

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2003年8月28日 (28.08.2003)

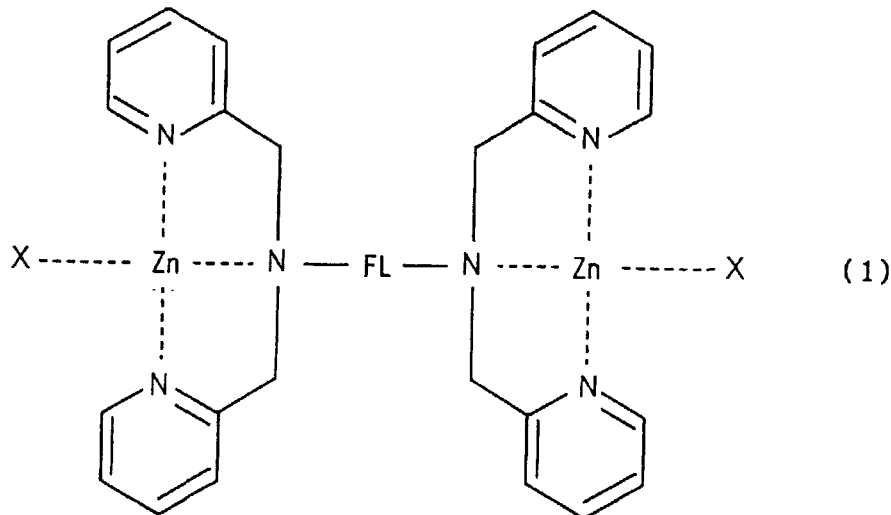
PCT

(10) 国際公開番号
WO 03/071280 A1

- (51) 国際特許分類⁷: G01N 33/58, 33/52, 21/78, 21/77, C07D 213/36, C09K 11/06 (HAMACHI, Itaru) [JP/JP]; 〒814-0012 福岡県 福岡市 早良区 昭代 2-8-8-504 Fukuoka (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP03/00705 (74) 代理人: 筒井 知 (TSUTSUI, Satoru); 〒812-0011 福岡県 福岡市 博多区 博多駅前 3-30-15 ライオンズ マンション 博多 906号 Fukuoka (JP).
- (22) 国際出願日: 2003年1月27日 (27.01.2003)
- (25) 国際出願の言語: 日本語 (81) 指定国 (国内): US.
- (26) 国際公開の言語: 日本語 (84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SI, SK, TR).
- (30) 優先権データ: 特願2002-45846 2002年2月22日 (22.02.2002) JP (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 科学技術振興事業団 (JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY CORPORATION) [JP/JP]; 〒332-0012 埼玉県 川口市 本町四丁目1番8号 Saitama (JP). 添付公開書類:
— 国際調査報告書
- (72) 発明者; および (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 浜地 格
- 2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: FLUORESCENT SENSOR FOR PHOSPHATE ION AND PHOSPHORYLATED PEPTIDE

(54) 発明の名称: リン酸イオンおよびリン酸化ペプチド用蛍光センサー



(57) Abstract: A fluorescent sensor for phosphate ions or phosphorylated peptides which comprises a compound selectively fluorescing by the action of phosphate ions and represented by the following general formula (1). In the formula (1), FL represents a fluorescent functional group or fluorescent group of atoms which has an aromatic ring or heterocycle (e.g., dimethylanthryl) and X represents a functional group or group of atoms which undergoes elimination in an aqueous solution to become an anion (e.g., NO₃).

[続葉有]

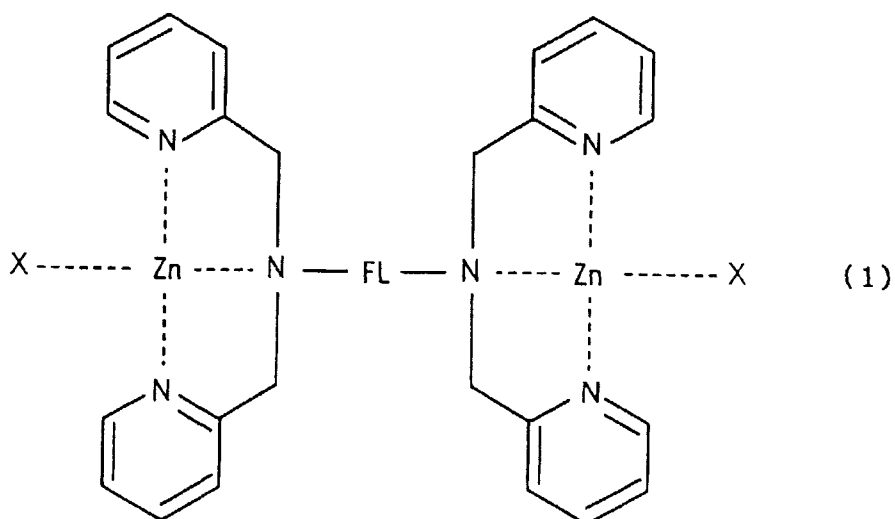


WO 03/071280 A1



(57) 要約:

下記的一般式(1)で表わされるリン酸アニオン選択的発蛍光性化合物から成る、リン酸イオンおよびリン酸化ペプチド用蛍光センサーが開示されている。式(1)中、FLは、芳香環または複素環を有する発蛍光性官能基または原子団(例えばジメチルアントリル基)を表わし、Xは、水溶液中で脱離してアニオンと成る官能基または原子団(例えばNO₃)を表わす。



明 細 書

リン酸イオンおよびリン酸化ペプチド用蛍光センサー技術分野

- 5 本発明は、アニオンを検出するための技術分野に属し、特に、生体内に相応する水溶液中でリン酸アニオンの存在下に蛍光変化するリン酸アニオン選択的発蛍光性化合物から成りリン酸イオンやリン酸化ペプチドの分析に用いられる蛍光センサーに関する。

10 背景技術

- リン酸アニオンは生体内において重要な役割を果たしている。例えばシグナル伝達系では、リン酸化タンパク質やリン脂質のリン酸基を介し、種々の情報伝達の制御が行なわれている。したがって、生体内に相応する水溶液中でリン酸アニオンを検出するセンシングシステムが確立できれば、細胞生物学等の分野にお
- 15 る基本的ツールとして生体内の諸プロセスの解析に利用でき、また、その成果に基づき新しい薬剤や試薬の開発に資することができるものと期待される。例えば、情報伝達異常によって引き起こされるガン化の鍵反応である細胞内リン酸化シグナルを認識し、その阻害剤等の設計のために有効であると考えられる。

- リン酸アニオンのようなアニオンを検出するには、アニオンに特異的に結合し
- 20 て蛍光変化する化合物から成る蛍光プローブが有用であると考えられる。しかしながら、金属イオンに代表されるカチオンを検出するための蛍光プローブは多く開発されているのに対し、アニオンを検出し得る蛍光プローブに関しては、有機溶媒中で機能するものは幾つか提示されているが、生体内のような中性水溶液中で使用できるものは殆ど存在しない。これは、一般にアニオンは金属イオンより
- 25 もサイズが大きいため、水溶液中では水和の影響を受けやすくキレートさせることが困難なことに一因がある。また、金属イオン検出用プローブの場合、蛍光化

化合物の構造式中に存在する芳香族アミノ基などが金属に配位することによって蛍光特性を変化させることが可能であるが、アニオン検出において同様の手法を用いることは困難なことにも因る。これらのことから、リン酸アニオンのようなアニオンを検出するための蛍光プローブの例はきわめて少ない。

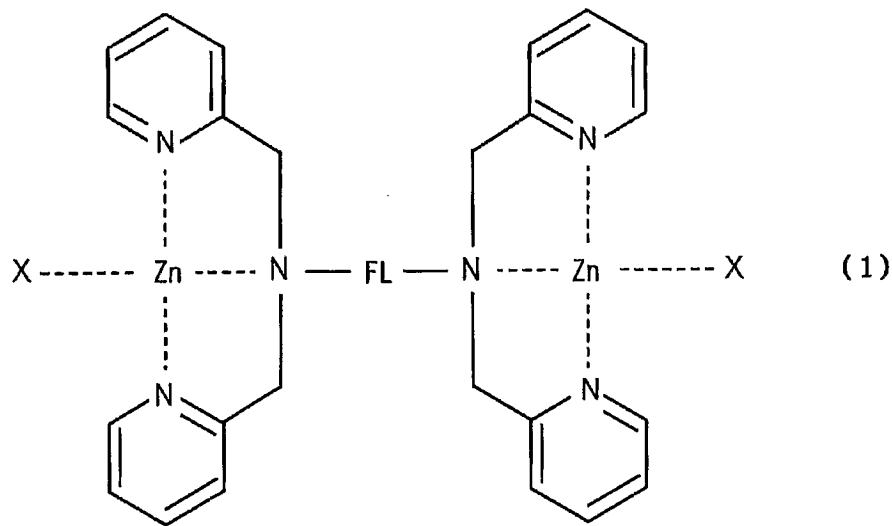
- 5 水溶液中でリン酸アニオンを認識する蛍光プローブの数少ない例として Beer らによって報告されているルテニウム-ビピリジルポリアザ化合物がある (P.D. Beer 他、Angew. Chem. Int. Ed., 40, 486 (2001); P.D. Beer 他、J. Am. Chem. Soc., 119, 11864 (1997)) が、その蛍光変化はかなり小さい。その他には、有機ボロン酸ジエステル化合物をリン酸イオン等のアニオン検出用蛍光プローブとして使用する例 (特開 2001-133407) が見出される程度である。

本発明の目的は、リン酸アニオンを高感度に検出することのできる蛍光プローブから成る新規なセンサーを提供することにある。

発明の開示

- 15 本発明者は、研究を重ねた結果、アントラセン等の蛍光性官能基を骨格として有する亜鉛ジピコリルアミン二核錯体型分子が、生理的条件に相応する水溶液中でリン酸アニオンを選択的に捕捉し、これを蛍光変化としてセンシングできることを発見した。

- かくして、本発明に従えば、上記の目的を達成し得るものとして、下記の一般式 (1) で表わされるリン酸アニオン選択的発蛍光性化合物から成る、リン酸イオンおよびリン酸化ペプチド用蛍光センサーが提供される。



式(1)中、FLは、芳香環または複素環を有する発蛍光性官能基または原子団を表わし、Xは、水溶液中で脱離してアニオンと成る官能基または原子団を表わす。

5

図面の簡単な説明

第1図は、本発明の蛍光センサーに用いられる亜鉛ジピコリルアミン二核錯体の合成スキームを概示する。

第2図は、本発明の蛍光センサーを用いて種々のアニオンの濃度変化に対する
10 蛍光強度変化を測定した1例を示す。

第3図は、本発明の蛍光センサーのペプチドに対する配列選択性を調べるのに用いたペプチドのアミノ酸配列を示す。

第4図は、本発明の蛍光センサーを用いて種々の配列のペプチドの濃度変化に対する蛍光強度変化を測定した1例を示す。

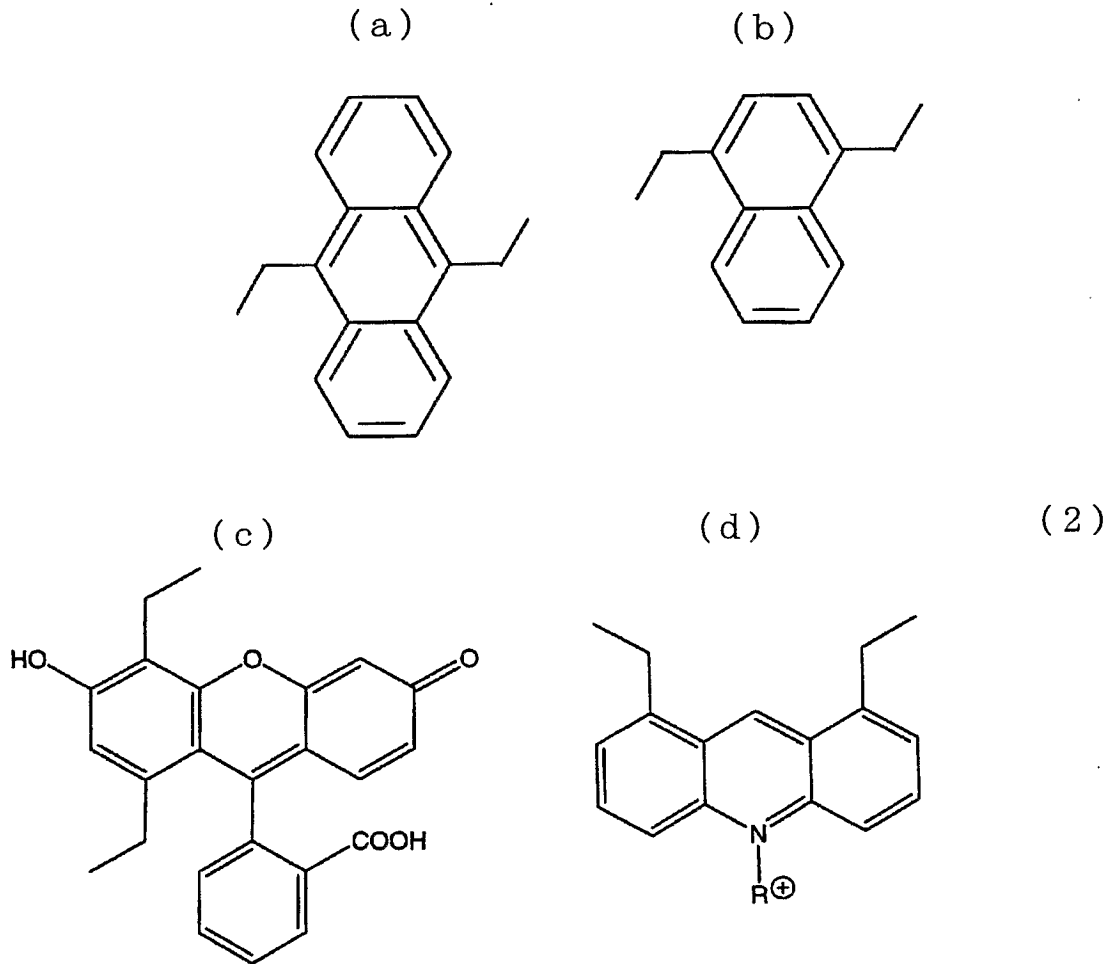
15

発明を実施するための最良の形態

本発明の蛍光センサーに用いられるリン酸アニオン選択的発蛍光性化合物は、式(1)で表わされるように、2, 2'-ジピコリルアミン(以下、Dpaと略

称する) と亜鉛とから構成される亜鉛二核錯体型化合物から成る新しいタイプのアニオン検出用蛍光プローブである。式(1)において、FLで表わされる芳香環または複素環を有する発蛍光性官能基または原子団として好ましい例は、下記の(2)の(a)、(b)、(c)または(d)で表わされるものである。

5

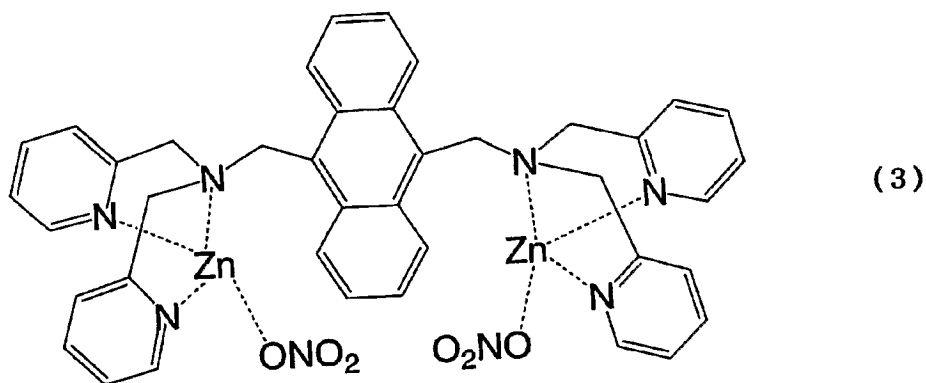


式(d)において、Rは、水素原子、炭素数1~4のアルキル基、またはベンジル基を表わす。

- 10 また、式(1)において、Xで表わされ、水溶液中で脱離してアニオンと成る官能基または原子団として好ましい例としては、NO₃、ハロゲン原子(特に、塩素または臭素)、ClO₄(過塩素酸イオン)などを挙げることができる。

かくして、本発明のリン酸イオンおよびリン酸化ペプチド用蛍光センサーを構

成するリン酸アニオン選択的発蛍光性化合物の特に好ましい1例は、下記の式(3)で表わされるものである(以下、式(3)の化合物をZn(Dpa)-9, 10-Anth錯体と略称する)。



5

式(3)の化合物に代表される式(1)の金属錯体は、生体内の条件(生理的条件)に相応する中性pHの水溶液中で、リン酸アニオンの存在下に顕著な蛍光変化を示すリン酸アニオン選択的発蛍光性化合物である。これは、式(1)で表わされる化合物は、水中においてXが脱離してリン酸アニオンと入れ替わることによりリン酸アニオンを選択的に捕捉し、これが蛍光変化として出現すること

10 因るものと考えられる。

かくして、本発明で用いられる式(1)で表わされる発蛍光性化合物は、 μM オーダーの濃度を含むきわめて低濃度のリン酸イオンの存在下に明瞭な蛍光変化を示すリン酸イオンの定性および定量分析用高感度センサーとして機能する(後

15 述の実施例2参照)。

さらに、式(1)で表わされる発蛍光性化合物は、単離したリン酸イオンのみならず、特定のリン酸化ペプチドに対しても蛍光応答を示す。すなわち、本発明の化合物は、リン酸化アミノ酸(アミノ酸残基)の他に疎水性アミノ酸残基およびアニオン性アミノ酸残基を含むアミノ酸配列から成るペプチドに対して高い親

20 和性を有し、該ペプチドの濃度変化に応じた蛍光変化を示す。これは、芳香環や

複素環を持つ本発明の化合物が、一般にトータルで4価の正電荷を有することに因るものと考えられる。このように、式(1)で表わされる亜鉛ジピコリルアミン二核錯体から成る本発明の化合物は、リン酸化ペプチドに対する配列選択的なセンサーとしても機能する(後述の実施例3参照)。

- 5 式(1)で表わされる発蛍光性化合物は、既知の反応を工夫することにより容易に合成することができる。第1図は、本発明で用いられる式(1)の発蛍光性化合物の合成スキームを概示するものである。第1図に示すように、発蛍光性官能基または原子団(FL)を有するプロモ体(A)を得ることができれば、これを炭酸カリウムの存在下に2, 2'-ジピコリルアミン(B)と反応させること
- 10 により、発蛍光性官能基または原子団(FL)を介して2つのDpaが結合した化合物(C)が生成される。発蛍光性化合物となる所望の金属錯体(1)を得るには、この化合物(C)を亜鉛のX塩(ZnX)と混合するだけでよい。すなわち、亜鉛は配位子置換活性であるため、平衡が非常に速いので、適当な緩衝液(例えば、ホウ酸緩衝液)でpHを調整した水溶液中で、合成レセプター分子と亜鉛
- 15 の塩(例えば硝酸亜鉛)を混合するだけで所望の錯体が形成される。

実施例

以下に、本発明の特徴をさらに具体的に明らかにするため実施例を示すが、本発明は、これらの実施例によって制限されるものではない。

- 20 なお、本明細書および図面中の化学構造式においては、慣用的な表現法に従い、炭素原子や水素原子を省略して示していることもある。また、化学構造式において、破線で示しているのは配位結合である。

実施例1：発蛍光性化合物の合成

- 本発明に従う発蛍光性化合物として、既述の式(3)で表される $Zn(Dpa)-9,$
- 25 $10-Anth$ 錯体を以下のように合成した。

まず、ジメチルアントリル基を介して2つのDpaが結合した化合物(第1図

- のCに相当)を次のように合成した: 50mL の二口フラスコに、ヨウ化カリウム 0.12g、炭酸カリウム 1.05g、9, 10-ビス(クロロメチル)アントラセン(A) 0.50 g を入れ、脱気窒素置換した後、ジメチルホルムアミド 10mL に溶解した。
- 5 ジピコリルアミン(B) 0.68mL を加えて 35 度で 6 時間、45 度で一晩加熱攪拌した。不溶物をろ別後、ろ液を減圧留去した。得られた残渣をクロロホルムに溶解し、0.01N 水酸化ナトリウム水溶液で洗浄した。有機相を濃縮後、シリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製し、黄土色固体を得た。同定はNMRと元素分析(計算値: C: 79.97、H: 6.04、N: 13.99、実測値: C: 79.84、H: 6.04、N: 13.99)で行った。
- 10 次に、以上のようにして得られた化合物 45.06mg をメタノールに溶解させ、50mM 硝酸亜鉛水溶液 3mL を加えて攪拌した。メタノールを減圧留去した後、凍結乾燥を行い黄土色固体として式(3)の化合物を得た。同定は質量分析(分子量計算値: 852.75、実測値: 852.94)および元素分析(計算値: C: 47.31、H: 3.97、N: 13.79、実測値: C: 47.20、H: 3.93、N: 13.74)で行った。
- 15 実施例 2: アニオン選択性実験
- 本発明に従う発蛍光性化合物として実施例 1 のように調製した Zn(Dpa)-9, 10-Anth 錯体を用いて、種々のアニオンの濃度変化に対する蛍光強度変化を測定した。測定したアニオンは、リン酸イオン(phosphate)、酢酸イオン(acetate)、硝酸イオン(nitrate)、硫酸イオン(sulfate)、アジドイオン(azide)、フッ素イオン(fluoride)、塩素イオン(chloride)および臭素イオン(bromide)であり、
- 20 いずれもナトリウム塩として水溶液中に添加し溶解させた。測定条件は以下のとおりである。
- Zn(Dpa)-9, 10-Anth 錯体濃度 = 10 μ M
アニオン濃度 = 0, 10, 20, 30, 100, 500, 1000, 2000 μ M (0~200eq.)
- 25 水溶液: pH(7.2), 10mM HEPES バッファー
測定温度 = 20°C

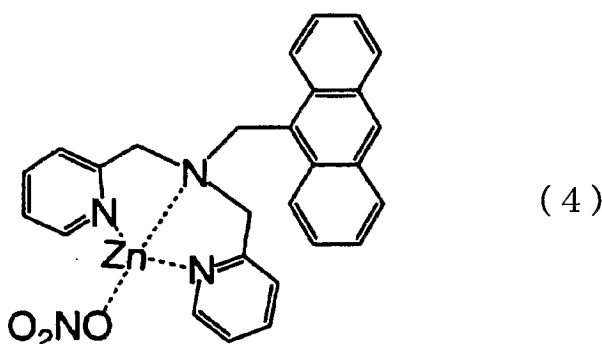
測定セル：1 cmセル

励起波長 $\lambda_{ex} = 380 \text{ nm}$ ($ex/em = 2.5/2.5 \text{ nm}$)

測定結果を第2図に示す。図に示されるようにリン酸イオン以外のアニオンについては、蛍光強度の変化は殆ど認められない。このように、本発明に従う Zn(Dpa)-9, 10-Anth 錯体は、リン酸アニオンに対して高い選択性を有し、高感度のリン酸アニオン分析用センサーとして機能することが理解される。

実施例3：ペプチドに対する配列選択性実験

既述の式(3)の Zn(Dpa)-9, 10-Anth 錯体を用い種々の配列のペプチドに対する蛍光変化を調べ、その選択性を評価した。比較のために、下記の式(4)で表わされるように Zn(Dpa)を1つだけ持つ単核錯体についても同様の実験を行なった(以下、式(4)の化合物を Zn(Dpa)-9-Anth 錯体と略称する)。



ペプチド合成

第3図に示すようなアミノ酸配列を有するペプチドを用いて実験を行なった。各ペプチドは、N末端がアセチル化により保護され且つC末端がアミド型となっており、ペプチド(peptide) 1, 1', 2および3のアミノ酸配列は、それぞれ、配列番号1, 2, 3および4として後述の配列表に記すものである。ペプチド1, 2および3は、第3図のカッコ内に示したキナーゼによりリン酸化されるコンセンサス配列を構成するものである。各配列は、次の特性を有するものとして選択した。

ペプチド1：リン酸化されたアミノ酸(5位の Tyr)を有するとともに、疎

水性残基を有し、負電荷をもつアミノ酸も存在する。

ペプチド1': ペプチド1のコントロールペプチドであり、リン酸化されたアミノ酸を有しない。

5 ペプチド2: リン酸化されたアミノ酸(5位のSer)を有し、疎水性残基を有してはいるが、正電荷をもつアミノ酸が多く存在する。

ペプチド3: リン酸化されたアミノ酸(4位のTyr)を有するとともに、疎水性残基を有し、正電荷・負電化をもつアミノ酸が同じ数存在し、全体的に電荷が中和されている。

10 各ペプチドはペプチド合成機(ABI 433A peptide synthesizer)により自動合成した。アミド樹脂(導入率 0.64mmol/g、0.1mmol スケール)に対して4等量のFmocアミノ酸(0.4mmol)を用い、ペプチド合成装置により自動合成した。なお、縮合剤にはHBTUを用い、N末端アミノ酸の脱保護まで行った。自動合成後、得られた樹脂を使い捨てカラムに移し、塩化メチレンでよく洗浄した。その後、塩化メチレン5ml、無水酢酸0.8mlを加え、ボルテックスで攪拌した。反
15 応追跡はカイザーテストにより行い、フリーのアミノ基が完全になくなるまで反応を続けた。反応終了後、塩化メチレンでよく洗浄し、デシケータ中で減圧乾燥した。

20 得られた樹脂を50mlのナスフラスコに入れ、切り出し・脱保護用試薬(m-クレゾール、チオアニソール、TFA)をそれぞれ必要量(樹脂300mgに対し、m-クレゾール0.06ml、チオアニソール0.36ml、TFA2.58ml)加え、室温で1時間攪拌した。樹脂をろ別し、ろ液を減圧留去した。TBMEを加え、粗ペプチドの沈殿物をろ取し、デシケータ中で減圧乾燥した。得られた粗ペプチドをNMPに溶解させ、HPLCを用いて目的ペプチドのピークを分取した。同定はMALCI-TOF-MSにより行った。

25 ペプチド選択性評価

各ペプチドに対する水溶液中における選択性は蛍光測定により評価した。測定

条件は下記のとおりである。

錯体濃度 = $0.5 \mu\text{M}$ 。但し、ペプチド 3 に対する $\text{Zn(Dpa)-9, 10-Anth}$ 錯体の濃度は $10 \mu\text{M}$ 。

ペプチド濃度 = $0 \sim 10 \text{eq.}$ 。但し、ペプチド 3 に対するペプチド濃度は $0 \sim 5 \text{eq.}$ 。

5 測定水溶液：pH (7.2)、50mM HEPES バッファー。

測定セル：1cm セル

励起波長 $\lambda_{\text{ex}} = 380 \text{nm}$ (スリット幅 $\text{ex/em} = 5/10 \text{nm}$)。

測定結果を第 4 図に示す。第 4 図に示されるように、 $\text{Zn(Dpa)-9, 10-Anth}$ 錯体のみが、リン酸化されたアミノ酸を有するとともに疎水性アミノ酸を有し且

10 つ負電荷をもつアミノ酸が存在するペプチド (ペプチド 1) のみに対して高い親和性を有し、そのペプチド濃度の変化に応じて蛍光強度が顕著に変化している。

したがって、本発明に従う $\text{Zn(Dpa)-9, 10-Anth}$ 錯体は、リン酸化ペプチドの対する配列選択的なセンサーとしても機能することが理解される。

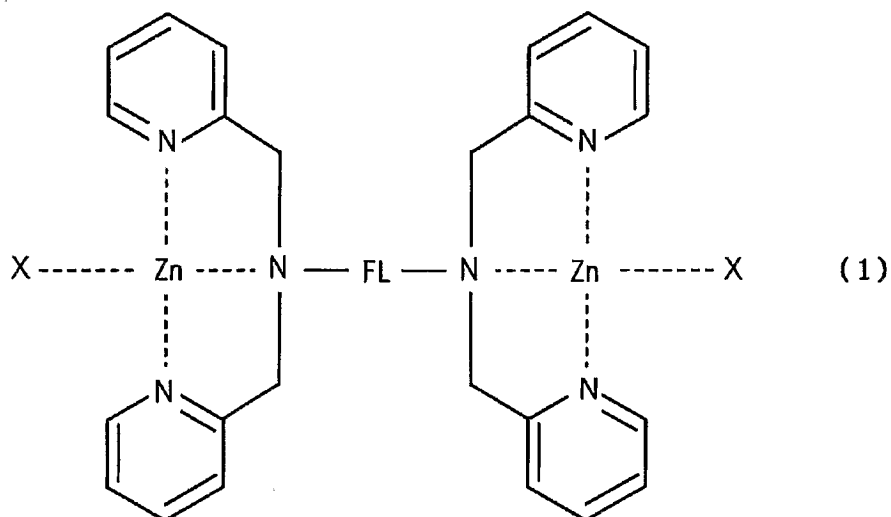
15 産業上の利用の可能性

如上の説明から明らかなように、本発明に従う亜鉛ジピコリルアミン二核錯体は、生体内の条件に相応する水溶液中において、リン酸イオンを検出する高感度の蛍光センサーとして機能し、また、リン酸化ペプチドに対する配列選択的な高感度センサーとしても有用である。したがって、本発明は、生体内の反応機構を

20 解明するための有力な研究手段を提供するとともに、この手段を利用して新しい薬剤、試薬、機能素子等の開発に資するものである。

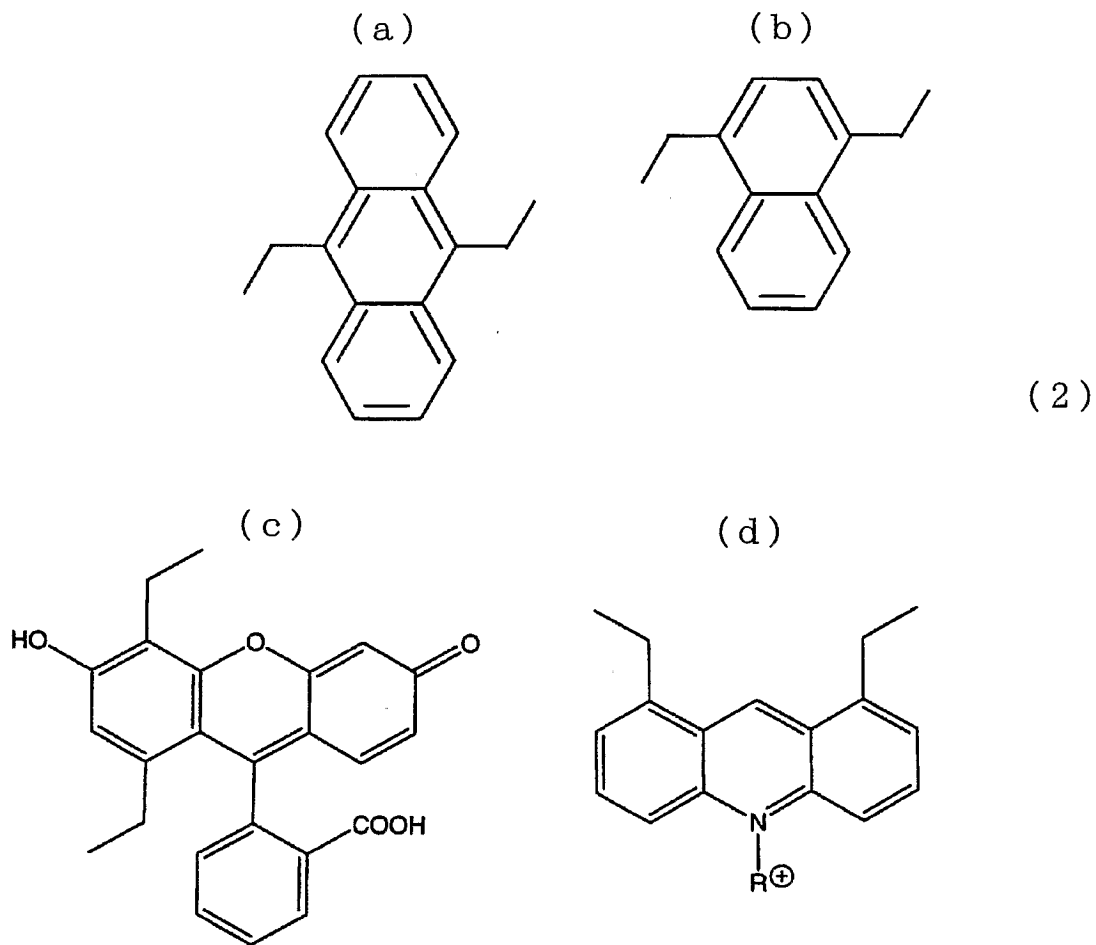
請求の範囲

1. 下記的一般式(1)で表わされるリン酸アニオン選択的発蛍光性化合物から成ることを特徴とするリン酸イオンおよびリン酸化ペプチド用蛍光センサー。



〔式(1)中、FLは、芳香環または複素環を有する発蛍光性官能基または原子団を表わし、Xは、水溶液中で脱離してアニオンと成る官能基または原子団を表わす。〕

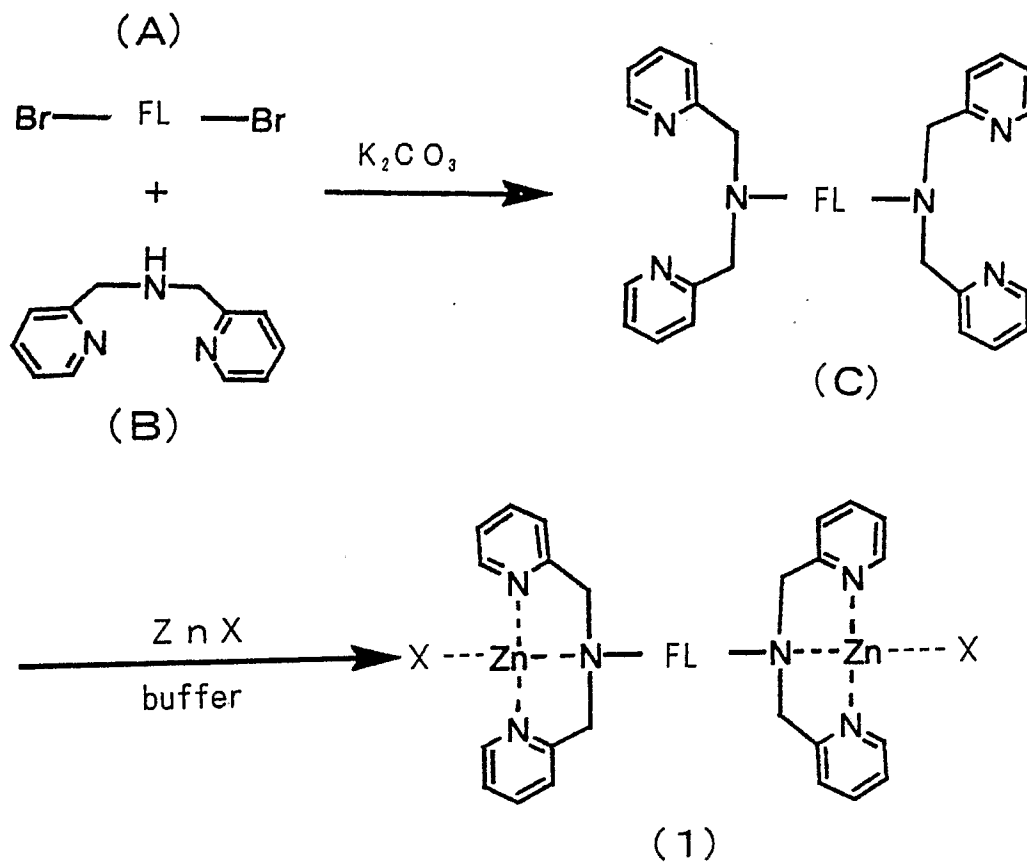
- 10 2. FLが、下記の(2)に示す(a)、(b)、(c)または(d)の1つから選ばれることを特徴とする請求項1の発蛍光性化合物。



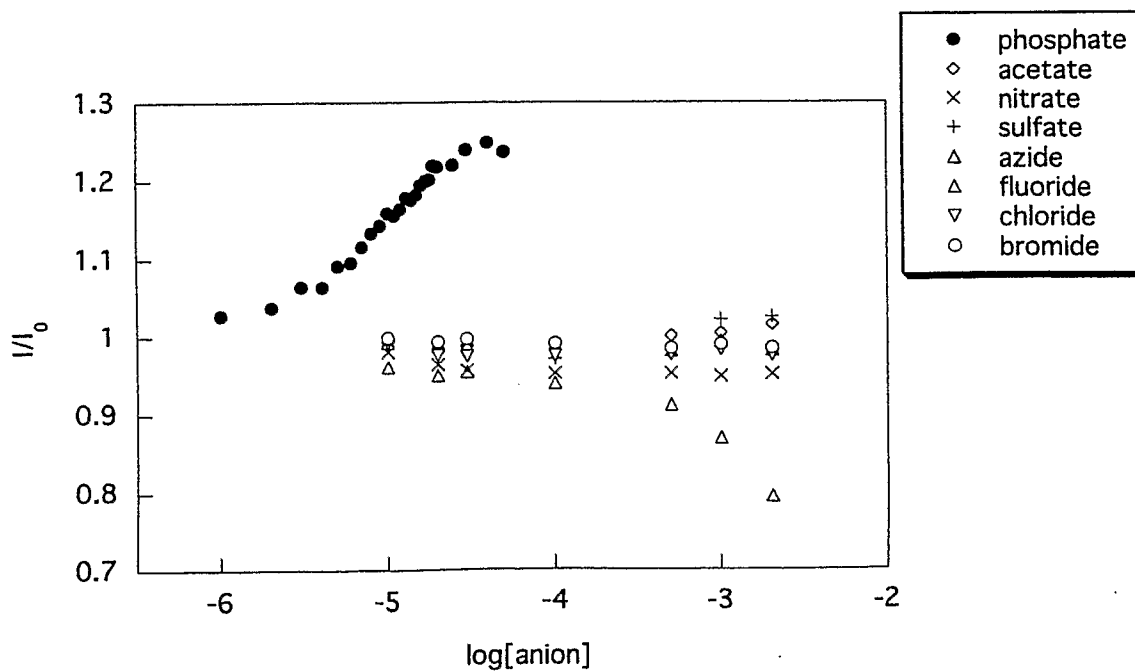
〔式 (d) において、R は、水素原子、炭素数 1 ~ 4 のアルキル基、またはベンジル基を表わす。〕

- 5 3. X が、 NO_3 、ハロゲン原子、または ClO_4 であることを特徴とする請求項 1 または 2 の発蛍光性化合物。

第 1 図



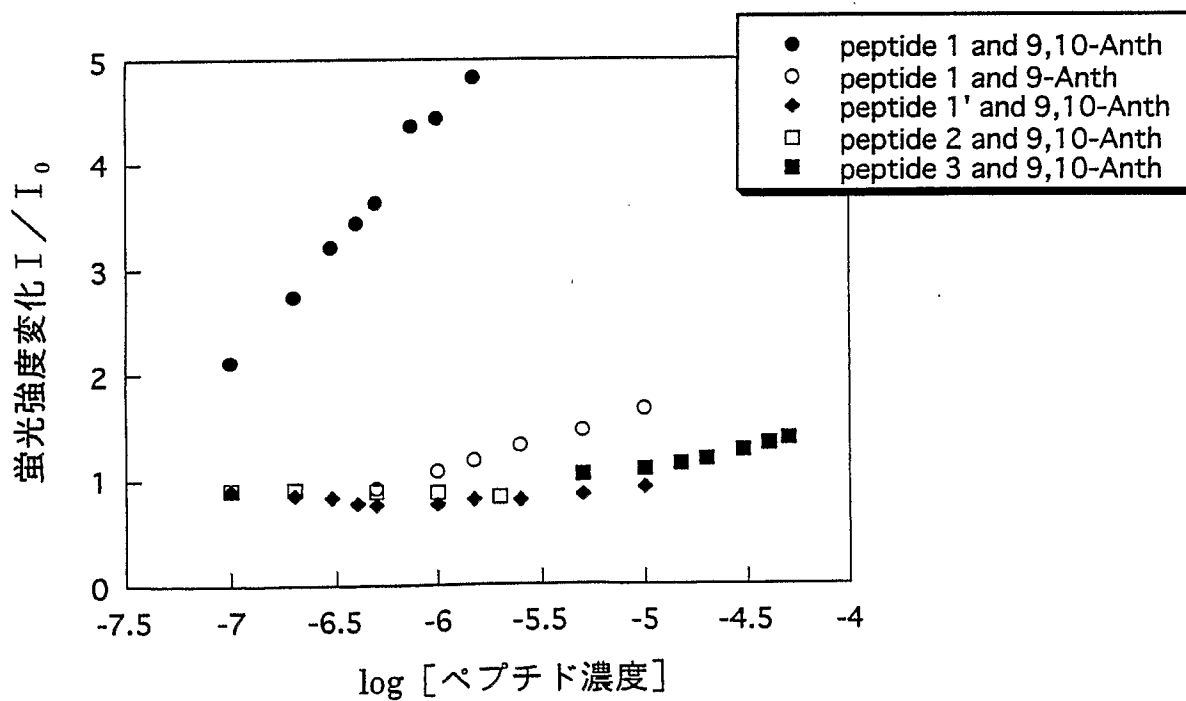
第 2 図



第3図

- peptide 1 AcNH-Glu-Glu-Glu-Ile-pTyr-Glu-Glu-Phe-Asp-CONH₂ (v-Src)
- peptide 1' AcNH-Glu-Glu-Glu-Ile-Tyr-Glu-Glu-Phe-Asp-CONH₂
- peptide 2 AcNH-Arg-Arg-Phe-Gly-pSer-Ile-Arg-Arg-Phe-CONH₂ (Bck2)
- peptide 3 AcNH-Lys-Ser-Gly-pTyr-Leu-Ser-Ser-Glu-CONH₂ (EGFR)

第4図



SEQUENCE LISTING

- <110> Japan Science and Technology Corporation
<110> HAMACHI itaru
- 5
- <120> Fluorescent sensors for phosphate-ions and phosphorylated peptides
- <130> P0087T-PCT
- 10 <150> JP P2002-045846
<151> 2002-02-22
- <160> 4
- 15 <210> 1
<211> 9
<213> Artificial Sequence
- <222> Position 5
- 20 <223> Tyrosine at the position 5 is phosphorylated
- <400> 1
Glu Glu Glu Ile Tyr Glu Glu Phe Asp
- 25 <210> 2
<211> 9

<213> Artificial Sequence

<400> 2

Glu Glu Glu Ile Tyr Glu Glu Phe Asp

5

<210> 3

<211> 9

<213> Artificial Sequence

10 <222> Position 5

<223> Serine at the position 5 is phosphorylated

<400> 3

Arg Arg Phe Gly Ser Ile Arg Arg Phe

15

<210> 4

<211> 8

<213> Artificial Sequence

20 <222> Position 4

<223> Tyrosine at the position 4 is phosphorylated

<400> 4

Lys Ser Gly Tyr Leu Ser Ser Glu

25

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP03/00705

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl⁷ G01N33/58, G01N33/52, G01N21/78, G01N21/77, C07D213/36, C09K11/06

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)
Int.Cl⁷ G01N33/58, G01N33/52, G01N21/78, G01N21/77, C07D213/36, C09K11/06

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2003
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2003 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2003

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	JP 2001-253871 A (Japan Science and Technology Corp.), 18 September, 2001 (18.09.01), (Family: none)	2, 3 1
A	WO 00/63422 A (IIT RESEARCH INSTITUTE), 26 October, 2000 (26.10.00), & AU 200051225 A & EP 1175507 A & JP 2002-541857 A	1-3
A	JP 7-508537 A (Eastman Kodak Co.), 21 September, 1995 (21.09.95), & WO 94/24123 A & EP 647223 A & US 5608059 A	1-3

Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

<p>* 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 document 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</p>	<p>"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</p>
---	--

Date of the actual completion of the international search 21 February, 2003 (21.02.03)	Date of mailing of the international search report 04 March, 2003 (04.03.03)
---	---

Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/00705

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Norio TERAMAE, "Denki Kassei Jinko Anion Receptor o Riyo shita Rinsan Ion Sensor no Kaihatsu", Kozo Kisei Kino Kaimen no Kochiku to Denkyoku Hanno Heisei 9 Nendo Seika Hokokusho, 1998, pages 147 to 148	1-3
A	Yoshio UMEZAWA, "Muki Rinsan oyobi Rinsanka Tanpakushitsu no Bunshi Ninshiki Kagaku to Kenshutsuho", CSJ: The Chemical Society of Japan Dai 80 Shuki Nenkai, 07 September, 2001 (07.09.01), page 80	1-3
P,X	Yasuko MITO'OKA et al., "Rinsanka Tanpakushitsu Peptide o Ninshiki suru Jinko Receptor no Kaihatsu (1)", CSJ: The Chemical Society of Japan Dai 81 Kai Shunki Nenkai, 11 March, 2002 (11.03.02), page 878	1-3

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ G01N 33/58 G01N 33/52 G01N 21/78 G01N 21/77 C07D213/36 C09K 11/06

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. Cl⁷ G01N 33/58 G01N 33/52 G01N 21/78 G01N 21/77 C07D213/36 C09K 11/06

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 1971-2003年
 日本国登録実用新案公報 1994-2003年
 日本国実用新案登録公報 1996-2003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)

CAS ONLINE, JOIS

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 請求の範囲の番号
X A	JP 2001-253871 A (科学技術振興事業団) 2001. 09. 18 (ファミリーなし)	2, 3 1
A	WO 00/63422 A (IIT RESEARCH INSTITUTE) 2000. 10. 26 & AU 200051225 A & EP 1175507 A & JP 2002-541857 A	1-3
A	JP 7-508537 A (イーストマン コダック カンパニー) 1995. 09. 21 & WO 94/24123 A & EP 647223 A & US 5608059 A	1-3

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

「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
 「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
 「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)
 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献
 「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
 「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
 「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
 「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

21. 02. 03

国際調査報告の発送日

04.03.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)
 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)
 宮澤 浩



2 J 9407

電話番号 03-3581-1101 内線 3251

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリ*	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 請求の範囲の番号
A	寺前紀夫, 電気活性人工アニオンレセプターを利用したリン酸イオンセンサーの開発, 構造規制機能界面の構築と電極反応 平成9年度成果報告書, 1998年, p. 147-148	1-3
A	梅澤喜夫, 無機リン酸およびリン酸化蛋白質の分子認識化学と検出法, 日本化学会第80秋期年会, 2001. 09. 07, p. 80	1-3
PX	水戸岡靖子ら, リン酸化蛋白質・ペプチドを認識する人工レセプターの開発 (1), 日本化学会第81春期年会, 2002. 03. 11, p. 878	1-3