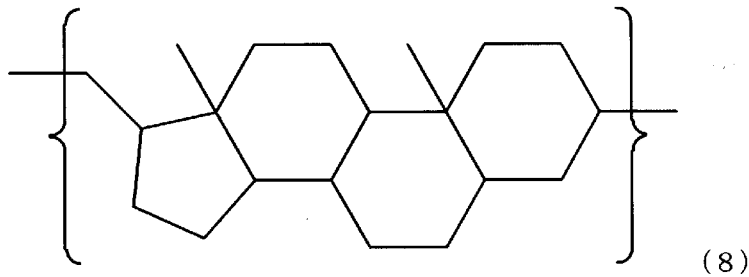
[0016] けい光団とりん光団を連結するリンカーは両者を化学的に結合するものであれば特に制限されないが、けい光団とりん光団との近接を避けるため、けい光団とりん光団を連結するリンカーは、できるだけ剛直であることが望ま

しい。また、その長さは20Å以上であることが好ましい。長さの上限は特に制限はないが、30Å以下であることが好ましい。リンカー部分の分子量としては、4,000以下が好ましい。

ステロイド、ポリペプチドは比較的容易に発光団と結合させることができるため、リンカーとして好適に使用しうる。また、ペプチド残基としてアスパラギン酸、リシンのような水溶性アミノ酸を含むペプチドを用いれば、発光プローブに水溶性を持たせることもできる。ポリペプチドとしてはアミノ酸残基数4-20のポリペプチドが好ましく、例えば、ポリプロリンが例示される。

例えば、リンカーとして下記のようなコレステロール骨格を含むものを用いることもできる。

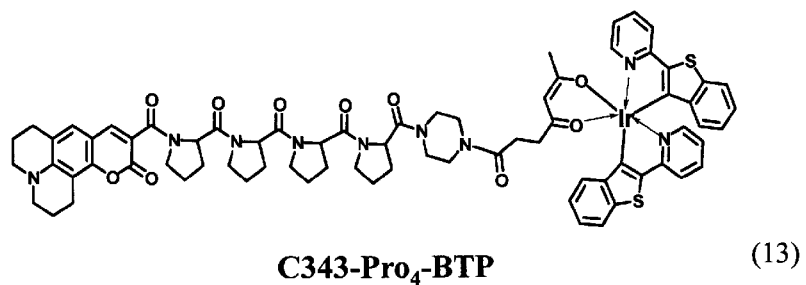
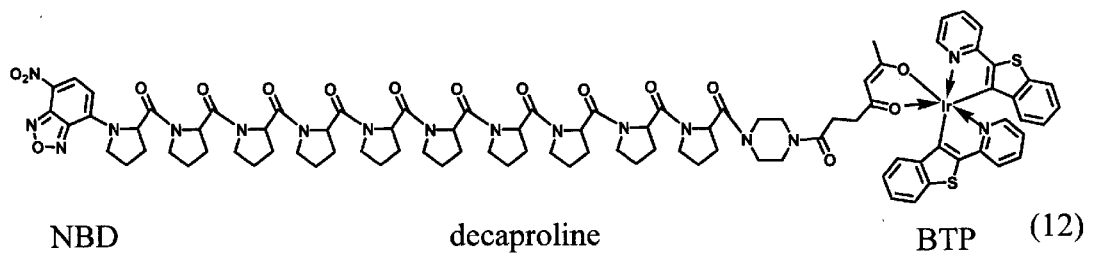
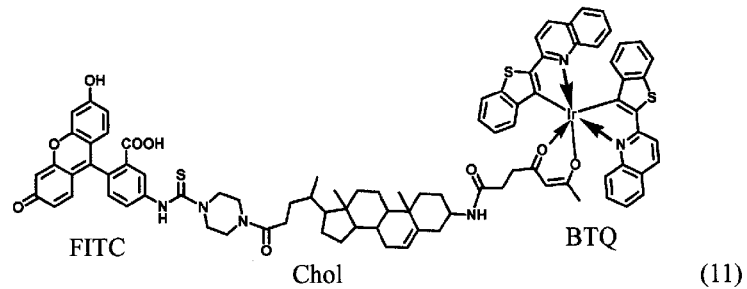
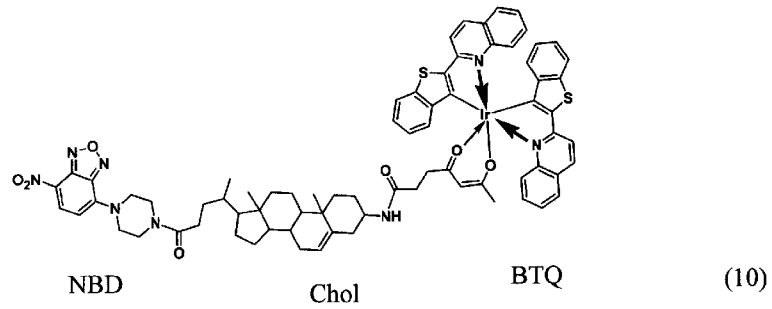
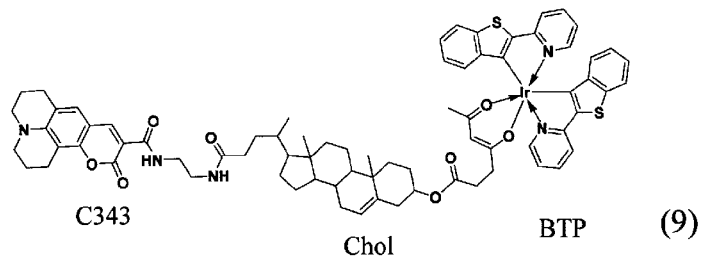
[化4]



なお、各環の炭素-炭素結合の1またはそれ以上は2重結合であってもよい。

[0017] より具体的には、下記の化合物が挙げられる。ただし、本発明の化合物は酸素濃度に依存した発色を示すものである限り、下記化合物に限定されるものではない。

[化5]



[0018] 化合物（9）は図2に示す通り、図1のエネルギー関係を満たしている。
また、化合物（10）および（11）も図1のエネルギー関係を満たして

いる。

また、化合物（13）も図1のエネルギー関係を満たしている。

一方、化合物（12）は図1のエネルギー関係を満たしていないが、その場合でも、剛直で長いリンカー（decaproline）を介して発光団を結合すれば、エネルギー移動が抑制され、けい光とりん光の両方を取り出すことができる。

[0019] 本発明の化合物は、りん光団化合物と、けい光団化合物を両端に反応性の基を有するリンカー化合物と反応させることによって得ることができる。例えば、上記化合物（9）は、後述の実施例に記載の方法に従って合成することができる。なお、化合物（9）においてBTPiに代えてBTQ、BTIQ、BTPHを用いることにより、下記のC343-Chol-BTQ、C343-Chol-BTIQ、C343-Chol-BTPHを得ることができる。

[0020] また、化合物（9）においてC343に代えて他のけい光団を用いることもできる。

[0021] 本発明の化合物は、酸素濃度に応じてその発光色が変化するため、その発色に基づいて酸素濃度を測定するための酸素応答性発光プローブとして用いることができる。例えば、化合物（9）の場合、紫色のときは酸素濃度が低く、青色のときは酸素濃度が高いというような判定ができる（図4）。

[0022] また、あらかじめ酸素濃度と、りん光強度と蛍光強度の比（ I_p/I_f ）との関係を求めておくことにより、酸素濃度を定量的に測定することも可能である。

[数1]

$$\frac{I_p}{I_f} = \frac{I_p^0}{I_f^0} \times \frac{1}{1 + K_{SV} \times pO_2} \qquad \frac{I_f}{I_p} = \frac{I_f^0}{I_p^0} \times (1 + K_{SV} \times pO_2)$$

K_{SV} : Stern-Volmer定数

[0023] 本発明の酸素応答性発光プローブを用いて試料中の酸素濃度を検出する場合、本発明の酸素応答性発光プローブを試料に添加してインキュベートした

後、プローブを励起してりん光を観察できるような蛍光顕微鏡、蛍光測定装置、蛍光イメージング装置などを用いてりん光を観察することができる。

実施例

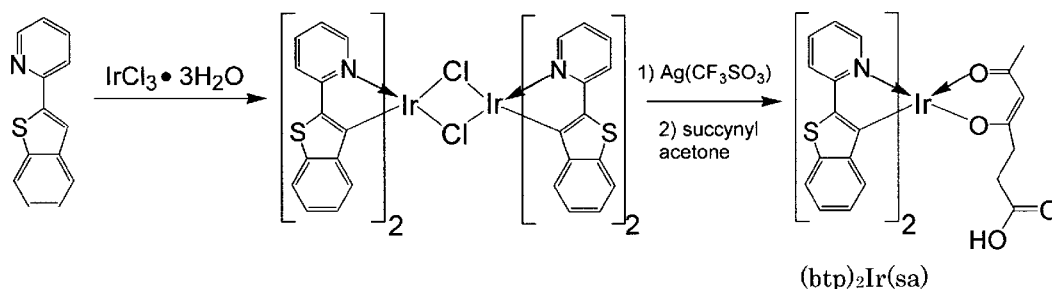
[0024] 以下に実施例を示し、本発明をさらに具体的に説明する。もともと、本発明は下記実施例に限定されるものではない。

[0025] [合成例]

(btp)₂Ir(sa)の合成

2-ベンゾチエニルピリジン (1175.4mg, 3.0mmol)、塩化イリジウム三水和物 (純度：90%, 1373.6mg, 6.5mmol) に2-エトキシエタノール (90ml)、水 (30ml) を加え、16時間還流した。溶液を室温まで冷却し生成した固体をろ過した。得られた固体 (859mg, 0.66mmol)、トリフルオロメタンスルホン酸銀 (377.2mg, 1.47mol) に脱水アセトン (120ml) を加え3時間還流し、溶液をろ過した。得られたろ液にスクシニルアセトン (308.8mg, 1.95mol)、トリエチルアミン (1ml) を加え室温にて20時間攪拌した。溶液を減圧乾固し、得られた固体をカラムクロマトグラフィー (展開溶媒：クロロホルム：メタノール (9 : 1, v/v)) を用いて生成した (収量：993.5mg, 収率：97.5%)。¹H NMR (300 MHz, d-DMSO, TMS, RT) : δ 8.60–8.51 (2H, m), 8.01–7.98 (2H, d), 7.78–7.74 (2H, q), 7.70–7.62 (2H, q), 7.23–7.21 (2H, q), 7.10–7.08 (2H, q), 6.83–6.77 (2H, t), 6.30–6.24 (2H, t), 5.43 (1H, s), 2.37–2.22 (4H, m), 1.76 (3H, s)

[化6]



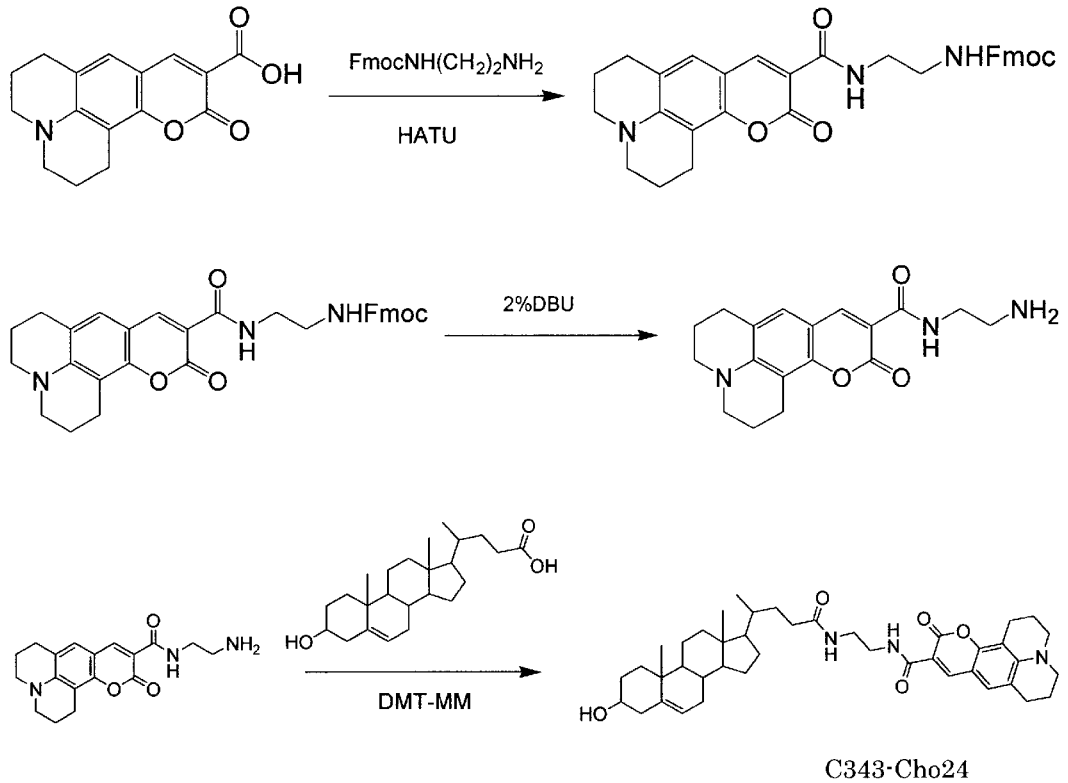
[0026] C343-Cho24の合成

クマリン343 (287.8mg, 1.0mmol)、Fmocエチレンジアミン (345.2mg, 1.0

8mmol)、ジイソプロピルエチルアミン (340 μ l, 2mmol) にDMF (6ml) を加え縮合剤としてHATU (418mg, 1.10mmol) を用いて、氷浴下3時間攪拌した。溶液に水を注ぎ、固体を析出させろ過した。得られた生成物をカラムクロマトグラフィー (展開溶媒: クロロホルム: メタノール9:1) を用いて生成した (収量: 380mg、収率: 69%)。得られた固体 (380mg、0.69mmol) に2%DBU/DMF (10ml) 溶液を加え3時間室温で攪拌した。溶液に水を加え、クロロホルムを用いて抽出を行い、クロロホルム溶液を硫酸ナトリウムで乾燥し、ろ過後、ろ液を減圧乾固した。得られた油状物質をエタノール (10ml) に溶解させ3 β -ヒドロキシ- Δ^5 -コレン酸 (262 mg、0.70mmol)、DMT-MM (415mg、1.5mmol) を加え、室温にて20時間攪拌した。反応液を減圧乾固し、得られた素生成物をカラムクロマトグラフィー (展開溶媒: クロロホルム: メタノール9:1) を用いて精製した (収量: 280mg、収率: 58%)。

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3 , TMS, RT): δ 9.09 (1H, s), 8.50 (1H, s), 6.96 (1H, s), 6.89 (1H, s), 5.31 (1H, s), 3.62–3.58 (2H, t), 3.55–3.50 (2H, t), 3.34 (4H, m), 2.87–2.83 (2H, t), 2.78–2.74 (2H, t), 1.95 (4H, m), 2.23–0.62 (34H, m, cholesterol moiety)

[化7]

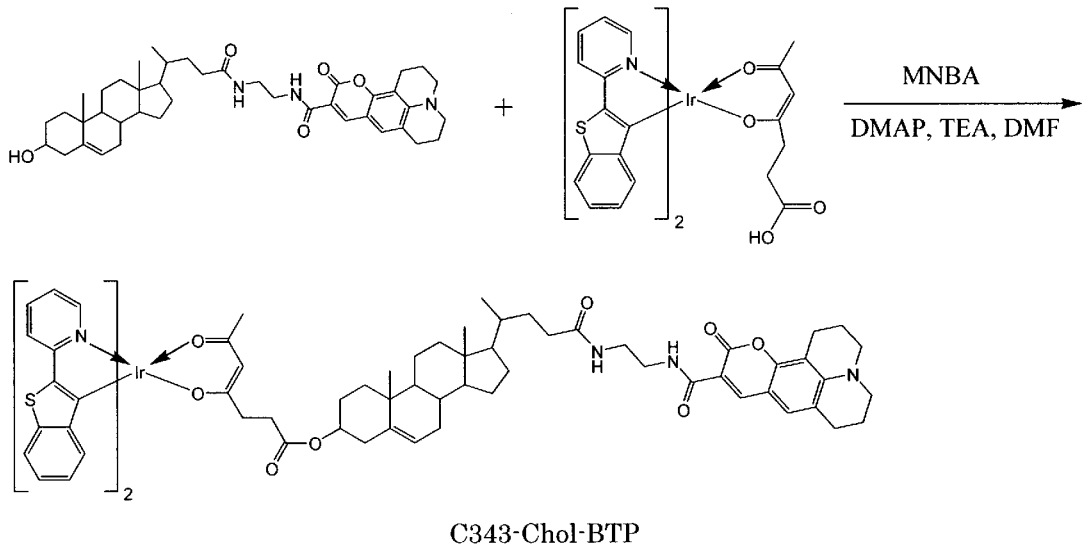


[0027] C343-ChoI-BTPの合成

C343-Cho24 (101mg、0.148mol)、(btp)₂lr(sa) (122mg、0.158mol)、無水2-メチル-6-ニトロ安息香酸 (MNBA、104mg、0.302mol)、ジメチルアミノピリジン (6.5mg、0.053mol)、トリエチルアミン (65 μ l、0.46mol) をDMF (8ml) に溶解させ、室温にて20時間攪拌した。反応液に水を注ぎ、酢酸エチルを用いて抽出を行い、酢酸エチル溶液を硫酸ナトリウムで乾燥し、ろ過後、ろ液を減圧乾固した。得られた固体をカラムクロマトグラフィー (展開溶媒: クロロホルム) を用いて精製した (収量: 85.5mg、収率: 41%)。

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃, TMS, RT): δ 9.1 (1H, s), 8.58 (1H, s), 8.39 (2H, d), 7.75 (2H, q), 7.64–7.62 (4H, d), 7.05–6.95 (5H, m), 6.79 (2H, d), 6.55 (1H, s), 6.25–6.15 (2H, m), 5.29 (2H, s), 3.65–3.55 (2H, m), 3.48–3.42 (2H, m), 3.33 (4H, m), 2.89 (2H, t), 2.77 (2H, t), 2.31–2.16 (4H, m), 1.97 (4H, m), 1.79 (3H, s), 2.23–0.62 (34H, m, cholesterol moiety)

[化8]



[0028] 実施例 1

C343-Chol-BTPの発光スペクトル

図3に示すようにC343-Chol-BTPの発光スペクトルは、C343のけい光とBTPのりん光からなる。酸素が存在しないアルゴン (Ar) 置換下では、けい光とりん光の両方の発光が認められ、空気飽和下 (aerated) ではりん光が消光し、けい光のみが観測される。けい光強度とりん光強度の比から酸素濃度を定量することができる。図4に、アセトニトリル中、空気飽和条件またはAr置換条件において、C343-Chol-BTP (濃度 $10.7 \mu\text{M}$) の発光の像を示した。その結果、C343-Chol-BTPは、空気飽和条件では青色、Ar置換条件では紫色を呈することがわかった。

[0029] 図5にアセトニトリル中のC343-Chol-BTP (濃度 $5.7 \mu\text{M}$) について、溶存酸素分圧を変えて測定した発光スペクトルを示す。それによると、酸素分圧の増加とともにりん光のみが消光しているのがわかる。

[0030] 図6にアセトニトリル中のC343-Chol-BTP (濃度 $5.7 \mu\text{M}$) について、479nmでモニターした蛍光強度と614nmでモニターしたりん光強度の比を酸素分圧に対してプロットした結果を示す。Stern-Volmerの式に基づいた解析から、蛍光とりん光の強度比を測定すれば、溶液中の酸素分圧を計測できることがわかる。

[0031] 参考例 1

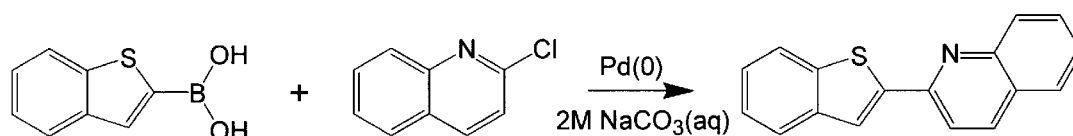
ビス[2-(2'-ベンゾチエニル)-キノリナート- N, O^{3'}]イリジウム (アセチルアセトン) ((btq)₂Ir(acac)) の合成

[0032] 2-ベンゾチエニルキノリンの合成

ベンゾ[b]チオフェン-2-イルボロン酸 (990mg、5.6mmol)、2-クロロキノリン (937mg、5.7mmol) をトルエン (20ml)、エタノール (10ml) に溶解させ、パラジウム触媒 (200mg、0.17mmol)、2M炭酸ナトリウム水溶液 (20ml) を加え、N₂置換下、5時間還流した。反応溶液を水に注ぎ、クロロホルムで抽出を行い、クロロホルム溶液を硫酸ナトリウムで乾燥し、ろ過後、ろ液を減圧乾固した。得られた固体をトルエンで洗浄した (収量: 888mg、収率: 61%)。

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃, TMS, RT): δ 8.20–8.17(1H, d), 8.15–8.12(1H, d), 7.98(1H, s), 7.96–7.93(1H, d), 7.91–7.88(1H, q), 7.86–7.83(1H, q), 7.82–7.79(1H, d), 7.75–7.70(1H, t), 7.55–7.50(1H, t), 7.39–7.36(2H, q)

[化9]

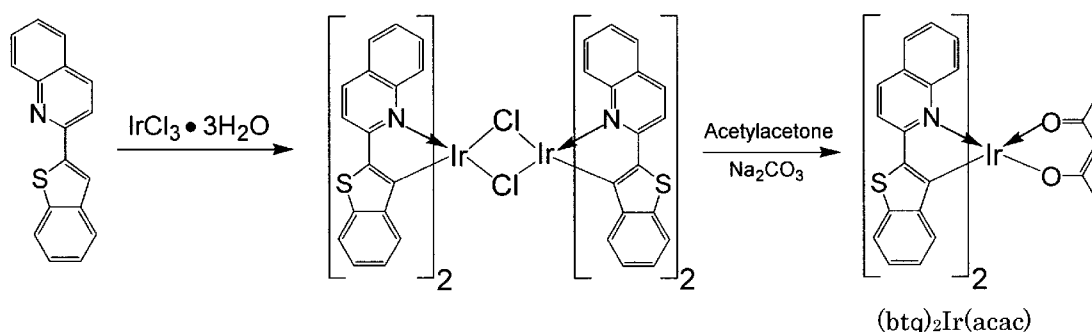
[0033] ビス[2-(2'-ベンゾチエニル)-キノリナート- N, O^{3'}]イリジウム (アセチルアセトン) の合成

2-ベンゾチエニルキノリン (581mg、2.2mmol)、塩化イリジウム三水和物 (純度: 90%、392mg、1.0mmol) に2-エトキシエタノール (30ml)、水 (10ml) を加え、16時間還流した。溶液を室温まで冷却し生成した固体をろ過した。得られた固体 (304mg、0.20mmol) に2-メトキシエタノール (25ml)、アセチルアセトン (1ml)、炭酸ナトリウム (170mg) を加え還流を加え2時間還流した。溶液を室温まで冷却し生成した固体をろ過した。得られた固体をカラムクロマトグラフィー (展開溶媒: クロロホルム) を用いて生成した (収量

: 262mg、収率 : 79%) 。

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3 , TMS, RT) : δ 8.17–8.14 (2H, d), 8.01–7.98 (2H, d), 7.85–7.83 (2H, d), 7.75–7.73 (2H, d), 7.71–7.68 (2H, d), 7.37–7.32 (2H, t), 7.73–7.23 (2H, t), 7.02–6.97 (2H, t), 6.57–6.52 (2H, t), 6.32–6.30 (2H, d), 4.63 (1H, s), 1.55 (6H, s)

[化10]



[0034] 参考例 2

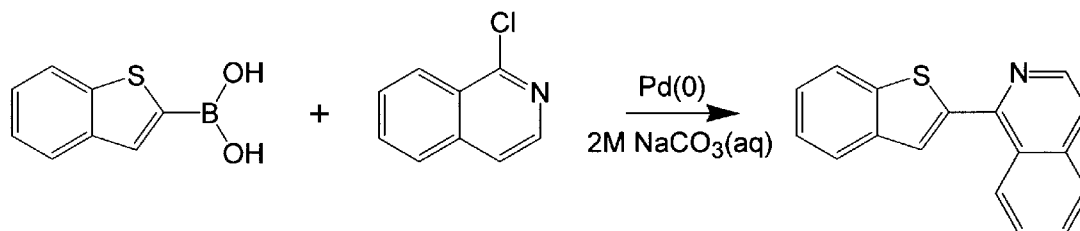
ビス[1-(2'-ベンゾチエニル)-キノリナート- N, O^{3'}]イリジウム (アセチルアセトン) ((btq)₂Ir(acac)) の合成

[0035] 1-ベンゾチエニルイソキノリンの合成

ベンゾ[b]チオフェン-2-イルボロン酸 (997mg、5.6mmol)、1-クロロイソキノリン (946mg、5.8mmol) をトルエン (20ml)、エタノール (10ml) に溶解させ、パラジウム触媒 (220mg、0.19mmol)、2M炭酸ナトリウム水溶液 (20ml) を加え、 N_2 置換下、5時間還流した。反応溶液を水に注ぎ、クロロホルムで抽出を行い、クロロホルム溶液を硫酸ナトリウムで乾燥し、ろ過後、ろ液を減圧乾固した。得られた固体をカラムクロマトグラフィー (展開溶媒 : クロロホルム) を用いて生成した (収量 : 1.16g、収率 : 79%) 。

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3 , TMS, RT) : δ 8.62–8.60 (2H, d), 7.96–7.87 (3H, m), 7.84 (1H, s), 7.78–7.73 (1H, d), 7.71–7.67 (1H, d), 7.65–7.63 (1H, d), 7.42–7.39 (2H, m)

[化11]

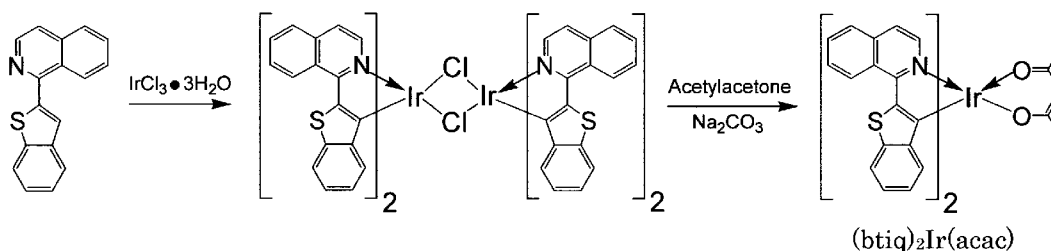


[0036] ビス[1-(2'-ベンゾチエニル)-キノリナート- N, O^{3'}]イリジウム (アセチルアセトン) の合成

1-ベンゾチエニルイソキノリン (574mg、2.2mmol)、塩化イリジウム三水和物 (純度: 90%、398mg、1.0mmol) に2-エトキシエタノール (30ml)、水 (10ml) を加え、16時間還流した。溶液を室温まで冷却し生成した固体をろ過した。得られた固体 (250mg、0.17mmol) に2-メトキシエタノール (30ml)、アセチルアセトン (1ml)、炭酸ナトリウム (150mg) を加え還流した。溶液を室温まで冷却し生成した固体をろ過した。得られた固体をカラムクロマトグラフィー (展開溶媒: クロロホルム) を用いて生成した (収量: 50mg、収率: 18%)。

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃, TMS, RT): δ 8.92–8.88 (2H, d), 8.22–8.19 (2H, d), 7.88–7.84 (2H, m), 7.68–7.64 (4H, m), 7.56–7.54 (2H, d), 7.32–7.27 (2H, m), 6.94–6.91 (2H, d), 6.56–6.53 (2H, m), 6.18–6.14 (2H, d), 5.12 (1H, s), 1.63 (6H, s)

[化12]



[0037] 参考例 3

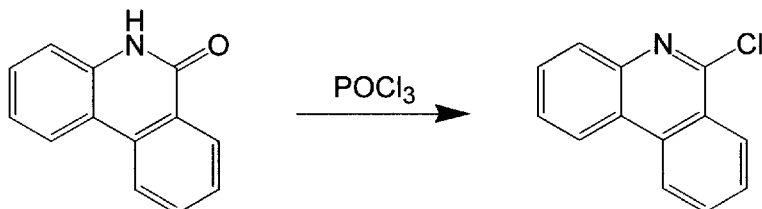
ビス[9-(2'-ベンゾチエニル)-フェナンスリナート- N, O^{3'}]イリジウム (アセチルアセトン) ((btph)₂Ir(acac)) の合成

[0038] 9-クロロフェナンスリジンの合成

フェナンスリジノン (2.0g) にオキシ塩化リン (15ml)、ジメチルアニリン (0.63ml) を加え、3時間還流した。溶液を水に注ぎクロロホルムで抽出を行い、クロロホルム溶液を硫酸ナトリウムで乾燥し、ろ過後、ろ液を減圧乾固した。得られた固体をカラムクロマトグラフィー (展開溶媒: クロロホルム) を用いて生成した (収量: 2.1g, 収率: 96%)。

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3 , TMS, RT): δ 8.63–8.60 (1H, d), 8.55–8.52 (1H, d), 8.50–8.48 (1H, d), 8.11–8.09 (1H, d), 7.94–7.92 (1H, t), 7.79–7.66 (3H, m)

[化13]

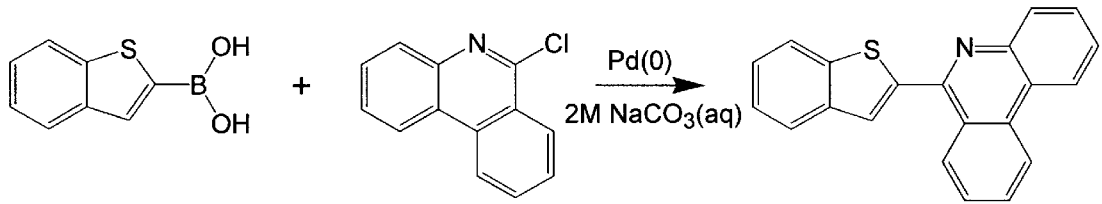


[0039] 9-ベンゾチエニルフェナンスリジリンの合成

ベンゾ[b]チオフェン-2-イルポロン酸 (884mg, 5.0mmol)、9-クロロフェナンスリジン (1.0g, 4.8mmol) をテトラヒドロフラン (30ml)、パラジウム触媒 (160mg, 0.14mmol)、2M炭酸ナトリウム水溶液 (20ml) を加え、 N_2 置換下、5時間還流した。反応溶液を水に注ぎ、クロロホルムで抽出を行い、クロロホルム溶液を硫酸ナトリウムで乾燥し、ろ過後、ろ液を減圧乾固した。得られた固体をカラムクロマトグラフィー (展開溶媒: クロロホルム) を用いて生成した (収量: 1.15g, 収率: 78%)。

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3 , TMS, RT): δ 8.74–8.71 (1H, d), 8.67–8.65 (1H, d), 8.62–8.59 (1H), 8.26–8.23 (1H, d), 7.97–7.88 (3H, m), 7.86 (1H, s), 7.80–7.67 (3H, m), 7.44–7.41 (2H)

[化14]

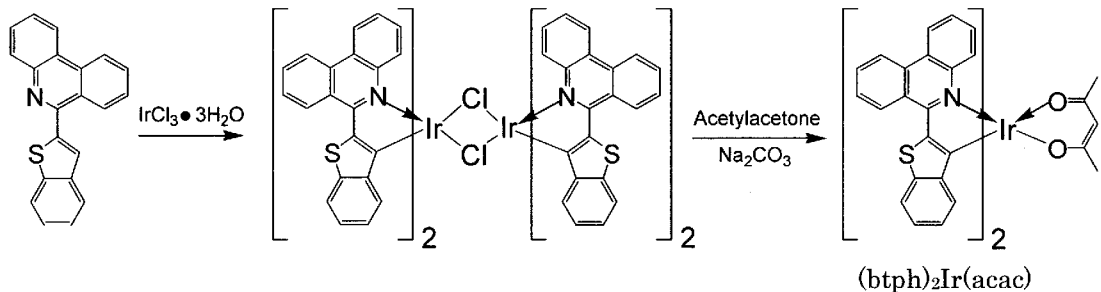


[0040] ビス[9-(2'-ベンゾチエニル)-フェナンスリナート- N, O^{3'}]イリジウム (アセチルアセトン) の合成

9-ベンゾチエニルフェナンスリジリン (706mg、2.3mmol)、塩化イリジウム三水和物 (純度: 90%、398mg、1.0mmol) に2-エトキシエタノール (30ml)、水 (10ml) を加え、16時間還流した。溶液を室温まで冷却し生成した固体をろ過した。得られた固体 (343mg、0.20mmol) に2-メトキシエタノール (20ml)、アセチルアセトン (1ml)、炭酸ナトリウム (180mg) を加え2時間還流した。溶液を室温まで冷却し生成した固体をろ過した。得られた固体をカラムクロマトグラフィー (展開溶媒: クロロホルム) を用いて生成した (収量: 293mg、収率: 80%)。

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃, TMS, RT): δ 9.35–9.33(2H, d), 8.72–8.70(2H, d), 8.46–8.44(2H, d), 7.98–7.87(4H, m), 7.85–7.82(2H, d), 7.73–7.70(2H, d), 7.43–7.38(2H, t), 7.20–7.15(2H, t), 7.04–6.99(2H, m), 6.52–6.51(4H, d), 4.50(1H, s), 1.39(6H, s)

[化15]



[0041] 表1に、(btq)₂Ir(acac)、(btiq)₂Ir(acac)、(btph)₂Ir(acac)の1,2-ジクロロエタン中におけるりん光スペクトルを示す。また、これらの化合物のりん光は酸素濃度依存性を示した (データは示さず)。

[0042] [表1]

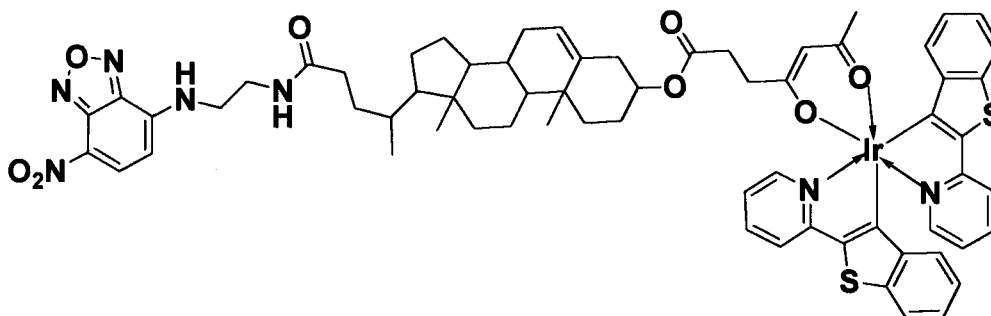
表1. 各イリジウム錯体の1,2-ジクロロエタン中におけるスペクトル特性およびりん光量子収率

化合物	吸収極大波長 $\lambda_{\text{abs}} / \text{nm}$	吸収極大波長における分子吸光係数 $\epsilon / \text{dm}^3\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$	りん光極大波長 $\lambda_{\text{p}} / \text{nm}$	りん光量子収率 Φ_{p}
(btq) ₂ Ir(acac)	540	8200	673	0.38
(btiq) ₂ Ir(acac)	542	10500	710	0.12
(btph) ₂ Ir(acac)	560	11700	719	0.29

[0043] 参考例1、2、3において、アセチルアセトンの代わりにスクシニルアセトンを用いることにより、それぞれ(btq)₂Ir(sa)、(btiq)₂Ir(sa)、(btph)₂Ir(sa)を得ることができる。そして、合成例において、(btp)₂Ir(sa)の代わりに(btq)₂Ir(sa)、(btiq)₂Ir(sa)、または(btph)₂Ir(sa)を用いることにより、C343-Chol-BTQ、C343-Chol-BTIQ、C343-Chol-BTPHを得ることができる。

[0044] なお、 $T_1' > T_1$ である下記化合物を合成してスペクトルを調べたところ、BTPのりん光がけい光に比べて非常に弱くなった。

[化16]

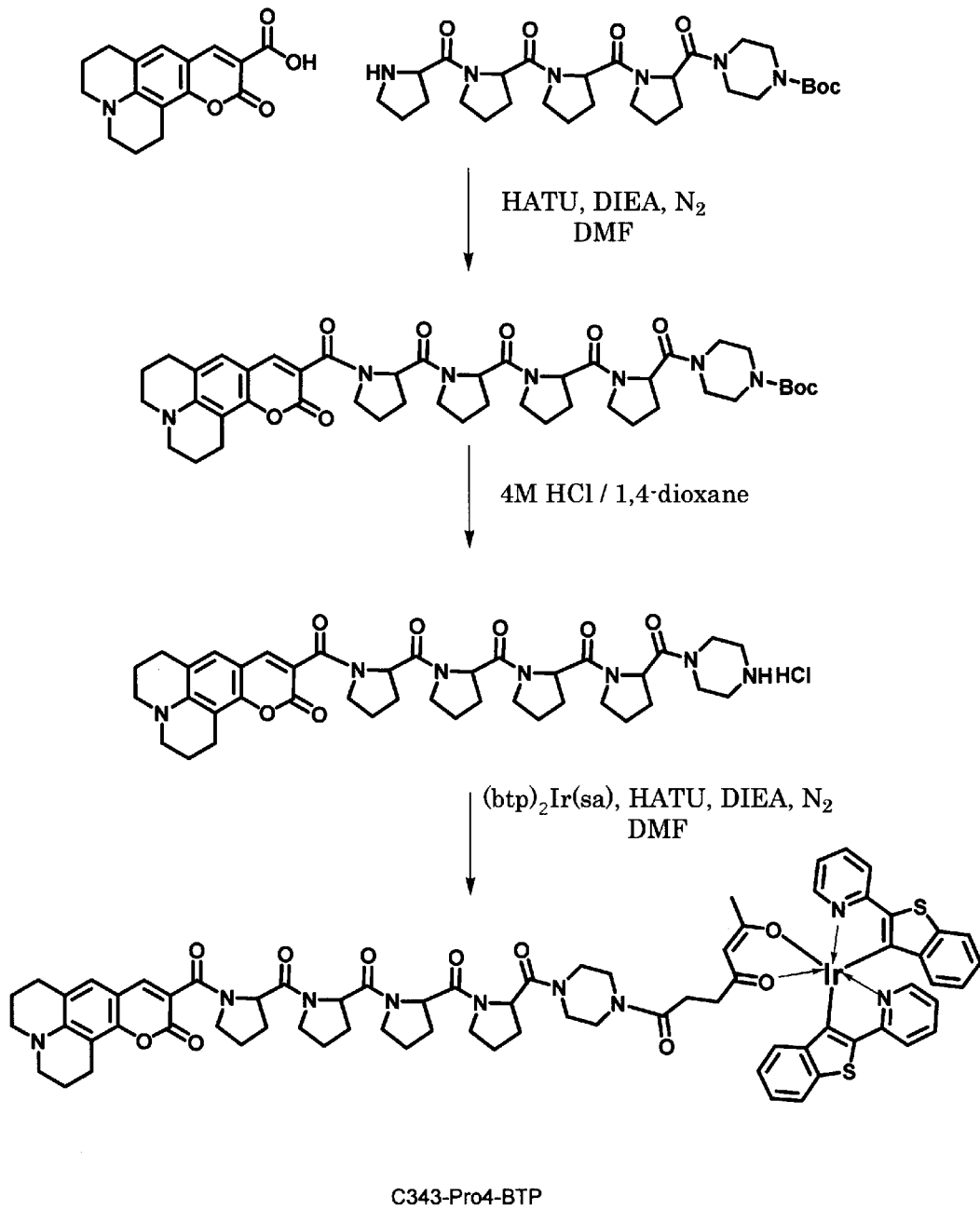


[0045] 実施例2

C343-Pro4-BTPの合成

下記の手順でC343とBTPをテトラプロリンリンカーで結合させることにより、C343-Pro4-BTPを合成した。

[化17]



[0046] C343-Pro4-BTPの発光スペクトル

図7にアセトニトリル中のC343-Chol-BTP（濃度 $1\ \mu\text{M}$ ）について、溶存酸素分圧を変えて測定した発光スペクトルを示す。それによると、アルゴン置換条件ではりん光の発光が見られ、酸素存在下ではりん光が消光しているのがわかる。

[0047] $1\ \text{mM}$ のDMPCを95:5 Tris-HCl:EtOH 中に加えることにより作製されたDMPC

脂質二分子膜（リポソーム）中のC343-Pro4-BTP（濃度1 μ M）について、溶存酸素分圧を変えて測定した発光スペクトルを図8に示す。それによると、酸素分圧の増加とともにりん光のみが消光しているのがわかる。

このプローブは脂溶性かつ、リポソーム中で凝集性を示さないため、細胞膜もしくは細胞内の小器官の膜に取り込まれると考えられる。したがって、細胞内の酸素濃度計測に有効であると考えられた。

[0048] 図9に上記DMPC脂質二分子膜（リポソーム）中のC343-Pro4-BTP（濃度1 μ M）について、479nmでモニターした蛍光強度と614nmでモニターしたりん光強度の比を酸素分圧に対してプロットした結果を示す。Stern-Volmerの式に基づいた解析から、蛍光とりん光の強度比を測定すれば、溶液中の酸素分圧を計測できることがわかる。

産業上の利用可能性

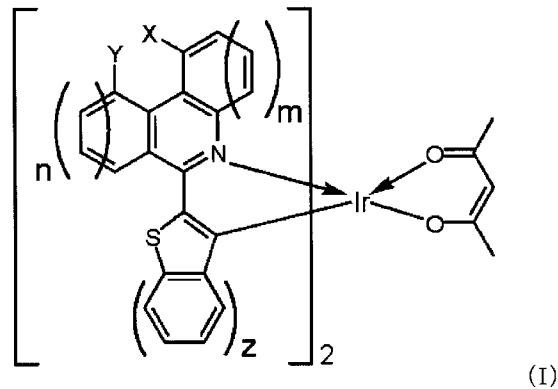
[0049] 本発明の酸素応答性発光プローブは、ひとつの分子内に短寿命（ナノ秒オーダー）のけい光を発するけい光団と長寿命（マイクロ秒オーダー）のりん光を発するりん光団を有することが特徴である。けい光は寿命が短いために溶存酸素の影響をほとんど受けない。一方、りん光は、寿命が長いため、励起寿命内に酸素分子と衝突し顕著な消光を受ける。従って、例えば、けい光団に緑色の発光を与える分子を、りん光団に赤色の発光を与える分子を用いれば、酸素が存在しないときには、両発光団の発光が混ざり合うために黄色の発光を与え、酸素が存在すると、赤色りん光が消光するため緑色の発光を与えるインテリジェントな発光プローブとなる。さらにこのプローブを用いて発光スペクトルを測定すれば、けい光強度とりん光強度の比を取るレシオ法によって簡便かつ高感度に酸素濃度を定量することができる。

これにより、本発明の酸素応答性発光プローブは分析化学、生命科学、バイオイメージング分野、医療診断、細胞生物学、環境計測などの分野に用いることができる。具体的には、酸素濃度定量試薬、低酸素細胞画像化試薬、低酸素腫瘍診断試薬などとして用いることができる。

請求の範囲

- [請求項1] リンカーと、該リンカーの第1の端に結合した酸素濃度応答性りん光団と、該リンカーの第2の端に結合したけい光団とを含む化合物。
- [請求項2] 酸素濃度応答性りん光団の三重項準位が、けい光団の三重項準位よりも小さいことを特徴とする、請求項1に記載の化合物。
- [請求項3] 酸素濃度応答性りん光団がイリジウム錯体を含む基である、請求項1または2に記載の化合物。
- [請求項4] イリジウム錯体が下記の構造を有する、請求項3に記載の化合物。

[化1]

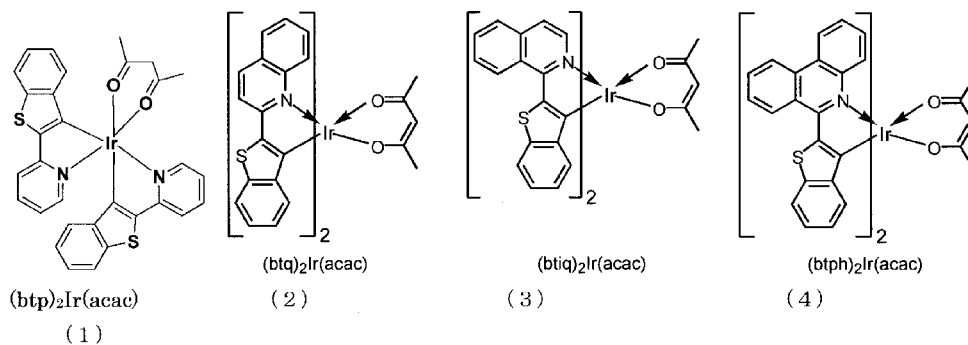


m、n、zが0～3の整数である。

XおよびYは 水素、またはアルキル基、アルコキシ基、アミノ基、ジメチルアミノ基、トリフルオロメチル基、シアノ基、アセチル基、カルボキシル基、アルキルエステル基、およびアルキルアミド基から選択される置換基を示す。

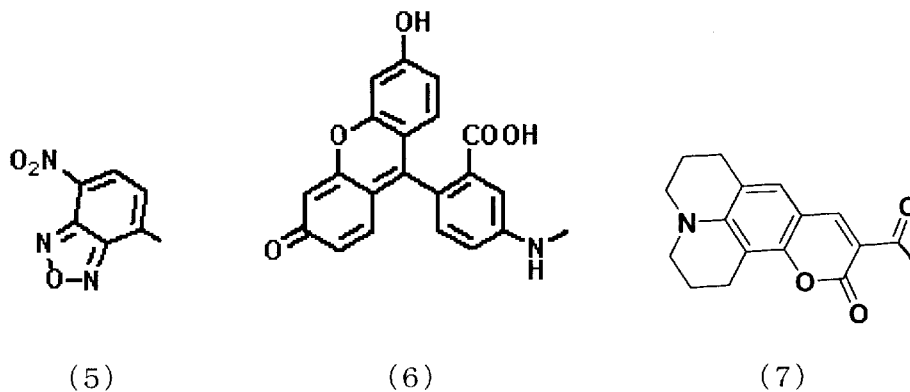
- [請求項5] イリジウム錯体が下記いずれかの構造を有する、請求項3に記載の化合物。

[化2]



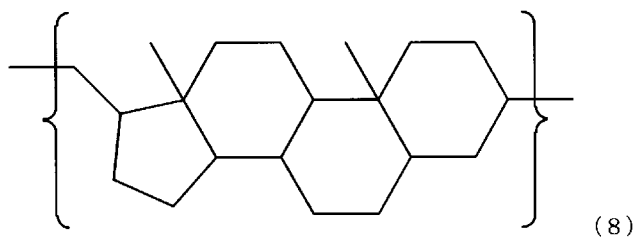
[請求項6] けい光団が下記いずれかの基を含む、請求項 1～5 のいずれか一項に記載の化合物。

[化3]



[請求項7] リンカーが下記の構造を含む、請求項 1～6 のいずれか一項に記載の化合物。

[化4]

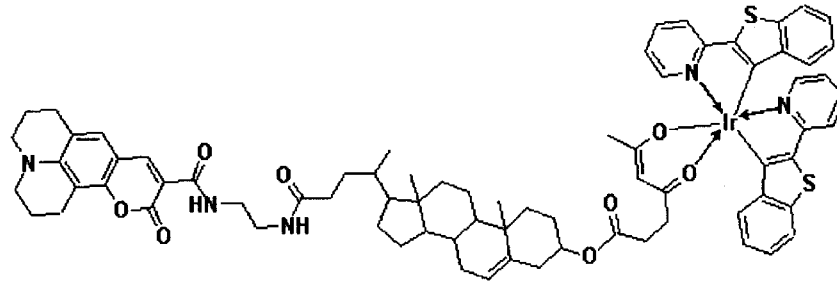


各環の炭素－炭素結合の 1 またはそれ以上は 2 重結合であってもよい。

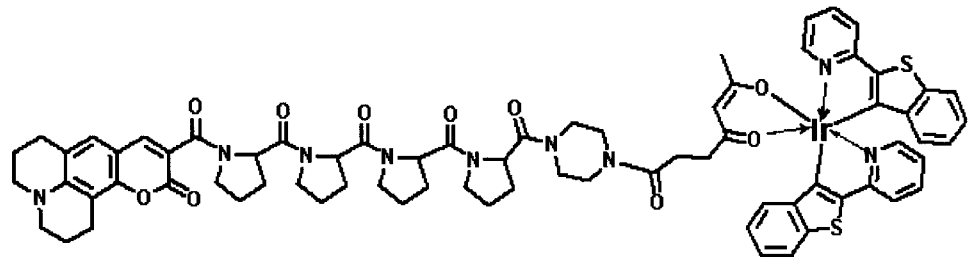
[請求項8] リンカーがポリプロリンである、請求項 1～6 のいずれか一項に記載の化合物。

[請求項9] 下記いずれかの化合物である、請求項 1～8 のいずれか一項に記載の化合物。

[化5]



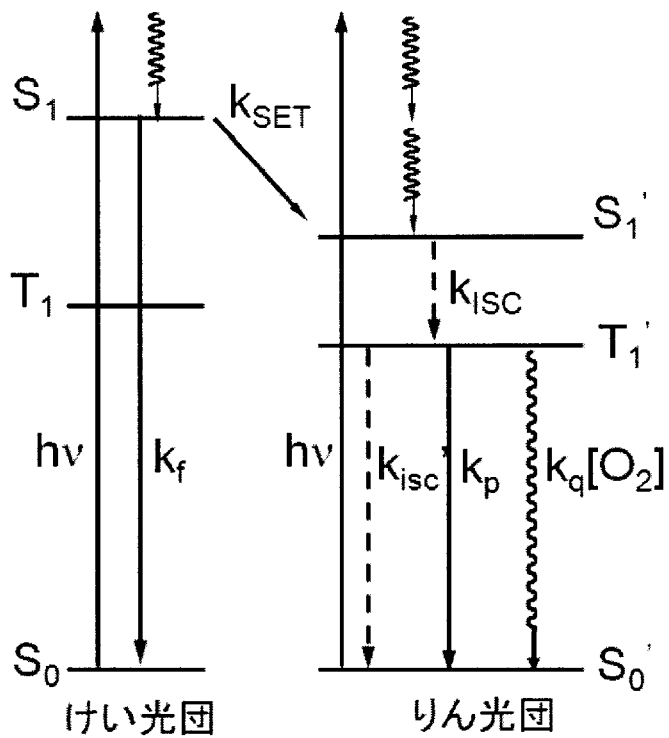
(9)



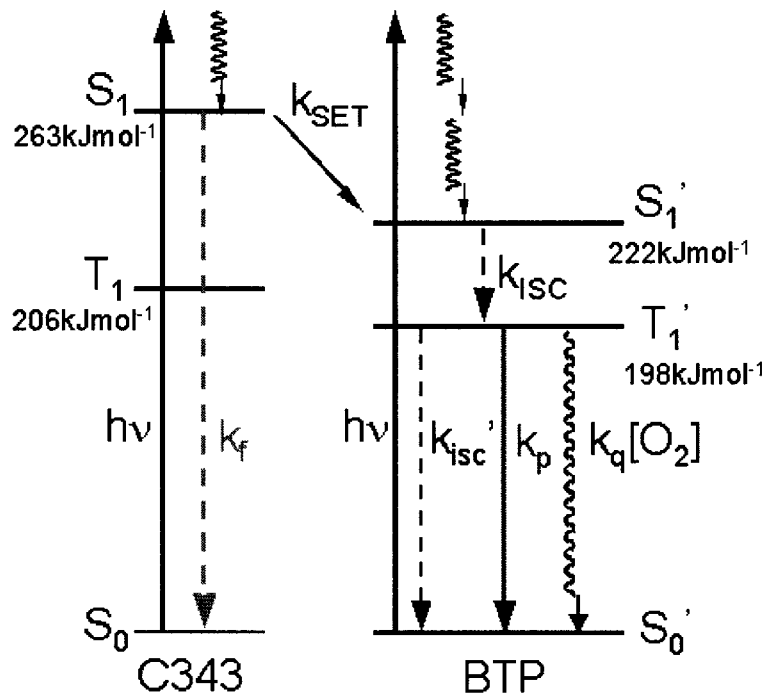
(13)

[請求項10] 請求項 1～9 のいずれか一項に記載の化合物を含む酸素応答性発光プローブ。

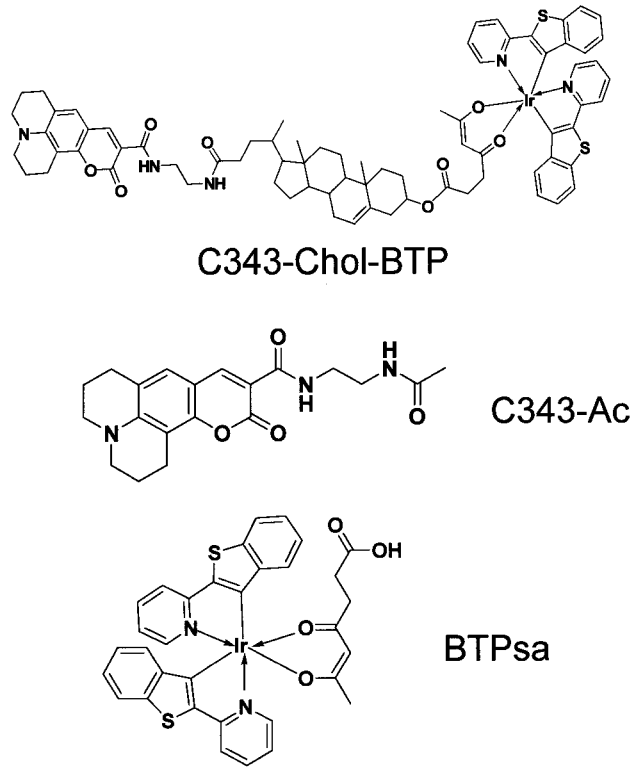
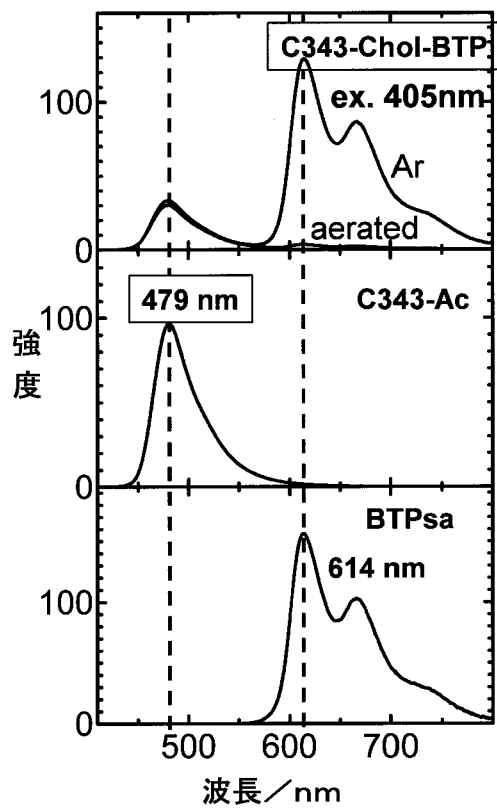
[図1]



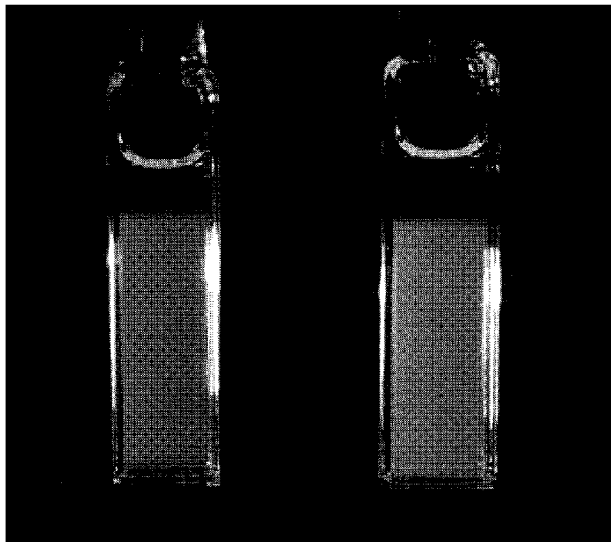
[図2]



[図3]



[図4]



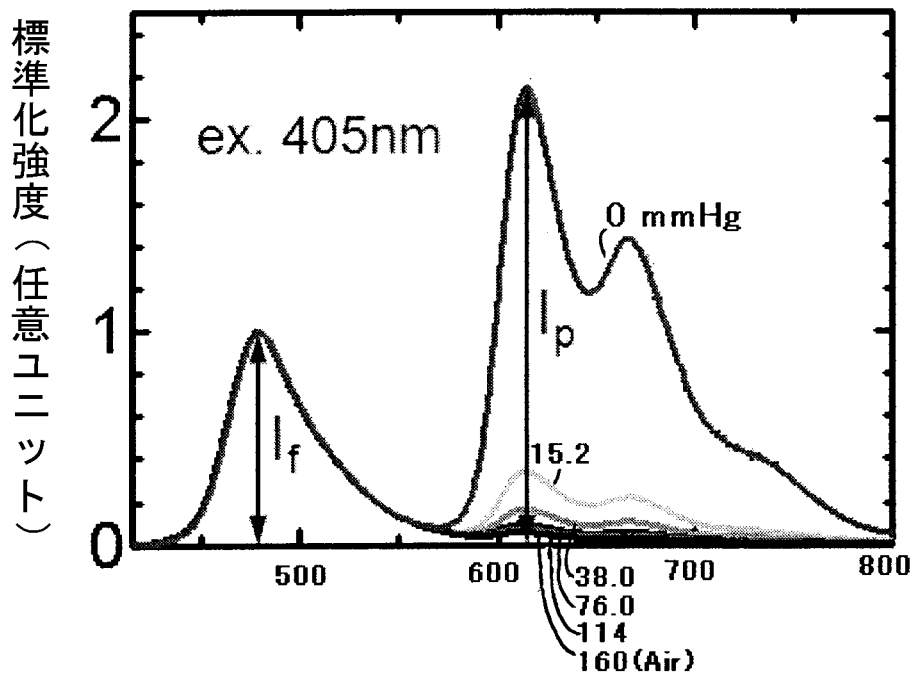
空気飽和

アルゴン置換

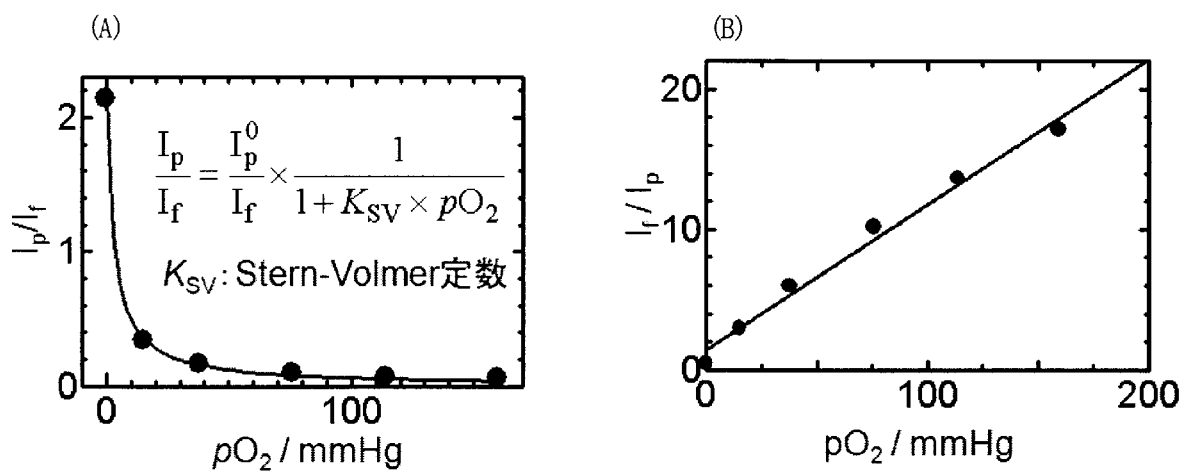
(青)

(紫)

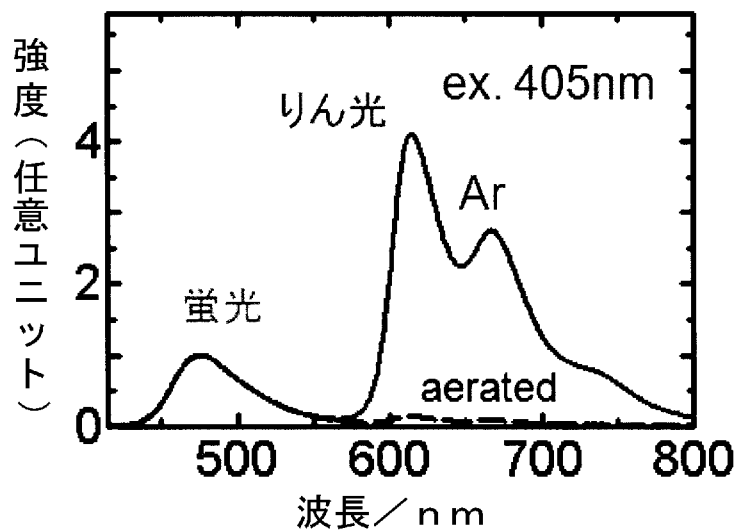
[図5]



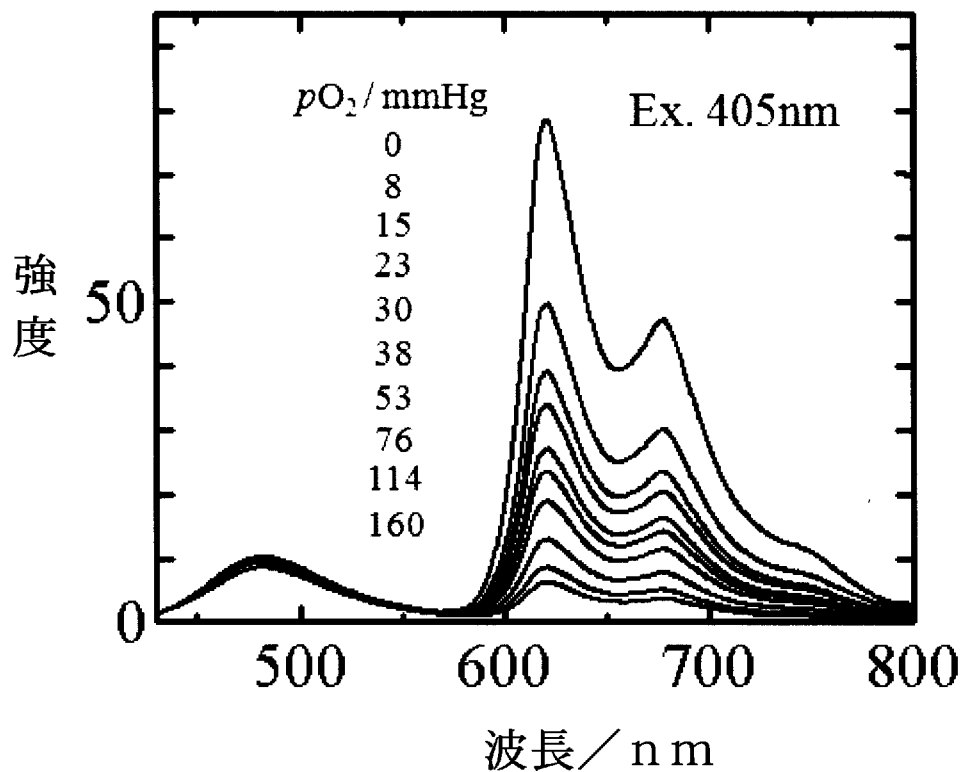
[図6]



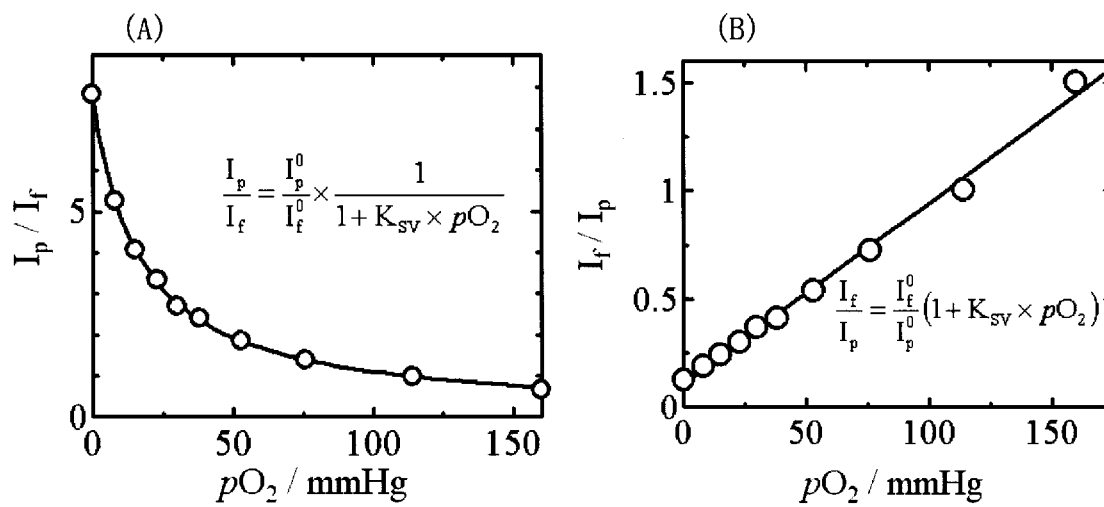
[図7]



[図8]



[図9]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2009/067919

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N31/22(2006.01)i, G01N21/78(2006.01)i, G01N31/00(2006.01)n

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)

G01N31/22, G01N21/78, G01N31/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2010
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2010	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2010

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CA/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN),
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X <u>Y</u> A	Raymond P. Brinas et al., Phosphorescent Oxygen Sensor with Dendritic Protection and Two-Photon Absorbing Antenna, J. Am. Chem. Soc., 2005, 127 (33), pp. 11851-11862	1, 2, 6, 10 <u>3-5</u> 7-9
Y	YOSHIHARA et al., "Iridium Sakutai no Shitsuon Rinko o Probe to suru Shishitsu Ni Bunshi Maku Chu no Sanso no Kyodo", Annual Meeting of Japan Society for Molecular Science Koen Yoshishu, 2007, 2C07	3-5
A	JP 2002-501479 A (The Trustees of the University of Pennsylvania), 15 January 2002 (15.01.2002), entire text; all drawings	1-10

 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
07 January, 2010 (07.01.10)Date of mailing of the international search report
26 January, 2010 (26.01.10)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2009/067919

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2003-254909 A (Japan Science and Technology Corp.), 10 September 2003 (10.09.2003), entire text; all drawings	1-10
A	JP 2007-049943 A (Kyoto University), 01 March 2007 (01.03.2007), entire text; all drawings	1-10
A	JP 2007-312688 A (Inax Corp.), 06 December 2007 (06.12.2007), fig. 5	7
A	Robert B. Best et al., Effect of flexibility and cis residues in single-molecule FRET studies of polyproline, PNAS, 2007, Vol. 104, No. 48, 18964-18969	8
A	Paramjit S. Arora et al., Design of Artificial Transcriptional Activators with Rigid Poly-L-proline Linkers, J. AM. CHEM. SOC., 2002, Vol. 124, 13067-13071	8
P,A	JP 2008-281467 A (National University Corporation Gunma University), 20 November 2008 (20.11.2008), entire text; all drawings	1-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/JP2009/067919

JP 2002-501479 A	2002.01.15	AT 265822 T	2004.05.15
		AT 310243 T	2005.12.15
		AU 700941 B2	1999.01.14
		AU 711817 B2	1999.10.21
		AU 722502 B2	2000.08.03
		AU 769780 B2	2004.02.05
		AU 1337000 A	2000.05.22
		AU 3145095 A	1996.02.22
		AU 5385798 A	1998.07.15
		AU 7979894 A	1995.05.04
		CA 2174209 A1	1995.04.20
		CA 2174209 C	2005.01.25
		CA 2195532 A1	1996.02.08
		CA 2195532 C	2005.06.07
		CA 2275191 A1	1998.06.25
		CA 2275191 C	2007.02.13
		CA 2348527 A1	2000.05.11
		DE 69532993 T2	2005.04.07
		DE 69734683 T2	2006.08.17
		DK 1021712 T3	2006.03.27
		EP 723548 A1	1996.07.31
		EP 723548 A4	1997.01.15
		EP 772416 A1	1997.05.14
		EP 772416 A4	1998.12.16
		EP 772416 B1	2004.05.06
		EP 1021712 A4	2000.07.26
		EP 1021712 A1	2000.07.26
		EP 1021712 B1	2005.11.16
		EP 1127265 A1	2001.08.29
		EP 1127265 A4	2006.01.25
		JP 2002-529696 A	2002.09.10
		US 5279297 A	1994.01.18
		US 5501225 A	1996.03.26
		US 5593899 A	1997.01.14
		US 5837865 A	1998.11.17
		US 6274086 B1	2001.08.14
		US 6362175 B1	2002.03.26
		WO 00/26643 A1	2000.05.11
		WO 95/10522 A1	1995.04.20
		WO 95/25463 A1	1995.09.28
		WO 96/03074 A1	1996.02.08
		WO 98/26708 A1	1998.06.25
JP 2003-254909 A	2003.09.10	(Family: none)	
JP 2007-049943 A	2007.03.01	US 2007/042345 A1	2007.02.22
JP 2007-312688 A	2007.12.06	(Family: none)	
JP 2008-281467 A	2008.11.20	(Family: none)	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2009/067919

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.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.:
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:

3. Claims Nos.:
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:
See extra sheet.

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 additional fees, this Authority did not invite payment of 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

International application No.

PCT/JP2009/067919

Continuation of Box No.III of continuation of first sheet (2)

The inventions of claims 1, 2, 6 and 10 are not novel over the invention disclosed in J. Am. Chem. Soc., 2005, 127(33), pp. 11851-11862, and therefore have no special technical feature. Then, the special technical features of the claims depending on claim 1 are examined. As a result, it is considered that the present application includes two groups of inventions in each of which the individual inventions are linked to one another through each of the special technical features stated below.

The inventions of claims 2, 6 and 10, which have no special technical feature, are classified into "Invention 1".

Invention 1: The inventions of claims 1-6, 9 and 10, and parts of the inventions of claims 7 and 8, which have the following special technical feature.

"A compound comprising a linker, an oxygen-concentration-responsive phosphorophore which is linked to a first end of the linker, and a fluorophore which is linked to a second end of the linker, wherein the oxygen-concentration-responsive phosphorophore is a group containing an iridium complex."

Invention 2: Parts of the inventions of claims 7 and 8, which have the following special technical feature.

"A compound comprising a linker, an oxygen-concentration-responsive phosphorophore which is linked to a first end of the linker, and a fluorophore which is linked to a second end of the linker, wherein the linker is a compound capable of preventing the phosphorophore and the fluorophore from being adjacently arranged to each other."

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))
 Int.Cl. G01N31/22(2006.01)i, G01N21/78(2006.01)i, G01N31/00(2006.01)n

B. 調査を行った分野
 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))
 Int.Cl. G01N31/22, G01N21/78, G01N31/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの
 日本国実用新案公報 1922-1996年
 日本国公開実用新案公報 1971-2010年
 日本国実用新案登録公報 1996-2010年
 日本国登録実用新案公報 1994-2010年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
 CA/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X Y A	Raymond P. Brinas et al., Phosphorescent Oxygen Sensor with Dendritic Protection and Two-Photon Absorbing Antenna, J. Am. Chem. Soc., 2005, 127 (33), pp. 11851-11862	1, 2, 6, 10 3-5 7-9
Y	吉原 他5名, イリジウム錯体の室温りん光をプローブとする脂質二分子膜中の酸素の挙動, 分子科学討論会講演要旨集, 2007, 2C07	3-5

C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー	の日の後に公表された文献
「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの	「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの	「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)	「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献	「&」同一パテントファミリー文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願	

国際調査を完了した日 07.01.2010	国際調査報告の発送日 26.01.2010
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 高場 正光 電話番号 03-3581-1101 内線 3292

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	JP 2002-501479 A (ザ トラスティーズ オヴ ザ ユニヴァーシ ティー オヴ ペンシルバニア) 2002. 01. 15、全文、全図	1-10
A	JP 2003-254909 A (科学技術振興事業団) 2003. 09. 10、全文、全図	1-10
A	JP 2007-049943 A (国立大学法人京都大学) 2007. 03. 01、全文、全 図	1-10
A	JP 2007-312688 A (株式会社 I N A X) 2007. 12. 06、図 5	7
A	Robert B. Best et al., Effect of flexibility and cis residues in single-molecule FRET studies of polyproline, PNAS, 2007, Vol. 104, No. 48, 18964-18969	8
A	Paramjit S. Arora et al., Design of Artificial Transcriptional Activators with Rigid Poly-L-proline Linkers, J. AM. CHEM. SOC., 2002, Vol. 124, 13067-13071	8
P, A	JP 2008-281467 A (国立大学法人群馬大学) 2008. 11. 20、全文、全 図	1-10

第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. 請求項 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2. 請求項 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. 請求項 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。
特別ページを参照

1. 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。
2. 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。
4. 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。

JP 2002-501479 A	2002. 01. 15	AT 265822 T	2004. 05. 15
		AT 310243 T	2005. 12. 15
		AU 700941 B2	1999. 01. 14
		AU 711817 B2	1999. 10. 21
		AU 722502 B2	2000. 08. 03
		AU 769780 B2	2004. 02. 05
		AU 1337000 A	2000. 05. 22
		AU 3145095 A	1996. 02. 22
		AU 5385798 A	1998. 07. 15
		AU 7979894 A	1995. 05. 04
		CA 2174209 A1	1995. 04. 20
		CA 2174209 C	2005. 01. 25
		CA 2195532 A1	1996. 02. 08
		CA 2195532 C	2005. 06. 07
		CA 2275191 A1	1998. 06. 25
		CA 2275191 C	2007. 02. 13
		CA 2348527 A1	2000. 05. 11
		DE 69532993 T2	2005. 04. 07
		DE 69734683 T2	2006. 08. 17
		DK 1021712 T3	2006. 03. 27
		EP 723548 A1	1996. 07. 31
		EP 723548 A4	1997. 01. 15
		EP 772416 A1	1997. 05. 14
		EP 772416 A4	1998. 12. 16
		EP 772416 B1	2004. 05. 06
		EP 1021712 A4	2000. 07. 26
		EP 1021712 A1	2000. 07. 26
		EP 1021712 B1	2005. 11. 16
		EP 1127265 A1	2001. 08. 29
		EP 1127265 A4	2006. 01. 25
		JP 2002-529696 A	2002. 09. 10
		US 5279297 A	1994. 01. 18
		US 5501225 A	1996. 03. 26
		US 5593899 A	1997. 01. 14
		US 5837865 A	1998. 11. 17
		US 6274086 B1	2001. 08. 14
		US 6362175 B1	2002. 03. 26
		WO 00/26643 A1	2000. 05. 11

		WO 95/10522 A1	1995. 04. 20
		WO 95/25463 A1	1995. 09. 28
		WO 96/03074 A1	1996. 02. 08
		WO 98/26708 A1	1998. 06. 25
-----	-----	-----	-----
JP 2003-254909 A	2003. 09. 10	(ファミリーなし)	
-----	-----	-----	-----
JP 2007-049943 A	2007. 03. 01	US 2007/042345 A1	2007. 02. 22
-----	-----	-----	-----
JP 2007-312688 A	2007. 12. 06	(ファミリーなし)	
-----	-----	-----	-----
JP 2008-281467 A	2008. 11. 20	(ファミリーなし)	
-----	-----	-----	-----

請求項 1, 2, 6, 10 に係る発明は、J. Am. Chem. Soc., 2005, 127 (33), pp. 11851-11862 に記載された発明に対して新規性が認められず、特別な技術的特徴を有しない。そこで、請求項 1 の従属請求項について特別な技術的特徴を判断すると、以下に示す各特別な技術的特徴で関連する 2 の発明が含まれるものと認められる。

なお、特別な技術的特徴を有しない請求項 2, 6, 10 に係る発明は、発明 1 に区分する。

発明 1：請求項 1-6, 9, 10 に係る発明及び請求項 7, 8 に係る発明のうち以下の特別な技術的特徴を有する発明

「リンカーと、該リンカーの第 1 の端に結合した酸素濃度応答性りん光団と、該リンカーの第 2 の端に結合したけい光団とを含む化合物において、酸素濃度応答性りん光団がイリジウム錯体を含む基である化合物」

発明 2：請求項 7, 8 に係る発明のうち以下の特別な技術的特徴を有する発明

「リンカーと、該リンカーの第 1 の端に結合した酸素濃度応答性りん光団と、該リンカーの第 2 の端に結合したけい光団とを含む化合物において、該リンカーがけい光団とりん光団との近接を避けるためのものである化合物」