



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110506208 A

(43)申请公布日 2019. 11. 26

(21)申请号 201880022541.0

(74)专利代理机构 中科专利商标代理有限责任
公司 11021

(22)申请日 2018.03.29

代理人 张国梁 张莹

(30)优先权数据

2017-066921 2017.03.30 JP

(51)Int.Cl.

G01N 33/543(2006.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2019.09.27

C07F 5/02(2006.01)

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2018/013406 2018.03.29

(87)PCT国际申请的公布数据

W02018/181796 JA 2018.10.04

(71)申请人 富士胶片株式会社

地址 日本国东京都

(72)发明人 知久浩之 渡边康介 金子和平

滨田和博 佐佐木晃逸 吉冈知昭

花木直幸

权利要求书5页 说明书48页 附图4页

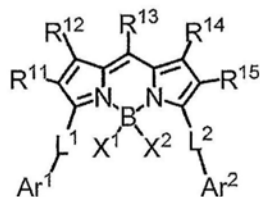
(54)发明名称

用于测定活体样品中的测定对象物质的试剂盒及方法

(57)摘要

本发明的课题在提供一种能够在从低浓度区域至高浓度区域为止的测定范围内以高精度测定活体样品中的测定对象物质的试剂盒及方法。根据本发明,提供一种用于测定活体样品中的测定对象物质的试剂盒,其包括:标记粒子,包含与活体样品中的测定对象物质具有结合性的第一结合物质;及基板,包含与上述测定对象物质或上述第一结合物质中的任一个具有结合性的第二结合物质,在上述试剂盒中,上述标记粒子为含有由下述式(1)表示的至少一种化合物和粒子的发光性的标记粒子。式(1)中的各记号表示在本说明书记载的含义。

CN 110506208 A

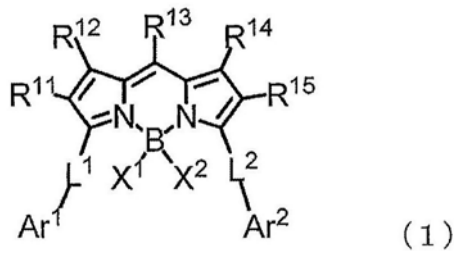


(1)

1. 一种用于测定活体样品中的测定对象物质的试剂盒,其包括:
 标记粒子,包含与活体样品中的测定对象物质具有结合性的第一结合物质;以及
 基板,包含与所述测定对象物质或所述第一结合物质中的任一个具有结合性的第二结合物质,

在所述试剂盒中,所述标记粒子为含有由下述式(1)表示的至少一种化合物和粒子的发光性的标记粒子,

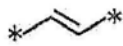
[化学式1]



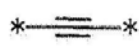
式中, $R^{11} \sim R^{15}$ 分别独立地表示氢原子、卤原子、烷基、芳基、杂环基、乙烯基、乙炔基、氨基、酰基、烷氧基、芳氧基、烷硫基或芳硫基,它们也可以具有取代基, $R^{11} \sim R^{15}$ 中的至少3个表示除氢原子以外的原子或基团; X^1 及 X^2 分别独立地表示卤原子、烷基、芳基、杂环基、羟基、烷氧基、芳氧基、烷硫基、芳硫基、乙烯基或乙炔基,它们也可以具有取代基, X^1 及 X^2 可以相互连结而形成环; Ar^1 及 Ar^2 分别独立地表示芳基或杂环基,它们也可以具有取代基; L^1 及 L^2 分别独立地表示式(L-1)~式(L-4)中的任一个;

[化学式2]

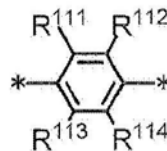
式(L-1)



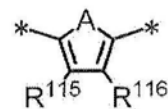
式(L-2)



式(L-3)



式(L-4)



式中, $R^{111} \sim R^{116}$ 分别独立地表示氢原子、卤原子、烷基、芳基、杂环基、乙烯基、乙炔基、氨基、酰基、烷氧基、芳氧基、烷硫基或芳硫基,它们也可以具有取代基;A表示-O-、-S-或-NH-。

2. 根据权利要求1所述的试剂盒,其中,

所述标记粒子为标记胶乳粒子。

3. 根据权利要求1或2所述的试剂盒,其中,

所述标记粒子具有羧基。

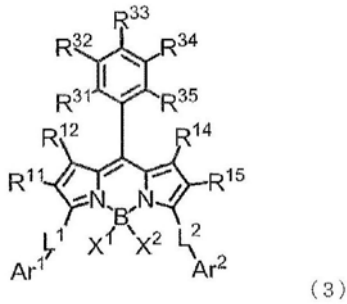
4. 根据权利要求1至3中任一项所述的试剂盒,其中,

所述标记粒子的平均粒径为70~500nm。

5. 根据权利要求1至4中任一项所述的试剂盒,其中,

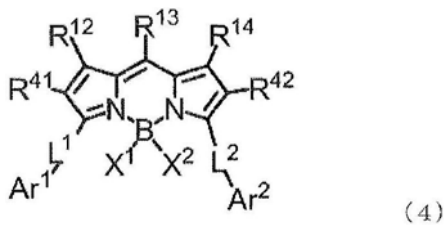
由所述式(1)表示的化合物为由下述式(3)表示的化合物,

[化学式3]



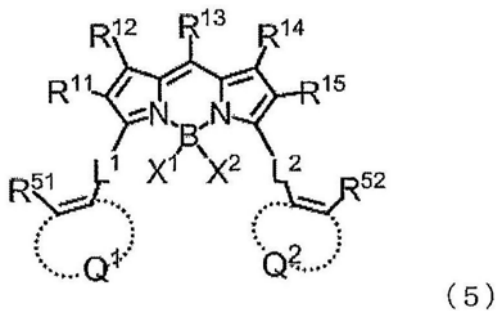
式中, R^{11} 、 R^{12} 、 R^{14} 、 R^{15} 、 X^1 、 X^2 、 Ar^1 、 Ar^2 、 L^1 及 L^2 与式(1)中的定义含义相同,其中, R^{11} 、 R^{12} 、 R^{14} 及 R^{15} 中的至少2个为除氢原子以外的原子或基团; R^{31} ~ R^{35} 分别独立地表示氢原子、卤原子、烷基、芳基、杂环基、乙烯基、乙炔基、氨基、酰基、氰基、烷氧基、芳氧基、烷硫基或芳硫基,它们也可以具有取代基, R^{31} 、 R^{32} 、 R^{34} 及 R^{35} 中的至少一个为由2个原子以上构成的基团。

6. 根据权利要求1至4中任一项所述的试剂盒,其中,
由所述式(1)表示的化合物为由下述式(4)表示的化合物,
[化学式4]



式中, R^{12} 、 R^{13} 、 R^{14} 、 X^1 、 X^2 、 Ar^1 、 Ar^2 、 L^1 及 L^2 与式(1)中的定义含义相同,其中, R^{12} 、 R^{13} 及 R^{14} 中的至少1个为除氢原子以外的原子或基团; R^{41} 及 R^{42} 分别独立地表示芳基、杂环基、乙烯基或乙炔基,它们也可以具有取代基。

7. 根据权利要求1至4中任一项所述的试剂盒,其中,
由所述式(1)表示的化合物为由下述式(5)表示的化合物,
[化学式5]



式中, R^{11} ~ R^{15} 、 X^1 、 X^2 、 L^1 及 L^2 与式(1)中的定义含义相同; R^{51} 及 R^{52} 分别独立地表示烷基、芳基、杂芳基、氨基、酰基、烷氧基、芳氧基、烷硫基或芳硫基,它们也可以具有取代基; Q^1 及 Q^2 分别独立地表示芳香族烃环或芳香族杂环,它们也可以具有取代基。

8. 根据权利要求1至7中任一项所述的试剂盒,其中,

所述标记粒子为含有至少一种能量供体化合物、至少一种能量受体化合物及粒子的发光性粒子,所述能量供体化合物及所述能量受体化合物中的至少一种为由所述式(1)表示的化合物。

9. 根据权利要求8所述的试剂盒,其中,

作为所述能量供体化合物,含有至少一种由所述式(1)表示的化合物,作为所述能量受体化合物,含有至少一种由所述式(1)表示的化合物。

10. 根据权利要求8或9所述的试剂盒,其中,

能量供体化合物与能量受体化合物的摩尔比为1:10~10:1。

11. 根据权利要求8至10中任一项所述的试剂盒,其中,

能量供体化合物与能量受体化合物的斯托克斯位移为40nm以上。

12. 根据权利要求1至11中任一项所述的试剂盒,其中,

所述基板具有包含所述第二结合物质的检测区域。

13. 根据权利要求12所述的试剂盒,其中,

所述检测区域为包含金的金属膜。

14. 一种测定活体样品中的测定对象物质的方法,包含以下工序:

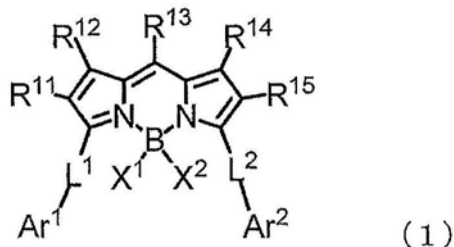
反应工序,使活体样品与包含与测定对象物质具有结合性的第一结合物质的标记粒子进行反应;

捕捉工序,使在所述反应工序中获得的反应产物和包含与所述测定对象物质或所述第一结合物质中的任一个具有结合性的第二结合物质的基板接触,从而在基板上捕捉标记粒子;以及

标记信息获取工序,获取与所述测定对象物质相关的标记信息,

所述标记粒子为含有由下述式(1)表示的至少一种化合物和粒子的发光性的标记粒子,

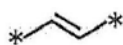
[化学式6]



式中, $R^{11} \sim R^{15}$ 分别独立地表示氢原子、卤原子、烷基、芳基、杂环基、乙烯基、乙炔基、氨基、酰基、烷氧基、芳氧基、烷硫基或芳硫基,它们也可以具有取代基, $R^{11} \sim R^{15}$ 中的至少3个表示除氢原子以外的原子或基团; X^1 及 X^2 分别独立地表示卤原子、烷基、芳基、杂环基、羟基、烷氧基、芳氧基、烷硫基、芳硫基、乙烯基或乙炔基,它们也可以具有取代基, X^1 及 X^2 可以相互连结而形成环; Ar^1 及 Ar^2 分别独立地表示芳基或杂环基,它们也可以具有取代基; L^1 及 L^2 分别独立地表示式(L-1)~式(L-4)中的任一个;

[化学式7]

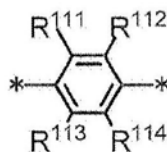
式(L-1)



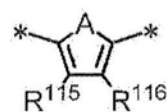
式(L-2)



式(L-3)



式(L-4)



式中, $R^{111} \sim R^{116}$ 分别独立地表示氢原子、卤原子、烷基、芳基、杂环基、乙烯基、乙炔基、

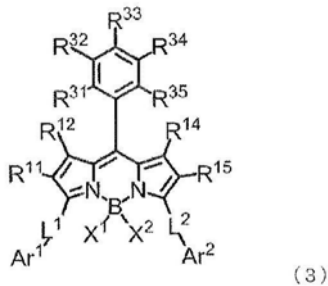
氨基、酰基、烷氧基、芳氧基、烷硫基或芳硫基，它们也可以具有取代基；A表示-O-、-S-或-NH-。

15. 根据权利要求14所述的方法，其中，
所述粒子为胶乳粒子。

16. 根据权利要求14或15所述的方法，其中，
所述粒子具有羧基。

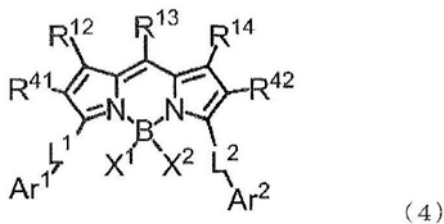
17. 根据权利要求14至16中任一项所述的方法，其中，
所述标记粒子的平均粒径为70~500nm。

18. 根据权利要求14至17中任一项所述的方法，其中，
由所述式(1)表示的化合物是由下述式(3)表示的化合物，
[化学式8]



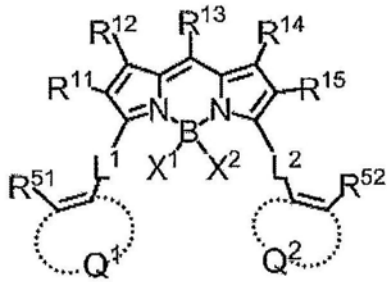
式中， R^{11} 、 R^{12} 、 R^{14} 、 R^{15} 、 X^1 、 X^2 、 Ar^1 、 Ar^2 、 L^1 及 L^2 与式(1)中的定义含义相同，其中， R^{11} 、 R^{12} 、 R^{14} 及 R^{15} 中的至少2个是除氢原子以外的原子或基团； R^{31} ~ R^{35} 分别独立地表示氢原子、卤原子、烷基、芳基、杂环基、乙烯基、乙炔基、氨基、酰基、氰基、烷氧基、芳氧基、烷硫基或芳硫基，它们也可以具有取代基， R^{31} 、 R^{32} 、 R^{34} 及 R^{35} 中的任一个是由2个原子以上构成的基团。

19. 根据权利要求14至17中任一项所述的方法，其中，
由所述式(1)表示的化合物是由下述式(4)表示的化合物，
[化学式9]



式中， R^{12} 、 R^{13} 、 R^{14} 、 X^1 、 X^2 、 Ar^1 、 Ar^2 、 L^1 及 L^2 与式(1)中的定义含义相同，其中， R^{12} 、 R^{13} 及 R^{14} 中的至少1个是除氢原子以外的原子或基团； R^{41} 及 R^{42} 分别独立地表示芳基、杂环基、乙烯基或乙炔基，它们也可以具有取代基。

20. 根据权利要求14至17中任一项所述的方法，其中，
由所述式(1)表示的化合物是由下述式(5)表示的化合物，
[化学式10]



(5)

式中, $R^{11} \sim R^{15}$ 、 X^1 、 X^2 、 L^1 及 L^2 与式(1)中的定义含义相同; R^{51} 及 R^{52} 分别独立地表示烷基、芳基、杂芳基、氨基、酰基、烷氧基、芳氧基、烷硫基或芳硫基,它们也可以具有取代基; Q^1 及 Q^2 分别独立地表示芳香族烃环或芳香族杂环,它们也可以具有取代基。

21. 根据权利要求14至20中任一项所述的方法,其中,

所述标记粒子为含有至少一种能量供体化合物、至少一种能量受体化合物及粒子的发光性粒子,所述能量供体化合物及所述能量受体化合物中的至少一种为由所述式(1)表示的化合物。

22. 根据权利要求21所述的方法,其中,

作为所述能量供体化合物,含有至少一种由所述式(1)表示的化合物,作为所述能量受体化合物,含有至少一种由所述式(1)表示的化合物。

23. 根据权利要求21或22所述的方法,其中,

能量供体化合物与能量受体化合物的摩尔比为1:10~10:1。

24. 根据权利要求21至23中任一项所述的方法,其中,

能量供体化合物与能量受体化合物的斯托克斯位移为40nm以上。

25. 根据权利要求14至24中任一项所述的方法,其中,

所述基板具有包含所述第二结合物质的检测区域。

26. 根据权利要求25所述的方法,其中,

所述检测区域为包含金的金属膜。

27. 根据权利要求26所述的方法,其中,

通过基于表面等离子体激元激发的荧光检测,获取与所述测定对象物质相关的标记信息。

用于测定活体样品中的测定对象物质的试剂盒及方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种用于测定活体样品 (biological sample) 中的测定对象物质的试剂盒 (kit)、及测定活体样品中的测定对象物质的方法。

背景技术

[0002] 作为用于对蛋白质、酵素或无机化合物等进行定量的高灵敏度且容易的测定法,广泛使用荧光检测法。荧光检测法是通过检测向认为包含被特定波长的光激发而发出荧光的测定对象物质的试样照射上述特定波长的激发光时所发出的荧光,从而确认测定对象物质的存在的方法。当测定对象物质并非荧光体时,例如,使对与测定对象物质特异性结合的物质以荧光色素进行标记的物质与试样接触,之后与上述同样地,通过检测照射激发光时所发出的荧光,能够确认测定对象物质的存在。

[0003] 在如上述的荧光检测法中,为了提高检测微量存在的测定对象物质的灵敏度,已知有利用基于等离子体激元共振的电场增强效果的方法。在该方法中,为了生成等离子体激元共振,准备在透明的支撑体上的规定区域设置有金属层的传感器芯片,对于支撑体与金属膜的界面,从支撑体的与金属层形成面相反的一面侧以全反射角以上的规定角度入射激发光。通过所述激发光的照射而在金属层产生表面等离子体激元,但通过基于该表面等离子体激元产生的电场增强作用,能够使荧光增强,从而信号/噪音比 (S/N比) 提高,能够进行高灵敏度的测定。相对于基于落射激发的荧光检测法 (也称作落射荧光法),基于表面等离子体激元激发的荧光检测法 (以下设为“SPF法”) 可获得约10倍的信号增强度,能够以高灵敏度进行测定。

[0004] 在专利文献1中,记载有使具有优选的激发峰值的初始供体染料和具有优选的发光峰值的最终受体染料在聚合物微小粒子中配合来制造出的荧光微小粒子。在专利文献1中,记载有作为上述染料而使用聚氮引达省染料的内容。

[0005] 在非专利文献1中,记载有设计以及合成了新型二苯乙烯BODIPY^R (注册商标,是boron-dipyrromethene的简称) 染料的内容,且对于合成的二苯乙烯BODIPY^R染料,分析了二氯甲烷溶液中的吸收以及发光光谱。

[0006] 以往技术文献

[0007] 专利文献

[0008] 专利文献1:日本专利第3442777号公报

[0009] 非专利文献

[0010] 非专利文献1:Olivier Galangau et al.,Org.Biomol.Chem.,2010,8,4546-4553

发明内容

[0011] 发明要解决的技术课题

[0012] 如上述,作为能够以简单的测定方法且以高灵敏度进行测定的方法已知有SPF法,但未能充分满足对于非常微量的测定对象物质的测定。在检测方法中,对如无法以抗体进

行夹心的低分子进行测定的竞争法中,为了提高检测灵敏度,需要减少反应系统中的粒子量,此时,荧光强度不足,高浓度区域无法精确度良好地进行测定,这是个问题。在专利文献1中记载的荧光微小粒子具有优选的有效斯托克斯位移,但存在量子产率低的问题。在非专利文献1中,对染料溶液的吸收以及发光光谱进行了分析,但未记载有将染料掺入粒子的内容。

[0013] 本发明的课题在于解决提供一种能够在遍及低浓度至高浓度的大范围的浓度区域中实现活体样品中的测定对象物质的高精确度的测定的试剂盒及方法。

[0014] 用于解决技术课题的手段

[0015] 本发明人等为了解决上述课题而进行深入研究的结果发现,能够通过如下来解决上述课题:一种试剂盒,其包括包含与测定对象物质具有结合性的第一结合物质的标记粒子、及包含与上述测定对象物质或上述第一结合物质中的任一个具有结合性的第二结合物质的基板,在上述试剂盒中,作为上述标记粒子,使用在680nm以上的长波长区域内具有发光极大波长,且显示高量子产率的标记粒子。本发明是基于上述见解而完成的。即,根据本发明,提供以下发明。

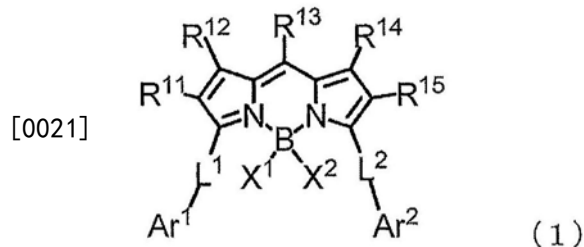
[0016] <1>一种用于测定活体样品中的测定对象物质的试剂盒,其包括:

[0017] 标记粒子,包含与活体样品中的测定对象物质具有结合性的第一结合物质、以及

[0018] 基板,包含与上述测定对象物质或上述第一结合物质中的任一个具有结合性的第二结合物质,

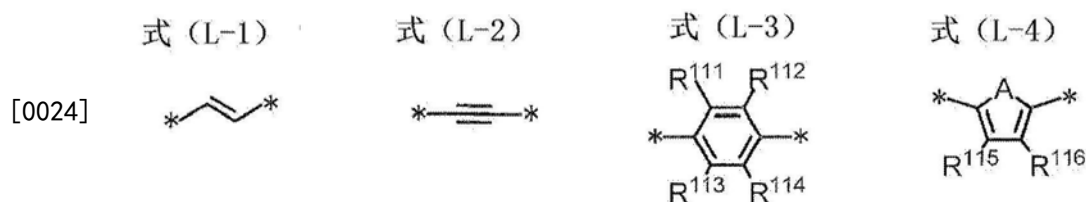
[0019] 在上述试剂盒中,上述标记粒子为含有由下述式(1)表示的至少一种化合物和粒子的发光性的标记粒子。

[0020] [化学式1]



[0022] 式中, $R^{11} \sim R^{15}$ 分别独立地表示氢原子、卤原子、烷基、芳基、杂环基、乙烯基、乙炔基、氨基、酰基、烷氧基、芳氧基、烷硫基或芳硫基,它们也可以具有取代基, $R^{11} \sim R^{15}$ 中的至少3个表示除氢原子以外的原子或基团。 X^1 及 X^2 分别独立地表示卤原子、烷基、芳基、杂环基、羟基、烷氧基、芳氧基、烷硫基、芳硫基、乙烯基或乙炔基,它们也可以具有取代基, X^1 及 X^2 可以相互连结而形成环。 Ar^1 及 Ar^2 分别独立地表示芳基或杂环基,它们也可以具有取代基。 L^1 及 L^2 分别独立地表示式(L-1)~式(L-4)中的任一个。

[0023] [化学式2]



[0025] 式中, $R^{11} \sim R^{16}$ 分别独立地表示氢原子、卤原子、烷基、芳基、杂环基、乙烯基、乙炔基、氨基、酰基、烷氧基、芳氧基、烷硫基或芳硫基, 它们也可以具有取代基。A 表示 -O-、-S- 或 -NH-。

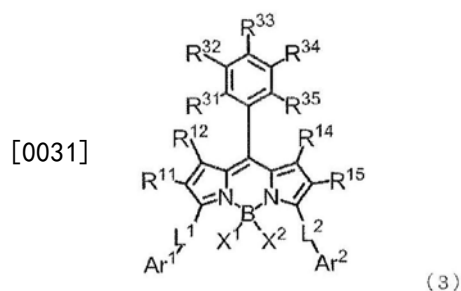
[0026] <2>根据<1>所述的试剂盒, 其中, 上述标记粒子为标记胶乳粒子。

[0027] <3>根据<1>或<2>所述的试剂盒, 其中, 上述标记粒子具有羧基。

[0028] <4>根据<1>至<3>中任一项所述的试剂盒, 其中, 上述标记粒子的平均粒径为 70~500nm。

[0029] <5>根据<1>至<4>中任一项所述的试剂盒, 其中, 由上述式 (1) 表示的化合物为由下述式 (3) 表示的化合物。

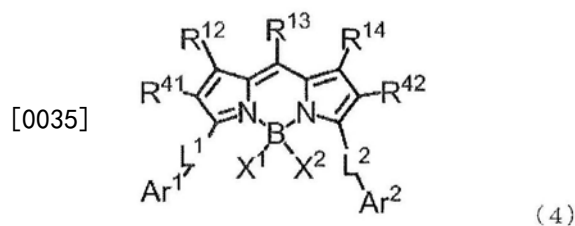
[0030] [化学式3]



[0032] 式中, R^{11} 、 R^{12} 、 R^{14} 、 R^{15} 、 X^1 、 X^2 、 Ar^1 、 Ar^2 、 L^1 及 L^2 与式 (1) 中的定义含义相同, 其中, R^{11} 、 R^{12} 、 R^{14} 及 R^{15} 中的至少 2 个是除氢原子以外的原子或基团。 $R^{31} \sim R^{35}$ 分别独立地表示氢原子、卤原子、烷基、芳基、杂环基、乙烯基、乙炔基、氨基、酰基、氰基、烷氧基、芳氧基、烷硫基或芳硫基, 它们也可以具有取代基, R^{31} 、 R^{32} 、 R^{34} 及 R^{35} 中的任一个是由 2 个原子以上构成的基团。

[0033] <6>根据<1>至<4>中任一项所述的试剂盒, 其中, 由上述式 (1) 表示的化合物是由下述式 (4) 表示的化合物。

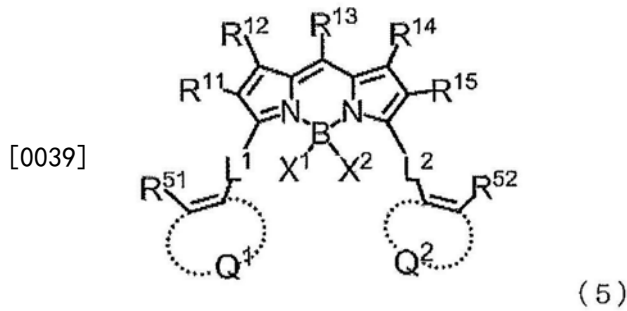
[0034] [化学式4]



[0036] 式中, R^{12} 、 R^{13} 、 R^{14} 、 X^1 、 X^2 、 Ar^1 、 Ar^2 、 L^1 及 L^2 与式 (1) 中的定义含义相同, 其中, R^{12} 、 R^{13} 及 R^{14} 中的至少 1 个是除氢原子以外的原子或基团。 R^{41} 及 R^{42} 分别独立地表示芳基、杂环基、乙烯基或乙炔基, 它们也可以具有取代基。

[0037] <7>根据<1>至<4>中任一项所述的试剂盒, 其中, 由上述式 (1) 表示的化合物为由下述式 (5) 表示的化合物。

[0038] [化学式5]



[0040] 式中, $R^{11} \sim R^{15}$ 、 X^1 、 X^2 、 L^1 及 L^2 与式 (1) 中的定义含义相同。 R^{51} 及 R^{52} 分别独立地表示烷基、芳基、杂芳基、氨基、酰基、烷氧基、芳氧基、烷硫基或芳硫基, 它们也可以具有取代基。 Q^1 及 Q^2 分别独立地表示芳香族烃环或芳香族杂环, 它们也可以具有取代基。

[0041] <8>根据<1>至<7>中任一项所述的试剂盒, 其中, 上述标记粒子为含有至少一种能量供体化合物、至少一种能量受体化合物及粒子的发光性粒子, 上述能量供体化合物及上述能量受体化合物中的至少一种为由上述式 (1) 表示的化合物。

[0042] <9>根据<8>所述的试剂盒, 其中, 作为上述能量供体化合物, 含有至少一种由上述式 (1) 表示的化合物, 作为上述能量受体化合物, 含有至少一种由上述式 (1) 表示的化合物。

[0043] <10>根据<8>或<9>所述的试剂盒, 其中, 能量供体化合物与能量受体化合物的摩尔比为 1:10~10:1。

[0044] <11>根据<8>至<10>中任一项所述的试剂盒, 其中, 能量供体化合物与能量受体化合物的斯托克斯位移为 40nm 以上。

[0045] <12>根据<1>至<11>中任一项所述的试剂盒, 其中, 上述基板具有包含上述第二结合物质的检测区域。

[0046] <13>根据<12>所述的试剂盒, 其中, 上述检测区域为包含金的金属膜。

[0047] <14>一种测定活体样品中的测定对象物质的方法, 其包含如下工序:

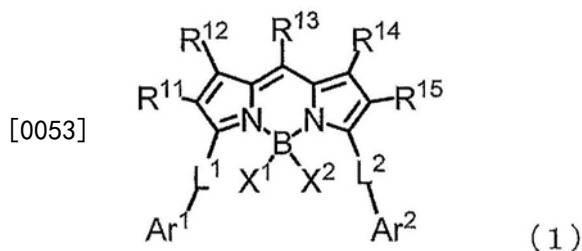
[0048] 反应工序, 使活体样品与包含与测定对象物质具有结合性的第一结合物质的标记粒子进行反应;

[0049] 捕捉工序, 使在上述反应工序中获得的反应产物与包含与上述测定对象物质或上述第一结合物质中的任一个具有结合性的第二结合物质的基板接触, 从而在基板上捕捉标记粒子; 以及

[0050] 标记信息获取工序, 获取与上述测定对象物质相关的标记信息,

[0051] 上述标记粒子为含有由下述式 (1) 表示的至少一种化合物和粒子的发光性的标记粒子。

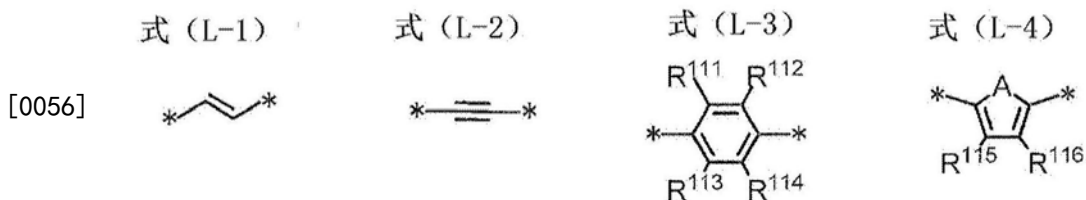
[0052] [化学式 6]



[0054] 式中, $R^{11} \sim R^{15}$ 分别独立地表示氢原子、卤原子、烷基、芳基、杂环基、乙烯基、乙炔

基、氨基、酰基、烷氧基、芳氧基、烷硫基或芳硫基，它们也可以具有取代基， $R^{11} \sim R^{15}$ 中的至少3个表示除氢原子以外的原子或基团。 X^1 及 X^2 分别独立地表示卤原子、烷基、芳基、杂环基、羟基、烷氧基、芳氧基、烷硫基、芳硫基、乙烯基或乙炔基，它们也可以具有取代基， X^1 及 X^2 可以相互连结而形成环。 Ar^1 及 Ar^2 分别独立地表示芳基或杂环基，它们也可以具有取代基。 L^1 及 L^2 分别独立地表示式(L-1)~式(L-4)中的任一个。

[0055] [化学式7]



[0057] 式中， $R^{111} \sim R^{116}$ 分别独立地表示氢原子、卤原子、烷基、芳基、杂环基、乙烯基、乙炔基、氨基、酰基、烷氧基、芳氧基、烷硫基或芳硫基，它们也可以具有取代基。A表示-O-、-S-或-NH-。

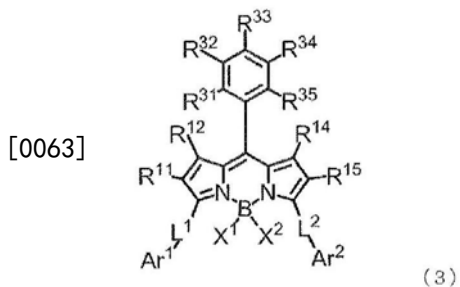
[0058] <15>根据<14>所述的方法，其中，上述粒子为胶乳粒子。

[0059] <16>根据<14>或<15>所述的方法，其中，上述粒子具有羧基。

[0060] <17>根据<14>至<16>中任一项所述的方法，其中，上述标记粒子的平均粒径为70~500nm。

[0061] <18>根据<14>至<17>中任一项所述的方法，其中，由上述式(1)表示的化合物为由下述式(3)表示的化合物。

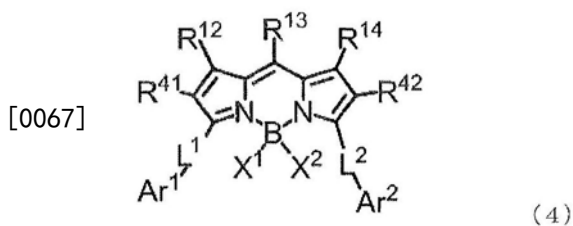
[0062] [化学式8]



[0064] 式中， R^{11} 、 R^{12} 、 R^{14} 、 R^{15} 、 X^1 、 X^2 、 Ar^1 、 Ar^2 、 L^1 及 L^2 与式(1)中的定义含义相同，其中， R^{11} 、 R^{12} 、 R^{14} 及 R^{15} 中的至少2个为除氢原子以外的原子或基团。 $R^{31} \sim R^{35}$ 分别独立地表示氢原子、卤原子、烷基、芳基、杂环基、乙烯基、乙炔基、氨基、酰基、氰基、烷氧基、芳氧基、烷硫基或芳硫基，它们也可以具有取代基， R^{31} 、 R^{32} 、 R^{34} 及 R^{35} 中的任一个是由2个原子以上构成的基团。

[0065] <19>根据<14>至<17>中任一项所述的方法，其中，由上述式(1)表示的化合物为由下述式(4)表示的化合物。

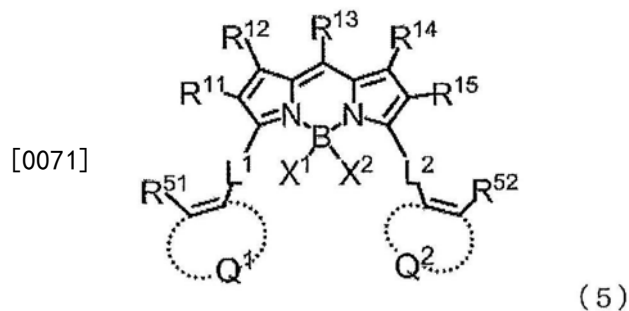
[0066] [化学式9]



[0068] 式中, R^{12} 、 R^{13} 、 R^{14} 、 X^1 、 X^2 、 Ar^1 、 Ar^2 、 L^1 及 L^2 与式(1)中的定义含义相同,其中, R^{12} 、 R^{13} 及 R^{14} 中的至少1个为除氢原子以外的原子或基团。 R^{41} 及 R^{42} 分别独立地表示芳基、杂环基、乙烯基或乙炔基,它们也可以具有取代基。

[0069] <20>根据<14>至<17>中任一项所述的方法,其中,由上述式(1)表示的化合物为由下述式(5)表示的化合物。

[0070] [化学式10]



[0072] 式中, $R^{11} \sim R^{15}$ 、 X^1 、 X^2 、 L^1 及 L^2 与式(1)中的定义含义相同。 R^{51} 及 R^{52} 分别独立地表示烷基、芳基、杂芳基、氨基、酰基、烷氧基、芳氧基、烷硫基或芳硫基,它们也可以具有取代基。 Q^1 及 Q^2 分别独立地表示芳香族烃环或芳香族杂环,它们也可以具有取代基。

[0073] <21>根据<14>至<20>中任一项所述的方法,其中,上述标记粒子为含有至少一种能量供体化合物、至少一种能量受体化合物及粒子的发光性粒子,上述能量供体化合物及上述能量受体化合物中的至少一种为由上述式(1)表示的化合物。

[0074] <22>根据<21>所述的方法,其中,作为上述能量供体化合物,含有至少一种由上述式(1)表示的化合物,作为上述能量受体化合物,含有至少一种由上述式(1)表示的化合物。

[0075] <23>根据<21>或<22>所述的方法,其中,能量供体化合物与能量受体化合物的摩尔比为1:10~10:1。

[0076] <24>根据<21>至<23>中任一项所述的方法,其中,能量供体化合物与能量受体化合物的斯托克斯位移为40nm以上。

[0077] <25>根据<14>至<24>中任一项所述的方法,其中,上述基板具有包含上述第二结合物质的检测区域。

[0078] <26>根据<25>所述的方法,其中,上述检测区域为包含金的金属膜。

[0079] <27>根据<26>所述的方法,其中,通过基于表面等离子体激元激发的荧光检测,获取与上述测定对象物质相关的标记信息。

[0080] 发明效果

[0081] 根据本发明的试剂盒及方法,能够在遍及低浓度至高浓度的大范围的浓度区域内实现活体样品中的测定对象物质的高精确度的测定。

附图说明

[0082] 图1表示化合物(4)的400MHz¹H NMR光谱。

[0083] 图2表示化合物(7)的400MHz¹H NMR光谱。

[0084] 图3表示传感器芯片的概略图。

[0085] 图4表示传感器芯片的分解图。

具体实施方式

[0086] 以下,对本发明的实施方式进行详细的说明。

[0087] 在本说明书中,使用“~”表示的数值范围表示将记载于“~”的前后的数值分别作为最小值以及最大值包含在内的范围。

[0088] [用于测定活体样品中的测定对象物质的试剂盒]

[0089] 基于本发明的用于测定活体样品中的测定对象物质的试剂盒包括包含与活体样品中的测定对象物质具有结合性的第一结合物质的标记粒子、及包含与测定对象物质或第一结合物质中的任一个具有结合性的第二结合物质的基板,其中,标记粒子为含有后述由式(1)表示的至少一种化合物和粒子的发光性的标记粒子。

[0090] (活体样品)

[0091] 作为活体样品,只要为能够包含测定对象物质的样品,则没有特别的限定,例如能够举出生物学样品尤其是动物(例如人、猫、狗、马等)的体液(例如血液、血清、血浆、脑脊液、泪液、汗、尿、脓、鼻涕或痰)或排泄物(例如粪便)、脏器、组织、粘膜、皮肤等。

[0092] (测定对象物质)

[0093] 作为测定对象物质没有特别的限定,例如可举出甲状腺素(T4)、三碘甲腺原氨酸(T3)、雌二醇(E2)、醛固酮、对称二甲基精氨酸(SDMA)、胆汁酸、皮质醇、胆固醇、皮质酮、黄体酮、睾酮、雌激素、维生素类、肌酸酐、氨基酸、 β -胡萝卜素、肌酸酐、地高辛、茶碱、叶酸、炎症标志物或败血症标志物等蛋白质等。

[0094] 孕酮为从卵巢和胎盘分泌,且与黄体功能或妊娠相关的性荷尔蒙。利用于月经的周期异常、不孕症的诊断。并且,还使用于狗的交配时期、猫的卵巢残余物确认。

[0095] (第一结合物质)

[0096] 在本发明中使用的第一结合物质为与测定对象物质具有结合性的物质。作为第一结合物质,能够使用抗原、抗体或它们的复合体,但并不限于这些。优选第一结合物质为抗体。当第一结合物质为抗体时,作为与测定对象物质具有结合性的抗体,例如能够使用由通过其测定对象物质免疫的动物的血清制备的抗血清、由抗血清提纯而成的免疫球蛋白部分、由使用通过其测定对象物质免疫的动物的脾脏细胞的细胞融合而获得的单克隆抗体、或者这些的断片[例如F(ab')₂、Fab、Fab' 或Fv]等。这些抗体的制备能够以通常的方法来进行。而且,如当该抗体为嵌合抗体等时,可为进行了改性的抗体,并且也能够使用市售的抗体或通过公知的方法由动物血清或培养上清液制备的抗体。

[0097] 例如,当测定对象物质为孕酮时,作为第一结合物质,使用与孕酮具有结合性的(优选特异性地识别孕酮的)抗孕酮抗体。

[0098] 以下举出抗孕酮抗体的制作方法之一的例子进行说明。

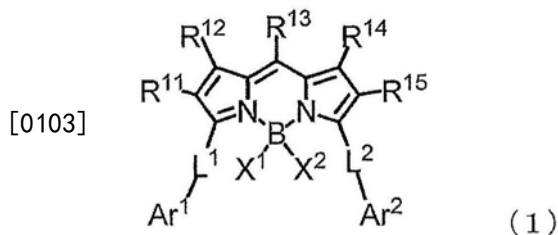
[0099] 能够混合孕酮、牛血清白蛋白(Bovine Serum Albumin,以下简称为BSA)、缩合剂来制作孕酮-BSA结合体。将结合体用作小鼠免疫致敏抗原,在小鼠背部皮下数次进行免疫。此时,能够适当选择完全佐剂(Complete Freund's Adjuvant:CFA)和/或不完全佐剂(Incomplete Freund's Adjuvant:IFA)来与免疫致敏抗原进行混合使用。完全佐剂为刺激免疫的物质,为石蜡与乳化剂的混合物。不完全佐剂为在完全佐剂中添加已灭绝的分枝杆菌或结核菌的死菌,进一步增强抗原性的物质。在数周内进行数次适当免疫致敏后,从小鼠进行采血来实施抗体效价的测定。当确认到抗体效价的充分上升时向腹腔内投放抗原,且

在数日后摘取脾脏。使如此从免疫小鼠摘取的脾脏细胞与变体骨髓瘤细胞 (myeloma) 融合, 能够制作具备抗体产生能力的融合细胞。从该融合细胞中仅选择相对于作为目标的抗原的抗体产生细胞, 并进一步为了仅增殖该细胞株而进行有限稀释。能够进行稀释后的细胞的培养 (克隆)。将如此获得的融合细胞株注射到小鼠的腹腔内, 使腹水型的抗体产生细胞增殖, 从而能够在腹水中产生单克隆抗体, 通过回收这些抗体, 能够得到目标抗体。

[0100] (标记粒子)

[0101] 在本发明中使用的标记粒子为含有由下述式 (1) 表示的至少一种化合物及粒子的发光性的标记粒子, 也叫作荧光标记粒子。

[0102] [化学式11]



[0104] 式 (1) 中的各符号的含义如在本说明书已定义。

[0105] 已知通常的色素化合物若增加向粒子的混入量, 则受到缔合的影响, 导致量子产率下降 (这也称作浓度猝灭)。尤其, 作为吸收波长为 650nm 以上的长波长的荧光色素化合物若混入到粒子中则容易产生浓度猝灭, 难以维持量子产率。

[0106] 在本发明中使用的由式 (1) 表示的化合物通过具有共轭体系取代基而能够以长波长发光, 且通过在二吡咯亚甲基骨架中具有多个取代基, 能够抑制聚合物粒子中的量子产率的下降。作为抑制量子产率下降的主要因素, 可以考虑基于相对于二吡咯亚甲基骨架沿垂直方向伸出的多个取代基的分子之间的相互作用 (例如 π - π 相互作用) 的抑制。根据由式 (1) 表示的化合物, 尤其能够制造在长波长范围内亮度高的发光性的标记粒子 (优选荧光粒子, 更优选荧光纳米粒子)。另外, 当标记粒子为荧光粒子时, 亮度表示荧光强度。根据本发明, 在生物体窗口区域 (容易透过生物体的红外波长区域即 650~900nm 附近) 的发光量子产率高, 因此能够提高利用了发光的感应的灵敏度。

[0107] 在本说明书中, 烷基可以为直链、支链、环状或它们的组合中的任一种, 直链或支链烷基的碳原子数优选为 1~36, 更优选为 1~18, 进一步优选为 1~12, 尤其优选为 1~6。作为环状的烷基, 例如可举出碳原子数 3~8 的环烷基等。作为烷基的具体例, 可举出甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基、仲丁基、叔丁基、正戊基、正己基、正庚基、正辛基、正壬基、正癸基、正十一烷基、正十二烷基、正十三烷基、正十四烷基、正十五烷基、正十六烷基、正十七烷基、正十八烷基以及环己基等。

[0108] 在本说明书中, 作为芳基, 优选碳原子数为 6~48 的芳基, 更优选碳原子数为 6~24 的芳基, 进一步优选碳原子数为 6~14 的芳基, 例如可举出苯基、萘基、蒽基、苝基、菲基、联苯基、芴基等。

[0109] 在本说明书中, 作为杂环基, 优选可以是 5~7 元的取代或未取代、饱和或不饱和、芳香族或非芳香族、单环或稠环的杂环基中的任一种。杂环基优选为成环原子选自碳原子、氮原子、氧原子以及硫原子, 且具有至少一个氮原子、氧原子以及硫原子中的任一个杂原子的杂环基, 进一步优选为碳原子数 3~30 的 5 或 6 元的芳香族杂环基。作为杂环基, 例如可举

[0122] X^1 及 X^2 所表示的烷基、芳基、杂环基、羟基、烷氧基、芳氧基、烷硫基、芳硫基、乙烯基或乙炔基可以具有取代基,作为上述取代基,可举出取代基组A中所记载的取代基。

[0123] Ar^1 及 Ar^2 所表示的芳基或杂环基可以具有取代基,作为上述取代基,可举出取代基组A中所记载的取代基。

[0124] $R^{111} \sim R^{116}$ 所表示的烷基、芳基、杂环基、乙烯基、乙炔基、氨基、酰基、烷氧基、芳氧基、烷硫基或芳硫基可以具有取代基,作为上述取代基,可举出取代基组A中所记载的取代基。

[0125] <由式(1)表示的化合物>

[0126] 式(1)中, $R^{11} \sim R^{15}$ 分别独立地表示氢原子、卤原子、烷基、芳基、杂环基、乙烯基、乙炔基、氨基、酰基、烷氧基、芳氧基、烷硫基或芳硫基,它们也可以具有取代基。 $R^{11} \sim R^{15}$ 中的至少3个表示除氢原子以外的原子或基团,优选 $R^{11} \sim R^{15}$ 中的至少4个表示除氢原子以外的原子或基团,更优选 $R^{11} \sim R^{15}$ 全部表示除氢原子以外的原子或基团。

[0127] R^{11} 及 R^{15} 可以为相同或不同的原子或基团,优选为相同的原子或基团。 R^{12} 及 R^{14} 可以为相同或不同的原子或基团,优选为相同的原子或基团。

[0128] R^{11} 及 R^{15} 优选表示氢原子、卤原子、烷基、芳基、杂环基、乙烯基或乙炔基,它们也可以具有取代基。

[0129] R^{12} 及 R^{14} 优选表示烷基,它们也可以具有取代基。

[0130] R^{13} 优选表示芳基,其可以具有取代基。

[0131] 式(1)中, X^1 及 X^2 分别独立地表示卤原子、烷基、芳基、杂环基、羟基、烷氧基、芳氧基、烷硫基、芳硫基、乙烯基或乙炔基,它们也可以具有取代基, X^1 及 X^2 可以相互连结而形成环。

[0132] X^1 及 X^2 优选表示卤原子或烷氧基。 X^1 及 X^2 更优选为氟原子、甲氧基、乙氧基、异丙氧基、叔丁氧基,它们也优选被氟原子、烷氧基取代。

[0133] 式(1)中, Ar^1 及 Ar^2 分别独立地表示芳基或杂环基,它们也可以具有取代基。

[0134] 式(1)中, L^1 及 L^2 分别独立地表示式(L-1)~式(L-4)中的任一个。

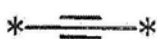
[0135] [化学式12]

[0136]

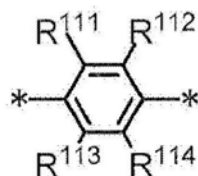
式(L-1)



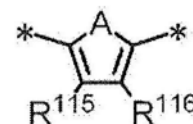
式(L-2)



式(L-3)



式(L-4)



[0137] 式中, $R^{111} \sim R^{116}$ 分别独立地表示氢原子、卤原子、烷基、芳基、杂环基、乙烯基、乙炔基、氨基、酰基、烷氧基、芳氧基、烷硫基或芳硫基,它们也可以具有取代基。A表示-O-、-S-或-NH-。

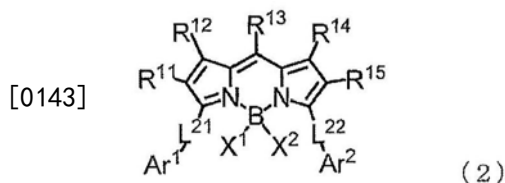
[0138] L^1 及 L^2 优选表示式(L-1)或式(L-2)中的任一个。

[0139] $R^{111} \sim R^{116}$ 优选为氢原子。

[0140] <关于由式(2)表示的化合物>

[0141] 作为由式(1)表示的化合物的优选例,可举出由下述式(2)表示的化合物。

[0142] [化学式13]



[0144] 式中, $R^{11} \sim R^{15}$ 、 X^1 、 X^2 、 Ar^1 及 Ar^2 与式 (1) 中的定义含义相同, 优选范围也与式 (1) 中的优选范围相同。 L^{21} 及 L^{22} 分别独立地表示由式 (L-1) 或式 (L-2) 表示的基团。

[0145] [化学式14]

式 (L-1)

式 (L-2)

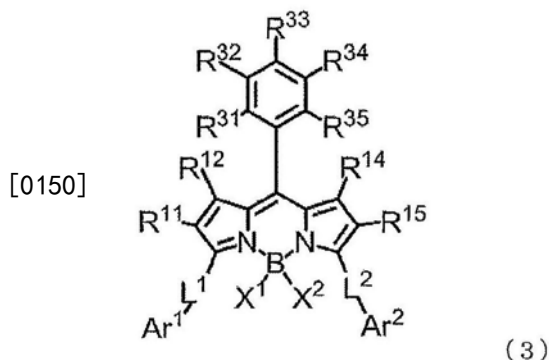
[0146]



[0147] <关于由式 (3) 表示的化合物>

[0148] 作为由式 (1) 表示的化合物的优选例, 可举出由下述式 (3) 表示的化合物。

[0149] [化学式15]



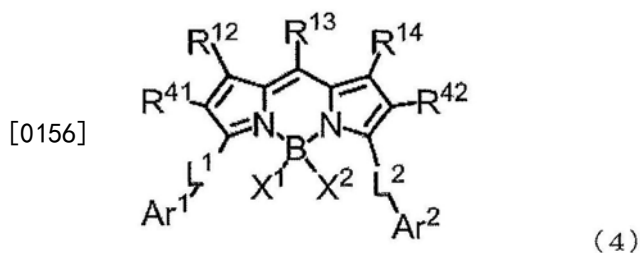
[0151] 式 (3) 中, R^{11} 、 R^{12} 、 R^{14} 、 R^{15} 、 X^1 、 X^2 、 Ar^1 、 Ar^2 、 L^1 及 L^2 与式 (1) 中的定义含义相同, 优选范围也与式 (1) 中的优选范围相同。其中, R^{11} 、 R^{12} 、 R^{14} 及 R^{15} 中的至少 2 个是除氢原子以外的原子或基团, 优选 R^{11} 、 R^{12} 、 R^{14} 及 R^{15} 中的至少 3 个是除氢原子以外的原子或基团, 更优选 R^{11} 、 R^{12} 、 R^{14} 及 R^{15} 是除氢原子以外的原子或基团。

[0152] 式 (3) 中, $R^{31} \sim R^{35}$ 分别独立地表示氢原子、卤原子、烷基、芳基、杂环基、乙烯基、乙炔基、氨基、氰基、酰基、烷氧基、芳氧基、烷硫基或芳硫基, 它们也可以具有取代基 (作为上述取代基, 可举出取代基组 A 中记载的取代基), R^{31} 、 R^{32} 、 R^{34} 及 R^{35} 中的任一个是由 2 个原子以上构成的基团。作为由 2 个原子以上构成的基团, 优选烷基、芳基、乙烯基、乙炔基、氨基、氰基、烷氧基, 更优选烷基。在烷基中, 优选仅由碳原子和氢原子构成的烷基、被卤原子取代的烷基, 更优选仅由碳原子数 1~6 的碳原子和氢原子构成的烷基、被氟原子取代的烷基, 进一步优选甲基、异丙基、叔丁基、三氟甲基, 尤其优选甲基。

[0153] <关于由式 (4) 表示的化合物>

[0154] 作为由式 (1) 表示的化合物的优选例, 可举出由下述式 (4) 表示的化合物。

[0155] [化学式16]



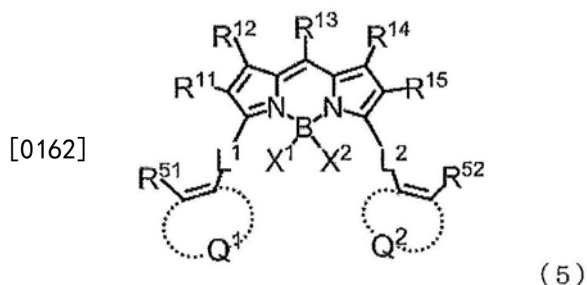
[0157] 式(4)中, R^{12} 、 R^{13} 、 R^{14} 、 X^1 、 X^2 、 Ar^1 、 Ar^2 、 L^1 及 L^2 与式(1)中的定义含义相同, 优选范围也与式(1)中的优选范围相同。其中, R^{12} 、 R^{13} 及 R^{14} 中的至少一个是除氢原子以外的原子或基团, 优选 R^{12} 、 R^{13} 及 R^{14} 中的至少2个是除氢原子以外的原子或基团, 更优选 R^{12} 、 R^{13} 及 R^{14} 是除氢原子以外的原子或基团。

[0158] 式(4)中, R^{41} 及 R^{42} 分别独立地表示芳基、杂环基、乙烯基或乙炔基, 它们也可以具有取代基。作为上述取代基, 可举出取代基组A中所记载的取代基。 R^{41} 及 R^{42} 优选分别独立地为芳基、乙烯基或乙炔基, 从提高量子产率的观点来看, 优选为芳基, 从长波长化的观点来看, 优选为乙烯基、乙炔基。当为芳基时, 优选在芳基的邻位或间位具有至少1个取代基, 更优选在邻位具有至少1个取代基。取代之为芳基的取代基的数量优选为1~3个, 更优选为2个或3个。作为取代之为芳基的取代基, 优选为烷基, 更优选为甲基、异丙基、叔丁基, 进一步优选为甲基。

[0159] <关于由式(5)表示的化合物>

[0160] 作为由式(1)表示的化合物的优选例, 可举出由下述式(5)表示的化合物。

[0161] [化学式17]



[0163] 式(5)中, R^{11} ~ R^{15} 、 X^1 、 X^2 、 L^1 及 L^2 与式(1)中的定义含义相同, 优选范围也与式(1)中的优选范围相同。

[0164] 式(5)中, R^{51} 及 R^{52} 分别独立地表示烷基、芳基、杂芳基、氨基、酰基、烷氧基、芳氧基、烷硫基或芳硫基, 它们也可以具有取代基。作为上述取代基, 可举出取代基组A中所记载的取代基。 R^{51} 及 R^{52} 优选分别独立地为烷基、烷氧基, 从提高量子产率的观点来看, 更优选为烷基, 进一步优选为甲基、乙基、异丙基、叔丁基, 尤其优选为甲基。从长波长化的观点来看, 更优选为烷氧基, 进一步优选为甲氧基、乙氧基、异丙氧基、叔丁氧基, 尤其优选为甲氧基。

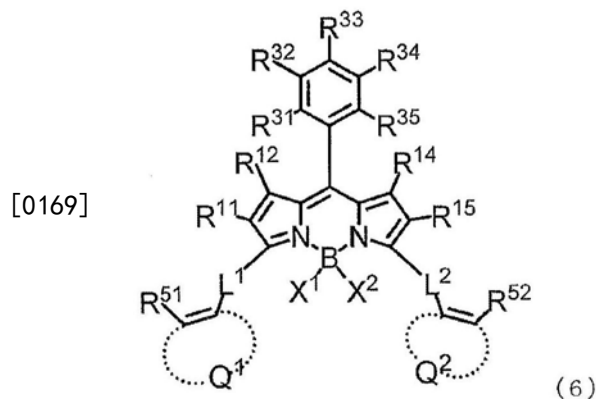
[0165] Q^1 及 Q^2 分别独立地表示芳香族烃环或芳香族杂环, 它们也可以具有取代基。作为上述取代基, 可举出取代基组A中所记载的取代基。 Q^1 及 Q^2 优选为芳香族烃环, 更优选为苯环、萘环、蒽环、菲环、芘环, 进一步优选为苯环、萘环, 尤其优选为苯环。作为包含 R^{51} 形成 Q^1 的基团以及包含 R^{52} 形成 Q^2 的基团, 优选甲苯基、二甲苯基、三甲苯基, 更优选为二甲苯基、三甲苯基, 进一步优选为在相对于与 L^1 或者 L^2 的键合位置位于邻位的两处具有甲基的二甲苯基、在相对于与 L^1 或者 L^2 的键合位置位于邻位的两处以及对位具有甲基的三甲苯基, 尤其优选为

在相对于与L¹或者L²的键合位置位于邻位的两处以及对位具有甲基的三甲苯基。

[0166] <关于由式(6)表示的化合物>

[0167] 由式(5)表示的化合物更优选为由下述式(6)表示的化合物。

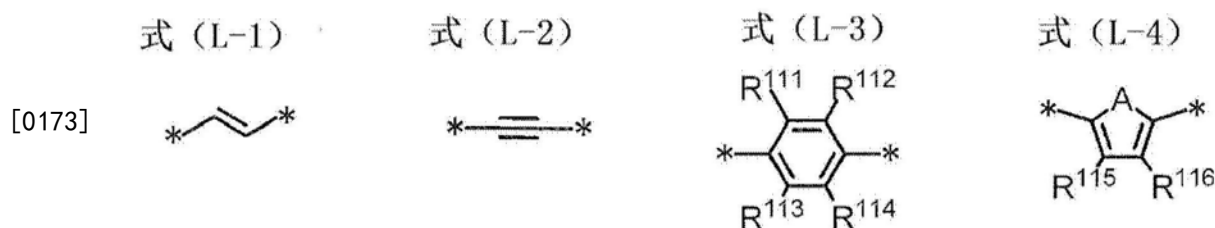
[0168] [化学式18]



[0170] 式中,R¹¹、R¹²、R¹⁴及R¹⁵分别独立地表示氢原子、卤原子、烷基、芳基、杂环基、乙烯基、乙炔基、氨基、酰基、烷氧基、芳氧基、烷硫基或芳硫基,它们也可以具有取代基,R¹¹、R¹²、R¹⁴及R¹⁵中的至少2个是除氢原子以外的原子或基团。X¹及X²分别独立地表示卤原子、烷基、芳基、杂环基、羟基、烷氧基、芳氧基、烷硫基、芳硫基、乙烯基或乙炔基,它们也可以具有取代基,X¹及X²可以相互连结而形成环。R³¹~R³⁵分别独立地表示氢原子、卤原子、烷基、芳基、杂环基、乙烯基、乙炔基、氨基、酰基、氰基、烷氧基、芳氧基、烷硫基或芳硫基,它们也可以具有取代基,R³¹~R³⁵中的任一个是氢原子。R⁵¹及R⁵²分别独立地表示烷基、芳基、杂芳基、氨基、酰基、烷氧基、芳氧基、烷硫基或芳硫基,它们也可以具有取代基。Q¹及Q²分别独立地表示芳香族烃环或芳香族杂环,它们也可以具有取代基。

[0171] L¹及L²分别独立地表示式(L-1)~式(L-4)中的任一个。

[0172] [化学式19]



[0174] 式中,R¹¹¹~R¹¹⁶分别独立地表示氢原子、卤原子、烷基、芳基、杂环基、乙烯基、乙炔基、氨基、酰基、烷氧基、芳氧基、烷硫基或芳硫基,它们也可以具有取代基。A表示-O-、-S-或-NH-。

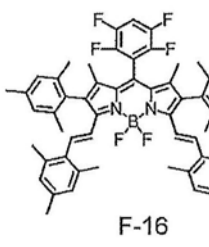
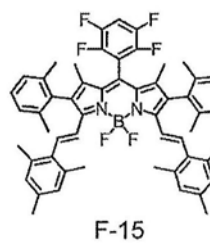
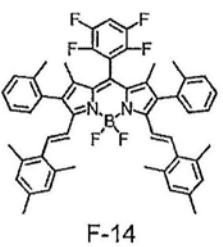
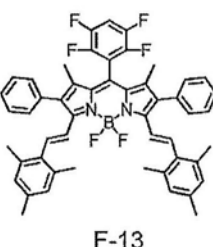
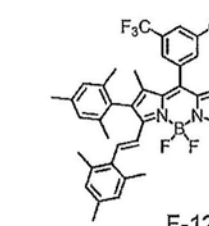
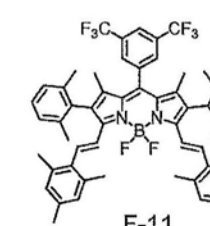
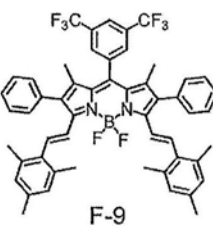
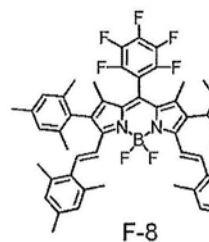
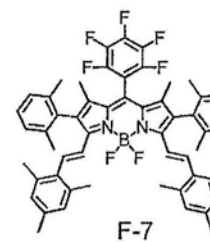
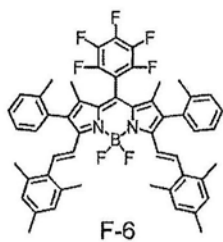
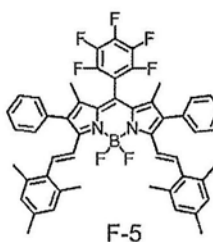
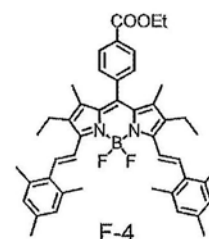
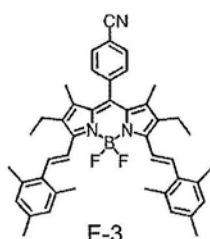
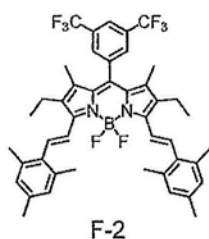
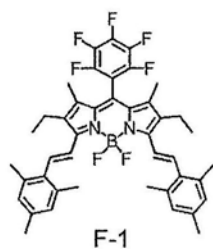
[0175] R¹¹及R¹⁵优选分别独立地为烷基、芳基、杂环基、乙烯基、乙炔基、氨基,更优选上述R¹¹及R¹⁵的含义相同,即为芳基、杂环基、乙烯基或乙炔基,进一步优选为芳基、乙烯基、乙炔基。从提高量子产率的观点来看,更优选芳基,从长波长化的观点来看,更优选为乙烯基、乙炔基。当为芳基时,优选在芳基的邻位或间位具有至少1个取代基,更优选在邻位具有至少1个取代基。取代为芳基的取代基的数量优选为1~3个,更优选为2个或3个。作为取代为芳基的取代基,优选为烷基,更优选为甲基、异丙基、叔丁基,进一步优选为甲基。

[0176] <由式(1)~式(6)表示的化合物的具体例>

[0177] 将由式(1)~式(6)表示的化合物的具体例记载于以下。Me表示甲基,Et表示乙基,iPr表示异丙基。

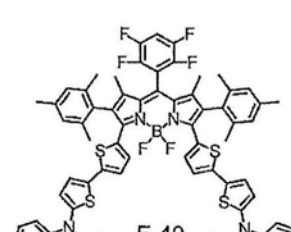
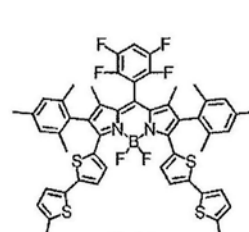
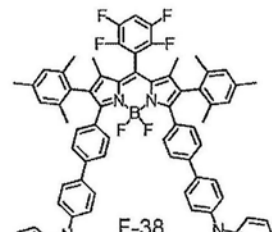
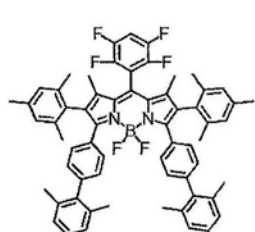
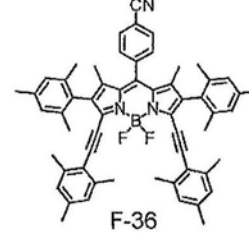
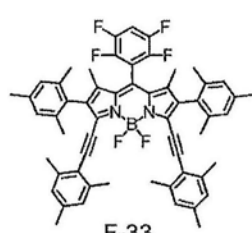
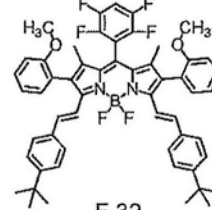
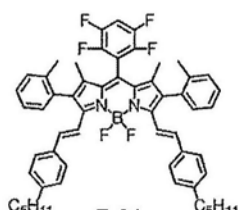
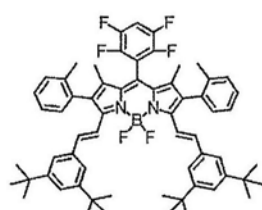
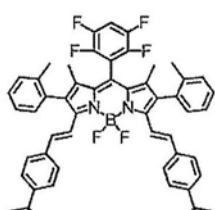
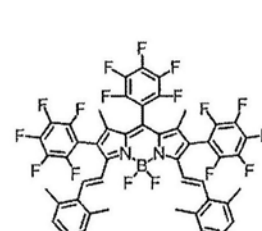
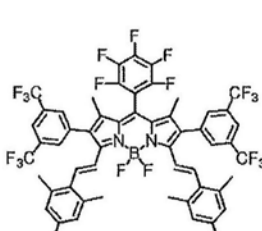
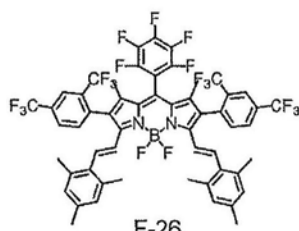
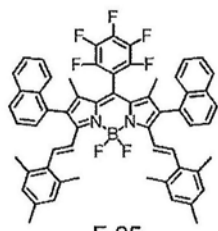
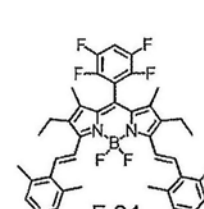
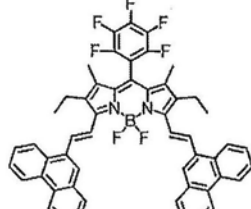
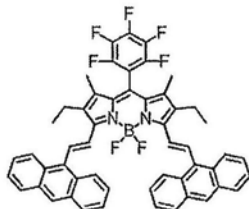
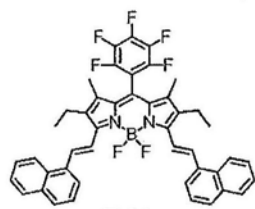
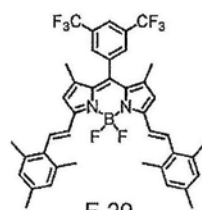
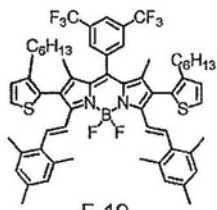
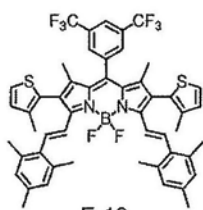
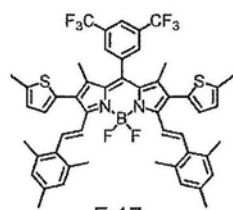
[0178] [化学式20]

[0179]



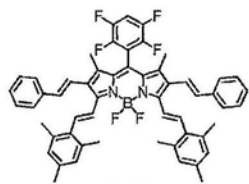
[0180] [化学式21]

[0181]

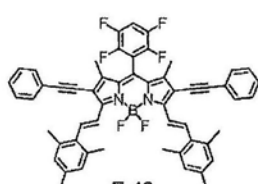


[0182] [化学式22]

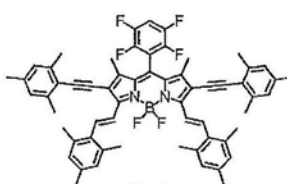
[0183]



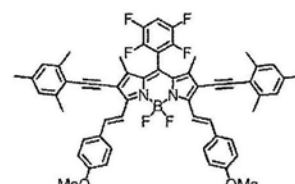
F-41



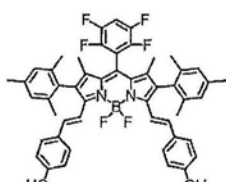
F-42



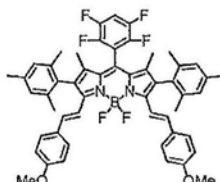
F-43



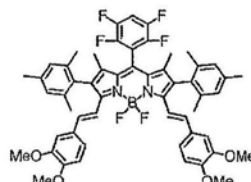
F-44



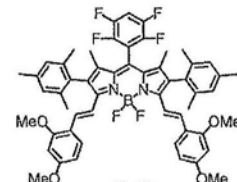
F-45



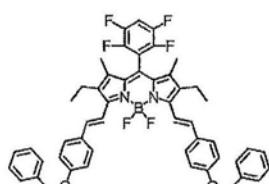
F-46



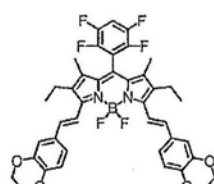
F-47



F-48



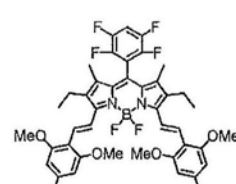
F-49



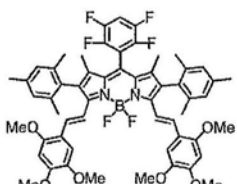
F-50



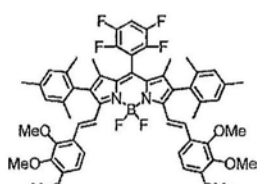
F-51



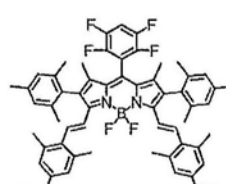
F-52



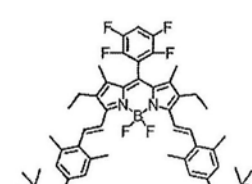
F-53



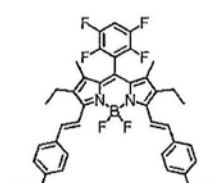
F-54



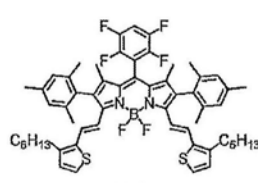
F-55



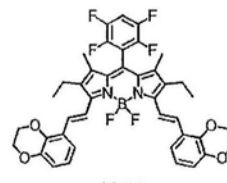
F-56



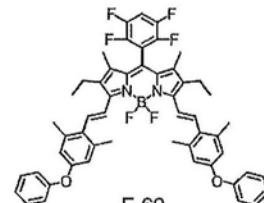
F-57



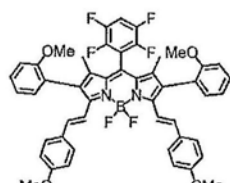
F-58



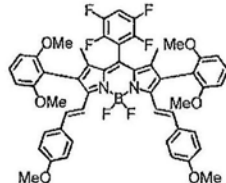
F-59



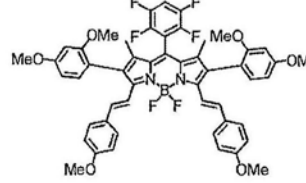
F-60



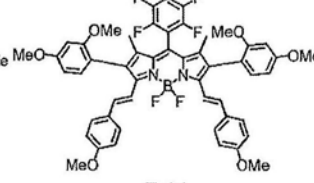
F-61



F-62

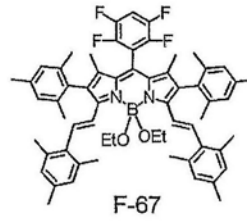
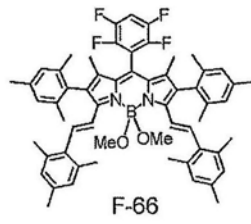


F-63

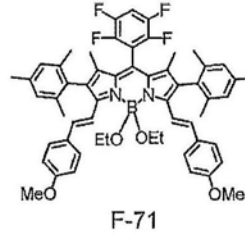
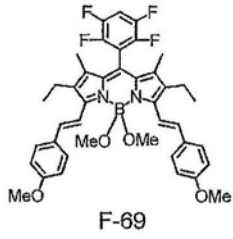


F-64

[0184] [化学式23]

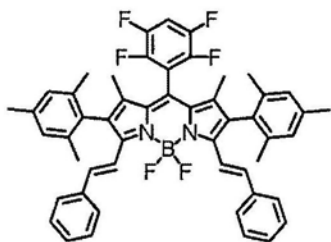


[0185]

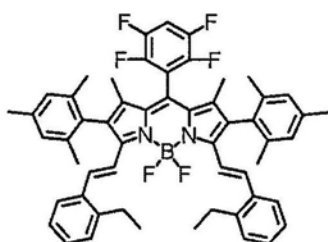


[0186] [化学式24]

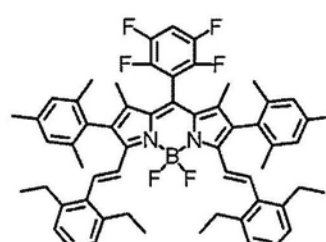
[0187]



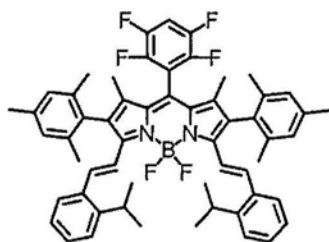
F-73



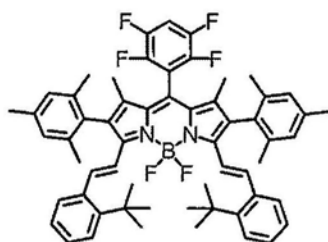
F-73



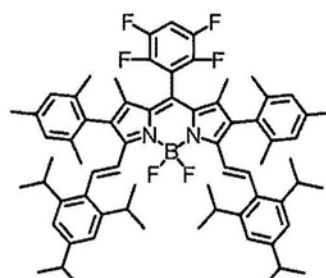
F-73



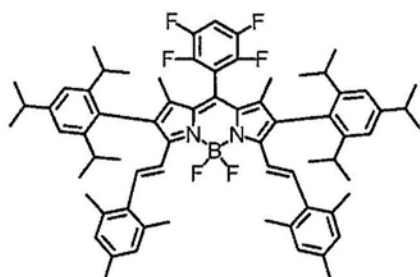
F-73



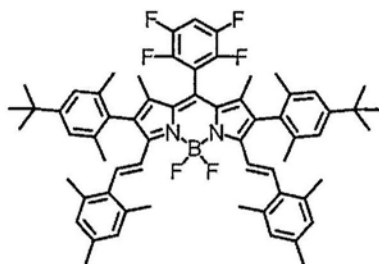
F-74



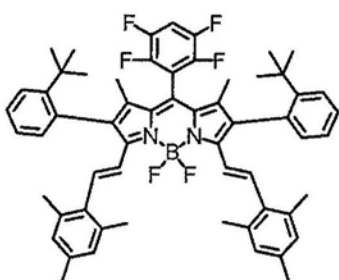
F-75



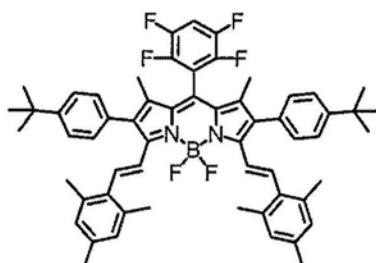
F-76



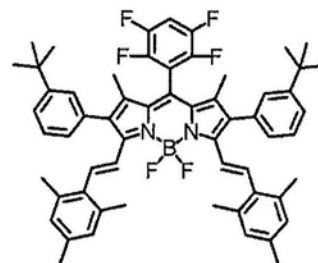
F-77



F-78



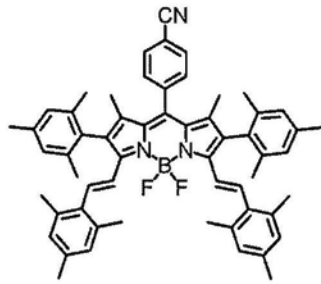
F-79



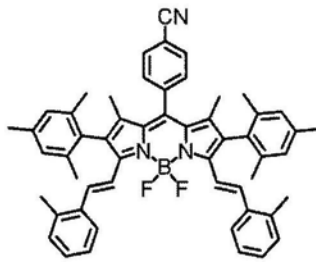
F-80

[0188] [化学式25]

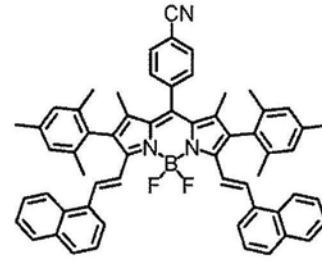
[0189]



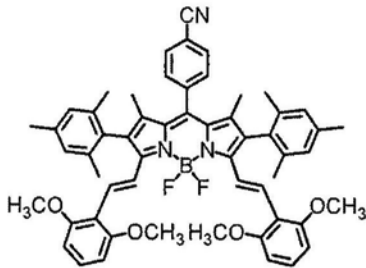
F-81



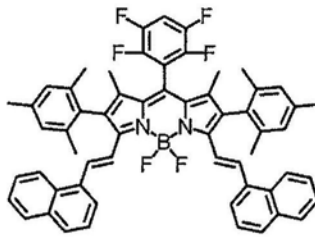
F-82



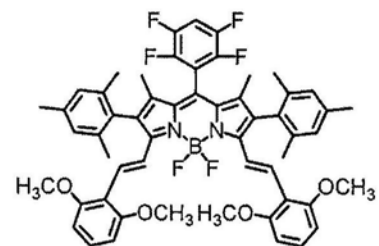
F-83



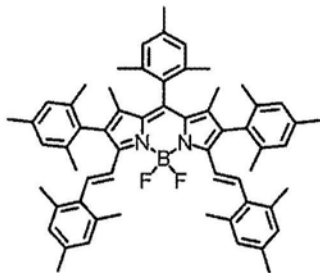
F-84



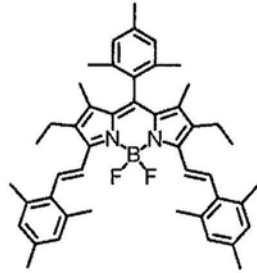
F-85



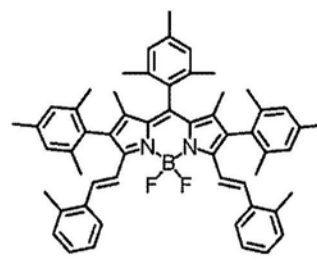
F-86



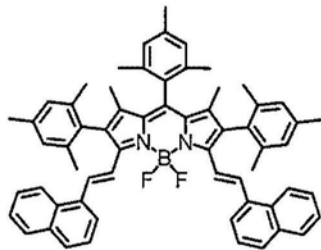
F-87



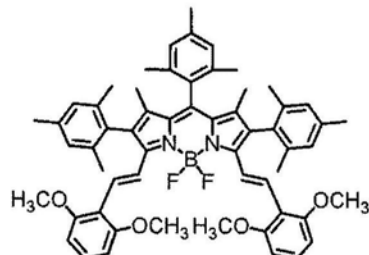
F-88



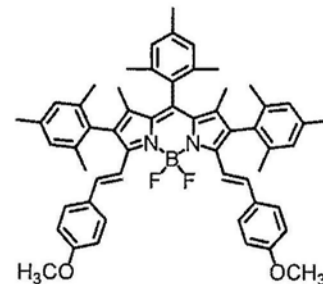
F-89



F-90



F-91



F-92

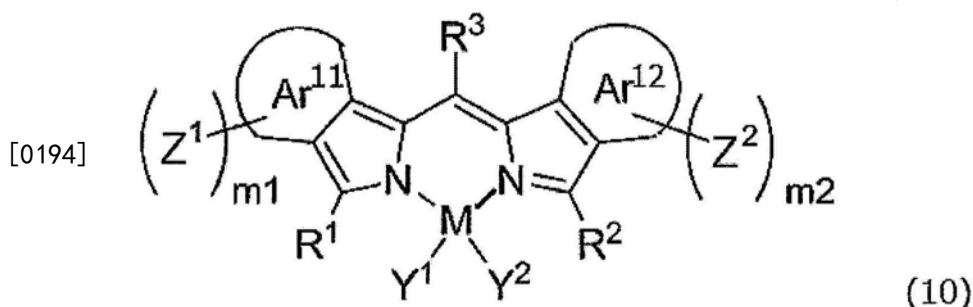
[0190] 标记粒子可为含有至少一种能量供体化合物、至少一种能量受体化合物及粒子的标记粒子,此时,上述能量供体化合物及上述能量受体化合物中的至少一种为由上述式(1)表示的化合物即可。

[0191] 在本发明的另一例子中,发光性的标记粒子作为能量供体化合物及能量受体化合物中的任一个而含有由式(1)表示的化合物,作为能量供体化合物及能量受体化合物中的另一个而含有由后述式(10)表示的化合物。即,作为发光性的标记粒子,可为作为能量供体化合物而含有由式(1)表示的化合物且作为能量受体化合物而含有由式(10)表示的化合物

的发光性的标记粒子,也可为作为能量受体化合物而含有由式(1)表示的化合物且作为能量供体化合物而含有由式(10)表示的化合物的发光性的标记粒子。

[0192] <由式(10)表示的化合物>

[0193] [化学式26]



[0195] 在式(10)中, m_1 及 m_2 分别独立地表示0~4的整数,且 m_1 及 m_2 中的任一个至少为1以上。 M 表示半金属原子或金属原子。 R^1 、 R^2 及 R^3 分别独立地表示氢原子、烷基、芳基、杂环基、乙烯基、乙炔基、酰基、烷氧基、芳氧基、烷硫基或芳硫基,它们也可以具有取代基。 Y^1 及 Y^2 分别独立地表示卤原子、烷基、芳基、杂环基、羟基、烷氧基、芳氧基、烷硫基、芳硫基、乙烯基或乙炔基,它们也可以具有取代基, Y^1 及 Y^2 可以相互连结而形成环。 Ar^{11} 及 Ar^{12} 分别独立地表示可以具有取代基的芳香环。 Z^1 及 Z^2 分别独立地表示芳基、杂环基或氨基,它们也可以具有取代基。当 m_1 为2以上时,多个 Z^1 可为相同的基团也可为分别不同的基团,当 m_2 为2以上时,多个 Z^2 可为相同的基团也可为分别不同的基团。

[0196] 在式(10)中, m_1 及 m_2 分别独立地表示0~4的整数,优选 m_1 及 m_2 均为1以上。 m_1 及 m_2 可为相同的整数也可为不同的整数,优选为相同的整数。优选 m_1 及 m_2 分别独立地表示1或2,更优选 m_1 及 m_2 均为1或均为2,尤其优选 m_1 及 m_2 均为1。

[0197] 式(10)中, M 表示半金属原子或金属原子,优选表示半金属原子,尤其优选表示氟原子。

[0198] 在式(10)中, R^1 、 R^2 及 R^3 分别独立地表示氢原子、烷基、芳基、杂环基、乙烯基、乙炔基、酰基、烷氧基、芳氧基、烷硫基或芳硫基,它们也可以具有取代基。

[0199] 优选 R^1 及 R^2 分别独立地为芳基或杂环基,它们也可以具有取代基。

[0200] R^1 及 R^2 分别可以相同也可以不同,优选相同。

[0201] R^1 及 R^2 不会连结而形成环。

[0202] 优选 R^3 为氢原子、烷基、芳基或杂环基,它们也可以具有取代基。更优选 R^3 为氢原子。

[0203] 在式(10)中, Y^1 及 Y^2 分别独立地表示卤原子、烷基、芳基、杂环基、羟基、烷氧基、芳氧基、烷硫基、芳硫基、乙烯基或乙炔基,它们也可以具有取代基, Y^1 及 Y^2 可以相互连结而形成环。

[0204] 优选 Y^1 及 Y^2 分别独立地表示卤原子、烷基、芳基、羟基、烷氧基或芳氧基,它们也可以具有取代基, Y^1 及 Y^2 可以相互连结而形成环。

[0205] 更优选 Y^1 及 Y^2 分别独立地为卤原子。

[0206] 进一步优选 Y^1 及 Y^2 为氟原子。

[0207] Y^1 及 Y^2 分别可以相同也可以不同,优选相同。

[0208] 在式(10)中,Ar¹及Ar²分别独立地表示可以具有取代基的芳香环。

[0209] 优选Ar¹及Ar²表示苯环。

[0210] 式(10)中,Z¹及Z²分别独立地表示卤原子、烷基、芳基、杂环基、乙烯基、乙炔基、酰基、烷氧基、芳氧基、烷硫基、芳硫基或氨基,它们也可以具有取代基。当m₁为2以上时,多个Z¹可为相同的基团也可为分别不同的基团,当m₂为2以上时,多个Z²可为相同的基团也可为分别不同的基团。

[0211] 优选Z¹及Z²分别独立地表示可以具有取代基的芳基。

[0212] 更优选Z¹及Z²分别独立地表示苯基、萘基或蒽基,它们也可以具有取代基。

[0213] 优选当m₁为2以上时,多个Z¹为相同的基团。

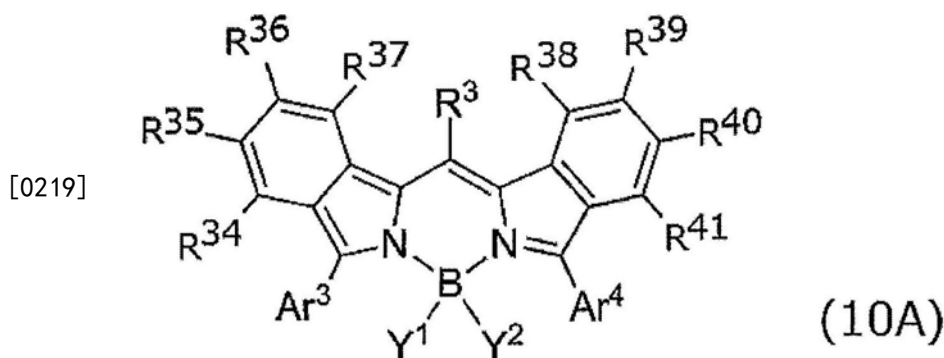
[0214] 优选当m₂为2以上时,多个Z²为相同的基团。

[0215] 由式(2)表示的化合物优选在分子内不具有羧酸基、磷酸基、磺酸基等酸性基。

[0216] <关于由式(10A)表示的化合物>

[0217] 作为由式(10)表示的化合物的优选例,可举出由下述式(10A)表示的化合物。

[0218] [化学式27]



[0220] 式(10A)中,Y¹及Y²分别独立地表示卤原子、烷基、芳基、杂环基、羟基、烷氧基、芳氧基、烷硫基、芳硫基、乙烯基或乙炔基,它们也可以具有取代基。作为上述取代基,可举出在取代基组A中记载的取代基。

[0221] 优选Y¹及Y²分别独立地表示卤原子。

[0222] 尤其优选Y¹及Y²为氟原子。

[0223] 式(10A)中,R³表示氢原子、烷基、芳基、杂环基、乙烯基、乙炔基或酰基,它们也可以具有取代基。

[0224] 优选R³为氢原子、烷基、芳基或杂环基,它们也可以具有取代基。

[0225] 更优选R³为氢原子。

[0226] 式(10A)中,Ar³及Ar⁴分别独立地表示芳基或杂环基,它们也可以具有取代基。作为上述取代基,可举出在取代基组A中记载的取代基。

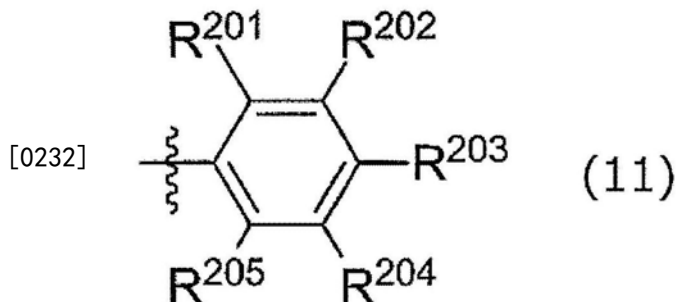
[0227] 式(10A)中,R³⁴~R⁴¹分别独立地表示氢原子、卤原子、烷基、芳基、杂环基、乙烯基、乙炔基、氨基、酰基、烷氧基、芳氧基、烷硫基或芳硫基,它们也可以具有取代基。作为上述取代基,可举出在取代基组A中记载的取代基。

[0228] 在式(10A)中,优选R³⁴~R⁴¹中的至少1个以上为可以具有取代基的芳基。

[0229] 进一步优选R³⁴~R³⁷中的至少1个以上为可以具有取代基的芳基,R³⁸~R⁴¹中的至少1个以上为可以具有取代基的芳基。

[0230] 更优选 $R^{34} \sim R^{41}$ 中的至少1个以上为由式(11)表示的基团。进一步优选 $R^{34} \sim R^{37}$ 中的至少1个以上为由式(11)表示的基团, $R^{38} \sim R^{41}$ 中的至少1个以上为由式(11)表示的基团。

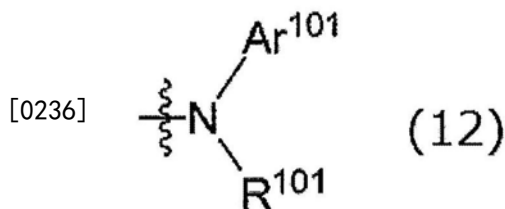
[0231] [化学式28]



[0233] 式(11)中, $R^{201} \sim R^{205}$ 为氢原子、卤原子、烷基、芳基、杂环基、乙烯基、乙炔基、酰基、烷氧基、芳氧基、烷硫基、芳硫基或氨基, R^{201} 及 R^{205} 中的至少一个为除氢原子以外的原子或基团。 R^{201} 和 R^{202} 可以相互连结而形成环, R^{202} 和 R^{203} 可以相互连结而形成环, R^{203} 和 R^{204} 可以相互连结而形成环, R^{204} 和 R^{205} 可以相互连结而形成环。

[0234] 根据其他优选方式, $R^{34} \sim R^{41}$ 中的至少1个以上为由式(12)表示的基团。进一步优选 $R^{34} \sim R^{37}$ 中的至少1个以上为由式(12)表示的基团, $R^{38} \sim R^{41}$ 中的至少1个以上为由式(12)表示的基团。

[0235] [化学式29]



[0237] 式(12)中, R^{101} 表示氢原子、烷基、芳基、杂环基、乙烯基、乙炔基或酰基,它们也可以具有取代基。作为上述取代基,可举出在取代基组A中记载的取代基。 Ar^{101} 表示芳基或杂环基,它们也可以具有取代基。作为上述取代基,可举出在取代基组A中记载的取代基。 Ar^{101} 和 R^{101} 可以相互连结而形成环。

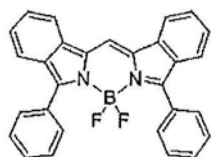
[0238] 由式(10)表示的化合物优选在分子内不具有羧酸基、磷酸基、磺酸基等酸性基。

[0239] <由式(10)或式(10A)表示的化合物的具体例>

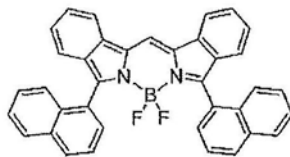
[0240] 以下记载由式(10)或式(10A)表示的化合物的具体例。Me表示甲基,Bu表示正丁基,Ph表示苯基。

[0241] [化学式30]

[0242]



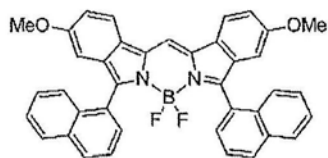
E-1



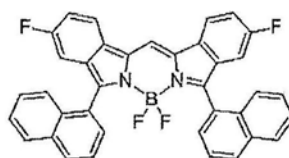
E-2



E-3



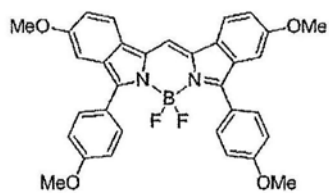
E-4



E-5



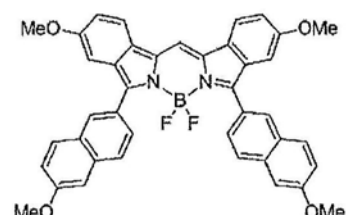
E-6



E-7



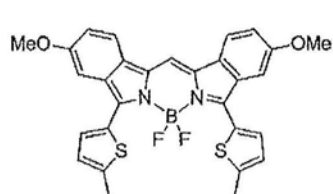
E-8



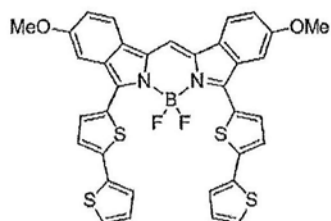
E-9

[0243] [化学式31]

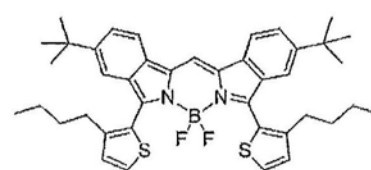
[0244]



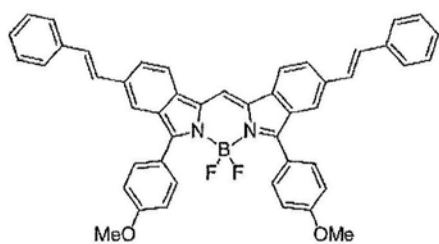
E-10



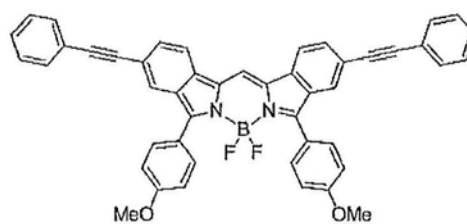
E-11



E-12



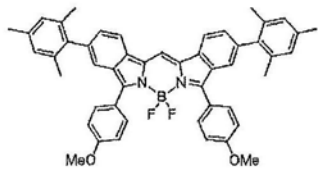
E-13



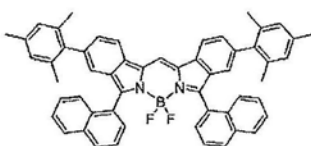
E-14

[0245] [化学式32]

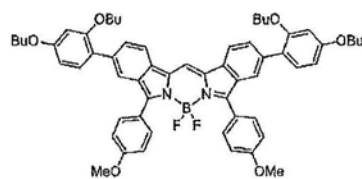
[0246]



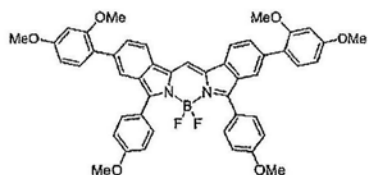
E-15



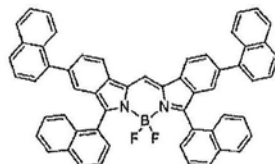
E-16



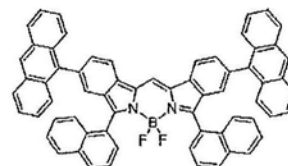
E-17



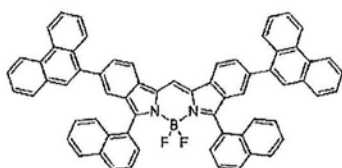
E-18



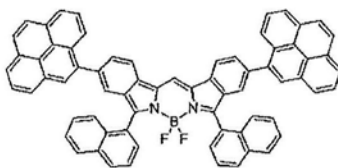
E-19



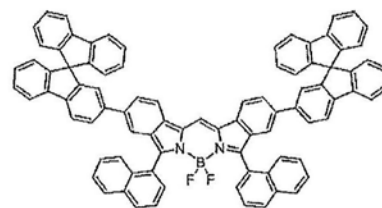
E-20



E-21



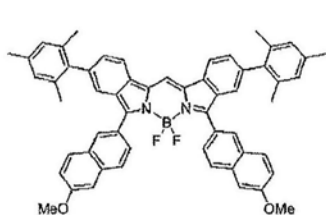
E-22



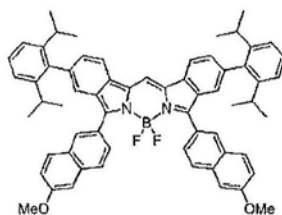
E-23

[0247] [化学式33]

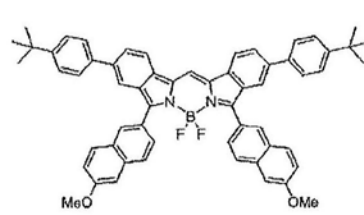
[0248]



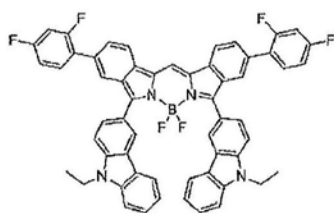
E-24



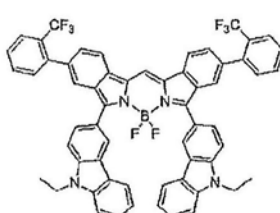
E-25



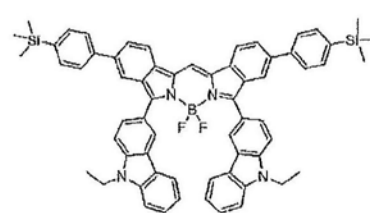
E-26



E-27



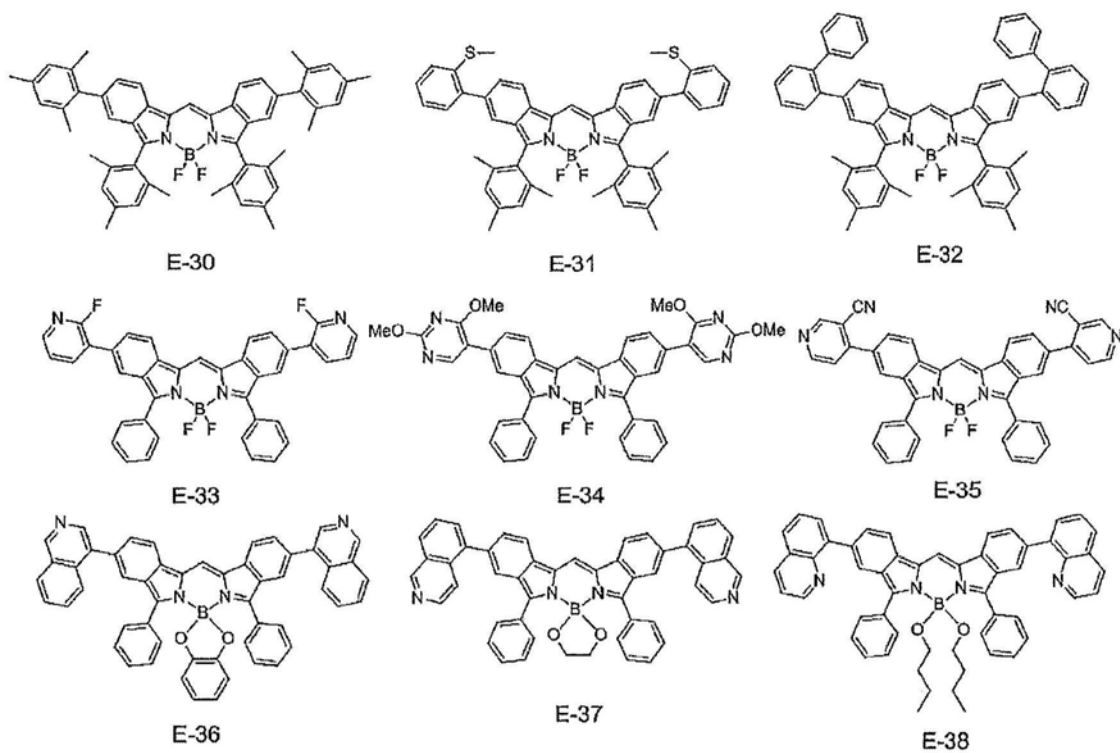
E-28



E-29

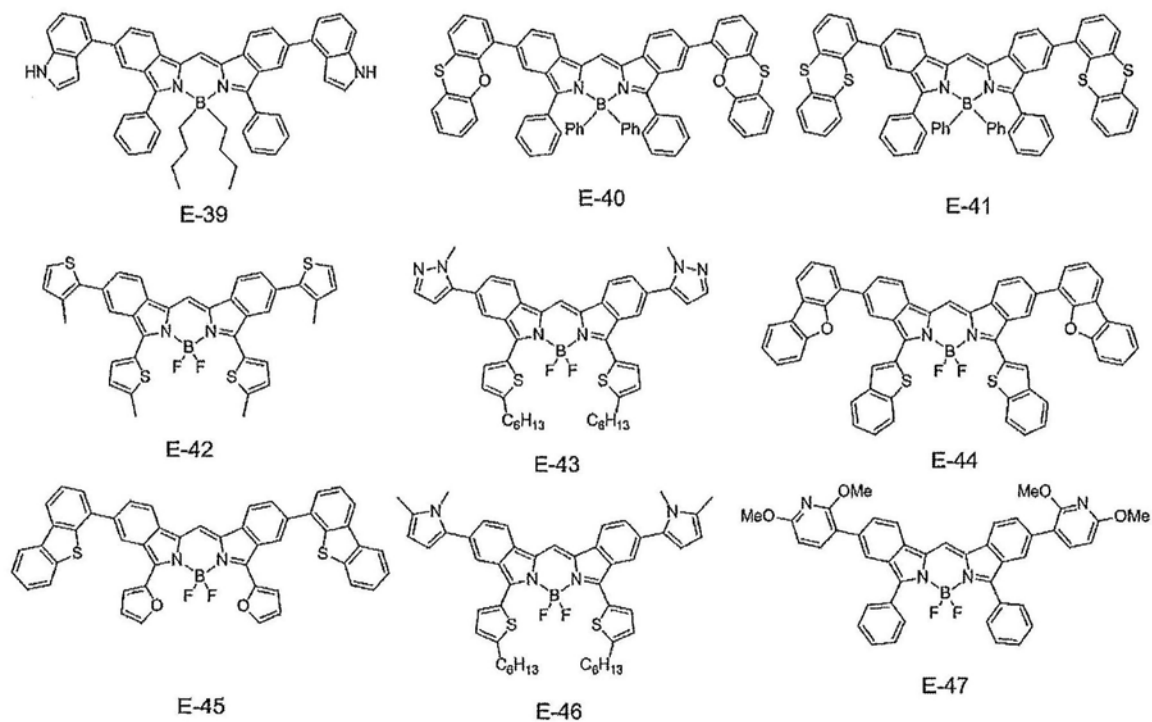
[0249] [化学式34]

[0250]



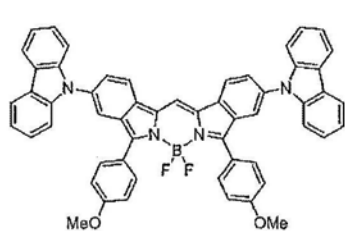
[0251] [化学式35]

[0252]

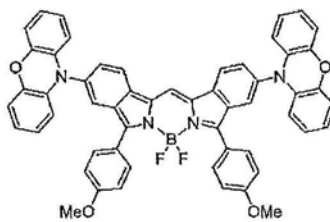


[0253] [化学式36]

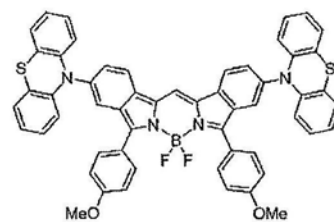
[0254]



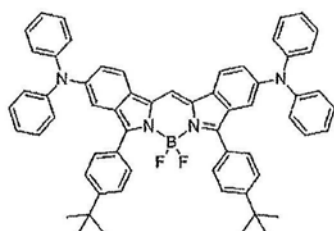
E-48



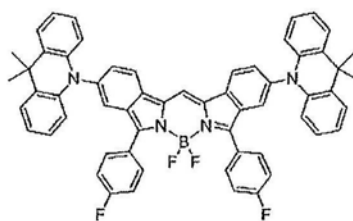
E-49



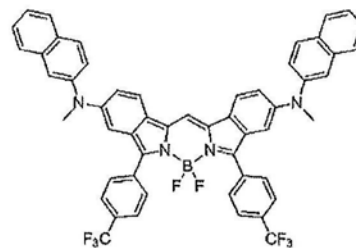
E-50



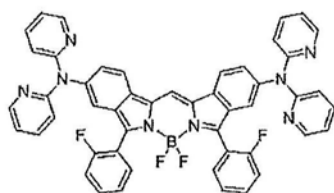
E-51



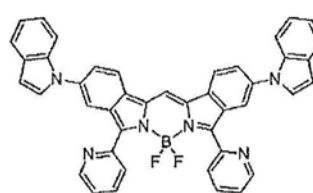
E-52



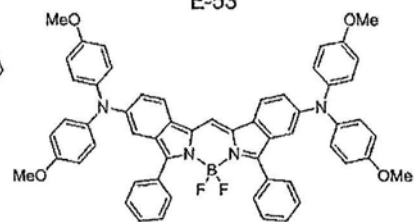
E-53



E-54



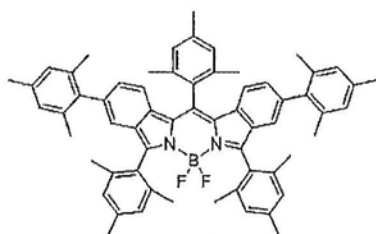
E-55



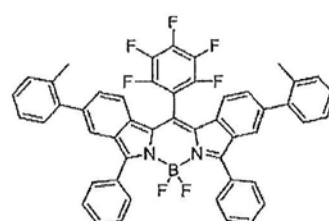
E-56

[0255] [化学式37]

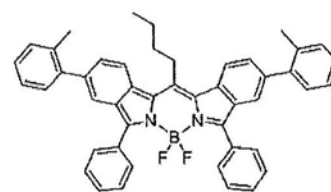
[0256]



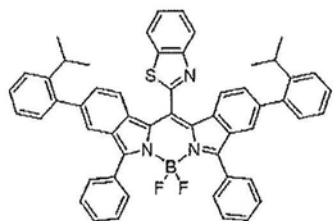
E-57



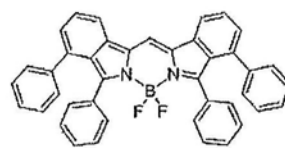
E-58



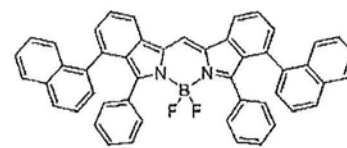
E-59



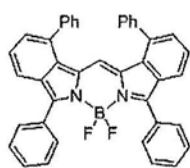
E-60



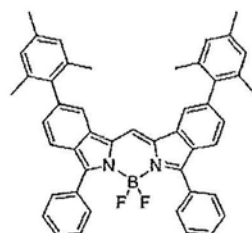
E-61



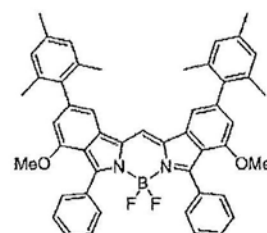
E-62



E-63



E-64



E-65

[0257] <关于能量供体化合物与能量受体化合物的组合的具体例>

[0258] 以下记载能量供体化合物与能量受体化合物的组合的具体例。

[0259] [表1]

[0260]

供体	受体
F-2	F-43
F-2	F-44
F-2	F-46
F-2	F-51
F-2	F-55
F-2	F-69
F-16	F-38
F-16	F-39
F-16	F-41
F-16	F-42
F-16	F-43
F-16	F-45
F-16	F-46
F-16	F-48
F-16	F-49
F-16	F-50
F-16	F-51
F-16	F-52
F-16	F-53
F-16	F-54
F-16	F-55
F-16	F-56
F-16	F-57
F-16	F-58
F-16	F-59
F-16	F-60
F-16	F-61
F-16	F-62
F-16	F-63

供体	受体
F-16	F-64
F-16	F-69
F-16	F-70
F-16	F-71
F-16	F-72
F-24	F-43
F-24	F-44
F-24	F-46
F-24	F-51
F-24	F-55
F-24	F-69
F-27	F-43
F-27	F-44
F-27	F-46
F-27	F-51
F-27	F-55
F-27	F-69
F-29	F-43
F-29	F-44
F-29	F-46
F-29	F-51
F-29	F-55
F-29	F-69
F-33	F-43
F-33	F-44
F-33	F-46
F-33	F-51
F-33	F-55
F-33	F-69

供体	受体
F-37	F-43
F-37	F-44
F-37	F-46
F-37	F-51
F-37	F-55
F-65	F-43
F-65	F-44
F-65	F-46
F-65	F-51
F-65	F-55
F-65	F-69
F-66	F-43
F-66	F-44
F-66	F-46
F-66	F-51
F-66	F-55
F-66	F-69
F-67	F-43
F-67	F-44
F-67	F-46
F-67	F-51
F-67	F-55
F-67	F-69
F-68	F-43
F-68	F-44
F-68	F-46
F-68	F-51
F-68	F-55
F-68	F-69

[0261] [表2]

[0262]

供体	受体	供体	受体	供体	受体
E-4	F-43	E-16	F-64	F-16	E-24
E-4	F-44	E-16	F-69	F-19	E-24
E-4	F-46	E-16	F-70	F-20	E-24
E-4	F-51	E-16	F-71	F-21	E-24
E-4	F-55	E-16	F-72	F-23	E-24
E-4	F-69	E-20	F-43	F-24	E-24
E-16	F-38	E-20	F-44	F-25	E-24
E-16	F-39	E-20	F-46	F-26	E-24
E-16	F-41	E-20	F-51	F-27	E-24
E-16	F-42	E-20	F-55	F-28	E-24
E-16	F-43	E-20	F-69	F-29	E-24
E-16	F-45	E-57	F-43	F-30	E-24
E-16	F-46	E-57	F-44	F-31	E-24
E-16	F-48	E-57	F-46	F-32	E-24
E-16	F-49	E-57	F-51	F-33	E-24
E-16	F-50	E-57	F-55	F-34	E-24
E-16	F-51	E-57	F-69	F-36	E-24
E-16	F-52	F-1	E-24	F-37	E-24
E-16	F-53	F-2	E-24	F-65	E-24
E-16	F-54	F-3	E-24	F-66	E-24
E-16	F-55	F-4	E-24	F-67	E-24
E-16	F-56	F-5	E-24	F-68	E-24
E-16	F-57	F-6	E-24	F-2	E-17
E-16	F-58	F-7	E-24	F-16	E-17
E-16	F-59	F-8	E-24	F-33	E-17
E-16	F-60	F-12	E-24	F-65	E-17
E-16	F-61	F-13	E-24	F-66	E-17
E-16	F-62	F-14	E-24	F-67	E-17
E-16	F-63	F-15	E-24	F-68	E-17

[0263] 关于能量供体化合物和能量受体化合物的选择,吸收为短波长的化合物为能量供体化合物,吸收为长波长的化合物为能量受体化合物,当能量供体化合物的发光与能量受体化合物的吸收稍微重叠时,具有能够在发光性的标记粒子中使用的可能性。优选能量受体化合物的吸收的极大波长位于比能量供体化合物的吸收的波长更长10~100nm程度的波长侧的情况。更优选能量受体化合物的吸收的极大波长位于比能量供体化合物的吸收的波长更长10~70nm的波长侧的情况。

[0264] 能量供体化合物的发光在吸收的何种程度的长波长发出(斯托克斯位移的大小)根据化合物而不同,因此无法一概而论,但由式(1)表示的化合物在吸收极大波长+30nm程度具有发光的极大,且从该程度至+100nm程度为止存在发光光谱,因此可推断通过同时使用在其附近具有吸收的受体化合物,能够实现能量移动系统。

[0265] 另外,关于各化合物的吸收波长,不仅将化合物进行合成来测定,还能够通过基于Gaussian等的计算来进行预测,且根据计算值的关系还能够推断能量供体化合物与能量受

体化合物的组合。

[0266] 在本发明中,斯托克斯位移的大小优选为25nm以上,更优选为30nm以上,进一步优选为35nm以上,更进一步优选为40nm以上,更加进一步优选为45nm以上,尤其优选为50nm以上,最优为60nm以上。斯托克斯位移的大小的上限没有特别的限定,通常为150nm以下。

[0267] <由式(1)~式(6)表示化合物的使用量>

[0268] 关于由式(1)表示的化合物相对于在本发明中使用的粒子(即添加由式(1)表示的化合物之前的粒子)的含量,只要不损坏本发明的效果则没有特别的限定,但优选为0.5 μ mol/g~400 μ mol/g,更优选为1 μ mol/g~300 μ mol/g,进一步优选为2 μ mol/g~200 μ mol/g,尤其优选为3 μ mol/g~100 μ mol/g。

[0269] 关于由式(1)~式(6)表示化合物相对于在本发明中使用的粒子(即添加由式(1)~式(6)表示的化合物之前的粒子)的含量,只要不损坏本发明的效果则没有特别的限定,优选为0.1质量%~30质量%,更优选为0.2质量%~20质量%,进一步优选为0.3质量%~10质量%,尤其优选为0.4质量%~8质量%。

[0270] 在发光性的标记粒子中,使用至少一种由式(1)~式(6)表示的化合物,但也可以使用两种以上由式(1)~式(6)表示的化合物。当使用两种以上由式(1)~式(6)表示的化合物时,优选总量成为上述范围内。

[0271] 当使用能量供体化合物与能量受体化合物的组合时,能量供体化合物与能量受体化合物的摩尔比优选为1:10~20:1,更优选为1:10~10:1,进一步优选为1:5~10:1。

[0272] 作为能量供体化合物而使用由式(1)表示的至少一种化合物,且作为能量受体化合物而使用由式(1)表示的至少一种化合物时,作为能量供体化合物可以使用两种以上的由式(1)表示的化合物,并且作为能量受体化合物也可以使用两种以上的由式(1)表示的化合物。上述情况下,所使用的由式(1)表示的化合物的总计量优选成为上述范围内。

[0273] <由式(1)~式(6)表示的化合物的制造方法>

[0274] 由式(1)~式(6)表示的化合物例如能够通过后述实施例所示的合成方案来制造。

[0275] 作为一例,在以下示出化合物(1)的合成的概要。在3,5-双(三氟甲基)苯甲醛以及二氯甲烷的混合物中,一边进行水冷一边添加3-乙基-2,4-二甲基吡咯和三氟乙酸后,在室温下进行搅拌,并一边进行水冷一边添加氯醌,在室温下进行搅拌后,一边进行水冷一边滴加二异丙基乙胺,并在室温下进行搅拌,接着一边进行水冷一边滴加三氟化硼二乙醚络合物,并在室温下进行搅拌来进行反应,从而能够合成化合物(1-A)。接着,将化合物(1-A)、2,4,6-三甲基苯甲醛115mg、及脱水甲苯进行混合并在室温下进行搅拌。添加哌啶以及1片对甲苯磺酸1水合物并一边蒸除溶剂一边进行搅拌,自然冷却后添加脱水甲苯并一边蒸除溶剂一边进行搅拌来进行反应,从而能够制造化合物(1)。

[0276] 作为另一例,化合物(3)能够根据后述的实施例中的<合成例2>的合成方案,将3,5-双(三氟甲基)苯甲醛和2,4-二甲基吡咯作为起始化合物,并经由化合物(3-A)、化合物(3-B)以及化合物(3-C)来制造。

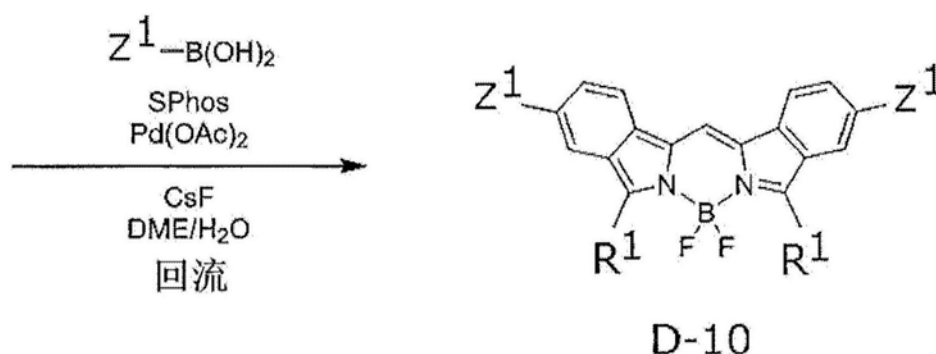
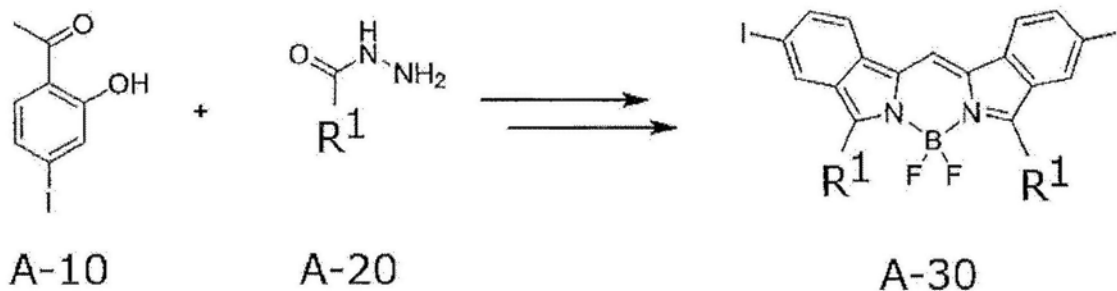
[0277] 化合物(1)以及化合物(3)在由式(1)表示的化合物的定义的范围之内。除了化合物(1)以及化合物(3)以外的由式(1)表示的化合物也能够通过将反应中使用的化合物替换成所希望的具有与由式(1)表示的目标化合物对应的取代基的化合物来制造。

[0278] <由式(10)表示的化合物的制造方法>

[0279] 由式(10)表示的化合物例如能够通过以下所示的合成方案来制造。

[0280] [化学式38]

[0281]



[0282] 上述合成方案中的 R^1 及 Z^1 的定义与式(10)中的 R^1 及 Z^1 的定义的含义相同。

[0283] 通过使化合物A-10与化合物A-20按照Macromolecules 2010,43,193-200中记载的方法进行反应,能够合成化合物A-30。接着,将化合物A-30、由式: $Z^1-B(OH)_2$ 表示的化合物及氟化铯(CsF)添加到二甲氧基乙烷(DME)与水的混合溶液中,并反复进行真空抽气、氮取代来进行脱气。通过添加乙酸钯($Pd(OAc)_2$)、2-二环己基磷基-2'及6'-二甲氧基联苯(SPhos)并进行升温,并且在回流下反应规定的时间(例如2~24小时),能够制造化合物D-10。

[0284] 化合物D-10在由式(10)表示的化合物的定义的范围。除化合物D-10以外的由式(10)表示的化合物也能够通过将化合物A-10、化合物A-20及由式: $Z^1-B(OH)_2$ 表示的化合物中的任一种以上的化合物替换成对应的化合物来制造。

[0285] <粒子>

[0286] 标记粒子包含粒子。粒子的材质以及形态没有特别的限定,例如能够使用聚苯乙烯珠等有机高分子粒子或玻璃珠等无机粒子。作为粒子的材质的具体例,可举出使苯乙烯、甲基丙烯酸、缩水甘油基(甲基)丙烯酸酯、丁二烯、氯乙烯、乙酸乙烯酯丙烯酸酯、甲基丙烯酸甲酯、甲基丙烯酸乙酯、甲基丙烯酸苯酯或甲基丙烯酸丁酯等单体聚合的均聚物、及使2种以上的单体聚合的共聚物等,也可以是使上述均聚物或共聚物均匀地悬浮的胶乳。并且,作为粒子,可举出其他有机高分子粉末、无机物质粉末、微生物、血球、细胞膜片、脂质体、微囊等。作为粒子,优选胶乳粒子。

[0287] 当使用胶乳粒子时,作为胶乳的材质的具体例,可举出聚苯乙烯、苯乙烯-丙烯酸

共聚物、苯乙烯-甲基丙烯酸共聚物、苯乙烯-缩水甘油基(甲基)丙烯酸酯共聚物、苯乙烯-苯乙烯磺酸盐共聚物、甲基丙烯酸聚合物、丙烯酸聚合物、丙烯腈-丁二烯-苯乙烯共聚物、氯乙烯-丙烯酸酯共聚物、聚乙酸乙烯酯丙烯酸酯等。作为胶乳,优选作为单体而至少包含苯乙烯的共聚物,尤其优选苯乙烯与丙烯酸或甲基丙烯酸的共聚物。胶乳的制作方法没有特别的限定,能够通过任意的聚合方法来制作。其中,当对发光性的标记粒子标记抗体来使用时,若存在表面活性剂则抗体固定化变得困难,因此在胶乳的制作中,优选使用无乳化剂乳化聚合即不利用表面活性剂等乳化剂的乳化聚合。

[0288] <发光性的标记粒子>

[0289] 本发明中的发光性的标记粒子通过包含由式(1)表示的化合物,具有680nm以上的长波长范围的发光极大波长,且显示出高量子产率。

[0290] 发光极大波长表示在吸收光谱中吸光度成为最大的波长。

[0291] 发光性的标记粒子的发光极大波长优选为680nm以上,更优选为700nm以上,尤其优选为720nm以上。本发明的发光性的标记粒子的发光极大波长的上限没有特别的限定,优选为900nm以下,更优选为800nm以下。

[0292] 发光性的标记粒子的发光极大波长能够使用市售的荧光分光光度计来进行测定,例如能够使用SHIMADZU CORPORATION制的荧光分光光度计RF-5300PC来进行测定。

[0293] 发光性的标记粒子的量子产率是作为荧光而发光的光子数相对于发光性的标记粒子所吸收的光子数的比例。

[0294] 本发明的发光性的标记粒子所显示的量子产率优选为0.25以上,更优选为0.4以上,进一步优选为0.5以上,更进一步优选为0.6以上,尤其优选为0.7以上。量子产率的上限没有特别的限定,通常为1.0以下。

[0295] 本发明的发光性的标记粒子的量子产率能够使用市售的量子产率测定装置来进行测定,例如能够使用Hamamatsu Photonics K.K.制的绝对PL量子产率测定装置C9920-02来进行测定。

[0296] (发光性的标记粒子的平均粒径(平均粒子直径)的测定方法)

[0297] 发光性的标记粒子的平均粒径根据粒子的材质、对被检测物质进行测定的浓度范围、测定设备等而不同,优选0.001~10 μ m(更优选0.01~1 μ m)的范围,更优选30~500nm的范围,进一步优选50~300nm的范围,尤其优选80~200nm的范围,最优选100~150nm的范围。能够在本发明中使用的发光性的标记粒子的平均粒径能够利用市售的粒度分布仪等进行测量。作为粒度分布的测定方法,已知有光学显微镜法、共聚焦激光显微镜法、电子显微镜法、原子力显微镜、静态光散射法、激光衍射法、动态光散射法、离心沉淀法、电脉冲测量法、色谱法、超声波衰减法等,且出售有与其各自的原理对应的装置。在这些测定方法中,从粒径范围以及测定的简便度来看,优选使用动态光散射法来测定发光性的标记粒子的平均粒径。作为使用动态光散射的市售的测定装置,可举出NANOTRAC UPA(NIKKISOCO.,LTD.)、动态光散射式粒径分布测定装置LB-550(HORIBA,Ltd.)、浓厚系粒径分析仪FPAR-1000(Otsuka Electronics Co.,Ltd.)等。在本发明中,将平均粒径作为在25 $^{\circ}$ C下、以粘度0.8872CP、水的折射率1.330的条件进行测定的中值粒径($d=50$)来求出。

[0298] <发光性的标记粒子的制造方法>

[0299] 发光性的标记粒子的制造方法没有特别的限定,能够通过将由式(1)表示的至少

一种化合物和粒子进行混合来制造。例如,能够通过向胶乳粒子等粒子中添加由式(1)表示的化合物来制作发光性的标记粒子。更具体而言,通过在包含水以及水溶性有机溶剂(四氢呋喃、甲醇等)中的任一种以上的粒子的分散液中添加包含由式(1)表示的化合物的溶液并进行搅拌,能够制作发光性的标记粒子。

[0300] 在本发明中,也可以制备包含上述本发明的发光性的标记粒子的分散液。

[0301] 分散液能够通过将本发明的发光性的标记粒子分散于分散介质中来制造。作为分散介质,可举出水、有机溶剂或水和有机溶剂的混合物等。作为有机溶剂,能够使用甲醇、乙醇、异丙醇等醇、四氢呋喃等酯系溶剂等。

[0302] 分散液中的发光性的标记粒子的固体成分浓度没有特别的限定,通常为0.1~20质量%,优选为0.5~10质量%,更优选为1~5质量%。

[0303] (基于第一结合物质的发光性的标记粒子的改性)

[0304] 使第一结合物质在发光性的标记粒子上固定化的方法例如记载于日本特开2000-206115号公报或Thermo Fisher Scientific的FluoSpheres(注册商标)聚苯乙烯微球粒(microsphere)F8813中附加的步骤(protocol)等,制备免疫凝集反应试剂的公知的方法能够使用任一种。并且,作为结合物质将抗体固定化于粒子的原理也能够采用基于物理吸附及共价键的化学键中的任一种原理。作为使抗体固定于粒子后覆盖抗体未被包覆的粒子表面的封闭剂(即第一封闭剂),例如能够使用白蛋白(BSA等)、脱酯乳、酪朊、来自大豆的成分、来自鱼的成分或聚乙二醇等、及包含上述物质或与上述物质的性质相同的物质的市售的免疫反应用封闭剂等。这些封闭剂也能够根据需要需要通过热或酸/碱等来实施部分改性等前处理。而且,作为第一封闭剂,也能够使用与测定对象物质不具有结合性的抗体(球蛋白)或不使用于试验区的蛋白质(Protein A、Protein G)等。

[0305] 以下例示出将抗体固定化于粒子的具体方法。在粒子分散成固体成分浓度为0.1~10质量%的溶液中,添加调整为0.01~20mg/mL的浓度的抗体溶液并进行混合。在温度4~50°C的条件下继续搅拌5分钟~48小时。接着通过离心分离及其以外的方法来使粒子与溶液分离,充分地去除包含于溶液且未与粒子结合的抗体。之后,重复0~10次将粒子通过缓冲液清洗的操作。期望将粒子和抗体进行混合,实施使粒子与抗体结合的操作后,使用与抗原抗体反应无关的成分,优选蛋白质、更优选球蛋白、白蛋白、Block Ace(注册商标)、脱酯乳及酪朊等封闭剂来保护粒子表面的抗体未结合的部分。

[0306] 将抗原或抗体等固定化于粒子时,能够根据需要添加稳定化剂。稳定化剂只要为蔗糖、多糖类等合成高分子或天然高分子等使抗原或抗体稳定化的稳定化剂则没有特别的限定,也能够使用Immunoassay Stabilizer(Advanced Biotechnologies Inc(领英))等市售的稳定化剂。

[0307] 具有第一结合物质的标记粒子包含于本发明的试剂盒,优选包含于作为试剂盒的一部分的容器例如杯中的方式。此时,通过将活体样品注入到包含标记粒子的容器内并进行混合、搅拌,能够使活体样品中的测定对象物质与第一结合物质结合。

[0308] (基板)

[0309] 在本发明中,为了实现高灵敏度的测定,优选采用进行后述的表面等离子体激元荧光(SPF)检测的测定法。作为此时的基板,优选使用在表面具有金属膜的基板。作为构成金属膜的金属,只要为可产生表面等离子体激元共振的金属则没有特别的限定。优选地可

举出金、银、铜、铝或白金等自由电子金属,尤其优选金。当使用金时,后述的检测区域在金膜上。上述金属能够单独或组合使用。并且,考虑到上述基板上的附着性,也可以在由基板和金属构成的层之间设置由铬等构成的介在层。金属膜的膜厚任意,例如优选为1nm以上且500nm以下,尤其优选为10nm以上且200nm以下。若超过500nm,则无法充分检测媒介物的表面等离子体激元现象。并且,当设置由铬等构成的介在层时,该介在层的厚度优选为0.1nm以上且10nm以下。

[0310] 金属膜的形成只要通过普通的方法进行即可,例如能够通过溅射法、蒸镀法、离子镀法、电镀法或非电解电镀法等来进行,为了设置基板材质与金属膜的混合层来使金属膜的密合性良好,优选通过溅射法来制作金属膜。此时,基板材质与金属膜的混合层的厚度只要能够确认充分的密合性则没有特别的限定,优选为10nm以下。

[0311] 金属膜优选配置于基板上。在此,“配置于基板上”是指除了金属膜在基板上以直接接触的方式配置的情况以外,还包含金属膜不与基板直接接触而是经由其他层配置的情况。作为能够在本发明中使用的基板的材质,例如能够使用作为普通的光学玻璃的一类的BK7(硼硅酸盐玻璃)等光学玻璃、或合成树脂具体而言为聚甲基丙烯酸甲酯、聚对苯二甲酸乙二醇酯、聚碳酸酯、或由环烯烃聚合物等相对于激光为透明的材料构成的材质。期望这种基板优选相对于偏光不显示各向异性且加工性优异的材料。

[0312] 作为用于SPF检测的基板的优选方式,能够举出在聚甲基丙烯酸甲酯(PMMA)上蒸镀金膜的基板等。

[0313] 基板具有检测区域,所述检测区域包含与测定对象物质或第一结合物质中的一个具有结合性的第二结合物质。

[0314] (第二结合物质)

[0315] 第二结合物质为与测定对象物质具有结合性的物质或与第一结合物质具有结合性的物质。当以夹心分析法(sandwich assay)进行定量时,作为第二结合物质,能够使用与测定对象物质具有结合性的物质。当以竞争法进行定量时,作为第二结合物质,能够使用与第一结合物质具有结合性的物质。在本发明中,优选以竞争法进行定量,且优选作为第二结合物质使用与第一结合物质具有结合性的物质。

[0316] 作为第二结合物质没有特别的限定,作为优选例可举出抗原、抗体或它们的复合体,优选为抗原,尤其优选作为第二结合物质而使用测定对象物质(此为与第一结合物质具有结合性的物质)。

[0317] 作为第二结合物质,当使用测定对象物质时,第二结合物质优选为测定对象物质与载体的结合体。载体表示能够与测定对象物质的多个分子结合的物质。作为优选的载体的一例,可举出蛋白质等,其中,具体而言能够举出牛血清白蛋白等。

[0318] 当测定对象物质为胆汁酸时,尤其优选第二结合物质包含胆酸和/或胆酸白蛋白结合体、脱氧胆酸和/或脱氧胆酸·白蛋白结合体、及鹅去氧胆酸和/或鹅去氧胆酸·白蛋白结合体。并且,当测定对象物质为孕酮时,优选第二结合物质为孕酮·白蛋白结合体。

[0319] (将第二结合物质在基板上固定化的方法)

[0320] 将第二结合物质在基板上固定化的方法例如记载于Nunc公司提供的Tech Notes Vol.2-12等,能够使用制备普通的ELISA(Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay:酵素结合免疫吸附法)试剂的公知的方法中的任一种。并且,也可以实施基于在基板上配置自组织化

单分子膜(SAM:Self-Assembled Monolayer)等的表面改性,作为将第二结合物质在基板上固定化的方法,也能够采用使用了物理吸附的方法、及使用了基于共价键的化学键的方法中的任一种方法。将第二结合物质固定于基板后,作为覆盖第二结合物质未被包覆的基板表面的封闭剂(第二封闭剂),能够使用公知的物质,例如BSA、球蛋白、脱酯乳、酪朊、来自大豆的成分、来自鱼的成分或聚乙二醇等、及包含上述物质或与上述物质相同性质的物质的市售的免疫反应用封闭剂等。这些封闭剂也能够根据需要需要通过热或酸/碱等实施部分改性等前处理。

[0321] (检测区域<试验区>)

[0322] 在本发明中,能够在基板上设置对活体样品中的测定对象物质的有无进行检测的试验区。在该试验区中,例如能够通过捕捉作为测定对象物质的抗原,检测与抗原结合的标记的量并进行定量,由此对抗原进行定量。或者,能够以仅无法结合与抗原结合的标记的方式,仅捕获未与抗原结合的标记,并计算抗原的结合的标记的量,从而对抗原进行定量。该检测方法被称作竞争法,在此对与竞争法相关的基板进行说明。

[0323] 在基板的试验区,优选具有与存在于标记粒子上的结合物质(例如抗体)进行反应的位置。作为本发明的优选的一方式,优选在基板的试验区上具有在活体样品中存在的抗原的方式。此时,通过使抗原与BSA在缩合剂的存在下进行反应来制作抗原·BSA结合体,并使该结合体吸附于试验区上,由此能够制作试验区。作为测定对象物质的抗原-BSA结合体能够通过溶解于缓冲液并点加在基板上,放置一定时间后,吸引上清液并使其干燥等方法来与基板上的试验区结合。

[0324] (参照区域<控制区域>)

[0325] 在本发明中,为了尽量抑制测定环境尤其是测定温度的影响,通过在基板上具有控制区域,并将试验区的信息以控制区域的信息进行标准化,由此能够将环境依赖性抑制为极低。作为控制区域,优选不依赖于在所使用的活体样品中存在的测定对象物质的量,而是设计成能够与所有的标记结合。优选具有与存在于标记粒子上的所有抗体进行相互作用的抗体。通过如此进行设计,将试验区的信息以控制区域的信息进行标准化,由此即使在例如低温环境下活体样品流动或反应速度受到影响时,也能够通过标准化来消除其影响,并始终精确度良好地获得不受测定环境影响的结果。

[0326] 作为优选存在于控制区域的抗体,优选具有识别在标记粒子上存在的结合物质(例如抗体)的功能,若该抗体来自于小鼠,则优选为抗小鼠抗体,若标记粒子上的抗体来自于山羊,则优选为抗山羊抗体。这些控制区域上的抗体能够通过溶解于缓冲液并点加于基板上,放置一定时间后,吸引上清液并使其干燥等方法来与基板结合。

[0327] (封闭剂)

[0328] 例如,在竞争法中,存在不仅对于不包含测定对象物质的阴性的活体样品,还对于包含测定对象物质而为阳性的活体样品进行反应而成为阴性的活体样品,高值背离的问题的解决被认为是课题。显示这种假阴性的原因尚不明确,但认为原因之一有可能是通过未被抗体覆盖的标记粒子表面与检测区域(试验区)的非特异性相互作用而存在原本不欲结合的标记粒子。并且,即使与在试验区上存在的物质相同的物质存在于标记粒子表面上时,在游离的抗体等存在于活体样品中的情况下,该抗体会与试验区上存在的物质和标记粒子表面上的物质中的任一个结合而导致有时即使在测定成为包含测定对象物质的阳性的活

体样品的情况下也被检测为阴性。

[0329] 通常,为了抑制固相表面(例如标记粒子表面、基板的金膜表面)上非特异吸附,使用通过BSA的封闭。

[0330] 作为除了与测定对象物质具有结合性的免疫球蛋白以外的免疫球蛋白,具体而言能够使用由通过与测定对象物质不同的抗原免疫的动物的血清制备的抗血清、由抗血清提纯而成的免疫球蛋白部分、由使用通过其测定对象物质免疫的动物的脾脏细胞的细胞融合而获得的单克隆抗体、或这些的断片[例如F(ab')₂、Fab、Fab'、或Fv]等。这些抗体的制备能够以通常的方法来进行。而且,如当该抗体为嵌合抗体等时,可为进行了改性的抗体,并且也能够使用市售的抗体或通过公知的方法由动物血清或培养上清液制备的抗体。

[0331] (抗体)

[0332] 在本发明中,抗体能够不限于其动物种类或子类等而进行使用。例如,能够在本发明中使用的抗体为来自于小鼠、白鼠、仓鼠、山羊、兔子、羊、牛、鸡等能够引起免疫反应的生物的抗体,具体而言为小鼠IgG、小鼠IgM、白鼠IgG、白鼠IgM、仓鼠IgG、仓鼠IgM、兔子IgG、兔子IgM、山羊IgG、山羊IgM、羊IgG、羊IgM、牛IgG、牛IgM、鸡IgY等,能够使用多克隆或单克隆中的任一种。断片化抗体为具有至少1个抗原结合部位,且由完全型抗体导出的分子,具体而言为Fab、F(ab')₂等。这些断片化抗体为通过酵素或化学处理、或使用遗传工程学方法获得的分子。

[0333] (试剂盒的其他要素)

[0334] 本发明的试剂盒使用于对测定对象物质进行测定的方法,当测定对象物质为胆汁酸时,为胆汁酸测定诊断用试剂盒,当测定对象物质为孕酮时,为孕酮测定诊断用的试剂盒。在本发明中,在实施测定对象物质的测定时,为包含包括固定有第二结合物质的基板及保持荧光粒子等标记粒子的部件的传感器芯片的试剂盒,但也可以包含表面等离子体激元激发装置及荧光测定器件等使用于测定对象物质的测定的各种器材或装置。而且,作为试剂盒的要件,也可以包括包含已知量的测定对象物质的样品、操作说明书等。

[0335] [测定活体样品中的测定对象物质的方法]

[0336] 测定基于本发明的活体样品中的测定对象物质的方法包含以下工序:

[0337] 反应工序,使活体样品和包含与测定对象物质具有结合性的第一结合物质的标记粒子进行反应;

[0338] 捕捉工序,使在上述反应工序中获得的反应产物与包含与上述测定对象物质或上述第一结合物质中的任一个具有结合性的第二结合物质的基板接触,从而在基板上捕捉标记粒子;以及

[0339] 标记信息获取工序,获取与上述测定对象物质相关的标记信息,

[0340] 在所述方法中,上述标记粒子为含有由式(1)表示的至少一种化合物和粒子的发光性的标记粒子。

[0341] 在本发明中,通过获取与测定对象物质的量相关的标记信息的测定对象物质相关标记信息获取工序,测定测定对象物质。

[0342] 本发明中的测定只要为测定对象物质的量的测定,则可以解释为最广泛的概念。作为测定方法的具体的实施方式,可举出竞争法及夹心分析法,优选竞争法。

[0343] 作为竞争法的一例,以下对于对孕酮进行定量的情况进行说明。在对除孕酮以外

的物质进行定量时也能够同样地实施。

[0344] 在竞争法中,首先,在孕酮·白蛋白结合体被固定化的孕酮免疫测定用基板上,使包含孕酮的活体样品及抗孕酮抗体标记荧光粒子接触。当在该活体样品中不存在孕酮时,通过抗孕酮抗体标记荧光粒子和基板上的孕酮(即,孕酮·白蛋白结合体中的孕酮)在基板上引起抗原抗体反应。另一方面,当在活体样品中存在孕酮时,在活体样品中的孕酮与抗孕酮抗体标记荧光粒子之间引起抗原抗体反应,阻碍抗孕酮抗体标记荧光粒子与基板上的孕酮(即,孕酮·白蛋白结合体中的孕酮)之间的抗原抗体反应。上述反应结束后,去除未与基板上的白蛋白结合的抗孕酮抗体标记荧光粒子。接着,将基板上的免疫复合体(即,抗孕酮抗体标记荧光粒子与基板上的孕酮·白蛋白结合体中的孕酮的复合体)的形成程度作为荧光强度来进行检测,由此能够测定活体样品中的孕酮的浓度等。

[0345] 竞争法中的荧光的测定方式能够采用酶标仪测定或流量测定中的任一种测定,例如能够通过以下方法来进行测定。预先准备多个孕酮浓度不同的孕酮量已知的样品,并将该样品及抗孕酮抗体标记荧光粒子预先进行混合。使该混合液与孕酮·白蛋白结合体固定化的区域接触。将来自于孕酮·白蛋白结合体固定化的区域的荧光信号在混合液以特定的时间间隔与结合体接触期间作为多个荧光信号来进行测定。由该多个荧光信号求出在各孕酮浓度中荧光量的时间变化(斜率)。将该时间变化设为Y轴且将孕酮浓度设为X轴来制图,使用最小二乘法等正合适的拟合方法,获取相对于荧光量的时间变化的孕酮浓度的关系式。根据如此获取的关系式,利用使用了作为检查目的的活体样品的荧光量的时间变化的结果,能够对活体样品中所含的孕酮量进行定量。

[0346] 该孕酮量的定量优选在短时间内进行。具体而言,优选在10分钟以内进行,更优选8分钟以内,进一步优选在6分钟以内进行。该定量时间优选包含以下时间,即利用通过最小二乘法等正合适的拟合方法来预先获取的荧光量的时间变化与孕酮浓度之间的关系式,在使样品及抗孕酮抗体标记荧光粒子与固定化有孕酮·白蛋白结合体的检测区域接触后,以使用了作为检查目的的活体样品的荧光量的时间变化的结果为基础,将活体样品中所含的孕酮量进行换算的时间。

[0347] 夹心分析法中没有特别的限定,例如能够按照以下步骤对测定对象物质进行测定。使有可能包含测定对象物质的活体样品和包含与测定对象物质具有结合性的第一结合物质的荧光粒子在基板上接触。当在活体样品中存在测定对象物质时,在测定对象物质、荧光粒子与基板之间会产生结合反应(抗原抗体反应等)。其结果,当在活体样品中存在测定对象物质时,形成由与基板结合的第二结合物质、测定对象物质、及具有第一结合物质的荧光粒子构成的免疫复合体。夹心分析法中,第二结合物质、测定对象物质、及具有第一结合物质的荧光粒子的反应结束后,去除未形成上述免疫复合体的具有第一结合物质的荧光粒子并进行清洗。接着通过将免疫复合体的形成程度作为荧光强度进行检测,能够对测定对象物质的浓度等进行测定。另外,荧光强度与测定对象物质的浓度具有正的相关关系。

[0348] (流路)

[0349] 在本发明的优选方式中,能够在基板上适用将有可能包含测定对象物质的活体样品及具有第一结合物质的标记粒子进行混合的混合液,并在流路上散开。流路只要为使活体样品和具有第一结合物质的标记粒子流到检测区域的通路则没有特别的限定。作为优选的流路形态,存在将包含具有第一结合物质的标记粒子的活体样品液进行点加的点加口、

作为检测区域的金属膜、及超出金属膜的流路,且具有活体样品能够通过金属膜上的结构。优选相对于金属膜在与点加口相反的一侧能够设置吸引口。

[0350] (表面等离子体激元荧光测定)

[0351] 作为本发明中的荧光等标记的检测方法没有特别的限定,例如优选使用能够检测荧光强度的设备来检测荧光强度,上述设备具体而言为酶标仪、或用于进行基于表面等离子体激元激发的荧光检测(SPF)的生物传感器等。优选能够通过基于表面等离子体激元共振的荧光检测来获取与测定对象物质的量相关的标记信息。

[0352] 另外,荧光测定方式可为酶标仪测定,电可为流量测定。基于表面等离子体激元激发的荧光检测法(SPF法)能够以比基于落射激发的荧光检测法(落射荧光法)更高的灵敏度进行测定。

[0353] 作为表面等离子体激元荧光(SPF)生物传感器,例如能够使用如在日本特开2008-249361号公报中记载的具备以下部件的传感器:光波导,由使规定波长的激发光透过的材料形成;金属膜,形成于该光波导的一个表面;光源,产生光束;光学系统,使上述光束通过光波导,并相对于上述光波导和金属膜的界面以产生表面等离子体激元的入射角入射;以及荧光检测机构,检测通过衰减波而被激发而产生的荧光,上述衰减波为通过上述表面等离子体激元被增强的衰减波。

[0354] 使用了本发明的荧光粒子的基于表面等离子体激元激发的荧光检测(SPF)系统优选为对来自于依赖于在基板上的金属膜上固定化的测定对象物质的量的荧光物质的荧光进行检测的化验方法,例如为通过溶液中的反应的进行,将光学性的透明度的变化作为浊度进行检测的方法,与所谓的胶乳凝集法不同。胶乳凝集法为如下方法,即胶乳试剂中的抗体敏化胶乳与活体样品中的抗原通过抗体反应而结合并凝集,该凝集块随着时间而增大,根据向该凝集块照射近红外光而获得的每单位时间的吸光度变化来对抗原浓度进行量化。在本发明中,与胶乳凝集法相比,能够提供非常简单的测定对象物质的检测方法。

[0355] (标准化)

[0356] 另外,本发明的方法也可为包含以下工序的方法:标记粒子相关标记信息获取工序,获取与标记粒子的量相关的标记信息;以及标准化工序,将在获取与测定对象物质的量相关的标记信息的测定对象物质相关标记信息获取工序中获取的标记信息通过在标记粒子相关标记信息获取工序中获取的标记信息进行标准化。

[0357] 在此,在使包含活体样品、及含有与测定对象物质具有结合性的第一结合物质的标记粒子的混合液与具有检测区域(试验区)和参照区域(控制区域)的基板接触,并在检测区域和参照区域上产生表面等离子体激元并且测定射出的荧光的强度的工序中,对基于在检测区域上产生的表面等离子体激元的荧光的强度进行测定的工序为获取与测定对象物质的量相关的标记信息的测定对象物质相关标记信息获取工序,对基于在参照区域上产生的表面等离子体体激元的荧光的强度进行测定的工序为标记粒子相关标记信息获取工序。将在这2个工序中获取的荧光强度的单位时间内的增加速度作为荧光讯号值的变化率来求出,并将检测区域的讯号值的变化率除以参照区域的讯号值的变化率的工序为标准化工序。

[0358] 以下,举出本发明的实施例对本发明进行进一步具体的说明。另外,以下实施例所示的材料、使用量、比例、处理内容、处理顺序等只要不脱离本发明的主旨则能够适当进行

变更。因此,本发明的范围并不限定性解释为以下所示的具体例。

[0359] 实施例

[0360] <1-1>化合物的合成

[0361] 术语表示以下含义。

[0362] MS:质量分析(mass spectrometry)

[0363] ESI:电喷射离子化(electrospray ionization)

[0364] NMR:核磁共振(nuclear magnetic resonance)

[0365] Me:甲基

[0366] Et:乙基

[0367] Bu:正丁基

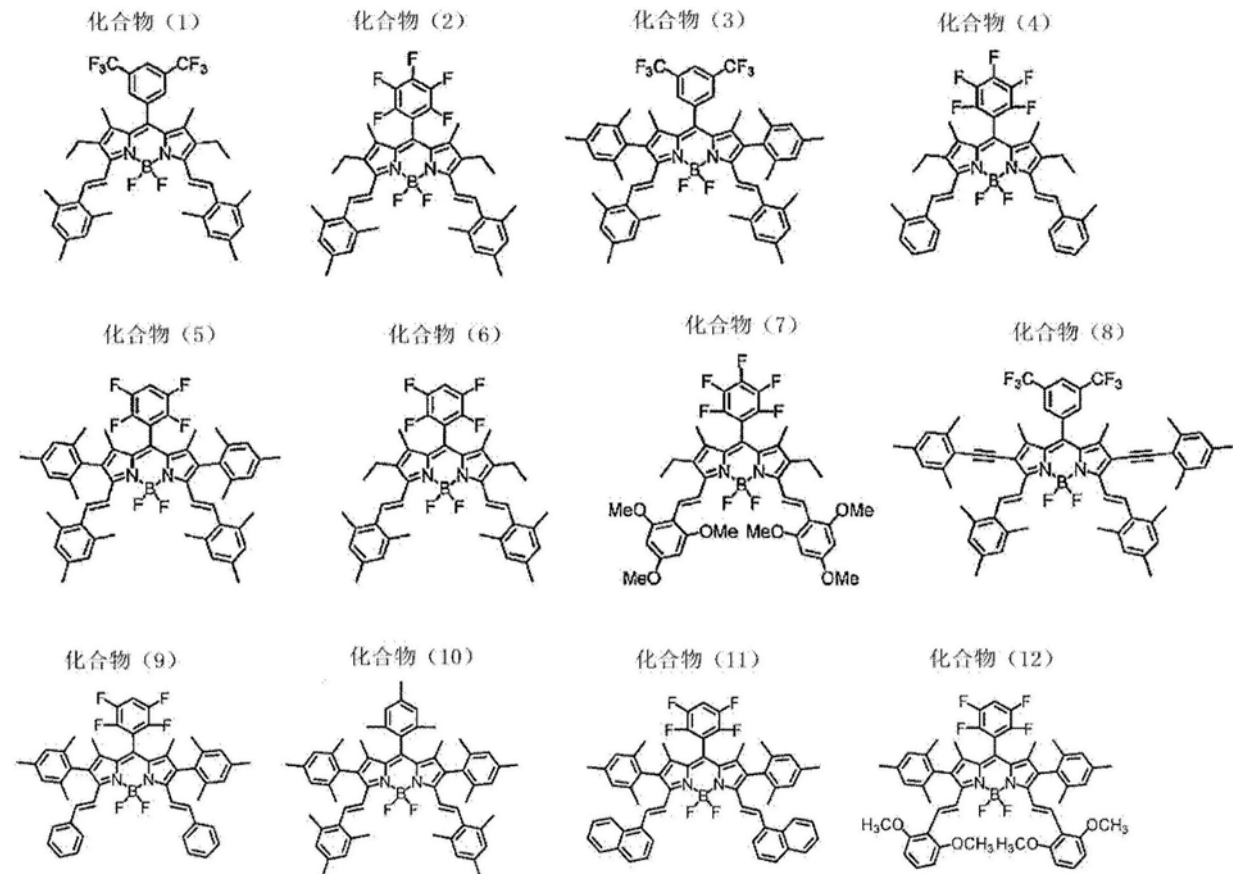
[0368] PL:光致发光

[0369] THF:四氢呋喃

[0370] 以下示出化合物(1)~化合物(12)的结构。

[0371] [化学式39]

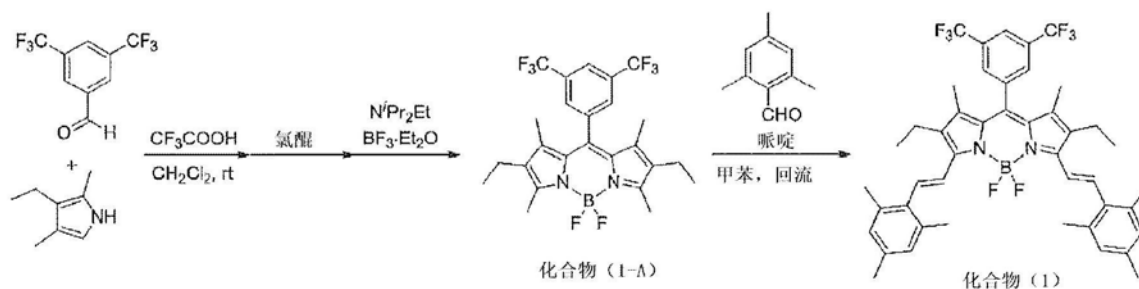
[0372]



[0373] <合成例(1)的合成>

[0374] [化学式40]

[0375]



[0376] 化合物(1-A)的合成

[0377] 在氮气气氛下,向100mL的三口烧瓶中导入3,5-双(三氟甲基)苯甲醛1.00g以及二氯甲烷20mL,并在室温下进行了搅拌。一边进行水冷一边滴加3-乙基-2,4-二甲基吡咯0.98g,接着,添加2滴三氟乙酸后,在室温下搅拌了30分钟。一边进行水冷一边添加氯醌1.0g,在室温下搅拌10分钟后,一边进行水冷一边滴加二异丙基乙胺(N^iPr_2Et)3.67g,并在室温下搅拌了15分钟。接着,一边进行水冷一边滴加三氟化硼二乙醚络合物5.6mL,并在室温下搅拌了30分钟。将滴加饱和碳酸氢钠以及甲苯并提取/分液而获得的有机层使用无水硫酸钠进行预备干燥后,进行了减压浓缩。将该粗产物利用硅胶柱色谱法(展开溶剂:己烷/乙酸乙酯)进行提纯后,使用甲醇进行再结晶,由此获得了1.28g的化合物(1-A)。

[0378] 1H NMR($CDCl_3$,400MHz): δ 8.03(s,1H),7.83(s,2H),2.54(s,6H),2.31(q, $J=7.6$ Hz,4H),1.21(s,6H),1.00(t, $J=7.6$ Hz,6H)。

[0379] 化合物(1)的合成

[0380] 向100mL的三口烧瓶中导入化合物(1-A)100mg、2,4,6-三甲基苯甲醛115mg以及脱水甲苯5mL,在室温下进行了搅拌。添加吡啶1mL以及1片对甲苯磺酸1水合物(Wako Pure Chemical Industries,Ltd.制,特级试剂),在140℃下一边蒸除溶剂一边搅拌1小时,自然冷却后添加脱水甲苯5mL,并在140℃下一边蒸除溶剂一边搅拌了1小时。将对反应液进行减压浓缩而获得的粗产物使用分取TLC(展开溶剂:己烷/乙酸乙酯)进行提纯后,使用甲醇进行再结晶,由此获得了71mg的化合物(1)。化合物的鉴定通过 1H -NMR和ESI-MS进行。

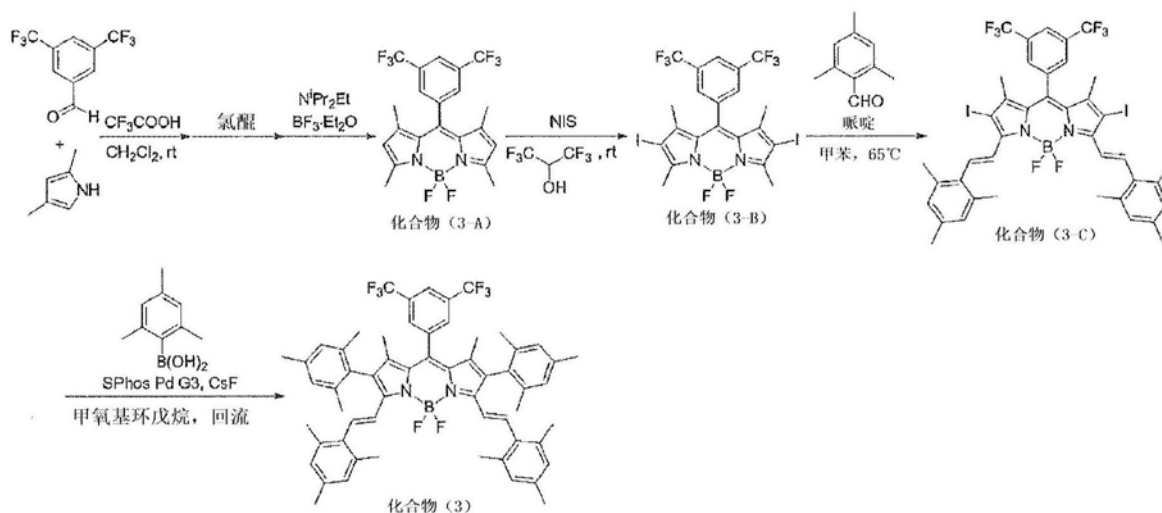
[0381] 1H NMR($CDCl_3$,400MHz): δ 8.06(s,1H),7.87(s,2H),7.38(d, $J=17.2$ Hz,2H),7.32(d, $J=17.2$ Hz,2H),6.93(s,4H),2.63(q, $J=7.6$ Hz,4H),2.44(s,12H),2.30(s,6H),1.27(s,6H),1.17(t, $J=7.6$ Hz,6H)。

[0382] ESI-MS: $[M-H] = 775.8$

[0383] <化合物(3)的合成>

[0384] [化学式41]

[0385]



[0386] 化合物(3-A)的合成

[0387] 在氮气气氛下,向1L的三口烧瓶中导入3,5-双(三氟甲基)苯甲醛16.22g以及二氯甲烷200mL,并在室温下进行了搅拌。一边进行水冷一边滴加2,4-二甲基吡咯15.75g,接着,添加5滴三氟乙酸后,在室温下搅拌了30分钟。一边进行水冷一边添加氯醌(Chloranil)19.45g,在室温下搅拌了30分钟后,一边进行水冷一边滴加二异丙基乙胺(N^iPr_2Et)80mL,并在室温下搅拌了30分钟。接着,一边进行水冷一边滴加三氟化硼二乙醚络合物($BF_3 \cdot Et_2O$)85mL,并在室温下搅拌了30分钟。将滴加饱和碳酸氢钠400mL并提取/分液而获得的有机层使用无水硫酸钠进行预备干燥后,进行了减压浓缩。将该粗产物利用硅胶柱色谱法(展开溶剂:己烷/乙酸乙酯)进行提纯后,使用乙醇进行再结晶,由此获得了4.40g的化合物(3-A)。

[0388] 化合物(3-B)的合成

[0389] 向300mL的三口烧瓶中导入化合物(3-A)3.05g以及1,1,1,3,3,3-六氟-2-丙醇60mL,在室温下进行了搅拌。导入N-碘琥珀酰亚胺3.60g,在室温下搅拌了1小时30分钟。将对反应液进行减压浓缩后添加硫代硫酸盐水溶液50mL(溶解有10g硫代硫酸盐)以及氯化甲烷100mL并提取/分液而获得的有机层使用无水硫酸钠进行预备干燥后,进行了减压浓缩。将该粗产物使用乙醇进行再结晶,由此获得了3.90g的化合物(3-B)。

[0390] 化合物(3-C)的合成

[0391] 向100mL的三口烧瓶中导入化合物(3-B)2.2g、2,4,6-三甲基苯甲醛2.6g以及脱水甲苯40mL,在室温下进行了搅拌。导入咪唑4mL并在65°C下搅拌了1小时。将对反应液进行减压浓缩而获得的粗产物利用硅胶柱色谱法(展开溶剂:己烷/乙酸乙酯)进行提纯后,使用乙醇进行再结晶,由此获得了2.4g的化合物(3-C)。

[0392] 化合物(3)的合成

[0393] 向100mL的三口烧瓶中导入化合物(3-C)96mg、2,4,6-三甲基苯基硼酸64mg、氟经铯130mg以及甲氧基环戊烷10mL,一边在室温下进行搅拌一边进行减压脱气后,设为了氮气气氛。在此,添加SPhos Pd G3(Aldrich制)63mg,进行了1小时加热回流。将添加饱和氯化胺水溶液10mL以及乙酸乙酯10mL并提取/分液而获得的有机层使用无水硫酸钠进行预备干燥后,进行了减压浓缩。将该粗产物使用分取TLC(展开溶剂:己烷/乙酸乙酯)进行提纯后,使用乙醇进行再结晶,由此获得了16mg的化合物(3)。化合物的鉴定通过 1H -NMR和ESI-MS来进

行。

[0394] ^1H NMR (CDCl_3 , 400MHz) : δ 8.02 (s, 1H) , 8.00 (s, 2H) , 7.42 (d, $J=22.4\text{Hz}$, 2H) , 6.92 (s, 4H) , 6.80 (s, 4H) , 6.67 (d, $J=22.4\text{Hz}$, 2H) , 2.27 (s, 6H) , 2.17 (s, 6H) , 2.16 (s, 6H) , 2.11 (s, 12H) , 2.01 (s, 12H) .

[0395] ESI-MS: $[\text{M}-\text{H}] = 955.8$

[0396] <化合物(2)的合成>

[0397] 在化合物(3)的合成中,将3,5-双(三氟甲基)苯甲醛替换成2,3,4,5,6-五氟苯甲醛,进一步将2,4-二甲基吡咯替换成2,4-二甲基-3-乙基吡咯,除此以外以同样的方式进行合成,并将粗产物利用硅胶柱色谱法(展开溶剂:己烷/乙酸乙酯)进行提纯后,使用二氯甲烷/甲醇进行再结晶,由此获得了8mg的化合物(2)。化合物的鉴定通过 ^1H -NMR测定来进行,且确认到是与Org.Biomol.Chem., 2010, 8, 4546-4553相同的NMR光谱。

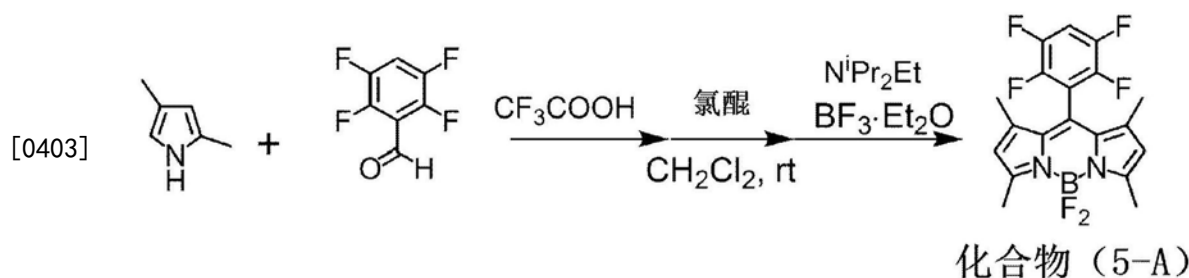
[0398] <化合物(4)的合成>

[0399] 在化合物(2)的合成中,将2,4,6-三甲基苯甲醛替换成邻甲基苯甲醛,除此以外以同样的方式进行合成来合成了化合物(4)。化合物的鉴定通过 ^1H -NMR和ESI-MS进行。400MHz ^1H -NMR光谱示于图1。

[0400] ESI-MS: $[\text{M}-\text{H}] = 673.3$

[0401] <化合物(5)的合成>

[0402] [化学式42]

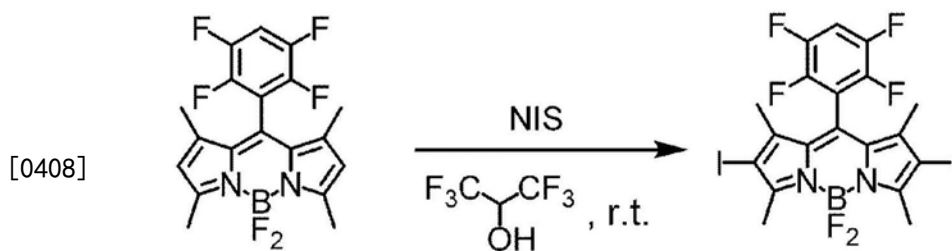


[0404] 化合物(5-A)的合成

[0405] 在氮气气氛下,向500mL的三口烧瓶中导入2,4-二甲基吡咯1.16ml以及二氯甲烷140mL,并在室温下进行了搅拌。添加2,3,5,6-四氟苯甲醛1.0g以及1滴三氟乙酸后,在室温下搅拌了15分钟。添加氯醌(Chloranil) 1.38g,并在室温下搅拌了15分钟后,一边进行水冷一边滴加二异丙基乙胺($\text{N}^i\text{Pr}_2\text{Et}$) 6.8mL,并在室温下搅拌了20分钟。接着,一边进行水冷一边滴加三氟化硼二乙醚络合物($\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$) 7.8mL,并在室温下搅拌了30分钟。将滴加饱和碳酸氢钠400mL并以二氯甲烷进行提取/分液而获得的有机层使用无水硫酸钠进行预备干燥后,进行了减压浓缩。将该粗产物利用硅胶柱色谱法(展开溶剂:己烷/乙酸乙酯)进行提纯后,使用甲醇进行再结晶,由此获得了360mg的化合物(5-A)。

[0406] 化合物(5-B)的合成

[0407] [化学式43]



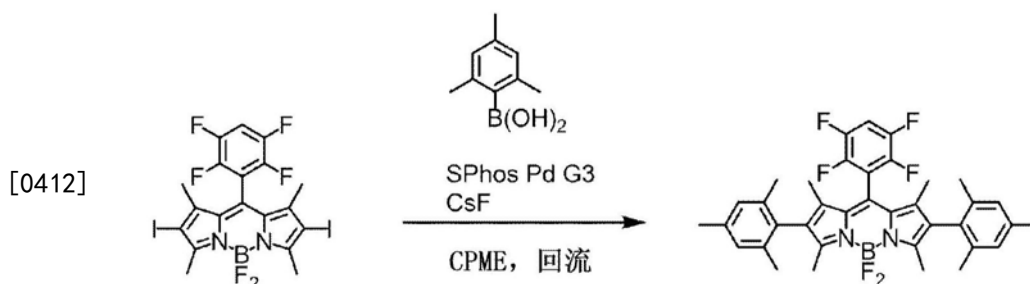
化合物 (5-A)

化合物 (5-B)

[0409] 向300mL的三口烧瓶中导入化合物(5-A) 300mg以及1,1,1,3,3,3-六氟-2-丙醇8mL,并在室温下进行了搅拌。导入N-碘琥珀酰亚胺409mg并在室温下搅拌了1小时30分钟。将对反应液进行减压浓缩后添加氯化甲烷40mL并提取/分液而获得的有机层使用无水硫酸钠进行预备干燥后,实施过滤并进行了减压浓缩。在该粗产物中添加乙醇并实施分散清洗以及过滤,由此获得了382mg的化合物(5-B)。

[0410] 化合物(5-C)的合成

[0411] [化学式44]



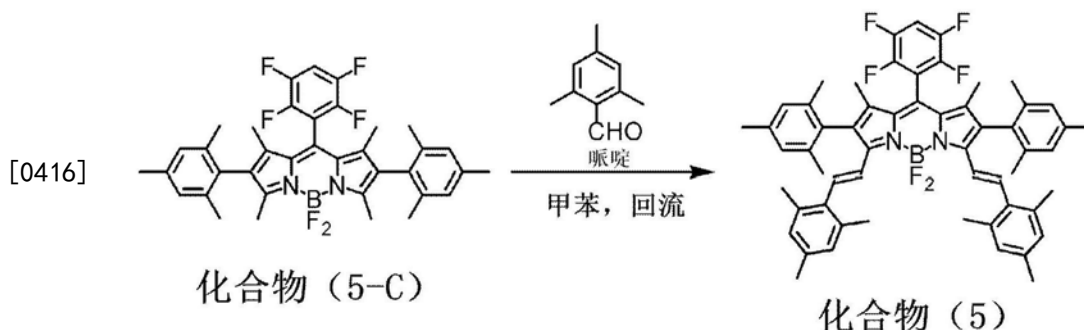
化合物 (5-B)

化合物 (5-C)

[0413] 向100mL的三口烧瓶中导入化合物(5-B) 278mg、2,4,6-三甲基苯基硼酸564mg、氟铯653mg以及甲氧基环戊烷43mL,一边在室温下进行搅拌一边进行减压脱气后,设为了氮气气氛。在此,添加SPhos Pd G3(Aldrich制) 269mg,进行了1小时加热回流。将添加乙酸乙酯250mL并提取/分液而获得的有机层使用无水硫酸钠进行预备干燥后,进行了减压浓缩。将该粗产物利用硅胶柱色谱法(展开溶剂:己烷/乙酸乙酯)进行提纯后,使其溶解于二氯甲烷5mL,进一步添加甲醇15mL后蒸除二氯甲烷,并使其再次沉淀。过滤沉淀物,获得了206mg的化合物(5-C)。

[0414] 化合物(5)的合成

[0415] [化学式45]



化合物 (5-C)

化合物 (5)

[0417] 向100mL的三口烧瓶中导入化合物(5-C) 50mg、甲苯5mL、2,4,6-三甲基苯甲醛46μ

1、哌啶400 μ l以及1片对甲苯磺酸,并在氮气中进行了1小时加热回流。继续添加2,4,6-三甲基苯甲醛46 μ l并使其加热回流1小时后,继续添加哌啶200 μ l并进一步使其加热回流1小时。反应结束后,进行减压浓缩,并将该粗产物利用硅胶柱色谱法(展开溶剂:己烷/甲苯)进行提纯后,溶解于二氯甲烷3ml,添加甲醇15ml后蒸除二氯甲烷,并使其再次沉淀,由此获得了16mg的化合物(5)。化合物的鉴定通过 $^1\text{H-NMR}$ 和ESI-MS来进行。

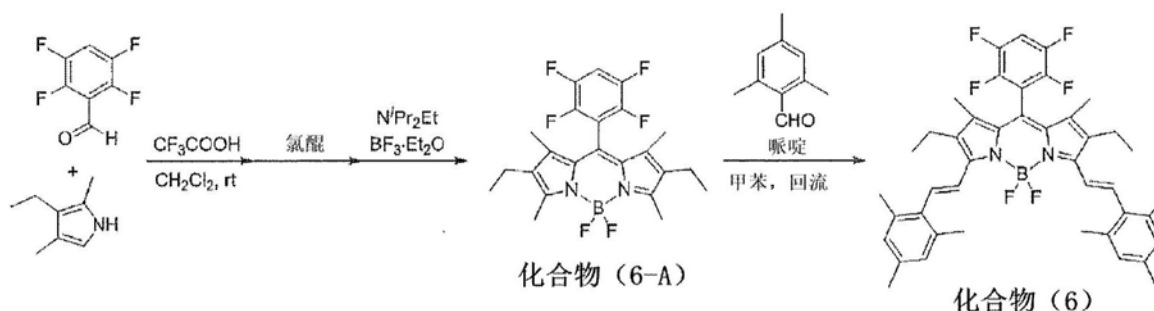
[0418] $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 400MHz): δ 7.43 (s, 1H), 7.39 (s, 1H), 7.29-7.21 (m, 1H), 6.94 (s, 4H), 6.80 (s, 4H), 6.69 (s, 1H), 6.65 (s, 1H), 2.29 (s, 6H), 2.23 (s, 6H), 2.08 (s, 12H), 2.03 (s, 12H), 1.33 (s, 6H).

[0419] ESI-MS: $[\text{M-H}]^- = 891.4$

[0420] <化合物(6)的合成>

[0421] [化学式46]

[0422]



[0423] 化合物(6-A)的合成

[0424] 在氮气气氛下,向100mL的三口烧瓶中导入2,3,5,6-四氟苯甲醛1.00g以及二氯甲烷20mL,并在室温下进行了搅拌。一边进行水冷一边滴加3-己基-2,4-二甲基吡咯0.98g,接着,滴加2滴三氟乙酸后,在室温下搅拌了15分钟。一边进行水冷一边添加氯醌1.0g,并在室温下搅拌10分钟后,一边进行水冷一边滴加二异丙基乙胺3.67g,并在室温下搅拌了15分钟。接着,一边进行水冷一边滴加三氟化硼二乙醚络合物5.6mL,并在室温下搅拌了60分钟。将滴加饱和碳酸氢钠以及甲苯并提取/分液而获得的有机层使用无水硫酸钠进行预干干燥后,进行了减压浓缩。将该粗产物利用硅胶柱色谱法(展开溶剂:甲苯)进行提纯后,使用甲醇进行再结晶,由此获得了0.76g的化合物(6-A)。

[0425] $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 400MHz): δ 7.20-7.30 (m, 1H), 2.54 (s, 6H), 2.33 (q, $J=7.6\text{Hz}$, 4H), 1.51 (s, 6H), 1.01 (t, $J=7.6\text{Hz}$, 6H).

[0426] 化合物(6)的合成

[0427] 向100mL的三口烧瓶中导入化合物(6-A)181mg、2,4,6-三甲基苯甲醛237mg以及脱水甲苯10mL,并在室温下进行了搅拌。添加哌啶2mL以及2片对甲苯磺酸1水合物(Wako Pure Chemical Industries, Ltd. 制, 特级试剂)一边在140 $^{\circ}\text{C}$ 下蒸除溶剂一边搅拌了1小时。将对反应液进行减压浓缩而获得的粗产物利用硅胶柱色谱法(展开溶剂:甲苯)进行提纯后,以乙腈进行再结晶,由此获得了194mg的化合物(6)。化合物的鉴定通过 $^1\text{H-NMR}$ 和ESI-MS进行。

[0428] $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 400MHz): δ 7.40 (d, $J=17.2\text{Hz}$, 2H), 7.32 (d, $J=17.2\text{Hz}$, 2H), 7.20-7.30 (m, 1H), 6.93 (s, 4H), 2.66 (q, $J=7.6\text{Hz}$, 4H), 2.44 (s, 12H), 2.30 (s, 6H), 1.55 (s, 6H), 1.19 (t, $J=7.6\text{Hz}$, 6H).

[0429] ESI-MS: $[M-H]^- = 711.7$

[0430] <化合物(7)的合成>

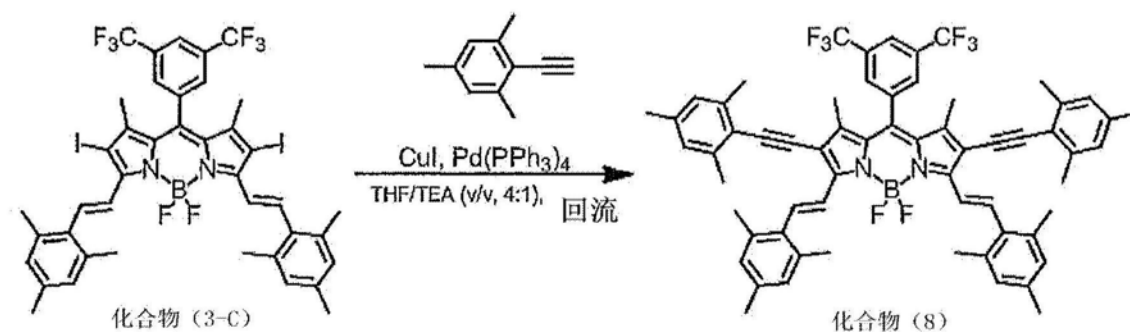
[0431] 在化合物(2)的合成中,将2,4,6-三甲基苯甲醛替换成2,4,6-三甲氧基苯甲醛,除此以外以同样的方式进行合成来合成了化合物(7)。化合物的鉴定通过 $^1\text{H-NMR}$ 和ESI-MS进行。将400MHz $^1\text{H-NMR}$ 光谱示于图2。

[0432] ESI-MS: $[M+H]^+ = 825.3$

[0433] <化合物(8)的合成>

[0434] [化学式47]

[0435]



[0436] 化合物(8)的合成

[0437] 向50mL的二口烧瓶中导入化合物(3-C) 97mg、2-乙炔-1,3,5-三甲基苯58mg、碘化铜(I) 3.8mg、THF 4mL以及三乙胺1mL,一边在室温下进行搅拌一边进行减压脱气后,设为了氮气气氛。在此,添加四(三苯基磷)钯(0) ($\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$) 并进行了2小时加热回流。通过减压蒸除去溶剂,并对其添加二氯甲烷30mL,使用水20mL和饱和氯化钠水溶液20mL进行清洗,并将有机层使用无水硫酸钠进行预备干燥后,进行了减压浓缩。将该粗产物利用硅胶柱色谱法(展开溶剂:己烷/甲苯)进行提纯后,使用甲醇进行再结晶,由此获得了26mg的化合物(8)。化合物的鉴定通过 $^1\text{H-NMR}$ 和ESI-MS来进行。

[0438] $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 400MHz): δ 8.60 (s, 1H), 8.56 (s, 1H), 8.09 (s, 1H), 7.90 (s, 2H), 7.41 (s, 1H), 7.37 (s, 1H), 6.88 (s, 4H), 6.85 (s, 4H), 2.36 (s, 12H), 2.34 (s, 12H), 2.28 (s, 6H), 2.27 (s, 6H).

[0439] ESI-MS: $[M-H]^- = 1003.5$

[0440] <化合物(9)的合成>

[0441] 在经由化合物(5-A)~化合物(5-C)来合成化合物(5)的方法中,将化合物(5)的合成中的2,4,6-三甲基苯甲醛替换成苯甲醛,其余以相同的方法进行合成,由此合成了化合物(9)。

[0442] <化合物(10)的合成>

[0443] 在经由化合物(5-A)~化合物(5-C)来合成化合物(5)的方法中,将化合物(5-A)的合成中的2,3,5,6-四氟苯甲醛替换成2,4,6-三甲基苯甲醛,其余以相同的方法进行合成,由此合成了化合物(10)。

[0444] <化合物(11)的合成>

[0445] 在经由化合物(5-A)~化合物(5-C)来合成化合物(5)的方法中,将化合物(5)的合成中的2,4,6-三甲基苯甲醛替换成2-甲酰基萘,其余以相同的方法进行合成,由此合成了

化合物(11)。

[0446] <化合物(12)的合成>

[0447] 在经由化合物(5-A)~化合物(5-C)来合成化合物(5)的方法中,将化合物(5)的合成中的2,4,6-三甲基苯甲醛替换成2,6-二甲氧基苯甲醛,其余以相同的方法进行合成,由此合成了化合物(12)。

[0448] <1-2>高亮度荧光胶乳分散液的制作

[0449] 进行了荧光胶乳粒子的制作。作为胶乳粒子,使用了在使苯乙烯和丙烯酸的9/1(质量比)混合物分散于水中的状态下进行聚合来制作的平均粒径150nm的粒子。平均粒径使用了动态光散射法来进行测定。在上述中制作的固体成分2%的胶乳粒子分散液(胶乳分散液)(25mL、固体500mg)中滴加THF(5mL)并搅拌了10分钟。并且,将包含化合物(1)24 μ mol/g的THF溶液(2.5mL)经由15分钟进行了滴加。表中的化合物量的 μ mol/g表示相对于胶乳的固体1g的所使用的化合物的摩尔数,质量%表示相对于胶乳的固体1g的所使用的化合物的质量%。在化合物的滴加结束后,搅拌30分钟,之后进行减压浓缩来去除了THF。之后,进行离心分离来使粒子沉淀后,添加超纯水来使其再次分散,由此制造了固体成分浓度2%的高亮度荧光胶乳分散液。

[0450] 并且,代替化合物(1)使用化合物(5)来进行相同的操作,并制造了包含化合物(5)的固体成分浓度2%的高亮度荧光胶乳分散液。

[0451] 另外,使用混合了化合物(1)24 μ mol/g和化合物(5)12 μ mol/g的混合物进行相同的操作,制造了包含化合物(1)和化合物(5)的固体成分浓度2%的高亮度荧光胶乳分散液。

[0452] <2-1>以抗孕酮抗体进行标记的荧光粒子的制备

[0453] 如下制备了以抗孕酮抗体进行标记的高亮度荧光胶乳粒子(平均粒径150nm)。

[0454] 在<1-2>中制作的固体成分浓度为2质量%的高亮度荧光胶乳分散液375 μ L中,将50mM的MES(2-吗啉代乙磺酸、DOJINDO LABORATORIES制)缓冲液(pH6.0)添加117 μ L,将10mg/mL的WSC(水溶性碳化二亚胺)水溶液添加5 μ L,在室温下搅拌了15分钟。之后,将0.5mg/mL的抗孕酮单克隆抗体(GeneTex公司制)添加182.4 μ L,在室温下搅拌了1.5小时。将2mol/L的Glycine(FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation制)水溶液添加37.5 μ L,搅拌15分钟后,通过离心分离(15,000rpm、4 $^{\circ}$ C、30分钟)使荧光胶乳粒子沉淀。去除上清液,将PBS(Phosphate Buffered Saline磷酸缓冲生理食盐水;FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation制)溶液(pH7.4)添加750 μ L,通过超声波清洗器使荧光胶乳粒子再次分散。进一步进行离心分离(15,000rpm、4 $^{\circ}$ C、15分钟),去除上清液后,添加包含1质量%BSA的PBS(pH7.4)溶液750 μ L,并使荧光胶乳粒子再次分散,由此获得了抗孕酮抗体结合荧光胶乳粒子的1质量%溶液。

[0455] <2-2>孕酮-BSA结合体的柠檬酸缓冲液的溶液的制备

[0456] 将孕酮-BSA结合体(BIO-RAD公司制)150 μ g添加到50mM浓度的柠檬酸缓冲液1mL(pH5.2,150mM NaCl)中来使其溶解,获得了柠檬酸缓冲液的溶液。

[0457] <2-3>孕酮-BSA结合体固定基板的制造

[0458] 准备聚甲基丙烯酸甲酯(PMMA)的基体(MITSUBISHI RAYON CO.,LTD.制、ACRYPET(注册商标)VH),通过蒸镀法,对厚度50nm的金膜的单面进行蒸镀并裁剪为7mm的宽度,并制作了7个相同的基板。在该基板的金蒸镀面上,点加基于在1.中制备的孕酮-BSA结合体的柠

檬酸缓冲液的溶液并使其干燥,制作了将孕酮-BSA结合体固定化的基板。

[0459] <2-4>基板的清洗及封闭

[0460] 在将如此制备的基板安装于传感器芯片的流路之前,预先制备将Tween20(聚氧乙烯(20)脱水山梨醇单月桂酸酯、FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation制)以0.05质量%的浓度包含的PBS溶液(pH7.4),使用该溶液300 μ L反复清洗了3次。清洗结束后,为了进行金蒸镀膜上的T4-BSA结合体的未吸附部分的封闭,将包含1质量%酪胺(Thermo Scientific社制)的PBS溶液(pH7.4)添加300 μ L,并在室温下放置了1小时。在以上述清洗用溶液进行清洗后,作为稳定化剂添加了Immunoassay Stabilizer(ABI公司制)300 μ L,在室温下放置30分钟,去除溶液并使用干燥机将水分完全去除。

[0461] <2-5>传感器芯片的制作

[0462] 以成为日本特开2010-190880号公报的第2实施方式的结构的方式制作了流路型传感器芯片。将其概略图示于图3及图4。图3为传感器芯片1的概略图,图4为传感器芯片1的分解图。传感器芯片1由上部部件2、中间部件3及基板4构成。在上部部件2中,设置有第一容器5及第二容器6。另外,将第一容器5及第二容器6的组合称作容器组7。在基板4形成有流路10,在流路10上形成有检测区域8及参照区域9。

[0463] <3-1>大型设备(已存的孕酮测定试剂)中的测定

[0464] 在免疫测定中,通过从业者更广泛地使用的大型设备即IMMULYZE 1000(LSI Medience Corporation),按照操作说明书对已知孕酮的量的样品进行测定,获得了孕酮的测定值。

[0465] <3-2>使用了抗体标记粒子的孕酮的测定

[0466] 准备了包含各种浓度(0.00ng/mL、0.5ng/mL、2.0ng/mL、15.0ng/mL、30.0ng/mL、45.0ng/mL)的孕酮的样品。接着,以使用在<2-1>中制备的抗孕酮抗体进行标记的抗体标记粒子与各种样品的混合液的制作的时间点的抗体标记粒子的浓度成为0.080%、0.040%、0.020%、0.010%、0.005%、0.002%、0.001%的方式准备多个各抗体标记粒子的浓度的杯,在各个浓度的杯中添加通过上述准备的各种浓度的样品,并对抗体标记粒子与样品的混合液搅拌10分钟来进行了制备。接着,在密封有2-5.中制作的基板的流路型传感器芯片上,分别点加了抗体标记粒子与样品的混合液。点加后,一边进行泵吸引一边使混合液以10 μ L/min的速度流下来接触固定有孕酮-BSA结合体的金膜面上,并对荧光强度继续进行了1.5分钟的测定。将在各基板中获得的检测区域与参照区域的各自的荧光强度的单位时间内的增加速度作为荧光讯号值来求出,并通过将检测区域的讯号值除以参照区域的讯号值来进行标准化。并且,准备孕酮浓度0的样品并同样地进行来自于不包含孕酮的样品的讯号值的标准化。

[0467] <4>校准曲线的制作

[0468] 求出根据在<3-2>中求出的孕酮的量为已知的样品进行标准化的荧光讯号值与在<3-1>中求出的大型设备的测定值的对应关系,由此对于在<2-2>中制备的使用了孕酮-BSA结合体的基板制作了校准曲线。在文献“The Immunoassay Handbook Third Edition Edited by David Wild(2005)”中,作为竞争法的校准曲线记载有能够使用S型函数的4参数逻辑斯谛曲线模型,根据该方法,使用作为获得近似线的方法而通常已知的最小二乘法,求出通过在3-2.中测定的各孕酮浓度中的荧光讯号值的各点的最附近的4参数逻辑斯谛曲

线,作为校准曲线。

[0469] 根据如上求出的校准曲线计算出了各孕酮浓度的样品的测定值。

[0470] 判定性能是否满足校准曲线的标准。校准曲线在2个位置进行规定。第一处为低浓度区域的校准曲线的斜率,取倒数,将2.0以内作为标准。第二处为自高浓度区域的测定点的校准曲线的背离(偏离),将4%以内作为标准。在该范围内,能够实现测定值的变动系数为10%以内,且准确度为10%以内,能够进行高精度的测定。

[0471] 作为低浓度区域,求出了临床意义上的孕酮的最小浓度即0.5ng/mL中的校准曲线的斜率。并且,作为高浓度区域,求出了孕酮浓度自30.0ng/mL和45.0ng/mL的各个校准曲线的背离(偏离),并计算平均值来进行了评价。结果综合示于表3。

[0472] <5>比较用粒子的制备

[0473] <5-1>比较用荧光胶乳粒子分散液的制作

[0474] 在<1-2>中制作的胶乳粒子分散液的固体成分浓度2质量%的水分散液100mL中添加甲醇100mL,在室温下搅拌了10分钟。另一方面,将另外准备的荧光色素(比较化合物:日本专利3442777号公报记载的化合物5)溶液(溶解于N,N-二甲基甲酰胺1mL、CHCl₃ 9mL、乙醇16mL)经由60分钟缓慢地滴加到了胶乳粒子分散液中。滴加完成后,以蒸发器将有机溶剂减压蒸馏后,反复进行3次离心分离和PBS水溶液中的再分散,并进行提纯,由此制备了比较用荧光胶乳粒子分散液。

[0475] <5-2>以抗孕酮抗体进行标记的比较用抗体标记粒子的制备

[0476] 在<2-1>中制备的荧光胶乳粒子的制备中,代替荧光胶乳粒子,替换成在<5-1>中制备的2质量%(固体成分浓度)的比较用荧光胶乳粒子,除此以外的工作相同地进行,制备了比较用抗体标记粒子。除此以外的工作同样地实施至<4>的测定为止。

[0477] <6>粒子荧光强度的测定

[0478] 在上述中将固体成分浓度2质量%的荧光胶乳分散液以超纯水稀释为200倍,将荧光分光光度计RF-5300PC(SHIMADZU CORPORATION制)的激发光设定为658nm来进行了测定。当荧光胶乳分散液的荧光强度高至超出了测定范围时,以超纯水进行稀释至能够测定荧光强度的极大值的范围。将荧光胶乳分散液的发光光谱的荧光强度的积分值相对于在7-1.中制作的荧光胶乳分散液的发光光谱的荧光强度的积分值设为粒子荧光强度(相对值)。以下示出在计算中使用的计算式。

[0479] 荧光强度(相对值) = (荧光胶乳分散液的发光光谱的荧光强度的积分值) / (在比较例中制作的荧光胶乳分散液的发光光谱的荧光强度的积分值)

[0480] <评价基准>

[0481] 低浓度区域的校准曲线斜率的倒数为2.0以下时的判定设为A,大于2.0时的判定设为B。

[0482] 将高浓度区域中的自校准曲线的偏离为4%以下时的判定设为A,大于4%时的判定设为B。

[0483] [表3]

[0484]

	化合物	粒子浓度	粒子荧光强度 (相对值)	低浓度区域的校准 曲线斜率的倒数		高浓度区域中的自 校准曲线的偏离	
					判定		判定
实施例1	(1)、(5)	0.080质量%	12.1	1.7	A	1.8%	A
实施例2	(1)、(5)	0.040质量%	12.1	1.6	A	1.9%	A
实施例3	(1)、(5)	0.020质量%	12.1	1.5	A	2.0%	A
实施例4	(1)、(5)	0.010质量%	12.1	1.4	A	2.4%	A
实施例5	(1)、(5)	0.005质量%	12.1	1.3	A	2.9%	A
实施例6	(1)、(5)	0.002质量%	12.1	1.2	A	3.3%	A
实施例7	(1)、(5)	0.001质量%	12.1	1.1	A	3.4%	A
实施例8	(1)	0.080质量%	5.8	2.0	A	2.0%	A
实施例9	(1)	0.040质量%	5.8	1.9	A	2.4%	A
实施例10	(1)	0.020质量%	5.8	1.8	A	2.8%	A
实施例11	(1)	0.010质量%	5.8	1.7	A	3.2%	A
实施例12	(1)	0.005质量%	5.8	1.6	A	3.4%	A
实施例13	(1)	0.002质量%	5.8	1.5	A	3.6%	A
实施例14	(1)	0.001质量%	5.8	1.4	A	3.8%	A
实施例15	(5)	0.080质量%	7.0	1.9	A	1.9%	A
实施例16	(5)	0.040质量%	7.0	1.8	A	2.2%	A
实施例17	(5)	0.020质量%	7.0	1.7	A	2.5%	A
实施例18	(5)	0.010质量%	7.0	1.6	A	3.1%	A
实施例19	(5)	0.005质量%	7.0	1.5	A	3.3%	A
实施例20	(5)	0.002质量%	7.0	1.4	A	3.5%	A
实施例21	(5)	0.001质量%	7.0	1.3	A	3.6%	A
比较例1	比较化合物	0.080质量%	1.0	3.8	B	2.0%	A
比较例2	比较化合物	0.040质量%	1.0	2.0	A	4.1%	B
比较例3	比较化合物	0.020质量%	1.0	1.9	A	4.5%	B
比较例4	比较化合物	0.010质量%	1.0	1.8	A	5.2%	B
比较例5	比较化合物	0.005质量%	1.0	1.7	A	7.2%	B
比较例6	比较化合物	0.002质量%	1.0	1.6	A	9.0%	B
比较例7	比较化合物	0.001质量%	1.0	1.5	A	10.2%	B

[0485] 根据表3的结果,在粒子荧光强度低的比较例的粒子中,若粒子浓度高则得不到低浓度区域的校准曲线斜率,若粒子浓度低则高浓度区域中的自校准曲线的偏离变大,因此并非是在整个测定范围内能够以高精度进行测定的条件。相对于此,可知本发明的高亮度荧光粒子能够在整个测定范围内以高精度进行测定,本发明的效果得到确认。

[0486] 符号说明

[0487] 1-传感器芯片,2-上部部件,3-中间部件,4-基板,5-第一容器,6-第二容器,7-容器组,8-检测区域,9-参照区域,10-流路。

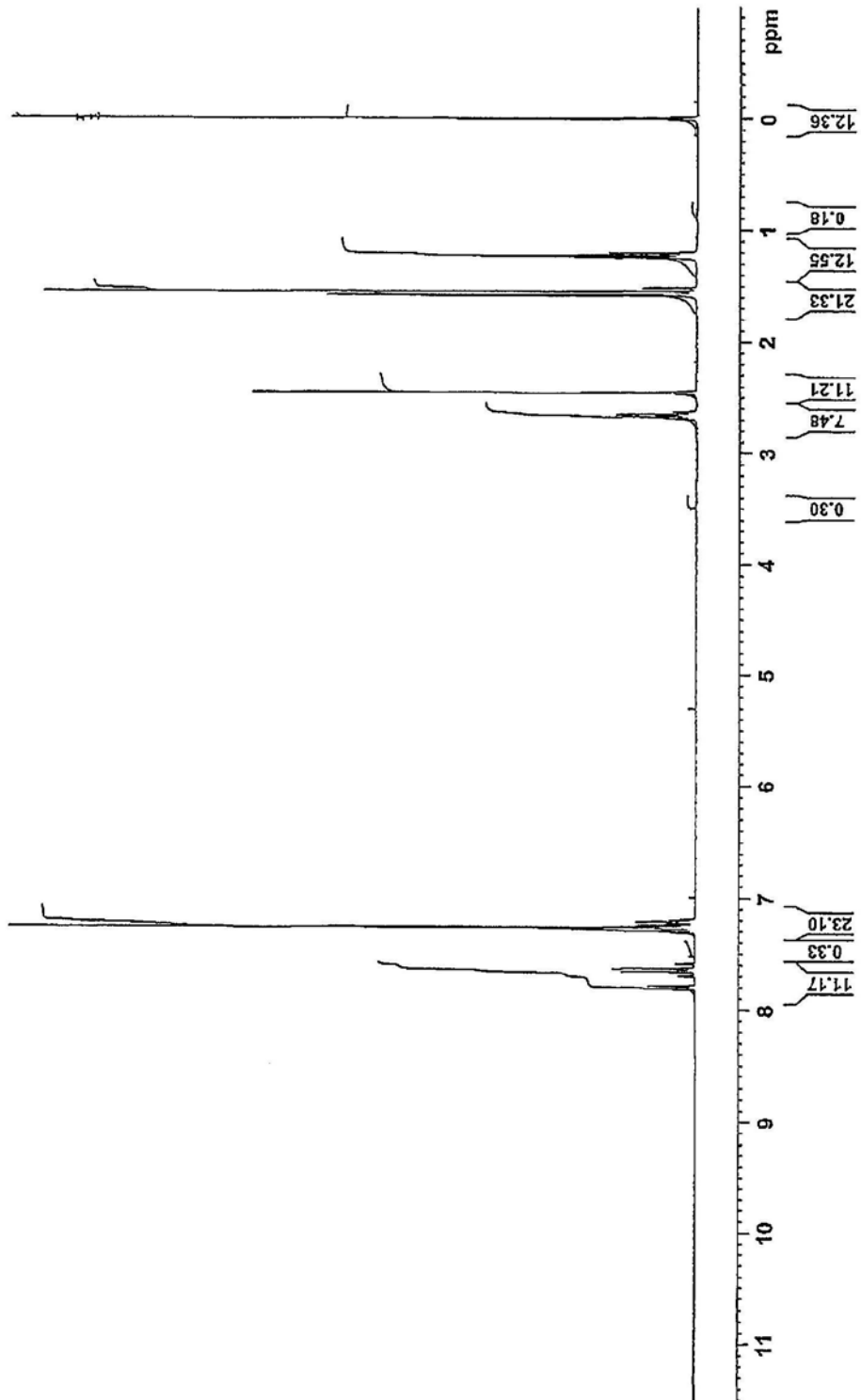


图1

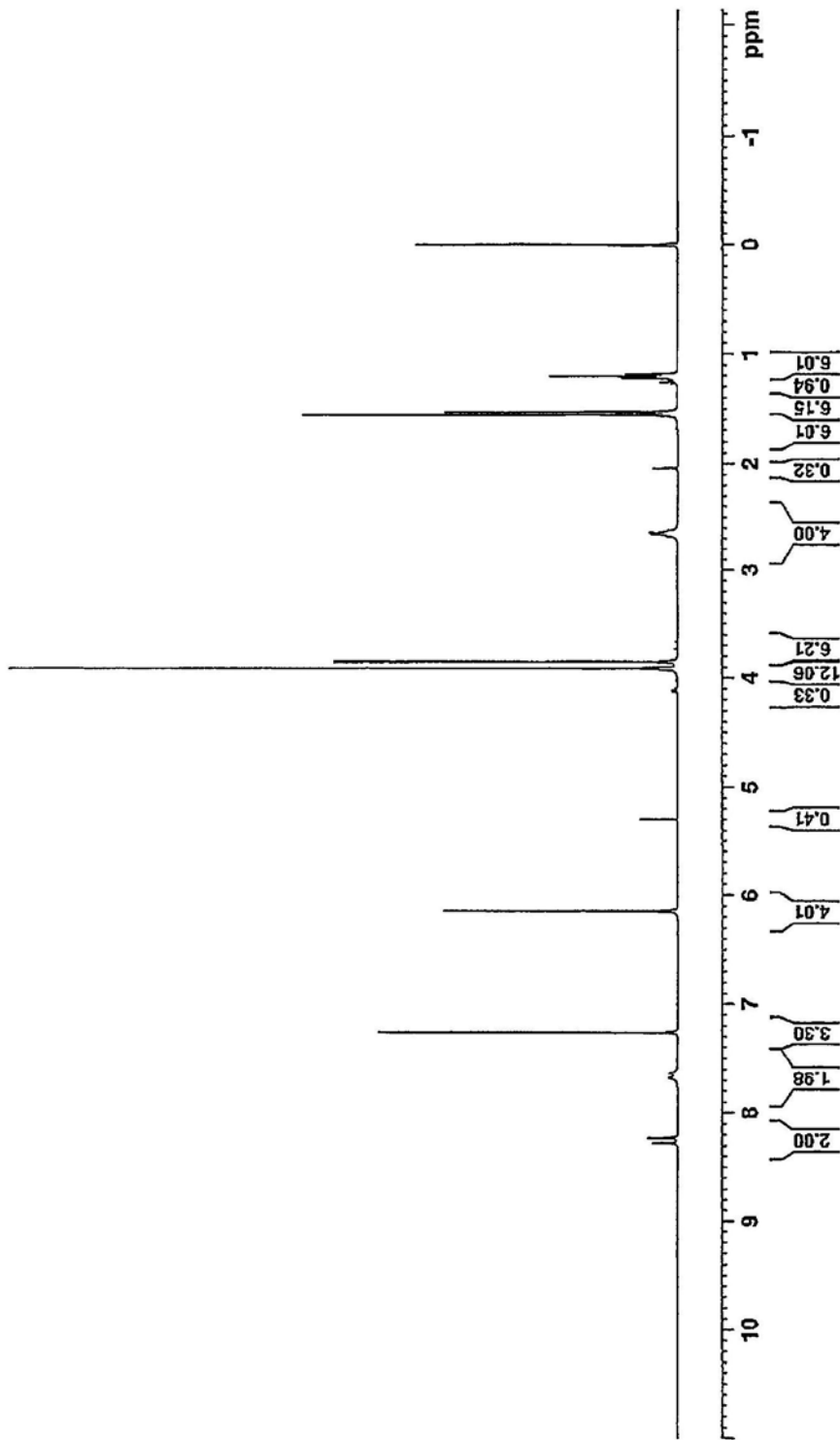


图2

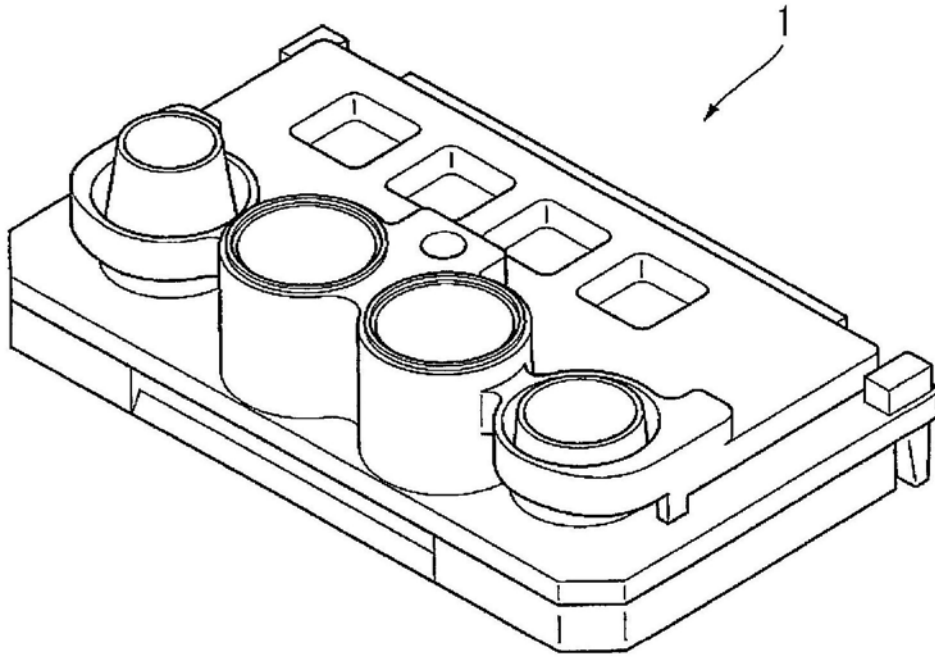


图3

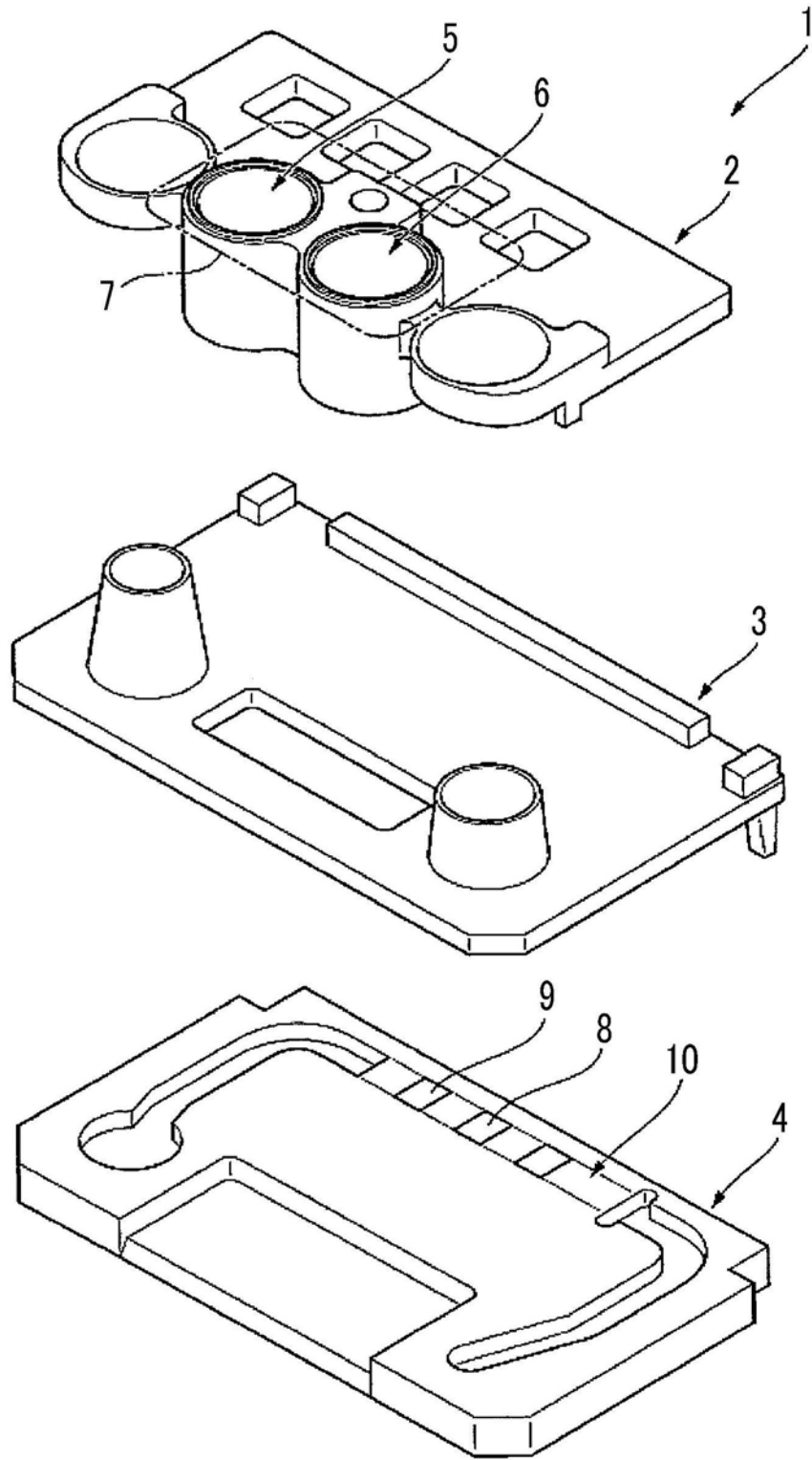


图4