

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02006/054426

発行日 平成20年8月7日(2008.8.7)

(43) 国際公開日 平成18年5月26日(2006.5.26)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C07C 43/166 (2006.01)	C07C 43/166	2G054
A61K 49/00 (2006.01)	A61K 49/00 A	4B063
C07D 207/448 (2006.01)	C07D 207/448 C S P	4C063
C07D 207/46 (2006.01)	C07D 207/46	4C069
C07D 409/06 (2006.01)	C07D 409/06	4C085
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 27 頁) 最終頁に続く		

出願番号 特願2006-544825 (P2006-544825)	(71) 出願人 305060567 国立大学法人富山大学 富山県富山市五福3190
(21) 国際出願番号 PCT/JP2005/019514	
(22) 国際出願日 平成17年10月24日(2005.10.24)	
(31) 優先権主張番号 特願2004-315018 (P2004-315018)	(74) 代理人 100114074 弁理士 大谷 嘉一
(32) 優先日 平成16年10月29日(2004.10.29)	
(33) 優先権主張国 日本国(JP)	(72) 発明者 井上 将彦 富山県富山市金屋5128-305
(31) 優先権主張番号 特願2005-118313 (P2005-118313)	(72) 発明者 藤本 和久 富山県富山市古沢632-110
(32) 優先日 平成17年4月15日(2005.4.15)	(72) 発明者 清水 久夫 富山県富山市古沢671-110
(33) 優先権主張国 日本国(JP)	Fターム(参考) 2G054 CE02 EA03 4B063 QA01 QA18 QQ42 QQ52 QR56 QR66 QS36 QX02
	最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 高蛍光量子収率型疎水性蛍光プローブ、それを用いる生体高分子検出法ならびに生体高分子間相互作用検出法

(57) 【要約】

【課題】

in vivoにおいて高感度検出ができる高蛍光量子収率型疎水性蛍光プローブ分子、その高蛍光量子収率型疎水性蛍光プローブ分子を用いた生体高分子検出法及び生体高分子間相互作用検出法を提供することを目的とする。

【解決手段】

ピレン骨格の1位にマレイドイミド基で置換されたアリールエチニル基を導入した蛍光プローブに代表されるエキシマー形成可能な蛍光性有機基に置換基を有するアリールエチニル基を導入した蛍光プローブ。この蛍光プローブ分子で被検生体高分子をラベル化することで可能となる生体高分子検出法ならびに生体高分子間相互作用検出法。

【選択図】

図 7

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

置換基を有するアリールエチニル基を蛍光性有機分子に導入したことを特徴とする蛍光プローブ分子。

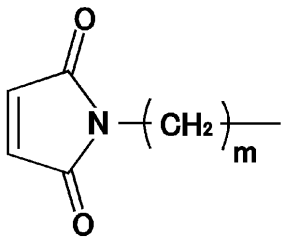
【請求項 2】

アリールエチニル基がフェニルエチニル基またはチエニルエチニル基であることを特徴とする請求の範囲 1 に記載の蛍光プローブ分子

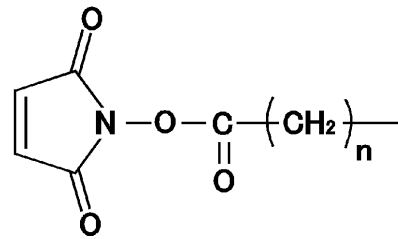
【請求項 3】

置換基が以下の置換基から選ばれたものであることを特徴とする請求の範囲 1 に記載の蛍光プローブ分子

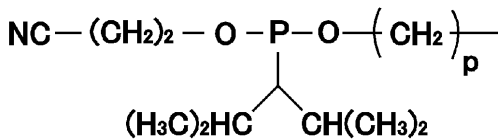
10



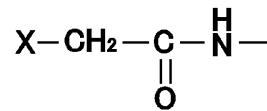
...(1)



...(2)



...(3)



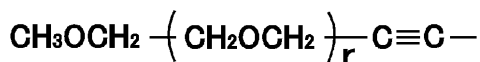
...(4)

20

(式中、X はハロゲン原子を；m は 0 または 1 ~ 5 の整数を；n および p は 1 ~ 5 の整数を意味する。)

【請求項 4】

無置換のアリールエチニル基および式



...(5)

30

(r は 6 ~ 10 の整数を意味する)

で示される基を蛍光性有機分子に導入したことを特徴とする蛍光プローブ分子。

【請求項 5】

アリールエチニル基がフェニルエチニル基またはチエニルエチニル基であることを特徴とする請求の範囲 4 に記載の蛍光プローブ分子

【請求項 6】

蛍光性有機分子がピレン、アントラセン、フルオレンまたはペリレンであることを特徴とする請求の範囲 1 ~ 5 のいずれかに記載の蛍光プローブ分子

【請求項 7】

請求の範囲 1 ~ 6 に記載のいずれかの蛍光プローブ分子を用いたことを特徴とする生体高分子検出法。

40

【請求項 8】

請求の範囲 1 ~ 6 に記載のいずれかの蛍光プローブ分子のエキシマー形成能を用いたことを特徴とする生体高分子間相互作用検出法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、高蛍光量子収率型疎水性蛍光プローブ分子の開発ならびに、該蛍光プローブ分子を用いる生体高分子検出法ならびに生体高分子間相互作用検出法に関する。

50

【背景技術】

【0002】

一般的な疎水性蛍光プローブ分子は、既存の蛍光性有機基にラベル化するための有機置換基を導入したものである。代表的な蛍光性有機基であるピレンは、モノマー発光だけでなくエキシマー発光も有するという特徴から、生体分子に対する疎水性蛍光プローブ分子として、広く応用されている〔非特許文献2〕。

また、フェニルエチニルピレン及びフェニルエチニルアントラセンで修飾したDNAが合成されている〔非特許文献3〕。該文献においては、DNAにヨウ化フェニル基を導入し、これにエチニルピレン、エチニルアントラセンを導入する手法をとっており、汎用性のラベル化試薬の開発を意図していない。

10

【0003】

一方、本発明者は〔非特許文献1〕において、ピレン骨格にエチニル基を導入することで、その吸収波長や蛍光波長が長波長側へとシフトすることを認識した。この知見を元に、生体高分子の広範なラベル化試薬の開発を目指したものである。

【0004】

【非特許文献1】J. Am. Chem. Soc. 1999, 121, 1452-1458

【非特許文献2】J. Biol. Chem. 1973, 248, 3173-3177

【非特許文献3】Tetrahedron 2004, 60, 4617-4626

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

20

【0005】

代表的な疎水性プローブであるピレンは、励起波長が比較的短波長である、蛍光量子収率が低い、溶媒中の溶存酸素による消光が顕著であるといった問題が存在する。励起波長が300 nm付近の蛍光性有機基の場合、該励起光が生体化学種に一部吸収され、該蛍光性有機基の励起確率が低下する可能性がある。蛍光量子収率が低いことは高感度検出の妨げとなる。溶媒中の溶存酸素による消光を受けやすいということも、イン・ビボ(in vivo)条件化で使用するには高感度検出の妨げとなる。

【0006】

本研究の発明者は、上記の問題点を克服し、高蛍光量子収率型疎水性蛍光プローブ分子を開発するために鋭意研究を行った。その結果、ピレン骨格の1位にアリールエチニル基を導入した蛍光性有機分子を基に開発した各種高蛍光量子収率型疎水性蛍光プローブ分子が問題点を解決することを見出し、さらに研究を進めた結果、本発明を完成させた。

30

【課題を解決するための手段】

【0007】

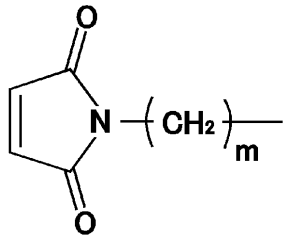
即ち、本発明は、第一の態様として、アリールエチニル基を有する高蛍光量子収率型疎水性蛍光プローブ分子、特にエキシマー形成可能な蛍光性有機基であることを特徴とする蛍光プローブ分子に係る。

本発明の第二の態様として、被検生体高分子を該蛍光プローブ分子でラベル化することで可能となる生体高分子検出法ならびに生体高分子間相互作用検出法に係る。

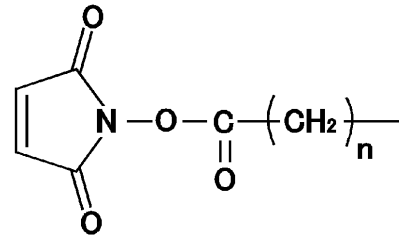
第1の発明は、置換基を有するアリールエチニル基を蛍光性有機分子に導入したことを特徴とする蛍光プローブ分子である。

40

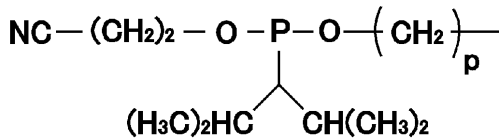
アリールエチニル基は、フェニルエチニル基またはチエニルエチニル基であってよい。置換基は以下の置換基から選ばれることを特徴とする。



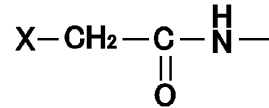
…(1)



…(2)



…(3)

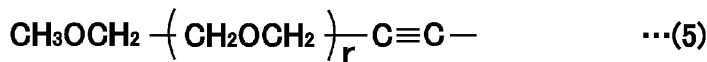


…(4)

10

(式中、Xはハロゲン原子を；mは0または1～5の整数を；nおよびpは1～5の整数を意味する。)

第2の発明は、無置換のアリールエチニル基および式



(rは6～10の整数を意味する)

20

で示される基を蛍光性有機分子に導入したことを特徴とする蛍光プローブ分子である。

アリールエチニル基はフェニルエチニル基またはチエニルエチニル基であってよい。

第1及び第2の発明において蛍光性有機分子はピレン、アントラセン、フルオレンまたはペリレンであることを特徴とする。

第3の発明は、第1又は第2の発明に係る蛍光プローブ分子を用いたことを特徴とする生体高分子検出法である。

また上記蛍光プローブ分子のエキシマー形成能を用いた生体高分子間相互作用検出法である。

【発明の効果】

【0008】

30

本発明の蛍光プローブ分子を用いることにより、被検生体高分子を溶存酸素存在下においても非常に高い感度で検出することが出来る。本発明の蛍光プローブ分子は、高い蛍光量子収率を持つので、DNAをはじめとするオリゴヌクレオチド鎖やタンパク質を該蛍光プローブ分子でラベル化することにより、また、細胞膜内へ導入することにより生体分子間相互作用の検出法に利用することが出来る。

【図面の簡単な説明】

【0009】

【図1】本発明の蛍光プローブ分子の合成例(スキーム1-1)を示す。

【図2】本発明の蛍光プローブ分子の合成例(スキーム1-2)を示す。

【図3】本発明の蛍光プローブ分子の合成例(スキーム1-3)を示す。

40

【図4】本発明の蛍光プローブ分子の合成例(スキーム1-4)を示す。

【図5】本発明の蛍光プローブ分子の合成例(スキーム2)を示す。

【図6】市販のピレニルマレイミドとグルタチオンの構造を示す。

【図7】化合物1とピレニルマレイミドにより、グルタチオンをラベル化した際の蛍光強度の比較を示す。

【図8】試験例2のゲル電気泳動の写真Aおよび写真B

【発明を実施するための最良の形態】

【0010】

本発明の蛍光プローブ分子は、溶存酸素存在下においても非常に高い感度でラベル化された生体高分子の検出を可能にする。その構造的特徴は、蛍光性有機分子にアミノ酸や核酸

50

を修飾するための基を置換基として有するアリールエチニル基を導入しているところである。

【0011】

アリールエチニル基として、フェニルエチニル基、ナフチルエチニル基、チエニルエチニル基が挙げられるが、フェニルエチニル基およびチエニルエチニル基が好ましい。

【0012】

本発明の蛍光プローブ分子に使用できる蛍光性有機基の例としては、ピレン、アントラセン、フルオレン、ペリレンが挙げられるが、ピレン、アントラセンが好ましい。

【0013】

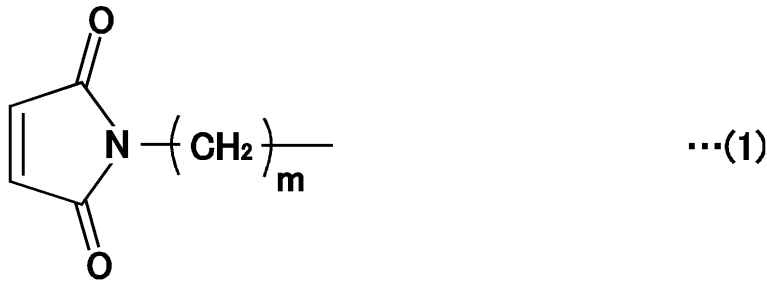
アミノ酸や核酸を修飾するための基として、例えば、アミノ酸であるシステインを修飾するためのマレイミド基、リジン修飾するためのスクシンイミジル基、DNA鎖に導入するためのホスホロアミダイト基などが挙げられる。これらの修飾基は、必ずしもスペーサーを介してアリールエチニル基に結合していなくてもよい。

具体的な基として、以下のものが挙げられる

【0014】

・マレイミド基

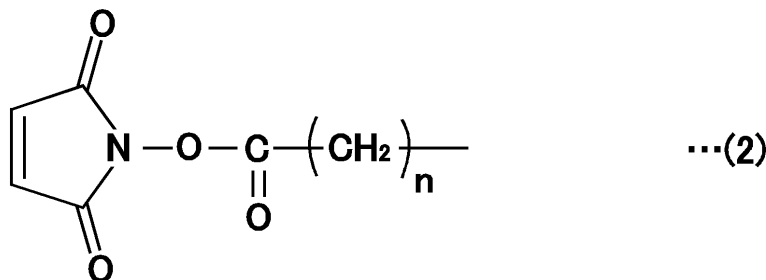
【化1】



(式中、mは、0または1～5の整数を意味する)

・スクシンイミジル基

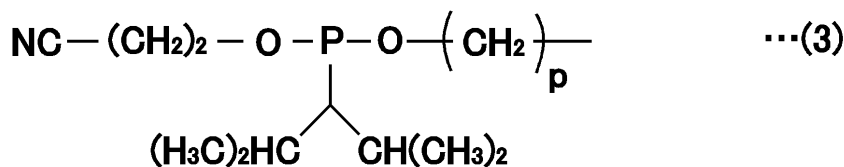
【化2】



(式中、nは、1～5の整数を意味する)

・ホスホロアミダイト基

【化3】



(式中、pは、1～5の整数を意味する)

・ハロゲン化アセトアミド基

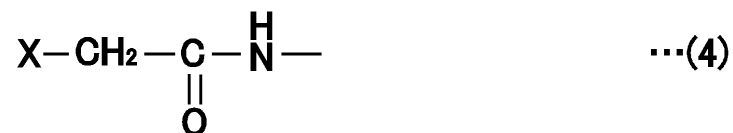
10

20

30

40

【化4】



(式中、Xは、ヨウ素、臭素などのハロゲン原子を意味する)

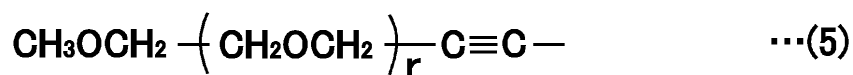
【0015】

また、細胞膜に導入するための基として、例えば、オキシエチレン基などが挙げられる。
 具体的な基として、以下のものが挙げられる

10

【0016】

【化5】



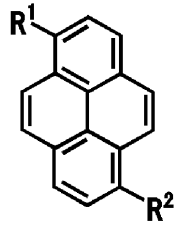
(式中、rは、6～10の整数を意味する)

【0017】

本発明の蛍光プローブ分子の代表的化合物を表1-1～表1-4に示す。

【表 1 - 1】

表 1-1

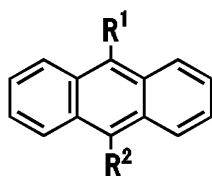


No.	R^1	R^2	
1	H		10
2			
3	H		20
4			
5	H		30
6			
7	H		40
8		$\equiv-(CH_2OCH_2)_8-CH_2OCH_3$	

【 0 0 1 8 】

【表 1 - 2】

表1-2

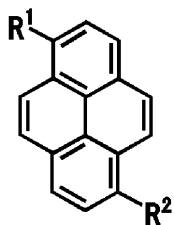


No.	R^1	R^2	
9	H		10
10			
11	H		20
12			
13	H		30
14			
15	H		
16		$\equiv-(CH_2OCH_2)_8-CH_2OCH_3$	40

【 0 0 1 9 】

【表 1 - 3】

表1-3



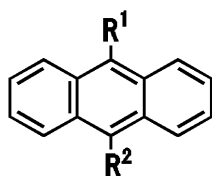
No.	R^1	R^2	
17	H		10
18			
19	H		20
20			
21	H		30
22		$\equiv-(CH_2OCH_2)_8-CH_2OCH_3$	

40

【 0 0 2 0 】

【表 1 - 4】

表1-4



No.	R ¹	R ²	
23	H		10
24			
25	H		20
26			
27	H		30
28		$\equiv-(\text{CH}_2\text{OCH}_2)_8-\text{CH}_2\text{OCH}_3$	

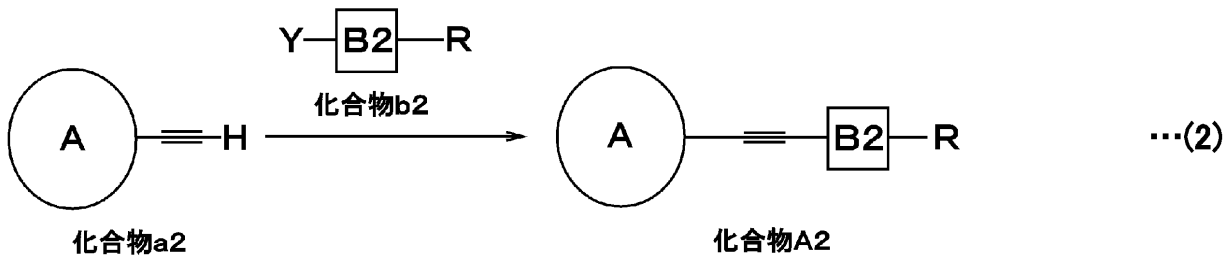
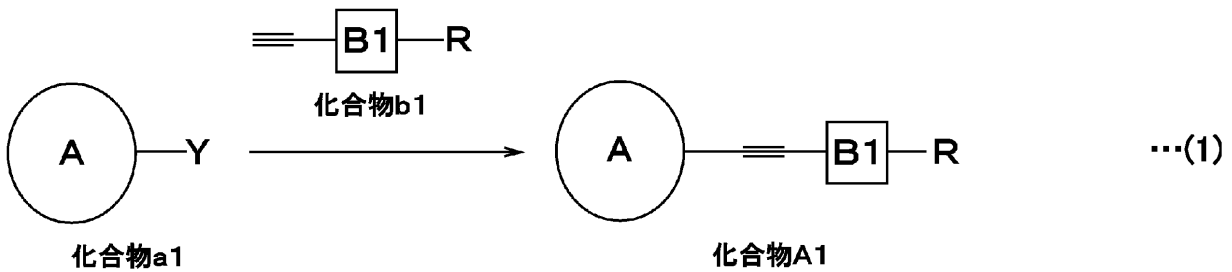
【0021】

本発明の蛍光プローブ分子は、使用する蛍光性有機基の種類等に応じて、適用な出発物質、中間体、及び反応条件等を適宜選択し、当業者に公知の任意の方法で合成することができる。

例えば、ハロゲン化アリールとアセチレンとのカップリングである菌頭反応を利用して本発明化合物を製造することができる。

【式 1】

【0022】



10

20

30

40

50

「式中、Aは、蛍光性有機基を；B1は、フェニル、ナフチルなどのアリール基を；B2はチエニル基を；Yは、ハロゲン原子またはトリフラート基を；Rは、上記したアミノ酸や核酸を修飾するための基または細胞膜に導入するための基を表す」

化合物aと化合物b1または化合物b2とを反応させるには、例えば、テトラキストリフェニルホスフィンパラジウムなどのパラジウム触媒とヨウ化銅の組み合わせに、溶剤としてトリエチルアミンやモルホリンなどの塩基性溶媒を使用する。反応時間は1～6時間、反応温度は10℃以上で溶剤が還流する温度までを上限とする。

本発明の代表的化合物の製造ルートを図1～図5に示した。

【0023】

本発明の蛍光プローブ分子による、生体高分子検出法ならびに生体高分子間相互作用検出法は、溶存酸素存在下においても高い感度で行うことが出来る。更に、該蛍光プローブ分子のエキシマー形成能を利用することにより、より効果的な検出法となる可能性を有する。

例えば、DNAをはじめとするオリゴヌクレオチド鎖の末端もしくは核酸塩基部分を該蛍光プローブ分子で修飾することで、該蛍光プローブ分子由来のエキシマー発光を利用した生体高分子の検出が可能となる。またタンパク質やその配位子(リガンド)となるペプチド鎖を該蛍光プローブ分子で修飾することで、生体高分子間相互作用の検出も可能となる。

以下本発明に係る化合物の合成例を説明するが、化合物の番号は図1～図5中の番号を示す。

【実施例】

【0024】

実施例1

・マレイミド誘導体(化合物1)の合成[合成スキーム1-1]

(1) 1-プロモピレン(化合物10)、テトラキストリフェニルホスフィンパラジウム、ヨウ化銅の混合物にトリエチルアミンを加え、均一な溶液になるまで50℃で加熱した。続いて、4-エチニルアニリン(化合物11)のトリエチルアミン溶液を加え4時間還流させた。室温まで戻した後、溶剤を回転式エバポレーターで除去した。残渣を飽和塩化アンモニウム水溶液に注ぎ、酢酸エチルで抽出した。酢酸エチル抽出物を回転式エバポレーターで処理した後、クロマトグラフ展開(シリカゲル；溶出液としてヘキサン：ジクロロメタン(1:1)を使用)すると、黄色固体の4-(1-ピレニルエチニル)アニリン(化合物12)が収率67%で得られた。

化合物12の物性データは以下のとおりである。

融点：152-153

【0025】

(2) 4 - (1 - ピレニルエチニル)アニリン (化合物12) のテトラヒドロフラン溶液に無水マレイン酸を0 で加えた。反応溶液を徐々に室温に戻し、12時間攪拌した。析出した沈殿物を別乾燥し、次の反応にそのまま使用した。得られた化合物13と酢酸ナトリウムの混合物に無水酢酸を加えて懸濁液とした。この懸濁液を100 で1時間攪拌した後、0 まで冷却し、さらに氷水を加えた。析出した沈殿物をろ取し、冷水ならびにヘキサンで洗浄を行った。得られた粗生成物をエタノール-クロロホルム混合溶媒から再結晶すると、橙黄色固体のマレイミド誘導体 (化合物1) が収率68%で得られた。

化合物1の物性データは以下のとおりである。

融点：262-263

【0026】

実施例2

・スクシンイミジルエステル誘導体 (化合物3) の合成 [合成スキーム1 - 3]

(1) 1 - プロモピレン (化合物10)、テトラキストリフェニルホスフィンパラジウム、ヨウ化銅の混合物にトリエチルアミンを加え、均一な溶液になるまで70 で加熱した。続いて、4 - エチニルジヒドロ桂皮酸 (化合物14) のトリエチルアミン溶液を加え3時間還流させた。室温まで戻した後、溶剤を回転式エバポレーターで除去した。残渣を希塩酸水溶液に注ぎ、酢酸エチルで抽出した。酢酸エチル抽出物を回転式エバポレーターで処理した後、クロマトグラフ展開 (シリカゲル; 溶出液としてジクロロメタンに続いてジクロロメタン:メタノール (30:1) を使用) すると、黄色固体の4 - (1 - ピレニルエチニル)ジヒドロ桂皮酸 (化合物15) が収率63%で得られた。

【0027】

(2) 化合物15、炭酸ジスクシンイミジルの混合物にアセトニトリル、テトラヒドロフラン、ピリジンを加え、6時間還流させた。室温まで戻した後、溶剤を回転式エバポレーターで除去した。残渣をクロマトグラフ展開 (シリカゲル; 溶出液としてジクロロメタンを使用) すると、黄緑色固体のスクシンイミジルエステル誘導体 (化合物3) が収率76%で得られた。

【0028】

実施例3

・ホスホロアミダイト誘導体 (化合物7) の合成 [合成スキーム1 - 2]

(1) 水素化リチウムアルミニウムにテトラヒドロフランを加え懸濁液とし、0 に冷却した。続いて、化合物15のテトラヒドロフラン溶液を加え0 で2時間攪拌した。希塩酸水溶液を加え不溶物をろ別した後、溶剤を回転式エバポレーターで除去した。残渣をクロマトグラフ展開 (シリカゲル; 溶出液としてジクロロメタンを使用) すると、淡黄色固体の3 - (4 - (1 - ピレニルエチニル)フェニル)プロパン - 1 - オール (化合物16) が収率85%で得られた。

【0029】

(2) 1H - テトラゾールおよび2 - シアノエチルテトライソプロピルホスホロジアミダイトを含むアセトニトリル溶液に、化合物16のアセトニトリル溶液を0 で加えた。室温で3時間攪拌させた後、溶剤を回転式エバポレーターで除去した。残渣をクロマトグラフ展開 (ヘキサン:トリエチルアミン (50:1) で前処理したシリカゲル; 溶出液としてヘキサン:ジクロロメタン (6:1) を使用) すると、黄緑色液体のホスホロアミダイト誘導体 (化合物7) が収率79%で得られた。

【0030】

実施例4

・ (化合物8) の合成 [合成スキーム1 - 4]

(1) 1, 6 - ジヨードピレン、テトラキストリフェニルホスフィンパラジウム、ヨウ化銅の混合物にモルホリンを加え、均一な溶液になるまで100 で加熱した。続いて、4, 7, 10, 13, 16, 19, 22, 25, 28 - ノナオキサ - 1 - ノナコサン (化合物18) のモ

10

20

30

40

50

ルホリン溶液を加え120 で5時間攪拌した。室温まで戻した後、溶剤を回転式エバポレーターで除去した。残渣にメタノールを加え、不溶物をろ過により除去した。メタノールを回転式エバポレーターで除去した後、クロマトグラフ展開（シリカゲル；溶出液としてジクロロメタンに続いてジクロロメタン：メタノール（60：1）を使用）すると、無色固体の1 - ヨード - 6 - (4, 7, 10, 13, 16, 19, 22, 25, 28 - ノナオキサ - 1 - ノナコスニル)ピレン（化合物19）が収率44%で得られた。

【0031】

(2) 化合物19、テトラキストリフェニルホスフィンパラジウム、ヨウ化銅の混合物にテトラヒドロフランとトリエチルアミンを加え、均一な溶液になるまで70 で加熱した。続いて、フェニルアセチレンを加え1時間還流させた。室温まで戻した後、溶剤を回転式エバポレーターで除去した。残渣をクロマトグラフ展開（シリカゲル；溶出液としてジクロロメタンに続いてジクロロメタン：メタノール（300：1）を使用）すると、黄色固体の1 - (4, 7, 10, 13, 16, 19, 22, 25, 28 - ノナオキサ - 1 - ノナコスニル) - 6 - (フェニルエチニル)ピレン（化合物8）が収率88%で得られた。

【0032】

実施例5

・（化合物27）の合成 [合成スキーム2]

(1) (2-チエニルメチル)アミン（化合物20）に無水酢酸、トリエチルアミンを0 で加え、室温で一時間攪拌した。溶剤を回転式エバポレーターで除去した後、残渣に水を加えジエチルエーテルで抽出した。ジエチルエーテル抽出物を回転式エバポレーターで処理することで、N - (2 - チエニルメチル)アセトアミド（化合物21）を得た。

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) 2.01 (s, 3 H), 4.60 (d, $J = 5.5$ Hz, 2 H), 5.85 (brs, 1 H), 6.95 - 6.98 (m, 2 H), 7.23 (dd, $J = 1.5$ and 5.0 Hz, 1 H)

(2) N - (2 - チエニルメチル)アセトアミドのジメチルホルムアミド溶液にN - プロモスクシンイミドを0 で加え、室温で12時間攪拌した。溶剤を回転式エバポレーターで除去した後、残渣にテトラヒドロフランを加え、不溶物をろ別した。溶液のテトラヒドロフランを回転式エバポレーターで除去した後、クロマトグラフ展開（シリカゲル；溶出液としてジクロロメタンを使用）すると、N - (5 - プロモ - 2 - チエニルメチル)アセトアミド（化合物22）が得られた。

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) 2.01 (s, 3 H), 4.50 (d, $J = 5.5$ Hz, 2 H), 5.88 (brs, 1 H), 6.72 (d, $J = 4.0$ Hz, 1 H), 6.88 (d, $J = 4.0$ Hz, 1 H)

(3) N - [(5 - プロモ - 2 - チエニル)メチル]アセトアミドのメタノール溶液に水酸化ナトリウム水溶液を室温に加え、60 で二日間攪拌した。溶剤を回転式エバポレーターで除去した後、残渣に水を加えジクロロメタンで抽出した。ジクロロメタン抽出物を回転式エバポレーターで処理し、(5 - プロモ - 2 - チエニルメチル)アミン（化合物23）を得た。

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) 3.99 (s, 2 H), 6.67 (d, $J = 4.0$ Hz, 1 H), 6.88 (d, $J = 4.0$ Hz, 1 H)

(4) (5 - プロモ - 2 - チエニルメチル)アミンに飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加え、懸濁液とする。そこにN - (メトキシカルボニル)マレイニンイミド（化合物24）を0 で加え、その温度で30分攪拌し、さらに室温で3時間攪拌する。反応終了後、濃硫酸を加え、pH3に調整する。その水溶液を酢酸エチルで洗浄した後、酢酸エチル層を回転式エバポレーターで処理した後、クロマトグラフ展開（シリカゲル；溶出液としてヘキサン：ジクロロメタン（1：1）を使用）すると、N - (5 - プロモ - 2 - チエニルメチル)マレイニンイミド（化合物25）が得られた。

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) 4.75 (s, 2 H), 6.72 (s, 2 H), 6.83 (d, $J = 3.5$ Hz, 1 H), 6.88 (d, $J = 3.5$ Hz, 1 H)

(5) 化合物27の合成

N - (5 - プロモ - 2 - チエニルメチル)マレイニンイミド、1 エチニルピレン（化合物26）、テトラキストリフェニルホスフィンパラジウム、ヨウ化銅にジメチルホルムアミドとトリエチルアミンを加え、60 で12時間攪拌し、N - [5 - (1 - ピレニルエチニル) - 2 -

10

20

30

40

50

チエニルメチル]マレインイミド(化合物27)が得られた。

【0033】

参考例 1

3-(4-ヨードフェニル)プロピオン酸、ビストリフェニルホスフィン塩化パラジウム、ヨウ化銅の混合物にトリエチルアミンを加え、均一な溶液になるまで70℃で加熱した。続いて、トリメチルシリルアセチレンを加え1時間還流させた。室温まで戻した後、溶剤を回転式エバポレーターで除去した。残渣を0.5N塩酸水溶液に注ぎ、酢酸エチルで抽出した。酢酸エチル抽出物を回転式エバポレーターで処理した後、得られた粗生成物を次の反応に使用した。この粗生成物をテトラヒドロフランに溶解させ、一滴の水を加え0℃に冷却した。続いて、フッ化テトラブチルアンモニウム塩のテトラヒドロフラン溶液を加え30分0℃で攪拌した。室温まで戻した後、溶剤を回転式エバポレーターで除去した。残渣をクロマトグラフ展開(シリカゲル; 溶出液としてヘキサン: 酢酸エチル(1:1)を使用)すると、無色固体の4-エチニルジヒドロ桂皮酸(化合物14)が収率97%で得られた。

【0034】

参考例 2

1-プロモピレン、テトラキストリフェニルホスフィンパラジウム、ヨウ化銅のトリエチルアミン溶液を調整し、エチニルチオフェンを加え60℃で一日攪拌した。室温まで戻した後、溶剤を回転式エバポレーターで除去した。残渣にヘキサンを加え、不溶物をろ過により除去した。ヘキサンを回転式エバポレーターで留去した後、残渣をクロマトグラフ展開(シリカゲル; 溶出液としてヘキサンを使用)すると、固体の1-(2-チエニルエチニル)ピレンが収率85%で得られた。ここで得られた化合物の蛍光スペクトルは、1-フェニルエチニルピレンより約10nm長波長側にシフトした。

融点: 131-133

【0035】

試験例 1

実施例1で合成した化合物1と市販のピレニルマレイミド(化合物A)を用いてペプチド鎖のシステイン側鎖のチオール基をラベル化し、それらの相対蛍光強度を比較した。被ラベル化分子としてグルタチオンを用いた。グルタチオンは、アミノ末端からグルタミン酸・システイン・グリシンの三つのアミノ酸から成る生理活性ペプチドである。

化合物1ならびに化合物Aのシステインラベル化部位は、マレイミド基である。システインのチオール基とプローブ分子のマレイミド基上の炭素-炭素二重結合とが反応をする。市販品である化合物Aそのもの(ラベル化反応前)は、ピレン由来の蛍光がほとんど消光されており(図7; 点線)、チオール基と反応することでその蛍光が復活する。化合物1も化合物Aと同様に、ラベル化反応前ではほとんど消光されていることが明らかとなった(図7; 破線)。化合物1ならびに化合物Aのジメチルスルオキシド溶液とグルタチオン水溶液を反応させた後の蛍光スペクトルを図7に示す。グルタチオンに対して、過剰量の化合物1と化合物Aを用いた(化合物1と化合物Aは等モル)。グルタチオンと反応した化合物Aは、ピレン由来の蛍光発光を示した(図7; 実線)。一方、化合物1はピレニルマレイミドに比べ約40nm長波長側にシフトし、かつブロード化された発光が観測された(図7; 太実線)。その蛍光強度を比較すると、化合物1は化合物Aの2.4倍以上である。

この結果より、グルタチオンをラベルした化合物1は非常に高い蛍光量子収率である。

【0036】

試験例 2

タンパク質である仔牛血清アルブミン(BSA)を用いて試験例1と同様の実験を行った。BSAは分子量が約67,000で35個のシステイン残基を持つ。ラベル化反応を行った後、ゲル電気泳動で比較を行った。図8の写真Aはクマシーブルー染色を行ったもので、写真Bは312nmの光を照射することによって観測された蛍光像を示す。写真Aにおいては、分子量マーカーを含め全てのレーンにおいてバンドが観測されるが、写真Bにおいては化合物1でラベル化されたBSAのみが明瞭にそのバンドが確認される。この結果より、試

験例 2 と同様に B S A をラベル化した化合物 1 は非常に高い蛍光量子収率であることが判明しただけでなく、化合物 1 は実際のタンパク質をラベル化する際にも非常に有用であることが示された。

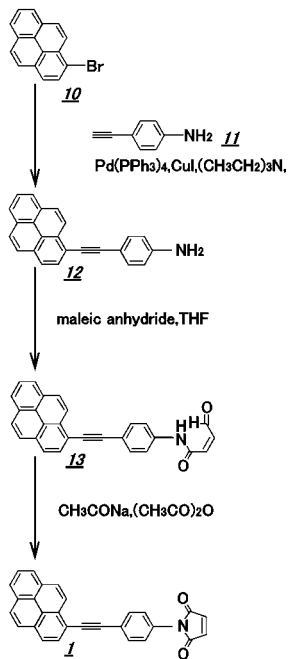
【産業上の利用可能性】

【0037】

本発明により、高蛍光量子型疎水性蛍光プローブ分子の開発ならびに生体高分子の高感度検出に成功した。該蛍光プローブ分子は、溶存酸素存在下においてもほとんど消光されないことや励起波長の長波長化が達成されていることから、非常に高い有用性を兼ね備えている。また、アリール基にラベル化部位を導入することで、さまざまな生体高分子に対する蛍光プローブ分子を供与することが可能となる。

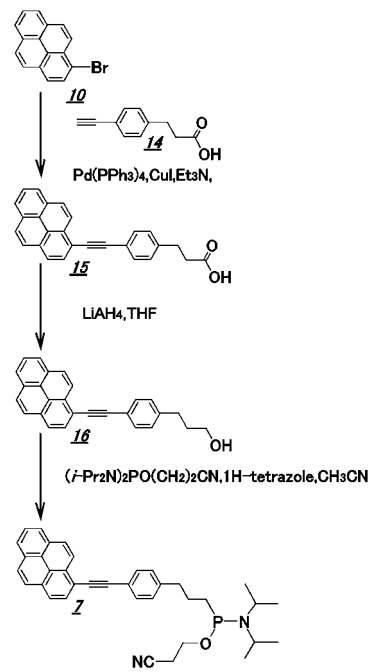
10

【図 1】



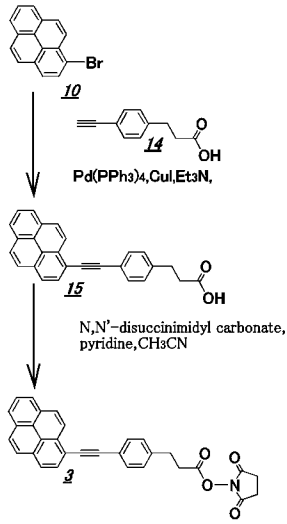
合成スキーム 1-1

【図 2】



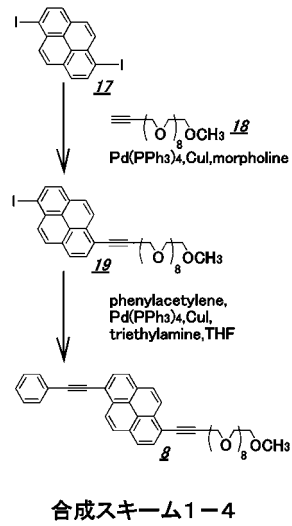
合成スキーム 1-2

【 図 3 】



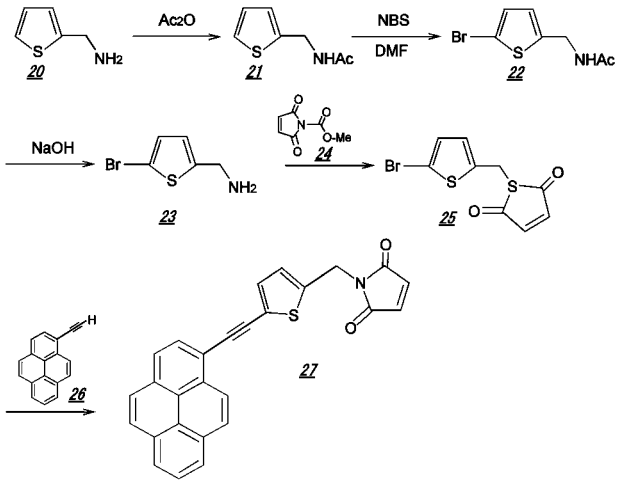
合成スキーム1-3

【 図 4 】



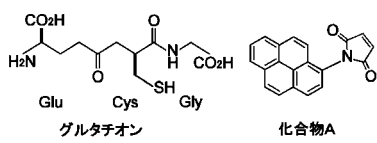
合成スキーム1-4

【 図 5 】

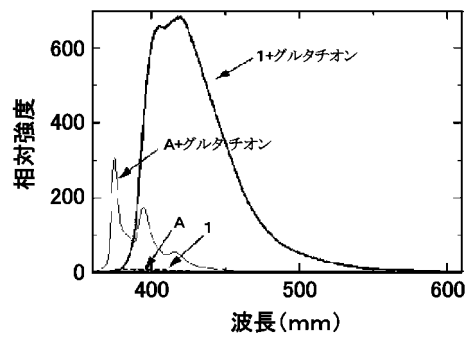


合成スキーム2

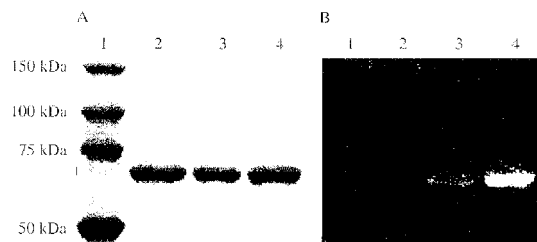
【 図 6 】



【 図 7 】



【 図 8 】



【手続補正書】

【提出日】平成18年2月24日(2006.2.24)

【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】請求の範囲

【補正方法】変更

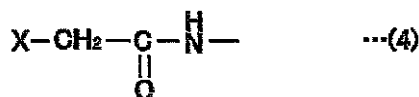
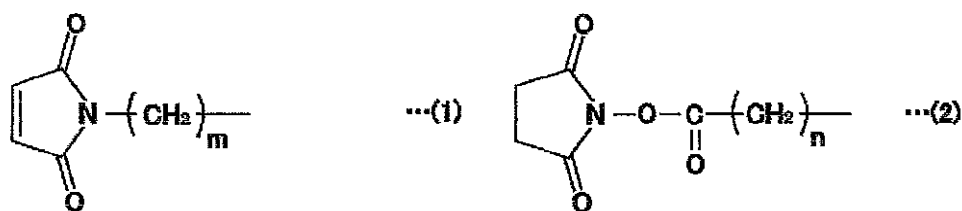
【補正の内容】

【書類名】請求の範囲

【請求項1】(補正後)置換基としてマレイミド基、スクシンイミジル基またはハロゲン化アセトアミド基のいずれかを有するアリールエチニル基を蛍光性有機分子に導入した蛍光プローブ分子。

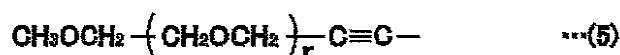
【請求項2】アリールエチニル基がフェニルエチニル基またはチエニルエチニル基であることを特徴とする請求の範囲1に記載の蛍光プローブ分子。

【請求項3】(補正後)置換基が以下の置換基から選ばれたものであることを特徴とする請求の範囲1に記載の蛍光プローブ分子。



(式中、Xはハロゲン原子を；mは0または1～5の整数を；nは1～5の整数を意味する。)

【請求項4】無置換のアリールエチニル基および式



(rは6～10の整数を意味する)

で示される基を蛍光性有機分子に導入したことを特徴とする蛍光プローブ分子。

【請求項5】アリールエチニル基がフェニルエチニル基またはチエニルエチニル基であることを特徴とする請求の範囲4に記載の蛍光プローブ分子。

【請求項6】(補正後)蛍光性有機分子がピレン、アントラセン、フルオレンまたはペリレンのいずれかであることを特徴とする請求の範囲1～5のいずれかに記載の蛍光プローブ分子。

【請求項7】請求の範囲1～6に記載のいずれかの蛍光プローブ分子を用いたことを特徴とする生体高分子検出法。

【請求項8】請求の範囲1～6に記載のいずれかの蛍光プローブ分子のエキシマー形成能を用いたことを特徴とする生体高分子間相互作用検出法。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2005/019514
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C07D207/448(2006.01), C07D207/404(2006.01), C07D409/06(2006.01), C07D409/14(2006.01), C07D333/16(2006.01), C07F9/6539(2006.01), C07F9/06 (2006.01), C07C43/166(2006.01), C07C233/07(2006.01), C07C233/43(2006.01), 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) C07D207/448(2006.01), C07D207/404(2006.01), C07D409/06(2006.01), C07D409/14(2006.01), C07D333/16(2006.01), C07F9/6539(2006.01), C07F9/06 (2006.01), C07C43/166(2006.01), C07C233/07(2006.01), C07C233/43(2006.01), 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 1996-2006 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2006 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2006 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) REGISTRY (STN), CAOLD (STN), CPlus (STN), JSTPlus (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	Hisao SHIMIZU et al., "Alkynylpyrene o Mochiiru Tanpaku · DNA no Keiko Hyoshiki", 2004 Nen Symposium on Photochemistry, 25 October, 2004 (25.10.04), page 43	1-3, 5-8 4
X A	MALAKHOV, Andrei D. et al., 1-(Phenylethynyl) pyrene and 9,10-bis(phenylethynyl)anthracene, useful fluorescent dyes for DNA labeling: Excimer formation and energy transfer, European Journal of Organic Chemistry, 12 March, 2004 (12.03.04), No.6, pages 1298 to 1307	1, 2, 5-8 4
A	JP 2003-116529 A (Teruyuki NAGAMUNE), 22 April, 2003 (22.04.03), & EP 1283257 A2 & US 2003/114523 A1 & CN 1405300 A	4-8
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input 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 06 January, 2006 (06.01.06)		Date of mailing of the international search report 17 January, 2006 (17.01.06)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/019514

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	LI, Qing X. et al., Affinity probes for the GABA-gated chloride channel: Selection of 5e-tert-butyl-2e-[4-(substituted-ethynyl)phenyl]-1,3-dithianes and optimization of linker moiety, Bioorganic & Medicinal Chemistry, 1995, Vol.3, No.12, pages 1667 to 1674	4-8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/019514

Continuation of A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

(International Patent Classification (IPC))

G01N33/483(2006.01), *G01N21/64*(2006.01), *G01N33/68*(2006.01),
G01N27/447(2006.01)

(According to International Patent Classification (IPC) or to both national
classification and IPC)

Continuation of B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (International Patent Classification (IPC))

G01N33/483(2006.01), *G01N21/64*(2006.01), *G01N33/68*(2006.01),
G01N27/447(2006.01)

Minimum documentation searched (classification system followed by
classification symbols)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/019514

Box No. II	Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)
<p>This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:</p> <p>1. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:</p> <p>2. <input type="checkbox"/> 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:</p> <p>3. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).</p>	
Box No. III	Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)
<p>This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows: (See extra sheet.)</p> <p>1. <input checked="" type="checkbox"/> As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.</p> <p>2. <input type="checkbox"/> As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.</p> <p>3. <input type="checkbox"/> 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.:</p> <p>4. <input type="checkbox"/> 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.:</p> <p>Remark on Protest</p> <p><input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, payment of a protest fee..</p> <p><input type="checkbox"/> 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.</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees.</p>	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/019514

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

The matter common to the fluorescent probe as claimed in claim 1 and the fluorescent probe as claimed in claim 4 resides in having an arylolethynyl group introduced into a fluorescent organic molecule. However, a fluorescent probe having an arylolethynyl group introduced into a fluorescent organic molecule had been publicly known before the application of the present case (see, for example, Eur. J. Org. Chem., 2004.03.12, No.6, p.1298-1307) and, therefore, the above matter cannot be considered as a special technical feature of the invention.

Accordingly,

(I) the special technical feature of the inventions according to claim 1 and claims 2, 3 and 6 to 8 depending thereon resides in "a fluorescent probe having an arylolethynyl group having a substituent introduced into a fluorescent organic molecule", while

(II) the special technical feature of the inventions according to claim 4 and claims 5 to 8 depending thereon resides in "a fluorescent probe molecule having an unsubstituted arylolethynyl group and a group represented by the formula (5) introduced into a fluorescent organic molecule".

Since it does not appear that there is a technical relationship between the above invention groups (I) and (II) involving one or more of the same or corresponding special technical features, these invention groups are not considered as being so linked as to form a single general inventive concept.

国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 2 0 0 5 / 0 1 9 5 1 4

<p>A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))</p> <p>Int.Cl. C07D207/448 (2006.01), C07D207/404 (2006.01), C07D409/06 (2006.01), C07D409/14 (2006.01), C07D333/16 (2006.01), C07F9/6539 (2006.01), C07F9/06 (2006.01), C07C43/166 (2006.01), C07C233/07 (2006.01), C07C233/43 (2006.01), G01N33/483 (2006.01), G01N21/64 (2006.01), (続き有)</p>												
<p>B. 調査を行った分野</p> <p>調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))</p> <p>Int.Cl. C07D207/448 (2006.01), C07D207/404 (2006.01), C07D409/06 (2006.01), C07D409/14 (2006.01), C07D333/16 (2006.01), C07F9/6539 (2006.01), C07F9/06 (2006.01), C07C43/166 (2006.01), C07C233/07 (2006.01), C07C233/43 (2006.01), G01N33/483 (2006.01), G01N21/64 (2006.01), (続き有)</p>												
<p>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</p> <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2006年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2006年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2006年</td> </tr> </table>			日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2006年	日本国実用新案登録公報	1996-2006年	日本国登録実用新案公報	1994-2006年		
日本国実用新案公報	1922-1996年											
日本国公開実用新案公報	1971-2006年											
日本国実用新案登録公報	1996-2006年											
日本国登録実用新案公報	1994-2006年											
<p>国際調査で利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)</p> <p>REGISTRY (STN), CAOLD (STN), Caplus (STN), JSTPlus (JOIS)</p>												
<p>C. 関連すると認められる文献</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>引用文献の カテゴリー*</th> <th>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</th> <th>関連する 請求の範囲の番号</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X A</td> <td>清水久夫ら, アルキニルピレンを用いるタンパク・DNAの蛍光標識, 2004年光化学討論会講演要旨集, 2004.10.25, p.43</td> <td>1-3, 5-8 4</td> </tr> <tr> <td>X A</td> <td>MALAKHOV, Andrei D. et al., 1-(Phenylethynyl)pyrene and 9,10-bis(phenylethynyl)anthracene, useful fluorescent dyes for DNA labeling: Excimer formation and energy transfer, European Journal of Organic Chemistry, 2004.03.12, No.6, p.1298-1307</td> <td>1, 2, 5-8 4</td> </tr> </tbody> </table>			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	清水久夫ら, アルキニルピレンを用いるタンパク・DNAの蛍光標識, 2004年光化学討論会講演要旨集, 2004.10.25, p.43	1-3, 5-8 4	X A	MALAKHOV, Andrei D. et al., 1-(Phenylethynyl)pyrene and 9,10-bis(phenylethynyl)anthracene, useful fluorescent dyes for DNA labeling: Excimer formation and energy transfer, European Journal of Organic Chemistry, 2004.03.12, No.6, p.1298-1307	1, 2, 5-8 4	
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	清水久夫ら, アルキニルピレンを用いるタンパク・DNAの蛍光標識, 2004年光化学討論会講演要旨集, 2004.10.25, p.43	1-3, 5-8 4										
X A	MALAKHOV, Andrei D. et al., 1-(Phenylethynyl)pyrene and 9,10-bis(phenylethynyl)anthracene, useful fluorescent dyes for DNA labeling: Excimer formation and energy transfer, European Journal of Organic Chemistry, 2004.03.12, No.6, p.1298-1307	1, 2, 5-8 4										
<p><input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。</p>												
<p>* 引用文献のカテゴリー</p> <table border="0"> <tr> <td>「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</td> <td>「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</td> </tr> <tr> <td>「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</td> <td>「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</td> </tr> <tr> <td>「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)</td> <td>「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</td> </tr> <tr> <td>「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</td> <td>「&」同一パテントファミリー文献</td> </tr> <tr> <td>「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願</td> <td></td> </tr> </table>			「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	
「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												
<p>国際調査を完了した日</p> <p>06.01.2006</p>	<p>国際調査報告の発送日</p> <p>17.01.2006</p>											
<p>国際調査機関の名称及びあて先</p> <p>日本国特許庁 (ISA/J P)</p> <p>郵便番号100-8915</p> <p>東京都千代田区霞が関三丁目4番3号</p>	<p>特許庁審査官 (権限のある職員)</p> <p>中木 亜希</p> <p>電話番号 03-3581-1101 内線 3492</p>	<p>4 P</p> <p>9282</p>										

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP2005/019514

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 請求の範囲の番号
A	JP 2003-116529 A (長棟輝行) 2003.04.22 & EP 1283257 A2 & US 2003/114523 A1 & CN 1405300 A	4-8
A	LI, Qing X. et al., Affinity probes for the GABA-gated chloride channel: Selection of 5- <i>tert</i> -butyl-2- <i>e</i> -[4-(substituted-ethynyl)phenyl]-1,3-dithianes and optimization of linker moiety, <i>Bioorganic & Medicinal Chemistry</i> , 1995, Vol.3, No.12, p.1667-1674	4-8

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP2005/019514

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. 請求の範囲 _____ 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. 請求の範囲 _____ 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. 請求の範囲 _____ 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きこ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の範囲について作成した。
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の範囲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の範囲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の範囲について作成した。

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を伴う異議申立てがなかった。

様式PCT/ISA/210（第1ページの続葉（2））（2005年4月）

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP2005/019514

<第 I I I 欄の続き>

請求の範囲 1 に記載された蛍光プローブと請求の範囲 4 に記載された蛍光プローブは、アリールエチニル基を蛍光性有機分子に導入した点で共通するものであるが、アリールエチニル基を蛍光性有機分子に導入した蛍光プローブは、本願出願前において公知であることから（例えば、Eur. J. Org. Chem., 2004. 03. 12, No. 6, p. 1298-1307 を参照。）、上記点を発明の特別な技術的特徴と認めることはできない。

してみると、

(I) 請求の範囲 1 及びこれを引用する請求の範囲 2, 3, 6-8 に係る発明の特別な技術的特徴は「置換基を有するアリールエチニル基を蛍光性有機分子に導入した蛍光プローブ」に関するものであり、一方、

(I I) 請求の範囲 4 及びこれを引用する請求の範囲 5-8 に係る発明の特別な技術的特徴は「無置換のアリールエチニル基及び式 (5) で示される基を蛍光性有機分子に導入した蛍光プローブ分子」に関するものである。

そして、上記 (I) 及び (I I) の発明は、一又は二以上の同一又は対応する特別な技術的特徴を含む技術的な関係にないから、単一の一般的発明概念を形成するように連関しているものとは認められない。

<A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) の続き>

Int.Cl. G01N33/68 (2006.01), G01N27/447 (2006.01)

<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)) の続き>

Int.Cl. G01N33/68 (2006.01), G01N27/447 (2006.01)

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I		テーマコード(参考)
C 0 7 F 9/48 (2006.01)	C 0 7 F	9/48	4 H 0 0 6
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q	1/68	A 4 H 0 5 0
G 0 1 N 21/78 (2006.01)	G 0 1 N	21/78	C
C 0 9 K 11/06 (2006.01)	C 0 9 K	11/06	6 9 0

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

Fターム(参考) 4C063 AA01 AA03 BB03 BB08 CC92 DD04 EE10
 4C069 AC36 BC06
 4C085 HH11 KA27 KB41 KB46 KB56 KB57 KB59 KB82 KB92
 4H006 AA01 AA03 AB92 GP01
 4H050 AA01 AA03 AB92

(注) この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。