



(51) 국제특허분류:

G01N 33/58 (2006.01) C07D 409/14 (2006.01)
G01N 33/543 (2006.01) C07D 487/04 (2006.01)
G01N 21/64 (2006.01)

(21) 국제출원번호:

PCT/KR2016/005166

(22) 국제출원일:

2016년 5월 16일 (16.05.2016)

(25) 출원언어:

한국어

(26) 공개언어:

한국어

(30) 우선권정보:

10-2015-0067872 2015년 5월 15일 (15.05.2015) KR
10-2016-0059525 2016년 5월 16일 (16.05.2016) KR

(71) 출원인: 재단법인 바이오나노헬스가드연구단 (BION-
ANO HEALTH GUARD RESEARCH CENTER)
[KR/KR]; 34141 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon
(KR). 한국과학기술연구원 (KOREA INSTITUTE OF
SCIENCE AND TECHNOLOGY) [KR/KR]; 02792 서
울시 성북구 화랑로 14길 5, Seoul (KR).

(72) 발명자: 김세훈 (KIM, Sehoon); 02741 서울시 성북구
오패산로 90, 삼성래미안아파트 118동 402호, Seoul
(KR). 정봉현 (CHUNG, Bong Hyun); 05510 서울시 송
파구 올림픽로 269, 롯데캐슬아파트 101동 2202호,
Seoul (KR). 김영선 (KIM, Youngsun); 02793 서울시 성
북구 월곡로 18가길 46, 306호, Seoul (KR). 박경미

(PARK, Kyung Mi); 34199 대전시 유성구 상대로 16,
트리폴시아파트 505동 1503호, Daejeon (KR). 서영
훈 (SEO, Young Hun); 02714 서울시 성북구 길음로
141, 신안파크아파트 3동 103호, Seoul (KR).

(74) 대리인: 특허법인 다나 (DANA PATENT LAW FIRM);
06242 서울시 강남구 역삼로 3길 11, 광성빌딩 신관
4-6층, Seoul (KR).

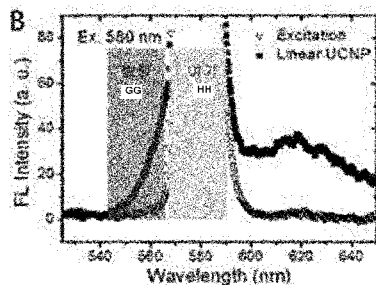
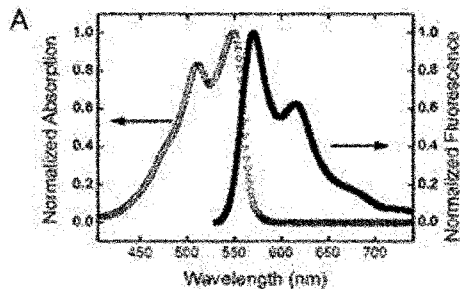
(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의
국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO,
AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BY, BZ,
CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO,
DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN,
HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KZ, LA,
LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN,
MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE,
PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE,
SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT,
TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의
역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM,
KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG,
ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ,
TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE,
ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC,
MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR),

[다음 쪽 계속]

(54) Title: METHOD FOR DETECTING BIOMATERIAL USING LINEAR UPCONVERSION FLUORESCENT PROPERTY

(54) 발명의 명칭: 선형 업컨버전 형광 특성을 이용한 생체물질 검출 방법



HH ... Excitation
GG ... Light emission

(57) Abstract: The present invention relates to a method for detecting bio-
material by means of a dye having a linear upconversion fluorescent prop-
erty, the method comprising the steps of: i) preparing a fluorescent sub-
stance having a linear upconversion fluorescent property; ii) reacting the
fluorescent substance and biomaterial to obtain a reaction complex thereof;
iii) exciting the reaction complex by means of a light source having a longer
wavelength than the maximum light-emitting wavelength of the fluorescent
substance; and iv) discovering and measuring the light-emitting signal hav-
ing a shorter wavelength than the wavelength of the excited light emitted
from the excited reaction complex. The present invention additionally
relates to a system and a kit for detecting biomaterial using a dye having a
linear upconversion fluorescent property.

(57) 요약서: 본 발명은 i) 선형 업컨버전 형광 특성을 가지는 형광체를
준비하고; ii) 상기 형광체와 생체물질을 반응시켜서 형광체와 생체물
질의 반응복합체를 형성하고; iii) 상기 반응복합체를, 상기 형광체의
최대발광파장보다 장파장의 광원으로 여기시키고; iv) 상기 여기된 반
응복합체로부터 방출되는, 상기 여기광의 파장보다 단파장인 발광 신
호를 탐지하여 측정하는; 단계를 포함하는, 선형 업컨버전 형광 특성
을 가진 염료를 이용한 생체물질 검출 방법에 관한 것이다. 본 발명은
또한 선형 업컨버전 형광 특성을 가진 염료를 이용한 생체물질 검출
시스템 및 키트에 관한 것이다.



OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, **공개:**
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))

명세서

발명의 명칭: 선형 업컨버전 형광 특성을 이용한 생체물질 검출 방법

기술분야

- [1] 본 발명은 선형 업컨버전 형광 특성을 이용한 생체물질의 검출 어세이(assay) 방법에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 대상 검체 (혈액, 객담 등)나 검출기관에는 기본적으로 형광을 띄는 물질들이 존재하여 형광 기반의 검출에 있어서 이러한 형광 물질은 배경잡음으로 작용한다. 또한 일반적인 종래 형광 입자를 사용할 경우 이러한 배경잡음이 함께 감지되므로 표적신호의 검출감도가 제한적이다.
- [3] 업컨버전 나노입자(upconversion nanoparticles: UCNPs)는 화학적으로 안정하고 소광이 없으며 생화학적으로 많이 사용되고 있는 양자점과는 달리, 최대 발광 파장이 크기-의존이 아니며 호스트 결정과 RE 도핑물질을 변화시켜 쉽게 다중 색 발광을 할 수 있다. 이러한 특성을 이용하여 UCNPs는 흐름 세포계측(flow cytometry), 광역학 요법(photodynamic therapy), 진단 등에 활용되고 있으며 면역분석법과 유전자 분석 같은 생물학적 분석에서 발광 표지로 사용되고 화학적 감지/세포의 영상화에도 활용되고 있다.
- [4] 그러나 기존의 업컨버전 나노입자(UCNPs)를 이용한 형광은 대부분 무기 나노결정의 비선형 업컨버전 방식으로 (이광자 및 다중광자를 흡수함), 이를 관측하기 위해서는 고전력의 결맞음 상태의 여기광원인 레이저가 필요한바 비용이 높고 관측이 용이하지 않다.
- [5] 이에 본 발명자들은, 선형 업컨버전 형광 특성을 생체물질 검출을 위한 방법에 적용함으로써, 일반 LED 광원으로도 관측이 가능한 신규 선형 업컨버전 나노입자를 개발하여 본 발명을 완성하였다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [6] 본 발명의 목적은 선형 업컨버전 형광 특성을 가진 염료를 이용한 생체물질 검출 방법을 제공하는 것이다.
- [7] 본 발명의 다른 목적은 선형 업컨버전 형광 특성을 가진 염료를 이용한 생체물질 검출 시스템을 제공하는 것이다.
- [8] 본 발명의 또 다른 목적은 선형 업컨버전 형광 특성을 가지는 형광체를 포함하는 선형 업컨버전 기반의 생체물질 진단 키트를 제공하는 것이다.

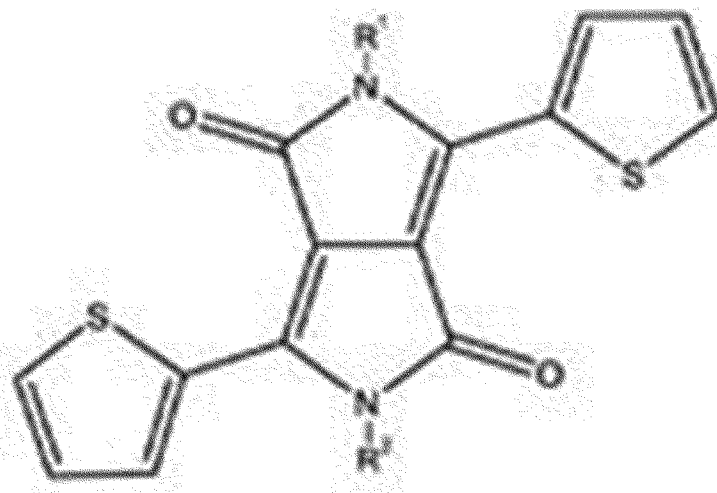
과제 해결 수단

- [9] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은
- [10] i) 선형 업컨버전 형광 특성을 가지는 형광체를 준비하고;

- [11] ii) 상기 형광체와 생체물질을 반응시켜서 형광체와 생체물질의 반응복합체를 형성하고;
- [12] iii) 상기 반응복합체를, 상기 형광체의 최대발광파장보다 장파장의 광원으로 여기시키고;
- [13] iv) 상기 여기된 반응복합체로부터 방출되는, 여기광의 파장보다 단파장인 발광 신호를 탐지하여 측정하는;
- [14] 단계를 포함하는, 선형 업컨버전 형광 특성을 가진 염료를 이용한 생체물질 검출 방법을 제공한다.
- [15] 본 발명의 용어, “업컨버전(upconversion) 형광”은 저에너지의 광을 흡수하여 고에너지의 광을 방출하는 넓은 범위의 광학 현상을 말한다.
- [16] 본 발명의 용어, “선형 업컨버전 형광”은, 다중광자 흡수 기반이 아닌 단일 광자 흡수에 따른 선형 광학 현상을 의미한다. 통상의 비선형 업컨버전 형광의 경우, 형광 중에서 둘 또는 둘 이상의 광자가 순차적으로 흡수되어 고에너지를 발광하는 현상인바, 본 발명의 선형 업컨버전 형광과 차이가 있다.
- [17] 본 발명의 상기 검출방법에서 선형 업컨버전 형광 특성을 갖는 형광체는 이에 제한되는 것은 아니나 바람직하게 Stokes' shift <100 nm 인 형광체일 수 있다. 본 발명의 용어, “Stokes' shift” 또는 “스토크스 이동”은 스토크스의 법칙에 있어서의 여기광 에너지와 발광 에너지의 차를 의미한다.
- [18] 본 발명의 상기 검출방법에서 상기 선형 업컨버전 형광 특성을 나타내는 형광체는, 이에 제한되는 것은 아니나, 바람직하게 하기 화학식 1로 표시되는 DPP(Diketo Pyrrolo Pyrrole) 유도체, 아센, 플루오레세인, 로다민, 옥사진, 티아진, 시아닌, 루브렌, 보디피, 레조루핀 및 헤미시아닌으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상인 것일 수 있다. 그러나 반드시 이로 제한되는 것은 아니며, 선형 업컨버전 형광 특성을 나타내는 형광체, 바람직하게 Stokes' shift <100 nm 인 형광체라면 어느 것이든 이용가능하다.

[19] [화학식 1]

[20]



[21] (상기 화학식 1에서 R1 및 R2는 서로 동일하거나 상이한 수소, 탄소수 1 내지

탄소수 60의 치환 또는 비치환된 알킬기, 탄소수 3 내지 탄소수 30의 치환 또는 비치환된 사이클로알킬기, 탄소수 6 내지 탄소수 60의 치환 또는 비치환된 아릴기, 탄소수 2 내지 탄소수 60의 치환 또는 비치환된 헤테로아릴기, 또는 탄소수 6 내지 탄소수 60의 치환 또는 비치환된 축합 다환기를 나타낸다.)

[22] 본 발명의 구체예에서, 상기 DPP 유도체는 바람직하게

[23] 2,5-비스(2-에틸헥실)-3,6-디(티오펜-2-일)피롤로[3,4-c]피롤-1,4(2H,5H)-디온
[2,5-bis(2-ethylhexyl)-3,6-di(thiophen-2-yl)pyrrolo[3,4-c]pyrrole-1,4(2H,5H)-dione][
화학식 2];

[24] 2,5-비스(2-에틸헥실)-2,5-디하이드로-3,6-디페닐-피롤로[3,4-c]피롤-1,4-디온
[2,5-bis(2-ethylhexyl)-2,5-dihydro-3,6-diphenyl-pyrrolo[3,4-c]pyrrole-1,4-dione][화학
식 3];

[25] 5-(2,5-비스(2-에틸헥실)-1,2,4,5-테트라하이드로-1,4-디옥소-3-(티오펜-2-일)피
롤로[3,4-c]피롤-6-일)티오펜-2-카발데히드
[5-(2,5-bis(2-ethylhexyl)-1,2,4,5-tetrahydro-1,4-dioxo-3-(thiophen-2-yl)pyrrolo[3,4-c]
pyrrol-6-yl)thiophene-2-carbaldehyde][화학식 4]; 또는

[26] 5,5'-(2,5-비스(2-에틸헥실)-3,6-디옥소-2,3,5,6-테트라하이드로피롤로[3,4c]피롤-
1,4-디일)비스(티오펜-2-카발데히드)
[5,5'-(2,5-Bis(2-ethylhexyl)-3,6-dioxo-2,3,5,6-tetrahydropyrrolo[3,4-c]pyrrole-1,4-diyl
)bis(thiophene-2-carbaldehyde)][화학식 5]

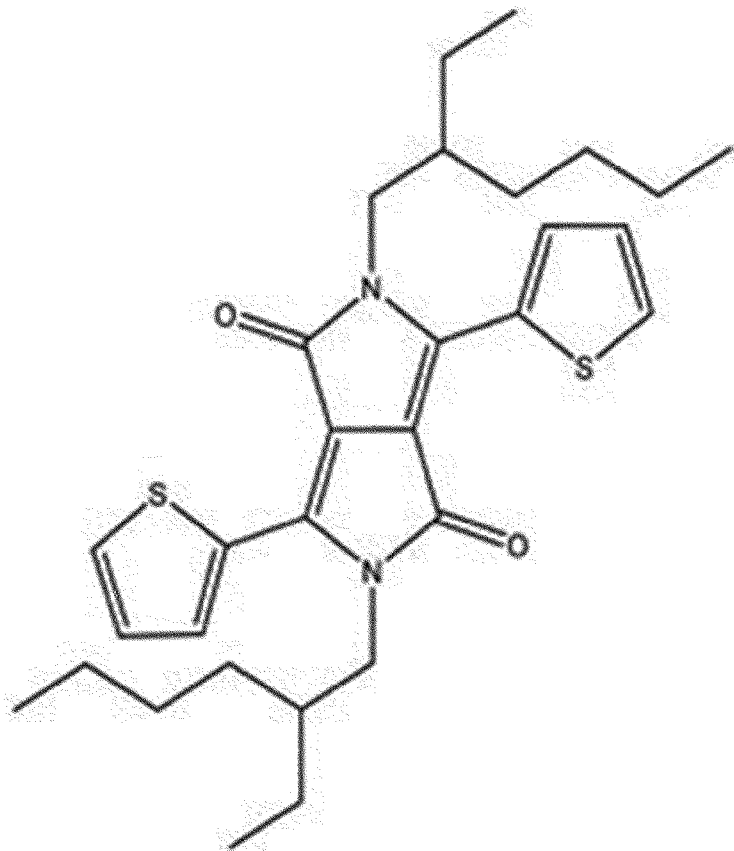
[27] 일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니며, 가장 바람직하게 하기 화학식 2로
표시되는

2,5-bis(2-ethylhexyl)-3,6-di(thiophen-2-yl)pyrrolo[3,4-c]pyrrole-1,4(2H,5H)-dione 일
수 있다.

[28] [화학식 2]

[29] 2,5-비스(2-에틸헥실)-3,6-디(티오펜-2-일)피롤로[3,4-c]피롤-1,4(2H,5H)-디온

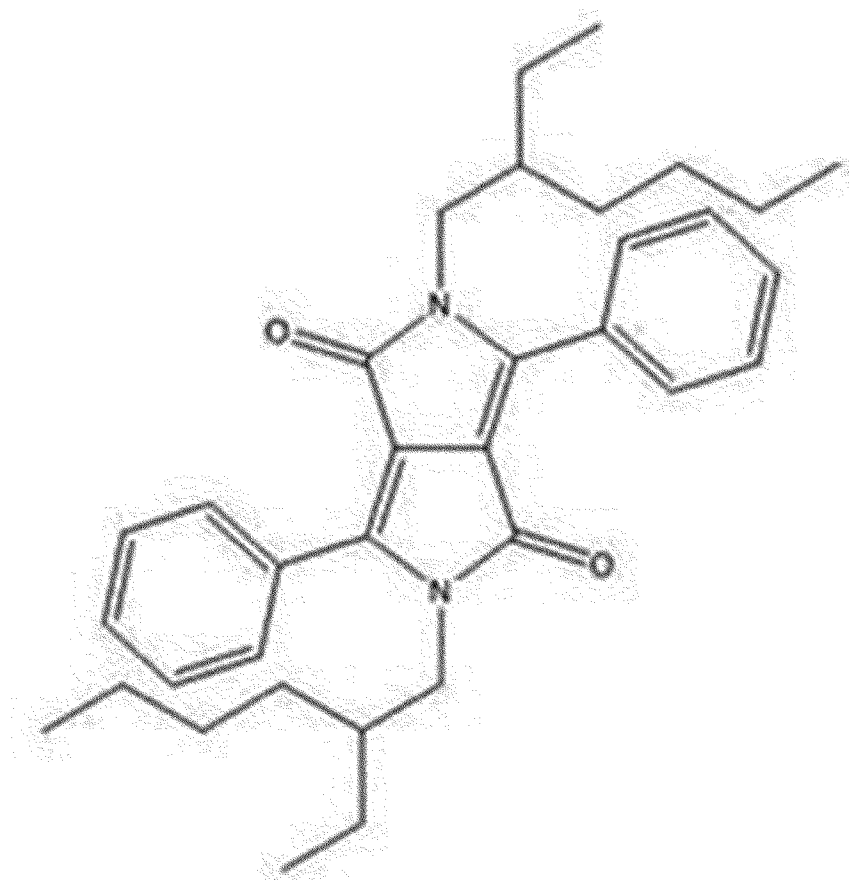
[30]



[31] [화학식 3]

[32] 2,5-비스(2-에틸헥실)-2,5-디하이드로-3,6-디페닐-피롤로[3,4-c]피롤-1,4-디온

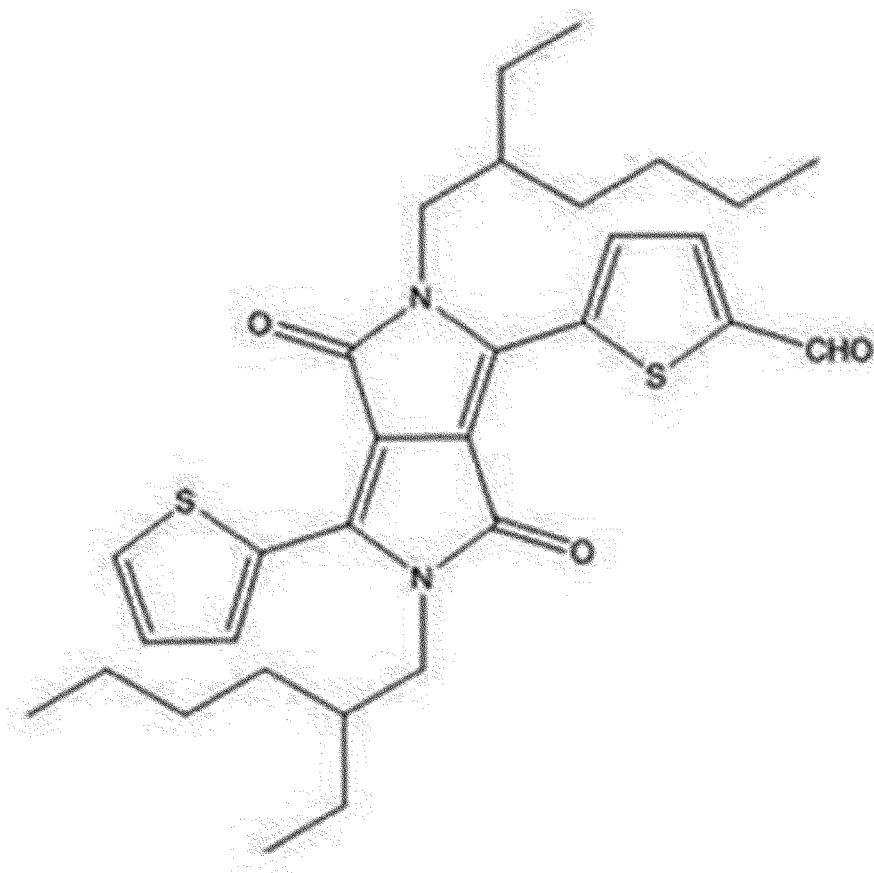
[33]



[34] [화학식 4]

[35] 5-(2,5-비스(2-에틸헥실)-1,2,4,5-테트라하이드로-1,4-디옥소-3-(티오펜-2-일)피롤로[3,4-c]피롤-6-일)티오펜-2-카발데히드

[36]

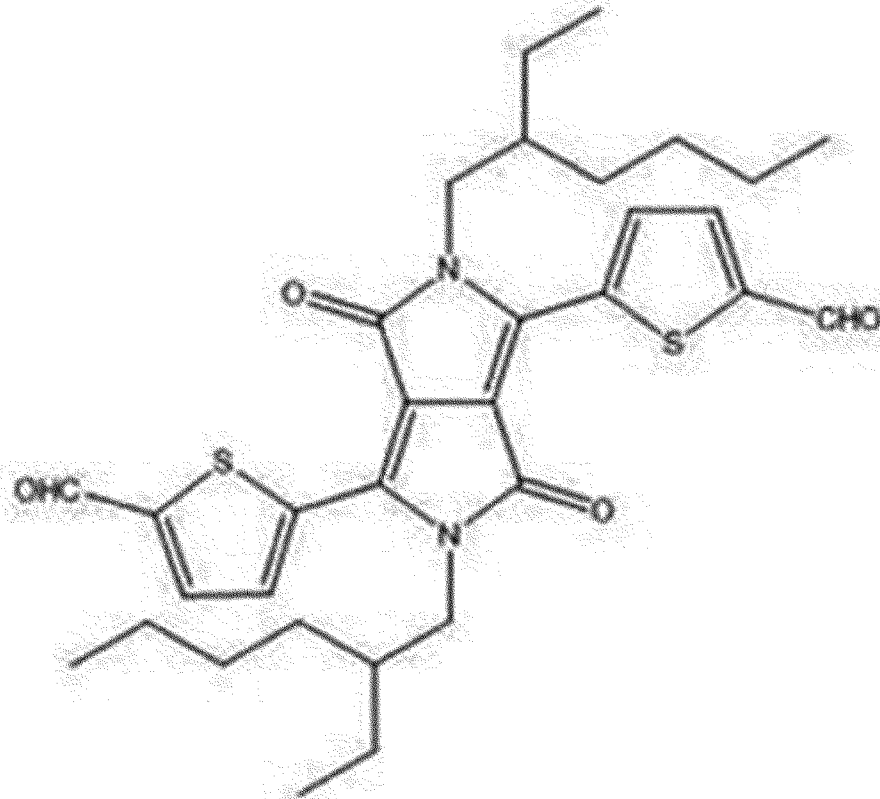


[37]

[화학식 5]

5,5'-(2,5-비스(2-에틸헥실)-3,6-디옥소-2,3,5,6-테트라하이드로피롤로[3,4c]피롤-1,4-디일)비스(티오펜-2-카발데히드)

[38]



- [39] 본 발명의 상기 검출방법의 i) 단계에서, 상기 형광체는 그 자체로 생체물질 검출용 분자와 접할될 수 있다. 또는 바람직하게 상기 형광체는 나노구조체에 담지되거나, 나노구조체에 접합(conjugation)된 형태의 형광 나노구조체일 수 있다.
- [40] 본 발명의 용어, "나노구조체"는 나노 크기의 구조체를 의미하며, 이때, 상기 나노구조체는 그 크기가 한정되는 것이 아니라, 상기 나노입자보다 큰 입자, 즉 마이크로입자 등을 포함할 수 있으며, 본 발명의 선형 업컨버전 형광 특성을 갖는 형광 염료를 담지하거나 또는 접합할 수 있는 크기라면 어떠한 크기라도 무방하다.
- [41] 상기 나노구조체는 이에 제한되는 것은 아니나, 나노입자, 나노비드, 나노에멀전, 마이셀, 리포솜 및 나노입자 현탁액으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상일 수 있다. 본 발명의 구체예에서 상기 나노구조체는 바람직하게는 폴리스티렌계 비드일 수 있다. 본 발명에서 상기 나노 비드는 바람직하게는 1~1000 nm의 크기일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [42] 본 발명의 상기 검출방법의 ii) 단계는, 상기 형광체가 생체물질 검출용 분자와 접합하고, 상기 생체물질 검출용 분자가 접합된 형광체와 상기 생체물질이 반응하여 상기 형광체와 생체물질의 반응복합체를 형성하는 것일 수 있다.
- [43] 이때, 상기 생체물질 검출분자는 단백질, 항체, 유전자, 지질, 효소, 앵타머(aptamer) 및 리간드로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니며, 검출하고자 하는 생체물질과 상보적으로

결합할 수 있는 물질이라면 어느 것이든지 가능하다.

- [44] 본 발명의 상기 검출방법의 iii) 단계는, 상기 형광체의 최대발광파장보다 5-50 nm 더 긴 장파장 영역의 광원으로 상기 반응복합체를 여기하는 것일 수 있다. 이때, 광원은 이에 제한되는 것은 아니나, 바람직하게 LED(light emitting diode) 또는 램프인 것일 수 있다. 즉, 본 발명의 광원은 레이저가 아닌 광원을 사용할 수 있고, 일반 LED 광원으로도 관측이 가능하므로, 본 발명의 형광 측정 시스템을 확보하는데 비용 절감 효과가 있다.
- [45] 본 발명의 상기 검출방법의 iv) 단계는, 반응복합체로부터 방출되는 발광 신호가, 상기 여기광의 파장보다 10-100 nm 더 짧은 단파장 영역의 발광 신호인 것일 수 있다.
- [46] 본 발명의 상기 검출방법에 있어서, 상기 생체물질은 이에 제한되는 것은 아니나 바람직하게 조직 추출물, 세포 용해물, 전혈, 혈장, 혈청, 침, 안구액, 뇌척수액, 땀, 뇨, 젖, 복수액, 활액, 복막액 및 혈액여지(dried blood spot)로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상일 수 있다.
- [47] 본 발명의 용어, "시료"는 본 발명의 방법 또는 진단 키트에 처리할 수 있는 시료라면 제한 없이 포함하며, 특히 진단 키트에 균등하게 처리할 수 있는 액상 시료일 수 있다. 본 발명에서 분석 시료는 표적 생체분자를 포함할 수 있는 모든 물질일 수 있으며, 특히 생체가 노출되거나 생체에 처리되는 각종 물질들과 생체에서 분리된 물질들일 수 있다. 상기 생체에서 분리된 물질들은 구체적으로는, 혈액, 소변, 콧물, 세포, 추출된 DNA, RNA, 단백질 등일 수 있다.
- [48] 또한 본 발명의 검출방법은 상기 생체물질 검출분자가 접합된 선형 업컨버전 형광 나노구조체를 생체물질 검출용 바이오칩 또는 키트 또는 스트립센서 상에 위치시켜 생체물질 검출용 바이오센서, 바이오칩 또는 키트를 제조하는 단계를 추가적으로 포함할 수 있다.
- [49] 본 발명은 또한, 생체물질 검출 시스템(10)에 관한 것으로, 도 1을 참조하면,
- [50] 생체물질이 주입되는 주입부 및 선형 업컨버전 형광 특성을 가지는 형광체를 포함하며, 상기 생체물질과 형광체의 반응복합체를 형성하는 반응부로 이루어진 생체물질 진단키트(120);
- [51] 상기 생체물질 진단키트의 반응부에 광원을 제공하는 광원부(110);
- [52] 상기 반응복합체의 형광체를 여기시키는 여기광의 파장보다 단파장인 발광 신호를 탐지하는 발광 신호 수집부(130); 및
- [53] 상기 수집된 발광 신호를 탐지하여 측정하는 측정부(140);를 포함하며,
- [54] 상기 광원부(110)는 상기 형광체의 최대발광파장보다 장파장의 광원을 제공하는 것을 특징으로 하는 선형 업컨버전 형광 특성을 가진 염료를 이용한 생체물질 검출 시스템(10)을 제공한다.
- [55] 상기 검출 시스템에서, 상기 형광체는 이에 제한되는 것은 아니나, Stokes' shift <100 nm 인 형광체일 수 있다.
- [56] 한편, 상기 광원부는 상기 광원으로부터 발하는 빛을 필터링하는 여기필터를

포함할 수 있으며, 상기 발광 신호 수집부는 상기 필터링된 빛을 투사시키는 렌즈를 포함할 수 있다. 한편, 상기 여기필터는 상기 광원의 소정과장만을 통과시키기 위한 것이다. 이에 더하여, 상기 발광 신호 수집부의 렌즈는 대물렌즈와 접안렌즈를 의미할 수 있으며, 상기 대물렌즈와 접안렌즈의 사이에는 통상적인 현미경과 같이, 발광필터를 포함할 수 있다. 상기 대물렌즈는 방사된 빛을 모아주기 위한 것이며, 상기 발광필터는 상기 대물렌즈로 모은 빛을 상기 측정부로 전달하여 측정이 용이하게 하기 위함이다(도 1).

[57] 이러한 광원부, 필터 및 렌즈의 배열 간격 등은 사용자가 상기 생체 물질을 관찰하기 용이하도록 배열할 수 있다.

[58] 이에 더하여, 본 발명의 상기 검출시스템에 있어서, 상기 진단 키트는 래피드 진단키트 또는 ELISA 키트인 것일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.

[59] 한편, 본 발명의 실시예에서는 진단 키트를 래피드 진단키트로 사용할 수 있다.

[60] 이러한 경우, 상기 래피드 진단키트는 시료패드, 콘주게이트패드, 신호밴드와 확인밴드로 구성된 반응부, 멤브레인 및 흡수패드로 이루어질 수 있다. 상기 시료패드는 시료를 주입하기 위한 주입부를 의미할 수 있으며, 상기 콘주게이트패드와 멤브레인은 반응부를 의미할 수 있다.

[61] 보다 구체적으로, 생체물질이 시료패드에 가해지면 액체인 시료는 건조상태의 시료패드를 적신 후, 콘주게이트 패드로 이동하여 분석대상물은 건조상태로 저장되어 있는 항체와 결합을 이루어 복합체를 형성하며, 멤브레인을 따라 이동하게 된다. 분리 멤브레인의 표면에는 신호밴드와 확인밴드가 인쇄되어 있으며, 시료내에 분석대상물이 포함되어 있는 경우 신호밴드부분에 복합체가 축적될 수 있다. 콘주게이트 패드의 항체에는 금 입자 또는 라텍스 비드 등의 물질이 연결되어 있어 일정량 이상의 복합체가 응집되는 경우 신호밴드부에서 발생하는 신호로 관찰할 수 있다.

[62] 이에 더하여, 멤브레인의 확인밴드에는 저장부의 항체와 결합하는 항체가 인쇄되어 있어 확인밴드의 신호유무를 통해 액체시료가 필요부분까지 이동 여부 및 항체의 작동여부를 판정하여 검사의 실효성 여부를 판독하는 기준으로 사용하며, 분리멤브레인의 말단에 부착된 흡수패드는 분리멤브레인을 통해 이동한 액체시료를 흡수하여 액체시료가 지속적으로 이동하도록 하는 펌프역할을 할 수 있다.

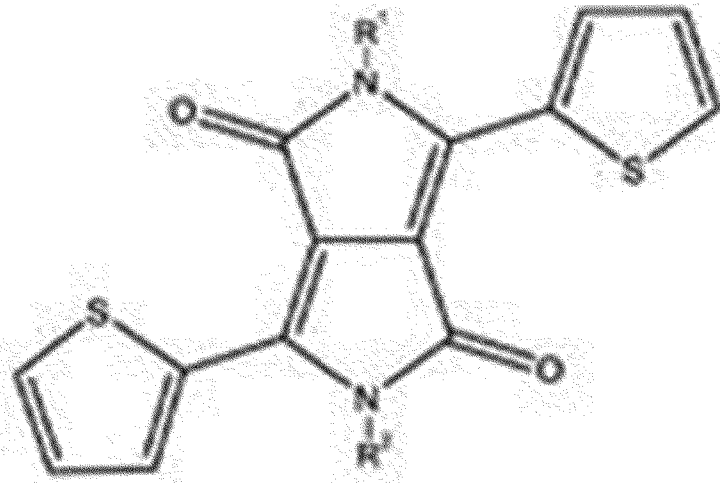
[63] 보다 구체적으로, 본 발명의 생체물질 진단키트는 선형 업컨버전 형광 특성을 이용하여 형광물질이 화학연결된 항체를 콘주게이트 패드에 건조상태로 저장하고, 시료(생체물질)를 시료패드에 주입하여 검사를 진행한다. 그 후, 시료(생체물질) 내에 분석대상물은 콘주게이트 패드로 이동하여 저장된 항체와 결합체를 이루어 분리멤브레인으로 이동한다. 신호밴드에 결합체가 축적되고, 여분의 형광물질 결합항체는 분리멤브레인을 통과하여 흡수패드에 흡수된다. 이때, 신호밴드에 선택적으로 흡착된 분석대상물과 형광물질 연결항체의 결합체는 광원부로부터 에너지를 받아 형광을 발생시킬 수 있다.

[64] 또한 상기 검출 시스템에서, 상기 선형 업컨버전 형광 특성을 나타내는 형광체는,

[65] 하기 화학식 1로 표시되는 DPP(Diketo Pyrrolo Pyrrole) 유도체, 아센, 플루오레세인, 로다민, 옥사진, 티아진, 시아닌, 루브렌, 보디피, 레조루핀 및 헤미시아닌으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상인 것일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니며, 선형 업컨버전 형광 특성을 나타내는 형광체, 바람직하게 Stokes' shift <100 nm 인 형광체라면 어느 것이든 이용가능하다.

[66] [화학식 1]

[67]



[68] (상기 화학식 1에서 R1 및 R2는 서로 동일하거나 상이한 수소, 탄소수 1 내지 탄소수 60의 치환 또는 비치환된 알킬기, 탄소수 3 내지 탄소수 30의 치환 또는 비치환된 사이클로알킬기, 탄소수 6 내지 탄소수 60의 치환 또는 비치환된 아릴기, 탄소수 2 내지 탄소수 60의 치환 또는 비치환된 헤테로아릴기, 또는 탄소수 6 내지 탄소수 60의 치환 또는 비치환된 축합 다환기를 나타낸다.)

[69] 본 발명의 구체예에서, 상기 DPP 유도체는 바람직하게

[70] 2,5-비스(2-에틸헥실)-3,6-디(티오펜-2-일)피롤로[3,4-c]피롤-1,4(2H,5H)-디온
[2,5-bis(2-ethylhexyl)-3,6-di(thiophen-2-yl)pyrrolo[3,4-c]pyrrole-1,4(2H,5H)-dione];

[71] 2,5-비스(2-에틸헥실)-2,5-디하이드로-3,6-디페닐-피롤로[3,4-c]피롤-1,4-디온
[2,5-bis(2-ethylhexyl)-2,5-dihydro-3,6-diphenyl-pyrrolo[3,4-c]pyrrole-1,4-dione];

[72] 5-(2,5-비스(2-에틸헥실)-1,2,4,5-테트라하이드로-1,4-디옥소-3-(티오펜-2-일)피롤로[3,4-c]피롤-6-일)티오펜-2-카발데히드
[5-(2,5-bis(2-ethylhexyl)-1,2,4,5-tetrahydro-1,4-dioxo-3-(thiophen-2-yl)pyrrolo[3,4-c]pyrrol-6-yl)thiophene-2-carbaldehyde]; 또는

[73] 5,5'-(2,5-비스(2-에틸헥실)-3,6-디옥소-2,3,5,6-테트라하이드로피롤로[3,4c]피롤-1,4-디일)비스(티오펜-2-카발데히드)
[5,5'-(2,5-Bis(2-ethylhexyl)-3,6-dioxo-2,3,5,6-tetrahydropyrrolo[3,4-c]pyrrole-1,4-diyl)bis(thiophene-2-carbaldehyde)]

[74] 일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니며, 가장 바람직하게 하기 화학식 2로

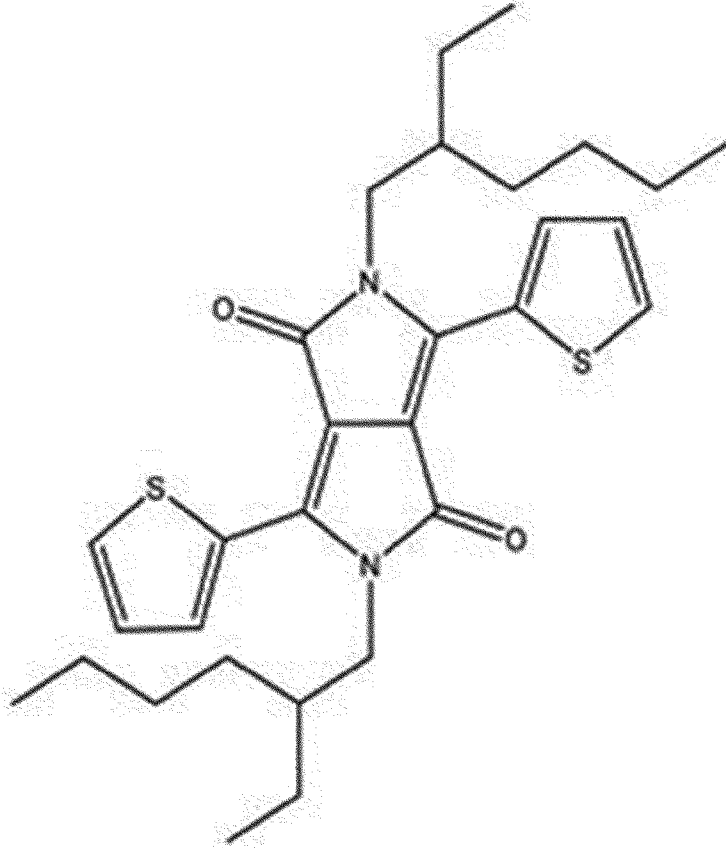
표시되는

2,5-bis(2-ethylhexyl)-3,6-di(thiophen-2-yl)pyrrolo[3,4-c]pyrrole-1,4(2H,5H)-dione 일 수 있다.

[75] [화학식 2]

[76] 2,5-비스(2-에틸헥실)-3,6-디(티오펜-2-일)피롤로[3,4-c]피롤-1,4(2H,5H)-디온

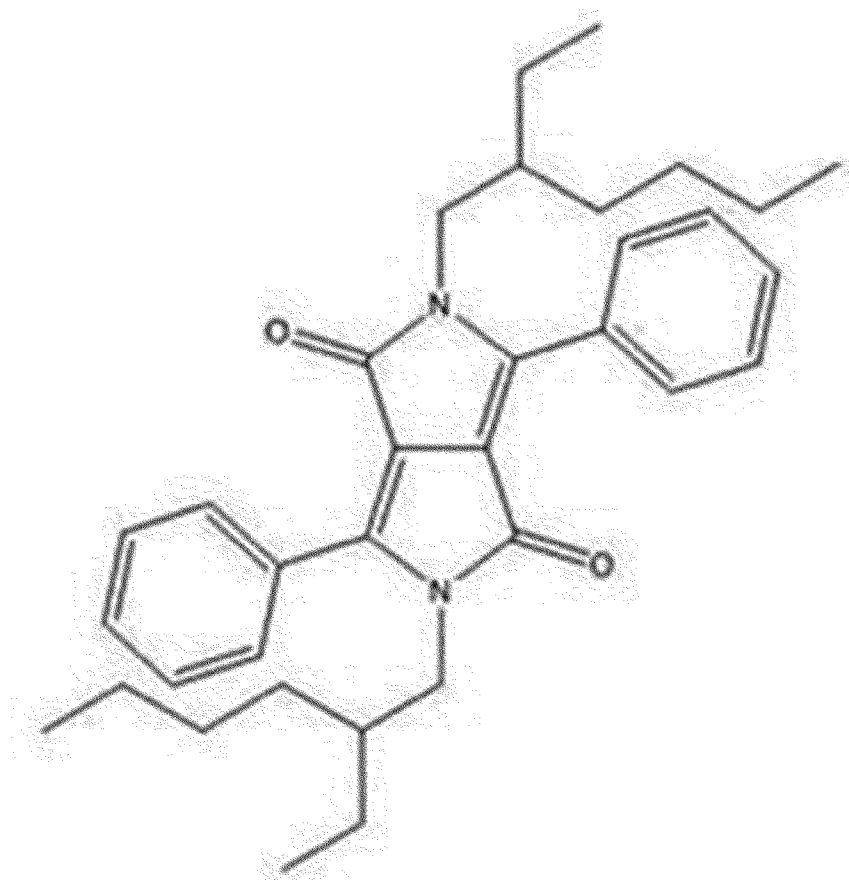
[77]



[78] [화학식 3]

[79] 2,5-비스(2-에틸헥실)-2,5-디하이드로-3,6-디페닐-피롤로[3,4-c]피롤-1,4-디온

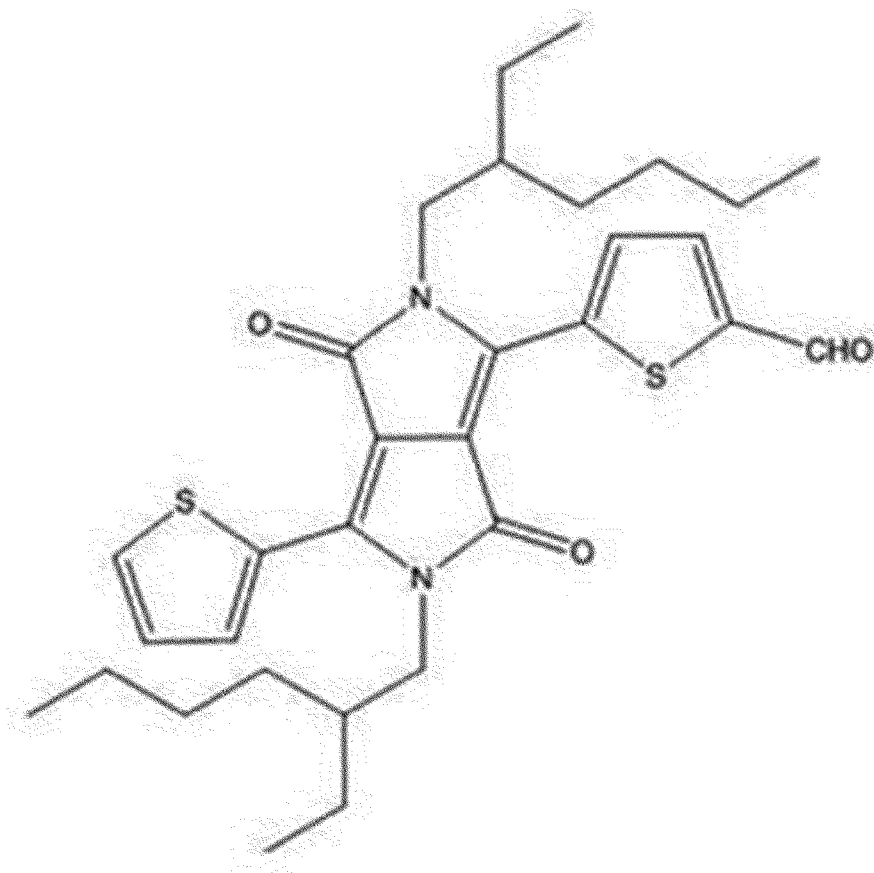
[80]



[81] [화학식 4]

[82] 5-(2,5-비스(2-에틸헥실)-1,2,4,5-테트라하이드로-1,4-디옥소-3-(티오펜-2-일)피롤로[3,4-c]피롤-6-일)티오펜-2-카발데히드

[83]

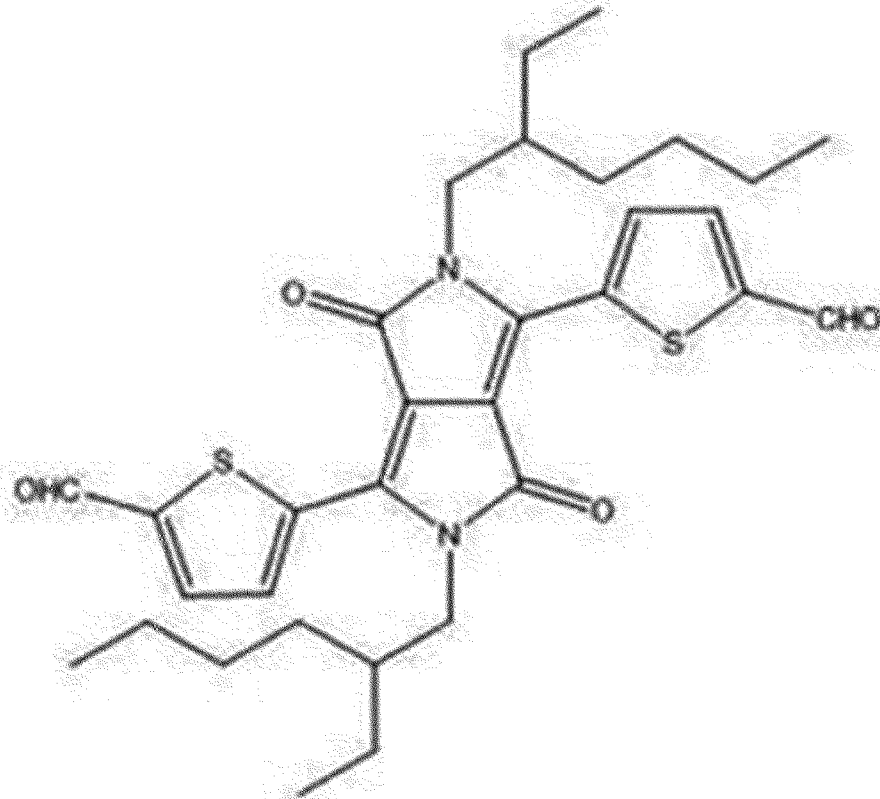


[84]

[화학식 5]

5,5'-(2,5-비스(2-에틸헥실)-3,6-디옥소-2,3,5,6-테트라하이드로피롤로[3,4c]피롤-1,4-디일)비스(티오펜-2-카발데히드)

[85]



[86] 본 발명의 상기 검출시스템에서, 상기 형광체는 그 자체로 생체물질 검출용 분자와 접할될 수 있다. 또는 바람직하게 상기 형광체는 나노구조체에 담지되거나, 나노구조체에 접합(conjugation)된 형태의 형광 나노구조체일 수 있다.

[87] 상기 나노구조체는 이에 제한되는 것은 아니나 나노입자, 나노비드, 나노에멀전, 마이셀, 리포솜 및 나노입자 현탁액으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상일 수 있다. 본 발명의 구체예에서 상기 나노구조체는 바람직하게는 폴리스티렌계 비드일 수 있다. 본 발명에서 상기 나노 비드는 바람직하게는 1~1000 nm의 크기일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.

[88] 상기 검출시스템의 상기 생체물질과 형광체의 반응복합체는, 이에 제한되는 것은 아니나, 상기 반응부 내에서 상기 형광체가 생체물질 검출용 분자와 접합되어 있고, 상기 생체물질 검출용 분자가 접합된 형광체와 상기 생체물질이 반응함으로써 형성되는 것일 수 있다.

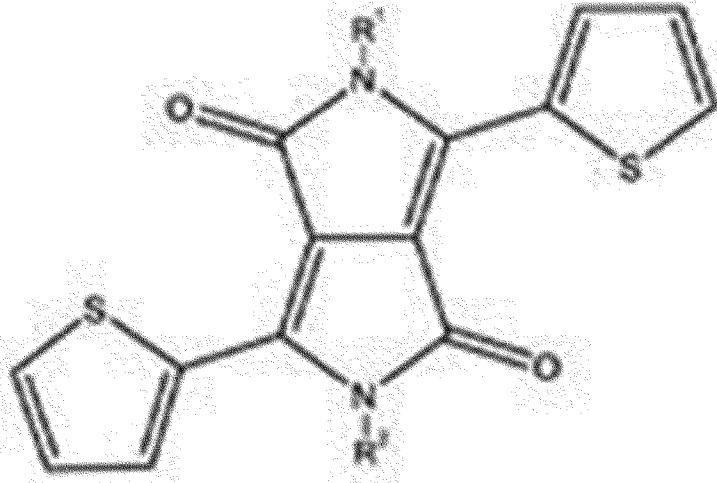
[89] 상기 검출시스템에 있어서, 상기 생체물질 검출용 분자는 단백질, 항체, 유전자, 지질, 효소, 앵타머(aptamer) 및 리간드로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니며, 검출하고자 하는 생체물질과 상보적으로 결합할 수 있는 물질이라면 어느 것이든지 가능하다.

[90] 상기 검출시스템에 있어서, 상기 형광체의 최대발광파장보다 장파장의 광원은, 이에 제한되는 것은 아니나 상기 형광체의 최대발광파장보다 5-50 nm 더 긴 장파장 영역의 광원인 것일 수 있다. 이 때, 광원은 이에 제한되는 것은 아니나,

바람직하게 LED(light emitting diode) 또는 램프인 것일 수 있다. 즉, 본 발명의 광원은 레이저 뿐만 아니라 레이저가 아닌 광원을 사용할 수 있고, 일반 LED 광원으로도 관측이 가능하므로, 본 발명의 형광 측정 시스템을 확보하는데 비용 절감 효과가 있다.

- [91] 상기 검출시스템에 있어서, 상기 형광체의 발광신호는, 여기광의 파장보다 단파장인 발광 신호로, 상기 여기광의 파장보다 10-100 nm 더 짧은 단파장 영역의 발광 신호인 것일 수 있다.
- [92] 상기 검출시스템에 있어서, 상기 생체물질은 이에 제한되는 것은 아니나 바람직하게 조직 추출물, 세포 용해물, 전혈, 혈장, 혈청, 침, 안구액, 뇌척수액, 땀, 노, 젖, 복수액, 활액, 복막액 및 혈액여지(dried blood spot)로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상인 것일 수 있다.
- [93] 본 발명은 또한, 선형 업컨버전 형광 특성을 가지는 형광체를 포함하는 선형 업컨버전 기반의 생체물질 진단 키트를 제공한다.
- [94] 본 발명의 용어 “진단 키트”는 본 발명의 선형 업컨버전 형광 나노입자 및 생체물질 검출분자를 포함하는 것으로, 표적 생체물질 검출과정에서 필요한 기타 시약, 도구 등의 구성을 추가로 포함할 수 있다. 또한 상기 진단 키트는 본 발명의 생체물질을 검출할 수 있는 래피드(rapid) 진단 키트로 제작될 수 있으며, 다양한 형태의 진단 키트로 제작될 수 있다.
- [95] 상기 생체물질 검출분자는 이에 제한되는 것은 아니나 바람직하게 단백질, 항체, 유전자, 지질, 효소, 앵타머(aptamer) 및 리간드로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상일 수 있으며, 가장 바람직하게는 항체일 수 있다.
- [96] 본 발명의 용어, “생체물질”은 생체 내외에서 발견될 수 있는 물질로서, 생체에 특정 반응을 일으키거나 특정 상태나 반응에 의해 발생하는 모든 물질을 말한다. 바람직하게는, 본 발명의 생체물질은 화합물, 단백질, DNA, RNA 또는 세포일 수 있다. 본 발명에서 용어, “표적 생체물질”은 본 발명의 진단키트가 존재 또는 함량을 검출하고자 하는 대상 물질을 의미하며, 구체적으로는 상기 진단키트를 구성하는 검출분자와 특이적 상호반응을 하는 물질을 의미한다.
- [97] 상기 선형 업컨버전 형광 나노구조체는 선형 업컨버전 형광 특성을 나타내는 형광 염료가 나노구조체에 담지되거나 또는 접합(conjugation)된 것일 수 있다.
- [98] 상기 선형 업컨버전 형광 특성을 나타내는 형광 염료는 하기 화학식 1로 표시되는 DPP(Diketo Pyrrolo Pyrrole) 유도체, 아센, 플루오르세인, 로다민, 옥사진, 티아진, 시아닌 및 헤미시아닌으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상인 것일 수 있다.
- [99] [화학식 1]

[100]



[101] (상기 화학식 1에서 R1 및 R2는 서로 동일하거나 상이한 수소, 탄소수 1 내지 탄소수 60의 치환 또는 비치환된 알킬기, 탄소수 3 내지 탄소수 30의 치환 또는 비치환된 사이클로알킬기, 탄소수 6 내지 탄소수 60의 치환 또는 비치환된 아릴기, 탄소수 2 내지 탄소수 60의 치환 또는 비치환된 헤테로아릴기, 또는 탄소수 6 내지 탄소수 60의 치환 또는 비치환된 축합 다환기를 나타낸다.)

[102] 종래의 업컨버전 나노입자(UCNPs)를 이용한 형광은 대부분 무기 나노결정의 비선형 업컨버전 방식으로 (이광자 및 다중광자를 흡수함) 이를 관측하기 위해서는 고전력의 결맞음 상태의 여기광원인 레이저가 필요한바 비용이 높고 관측이 용이하지 않았다. 그러나 본 발명의 선형 업컨버전 형광 나노 입자 기반 진단 키트는 LED 광원으로도 관측이 가능한바, 시스템 개발 비용 절감이 가능하다.

[103] 본 발명의 구체예에서는 티오펜-2-카보나이트릴(thiophene-2 carbonitrile) 및 디메틸숙시네이트(Dimethyl succinate)를 이용해 3,6-Di(thiophen-2-yl)pyrrolo[3,4-c]pyrrole-1,4(2H,5H)-dione을 합성한 후, Ethylhexyl bromide를 첨가해 2,5-bis(2-ethylhexyl)-3,6-di(thiophen-2-yl)pyrrolo[3,4-c]pyrrole-1,4(2H,5H)-dione를 합성하였다. 이후, 2,5-bis(2-ethylhexyl)-3,6-di(thiophen-2-yl)pyrrolo[3,4-c]pyrrole-1,4(2H,5H)-dione을 폴리스티렌 비드에 담지하여 신규 선형 업컨버전 나노 입자를 합성하였으며, 개발된 입자는 업컨버전 형광 특성을 나타내는 것을 확인하였다. 또한 본 발명의 신규 선형 업컨버전 나노입자를 이용해 이용해 래피드 키트(Rapid kit) 진단 시스템을 개발하였다.

[104] 다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 일반적으로, 본 명세서에서 사용된 명명법은 본 기술분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.

발명의 효과

- [105] 본 발명의 선형 업컨버전 형광 나노구조체는 배경잡음 없이 입자의 신호만을 검출할 수 있어 S/N비 및 민감도를 획기적으로 향상시킬 수 있다. 또한 본 발명의 선형 업컨버전 나노구조체의 형광은 일반 LED 광원으로도 관측이 가능하므로, 생체물질 진단 시스템 확보에 있어 비용 절감 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

- [106] 도 1은 본 발명의 생체물질 검출 시스템을 나타낸 블록도이다.
- [107] 도 2는 본 발명의 DPP-Th의 흡수 및 형광 스펙트럼 (A)과 DPP-Th가 담지된 폴리스티렌 나노비드의 선형업컨버전 형광 스펙트럼 (B)이다 (DPP-Th: 2,5-bis(2-ethylhexyl)-3,6-di(thiophen-2-yl)pyrrolo[3,4-c]pyrrole-1,4(2H,5H)-dione).
- [108] 도 3은 본 발명의 DPP-Th가 담지된 폴리스티렌 나노비드의 담지 형광체 농도에 따른 선형업컨버전 형광 특성을 나타내는 결과이다 (DPP-Th: 2,5-bis(2-ethylhexyl)-3,6-di(thiophen-2-yl)pyrrolo[3,4-c]pyrrole-1,4(2H,5H)-dione).
- [109] 도 4는 본 발명의 선형 업컨버전 형광 재료를 이용해 제조한 생체 물질 진단을 위한 래피드 키트의 모식도이다.
- [110] 도 5는 본 발명의 선형 업컨버전 형광 기반 래피드 키트 검출 시스템의 구성에 대한 모식도이다.
- [111] 도 6은 본 발명에 따른 선형 업컨버전 나노입자를 이용하여 생체물질을 검출할 수 있는 래피드 키트 측정 장치를 나타낸 것이다.
- [112] 도 7은 본 발명의 래피드 키트 진단 스트립 상에서, DPP-Th 담지 나노비드의 선형 업컨버전 형광 신호 감도를 일반 다운컨버전 형광 신호와 비교하여 나타낸 결과이다.
- [113] 도 8은 본 발명의 래피드 키트 진단 스트립 상에서의 인간 혈청(human serum) 대비 DPP-Th 담지 나노비드 (A), Rubrene 담지 고분자 계면활성제 미셀 나노입자 (micelle, Pluronic F127) (B), Resorufin 수용액 (C), Rhodamine B 수용액 (D)의 선형 업컨버전 형광 신호 감도를 일반 다운컨버전 형광과 비교하여 나타낸 결과이다.
- [114] 도 9a 및 도 9b는 본 발명에 따른 선형 업컨버전 나노입자를 이용하여 래피드 키트 기반의 멤브레인 상에서 면역반응을 확인한 결과이다.
- [115] 도 10은 본 발명에 따른 선형 업컨버전 나노입자를 이용한 래피드 진단 키트 적용 결과이다.
- [116] 도 11은 본 발명에 따른 선형 업컨버전 형광 특성을 활용하여 유전자 분석을 수행한 결과이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [117] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는 것은 이 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.
- [118] 실시예 1. 선형 업컨버전 염료(DPP-Th) 합성

- [119] 실시예 1-1. 3,6-Di(thiophen-2-yl)pyrrolo[3,4-c]pyrrole-1,4(2H,5H)-dione 의 합성
- [120] 소듐(2.65 g, 0.13 mol) 및 FeCl₃ 의 혼합물을 t-아밀 알코올(250 mL)에 용해하였다. 혼합물은 용액이 연한 노란색으로 변할때까지 110°C 에서 교반하였다. 3시간동안 110°C 에서 가열한 후, 티오펜-2 카보나이트릴(thiophene-2 carbonitrile, 11.9 g, 0.12 mol)을 반응 혼합물에 넣고 0.5 시간동안 유지하였다. 디메틸 숙시네이트(Dimethyl succinate, 5.29 g, 0.04 mol)를 1.5시간 동안 드롭방식(drop-wise)으로 천천히 첨가하고, 반응 혼합물을 120°C 에서 4시간 동안 교반하였다. 이후, 0°C로 쿨링하고, 반응 혼합물을 MeOH/HCl 에 침강시켰다. 얻어진 고체를 정제하고 뜨거운 MeOH 로 세척하고, 감압하여 건조하였다. 상기 방법으로 어두운 붉은색 고체인 3,6-Di(thiophen-2-yl)pyrrolo[3,4-c]pyrrole-1,4(2H,5H)-dione를 10.2 g (84.8 %) 얻어 정제 없이 사용하였다.
- [121] 실시예 1-2. 2,5-bis(2-ethylhexyl)-3,6-di(thiophen-2-yl)pyrrolo [3,4-c]pyrrole-1,4(2H,5H)-dione(DPP-Th)의 합성
- [122] 상기 실시예 1-1에서 얻어진 3,6-Di(thiophen-2-yl)pyrrolo[3,4-c]pyrrole-1,4(2H,5H)-dione (4 g, 0.013 mol) 및 K₂ CO₃ (5.5 g, 0.039 mol) 를 아르곤 상태에서 DMF (140 mL)에 현탁하였다. 반응 혼합물을 110 °C에서 3시간동안 교반하였다. 드롭 방식으로 2-에틸헥실 브로마이드(2-Ethylhexyl bromide, 9 g, 0.046 mol)를 첨가하고, 24시간동안 반응 혼합물을 유지하였다. 상온에서 쿨링 후, 용매는 회전농축기(rotary evaporator)로 제거하였다. 이후, 물을 첨가하고, 물로 크루드를 정제하였다. 잔여물은 MeOH로 재결정하여 정제하였다. 최종적으로 갈색 고체인 2,5-bis(2-ethylhexyl)-3,6-di(thiophen-2-yl)pyrrolo[3,4-c]pyrrole-1,4(2H,5H)-dione 1.1g(15.7 %)을 얻었다.
- [123] 실시예 2. 선형 업컨버전 나노비드 제조 및 선형 업컨버전 나노비드의 형광 특성
- [124] 실시예 1에서 얻은 5×10⁻⁵ M의 100μL DPP-Th 의 THF(Tetrahydrofuran) 용액을 0.4 w/v% 카복실화된 폴리스티렌 비드(100 nm, 인바이트로젠) 600μL 에 첨가하였다. 혼합액을 상온에서 30분간 천천히 교반하였다. 이후, 회전농축기로 THF를 제거하여 선형 업컨버전 나노비드를 제조하였다.
- [125] 이에 더하여, 도 2 는 본 발명의 DPP-Th의 흡수 및 형광 스펙트럼 (A)과 DPP-Th가 담지된 폴리스티렌 나노비드의 선형업컨버전 형광 스펙트럼 (B)이다 (DPP-Th: 2,5-bis(2-ethylhexyl)-3,6-di(thiophen-2-yl)pyrrolo[3,4-c]pyrrole-1,4(2H,5H)-dione). 상기 형광체는 약 20 nm의 Stokes' shift를 가지며, 담지된 폴리스티렌 나노비드는 580 nm 여기 하에서 여기광보다 단파장 영역(540-570 nm)의 형광 성분을 가지는 것을 확인할 수 있다.
- [126] 구체적으로, 신규 선형 업컨버전 나노구조체의 형광 특성을 확인하였다. 그

결과, 개발된 입자는 장파장 빛을 흡수해 단파장 빛을 방출하는 업컨버전 형광 성분을 가지는 것을 확인하였다. 또한 담지된 형광 염료의 농도에 따른 형광 강도(intensity)를 측정하였다. 그 결과를 도 3에 나타내었다.

- [127] 실시예 3. 선형 업컨버전 나노입자 기반 래피드(Rapid) 진단 키트 및 측정 시스템 개발
- [128] 실시예 2의 선형 업컨버전 나노입자를 이용해 생체 물질 진단을 위한 래피드 키트를 개발하였다 (도 4).
- [129] 래피드 키트(120)는 일반적으로 알려진 구성을 바탕으로 제작하였다. 구체적으로, 시료패드(121), 컨쥬게이션 패드(122), 멤브레인(125) 및 흡수 패드를 포함한 래피드 진단 키트(120)를 제작하였다.
- [130] 한편, 상기 래피드 진단키트(120)의 시료패드는 본 발명의 주입부(121)를 의미하며, 상기 컨쥬게이션 패드(122), 신호패드(123), 확인밴드(124), 멤브레인(125) 및 흡수 패드는 반응부(126)를 의미한다.
- [131] 이에 더하여, 상기 선형 업컨버전 나노입자 기반 래피드 진단 키트(120)를 이용하여 도 5에 나타난 생체 물질 검출 시스템(10)을 구축하였다. 구체적으로, LED 광원(110)은 여기광이 여기필터(미도시)를 거쳐 래피드 진단 키트(110)에 조사되도록 위치하며, 진단 키트(120) 상에서 발생한 형광은 대물렌즈(131) 발광필터(132) 및 접안렌즈(133)를 거쳐 측정부(140)에 도달하도록 위치하였다. 상기 대물렌즈(131)는 키트(120) 상에 초점거리가 맞도록 배열되어, 키트(120) 상의 해당 초점영역의 형광 신호를 측정하도록 설계되었다 (도 5 및 6).
- [132] 실시예 4. 선형 업컨버전 나노비드의 혈청 시료상에서의 형광 신호 감도 테스트
- [133] 실시예 2의 선형 업컨버전 나노입자를 이용해 진단 스트립 상에서의 혈청(background) 대비 선형 업컨버전 형광의 신호 감도를 측정하였다 (도 7). 먼저, 1 μ l FBS (fetal bovine serum) 및 FBS에 1/10로 희석된 DPP-Th 나노비드 (4 mg/ml in DW)를 진단 스트립 상에 각각 위치시켰다. 그 후, 하기 표 1의 조건에 따른 이미징 시스템을 이용해 선형 업컨버전 형광 특성을 확인하였다. 본 명세서상의 선형 업컨버전 형광 및 일반 형광 특성은 하기 표 1의 조건에서 측정한 것이다.
- [134] [표1]
선형 업컨버전 형광 및 일반 다운컨버전 형광 측정 조건

	일반 형광 (다운컨버전)	선형 업컨버전 형광
여기광 파장	500 nm	590 nm
측정 발광 파장	585 nm	550 nm

- [135] 도 7을 통해, 본 발명에 따른 선형 업컨버전 형광 특성을 이용하면, LED 등의 광원을 이용해서 배경잡음 없이 표적신호를 고감도로 측정할 수 있음을 알 수 있다.

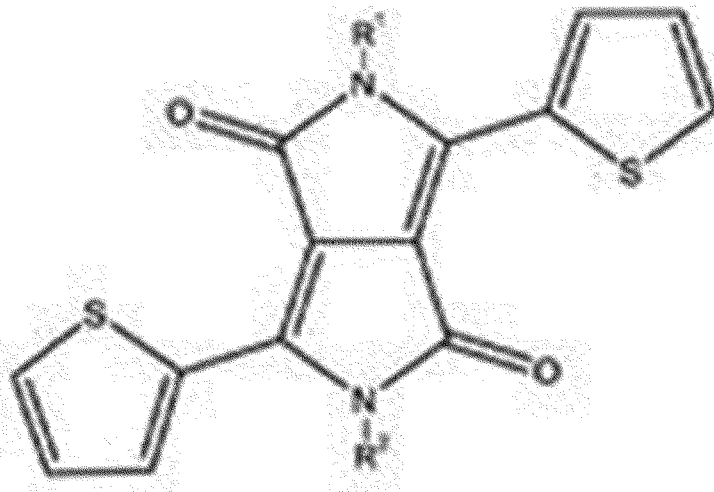
- [136] 실시예 5. 선형 업컨버전 형광체의 혈청시료 상에서의 형광 신호 감도 테스트
- [137] 실시예 2의 DPP-Th 담지 나노입자뿐만 아니라 Rubrene 담지 고분자 계면활성제 미셀 나노입자 (micelle, Pluronic F127), Resorufin 수용액, Rhodamine B 수용액의 혈청 시료 대비 선형 업컨버전 형광 신호 감도를 다운컨버전 형광과 비교하였다. Rubrene 담지 미셀 나노입자는 고분자 계면활성제 (Pluronic F127) 20 mg, rubrene 1 mg를 THF 용액상에서 건조한 후 증류수를 첨가하여 재분산하여 준비하였다 (rubrene의 최종농도 4×10^{-4} M로 희석하였다). Resorufin 수용액과 Rhodamine B 수용액은 10^{-5} M의 농도로 각각 인산완충용액 (PBS, pH 8.0)와 증류수에 준비하였으며, DPP-Th 는 염료 농도 10^{-5} M로 희석하여 준비하였다. 상기 재료들은 human serum과 1:1 부피비로 혼합하여 진단 스트립상에 위치한 후 선형 업컨버전 형광 특성을 확인하였다(도 8). 도 8에 나타난 바와 같이, 본 발명에 따른 선형 업컨버전 형광은 일반 형광과 비교하여 혈청(serum)의 자가형광에 의한 배경잡음이 거의 없음을 확인할 수 있다.
- [138] 실시예 6. 선형 업컨버전 나노입자를 이용한 면역반응 확인
- [139] 실시예 2의 선형 업컨버전 나노입자의 표면에 항체를 수식하고 니트로셀룰로오스 멤브레인 상에서 혈청과 단백질 용액을 사용하여 면역반응 실험을 수행하였다. 항체 수식 공정은 다음과 같다: 실시예 2의 선형 업컨버전 나노입자가 포함된 수용액(1 ml, 3 mg/ml)에 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride 수용액($30 \mu\text{l}$, 100 mg/ml)를 첨가하고, 실온에서 15분 동안 반응시켰다. 여기에 항 C-reactive protein(CRP) 다클론 항체(pAb-CRP; Millipore사, Calbiochem)를 첨가하고($15 \mu\text{l}$, 10 mg/ml) 실온에서 90분 동안 반응시켰다. 12,000 rpm에서 15분간 원심분리를 하여 3회 세척을 수행하고 3% Bovine serum albumin (BSA)로 블락킹하였다.
- [140] 니트로셀룰로오스 멤브레인 상에서의 면역반응 확인을 위한 실험은 다음과 같이 수행하였다. control 항체(antirabbit IgG; R&D system)와 test 항체(mAb-CRP; R&D system)가 고정된 멤브레인을 블락킹 버퍼(1 % BSA 포함 PBS)로 블락킹을 수행하고 PBS로 세 번 세척하였다. 이후 상기 막 전반에, 상기 항체 수식된 선형 업컨버전 나노입자, 항원(CRP) 및 혈청이 혼합된 용액을 도포한 후 PBST로 세 번 세척하였다. 상기 면역반응 실험 수행 후 니트로셀룰로오스 멤브레인부의 형광을 측정하여 그 결과를 도 9a 및 도 9b에 나타내었다. 도 9a에 나타난 것과 같이, 혈청 자체가 PBST 세척 후에도 막 전반에 걸쳐 흡착되는 것을 일반 형광에서 확인 할 수 있다. 상기 항원과 항체 수식된 선형 업컨버전 나노입자, 혈청의 혼합물이 도포되었을 시, control 및 test 항체 고정부에서 선택적으로 강한 형광이 나오는 것을 알 수 있다. 일반 형광에서는 도포 용액에 포함된 혈청의 멤브레인 흡착에 따른 형광 신호가 함께 검출되어 강한 배경 잡음으로 작용하는 반면, 선형 업컨버전 형광에서는 항체 고정부에 결합한 나노입자의 신호가 높은 감도로 측정됨을 알 수 있다.
- [141] 실시예 7. 선형 업컨버전 나노입자 기반 래피드(Rapid) 진단 키트 적용

- [142] 실시예 3에 따른 진단 키트의 컨쥬게이션 패드에 실시예 6의 항체수식 선형 업컨버전 나노입자를 담지하고 용출 로딩(eluent loading)을 통한 입자 유동 특성을 선형업컨버전 신호로 관측하였다. 그 결과를 도 10에 나타내었다. 도 10에 나타난 것과 같이, 선형 업컨버전 형광 모드에서 입자 유동 특성이 확인되고 멤브레인 영역의 배경 잡음이 최소화된 신호를 관측할 수 있다.
- [143] 실시예 8. 선형 업컨버전 형광 기반 유전자 분석
- [144] 선형업컨버전 형광 특성을 유전자 분석에 적용하였다. 프로브 유전자가 컨쥬게이션된 금속 나노입자를 이용하여 타겟 유전자를 검출하는 방법은 알려져 있다. 본 실시예에서는 종래 알려진 방법에 본 발명에 따른 선형 업컨버전 형광 기술을 적용하였다. 구체적으로, 금 나노입자-형광체 플랫폼(gold nanobeacon)을 제작하여 타겟 DNA 혼성화반응을 통해 턴-온(turn-on) 형광센서로 활용할 수 있다. 유전자 분석에 사용한 유전자 서열은 다음과 같다:
- [145] 프로브 DNA 서열(hairpin type): 5'-SH-(CH₂)₆-TCG CTG AGA TCG GGA TCC CCA AAA TCA GCG A-(CH₂)₆-TAMRA-3' (바이오니아)
- [146] 타겟 DNA 서열: 5'-GGG GAT CCC GAT CTC AG-3' (바이오니아)
- [147] 15 nm Au NP 및 프로브 DNA 를 1:100의 몰비로 반응시켰다. 그 다음 상기 반응물에 NaCl 용액을 (5 M)을 1시간 간격으로 총 4회에 걸쳐 첨가하여 최종 NaCl 농도가 0.3 M이 되도록 하였다. 그리고 세 번의 원심분리를 수행하여 정제하였다(14,000 rpm, 30 min, 4 °C)
- [148] 상기 프로브 DNA가 컨쥬게이션된 금 나노입자를 타겟 DNA와 반응시킨 다음 형광을 측정하였다. 구체적으로, 1.5 nM 나노비콘과 100 nM 타겟 DNA(pH 7 Tris 버퍼)를 37 °C에서 1시간 동안 반응한 후, 발생한 형광 신호를 혈청의 유무에 따라 비교하였다. 그 결과를 도 11에 나타내었다.
- [149] 도 11을 보면, 소광되어 있던 형광체(TAMRA)의 형광이 타겟 DNA에 의해 디켄칭 (dequenching)되는 것을 혈청이 없는 환경에서 관측할 수 있다. 혈청이 존재하는 환경(50% 부피비)에서, 타겟 DNA에 의해 발생한 형광 신호가 혈청의 자가형광에 묻히는 것이 일반 형광 모드에서 관측된다. 그러나 선형 업컨버전 형광 모드에서는 혈청의 유무에 관계없이 형광체의 발생 형광 신호가 뚜렷이 관측되는 것을 알 수 있다.
- [150] <부호의 설명>
- [151] 10: 생체물질 검출 시스템
- [152] 110: 광원부
- [153] 120: 진단키트
- [154] 121: 주입부 122: 콘쥬게이트패드
- [155] 123: 신호밴드 124: 확인밴드
- [156] 125: 멤브레인 126: 반응부
- [157] 130: 발광신호 수집부 131: 대물렌즈
- [158] 132: 발광필터 133: 접안렌즈

[159] 140: 측정부

청구범위

- [청구항 1] i) 선형 업컨버전 형광 특성을 가지는 형광체를 준비하고;
 ii) 상기 형광체와 생체물질을 반응시켜서 형광체와 생체물질의 반응복합체를 형성하고;
 iii) 상기 반응복합체를, 상기 형광체의 최대발광파장보다 장파장의 광원으로 여기시키고;
 iv) 상기 여기된 반응복합체로부터 방출되는, 여기광의 파장보다 단파장인 발광 신호를 탐지하여 측정하는;
 단계를 포함하는, 선형 업컨버전 형광 특성을 가진 염료를 이용한 생체물질 검출 방법.
- [청구항 2] 제1항에 있어서,
 상기 형광체는 Stokes' shift <100 nm 인 형광체인, 방법.
- [청구항 3] 제1항에 있어서,
 상기 선형 업컨버전 형광 특성을 나타내는 형광체는,
 하기 화학식 1로 표시되는 DPP(Diketo Pyrrolo Pyrrole) 유도체, 아센, 플루오레세인, 로다민, 옥사진, 티아진, 시아닌, 루브렌, 보디피, 레조루핀 및 헤미시아닌으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상인 방법:
 [화학식 1]



(상기 화학식 1에서 R1 및 R2는 서로 동일하거나 상이한 수소, 탄소수 1 내지 탄소수 60의 치환 또는 비치환된 알킬기, 탄소수 3 내지 탄소수 30의 치환 또는 비치환된 사이클로알킬기, 탄소수 6 내지 탄소수 60의 치환 또는 비치환된 아릴기, 탄소수 2 내지 탄소수 60의 치환 또는 비치환된 헤테로아릴기, 또는 탄소수 6 내지 탄소수 60의 치환 또는 비치환된 축합 다환기를 나타낸다.)

- [청구항 4] 제3항에 있어서,
 상기 DPP 유도체는,

2,5-비스(2-에틸헥실)-3,6-디(티오펜-2-일)피롤로[3,4-c]피롤-1,4(2H,5H)-디온;

2,5-비스(2-에틸헥실)-2,5-디하이드로-3,6-디페닐-피롤로[3,4-c]피롤-1,4-디온;

5-(2,5-비스(2-에틸헥실)-1,2,4,5-테트라하이드로-1,4-디옥소-3-(티오펜-2-일)피롤로[3,4-c]피롤-6-일)티오펜-2-카발데히드; 또는

5,5'-(2,5-비스(2-에틸헥실)-3,6-디옥소-2,3,5,6-테트라하이드로피롤로[3,4c]피롤-1,4-디일)비스(티오펜-2-카발데히드)인 방법.

[청구항 5] 제1항에 있어서,
상기 i) 단계에서, 상기 형광체는 나노구조체에 담지되거나, 나노구조체에 접합된 형태의 형광 나노구조체인 것인, 방법.

[청구항 6] 제5항에 있어서,
상기 나노구조체는 나노입자, 나노비드, 나노에멀전, 마이셀, 리포솜 및 나노입자 현탁액으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상인 것인, 방법.

[청구항 7] 제1항에 있어서,
상기 ii) 단계는, 상기 형광체가 생체물질 검출용 분자와 접합하고, 상기 생체물질 검출용 분자가 접합된 형광체와 상기 생체물질이 반응하여 상기 형광체와 생체물질의 반응복합체를 형성하는 것인, 방법.

[청구항 8] 제7항에 있어서,
상기 생체물질 검출용 분자는 단백질, 항체, 유전자, 지질, 효소, 앵타머(aptamer) 및 리간드로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상인 것인, 방법.

[청구항 9] 제1항에 있어서,
상기 iii) 단계는, 상기 형광체의 최대발광파장보다 5-50 nm 더 긴 장파장 영역의 광원으로 여기하는 것인, 방법.

[청구항 10] 제1항에 있어서,
상기 iii) 단계의 광원은 레이저, LED(light emitting diode) 또는 램프인 방법.

[청구항 11] 제1항에 있어서,
상기 iv) 단계는, 반응복합체로부터 방출되는 발광 신호가, 상기 여기광의 파장보다 10-100 nm 더 짧은 단파장 영역의 발광 신호인 것인 방법.

[청구항 12] 제1항에 있어서,
상기 생체물질은 조직 추출물, 세포 용해물, 전혈, 혈장, 혈청, 침, 안구액, 뇌척수액, 땀, 뇨, 젖, 복수액, 활액, 복막액 및 혈액여지(dried blood spot)로 이루어진 군에서 선택되는 것인 방법.

[청구항 13] 생체물질이 주입되는 주입부 및 선형 업컨버전 형광 특성을 가지는 형광체를 포함하며, 상기 생체물질과 형광체의 반응복합체를 형성하는

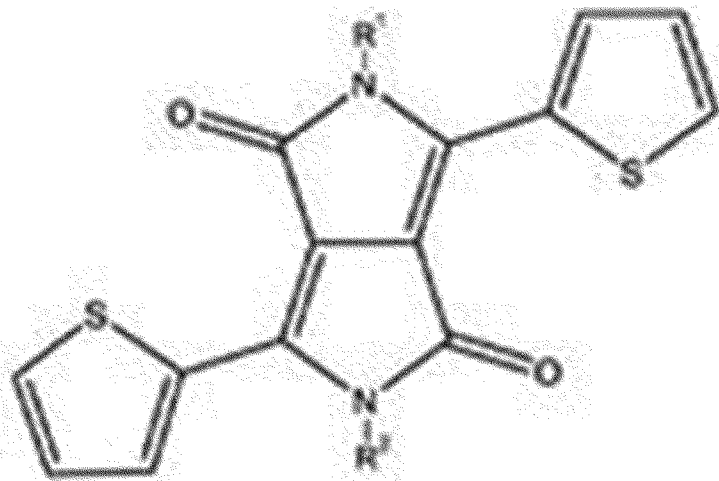
반응부로 이루어진 생체물질 진단키트;
 상기 생체물질 진단키트의 반응부에 광원을 제공하는 광원부;
 상기 반응복합체의 형광체를 여기시키는 여기광의 파장 보다 단파장인
 발광 신호를 탐지하는 발광 신호 수집부; 및
 상기 수집된 발광 신호를 탐지하여 측정하는 측정부;를 포함하며,
 상기 광원부는 상기 형광체의 최대발광파장보다 장파장의 광원을
 제공하는 것을 특징으로 하는 선형 업컨버전 형광 특성을 가진 염료를
 이용한 생체물질 검출 시스템.

[청구항 14] 제13항에 있어서,
 상기 광원부는
 상기 광원으로부터 발하는 빛을 필터링하는 여기필터; 및
 상기 여기필터의 전면에 위치하며, 필터링된 빛을 투사시키는 렌즈;를
 포함하는 생체물질 검출 시스템.

[청구항 15] 제13항에 있어서,
 상기 형광체는 Stokes' shift <100 nm 인 형광체인, 생체물질 검출 시스템.

[청구항 16] 제13항에 있어서,
 상기 선형 업컨버전 형광 특성을 나타내는 형광체는,
 하기 화학식 1로 표시되는 DPP(Diketo Pyrrolo Pyrrole) 유도체, 아센,
 플루오레세인, 로다민, 옥사진, 티아진, 시아닌, 루브렌, 보디피, 레조루핀
 및 헤미시아닌으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상인
 생체물질 검출시스템:

[화학식 1]



(상기 화학식 1에서 R1 및 R2는 서로 동일하거나 상이한 수소, 탄소수 1
 내지 탄소수 60의 치환 또는 비치환된 알킬기, 탄소수 3 내지 탄소수 30의
 치환 또는 비치환된 사이클로알킬기, 탄소수 6 내지 탄소수 60의 치환
 또는 비치환된 아릴기, 탄소수 2 내지 탄소수 60의 치환 또는 비치환된
 헤테로아릴기, 또는 탄소수 6 내지 탄소수 60의 치환 또는 비치환된 축합

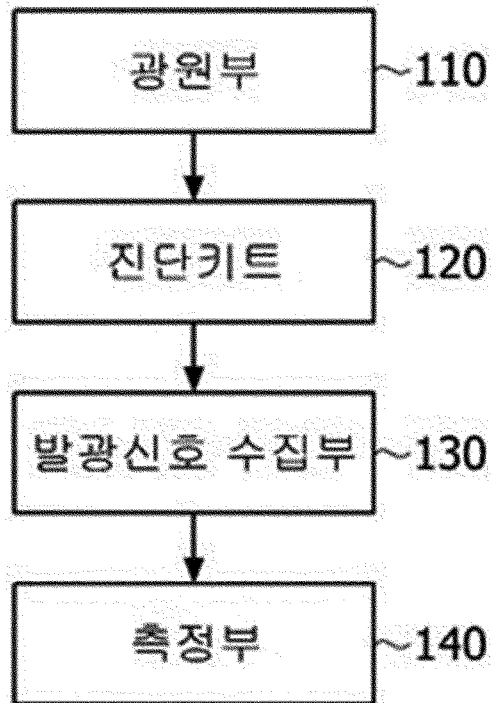
- 다환기를 나타낸다.)
- [청구항 17] 제16항에 있어서,
상기 DPP 유도체는,
2,5-비스(2-에틸헥실)-3,6-디(티오펜-2-일)피롤로[3,4-c]피롤-1,4(2H,5H)-디온;
2,5-비스(2-에틸헥실)-2,5-디하이드로-3,6-디페닐-피롤로[3,4-c]피롤-1,4-디온;
5-(2,5-비스(2-에틸헥실)-1,2,4,5-테트라하이드로-1,4-디옥소-3-(티오펜-2-일)피롤로[3,4-c]피롤-6-일)티오펜-2-카발데히드; 또는
5,5'-(2,5-비스(2-에틸헥실)-3,6-디옥소-2,3,5,6-테트라하이드로피롤로[3,4c]피롤-1,4-디일)비스(티오펜-2-카발데히드)인 생체물질 검출 시스템.
- [청구항 18] 제13항에 있어서,
상기 형광체는 나노구조체에 담지되거나, 나노구조체에 접합된 형태의 형광 나노구조체인 것인, 생체물질 검출 시스템.
- [청구항 19] 제18항에 있어서,
상기 나노구조체는 나노입자, 나노비드, 나노에멀전, 마이셀, 리포솜 및 나노입자 현탁액으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상인 것인, 생체물질 검출 시스템.
- [청구항 20] 제13항에 있어서,
상기 생체물질과 형광체의 반응복합체는, 상기 반응부 내에서 상기 형광체가 생체물질 검출용 분자와 접합되어 있고, 상기 생체물질 검출용 분자가 접합된 형광체와 상기 생체물질이 반응함으로써 형성되는 것인, 생체물질 검출 시스템.
- [청구항 21] 제20항에 있어서,
상기 생체물질 검출용 분자는 단백질, 항체, 유전자, 지질, 효소, 앵타머(aptamer) 및 리간드로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상인 것인, 생체물질 검출 시스템.
- [청구항 22] 제13항에 있어서,
상기 형광체의 최대발광파장보다 장파장의 광원은, 상기 형광체의 최대발광파장보다 5-50 nm 더 긴 장파장 영역의 광원인 것인, 생체물질 검출 시스템.
- [청구항 23] 제13항에 있어서,
상기 여기 광원부의 광원은 LED(light emitting diode) 또는 램프인 생체물질 검출 시스템.
- [청구항 24] 제13항에 있어서,
상기 형광체의 발광 신호는, 상기 여기파장보다 10-100 nm 더 짧은 단파장 영역의 발광 신호인 것인 생체물질 검출 시스템.
- [청구항 25] 제13항에 있어서,

상기 생체물질은 조직 추출물, 세포 용해물, 전혈, 혈장, 혈청, 침, 안구액, 뇌척수액, 땀, 뇨, 젖, 복수액, 활액, 복막액 및 혈액여지(dried blood spot)로 이루어진 군에서 선택되는 것인 생체물질 검출 시스템.

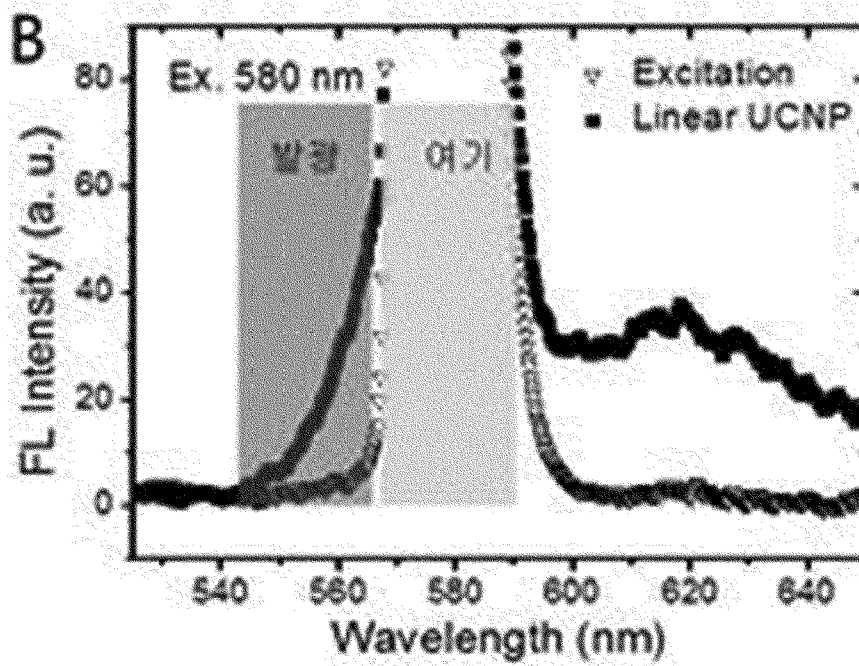
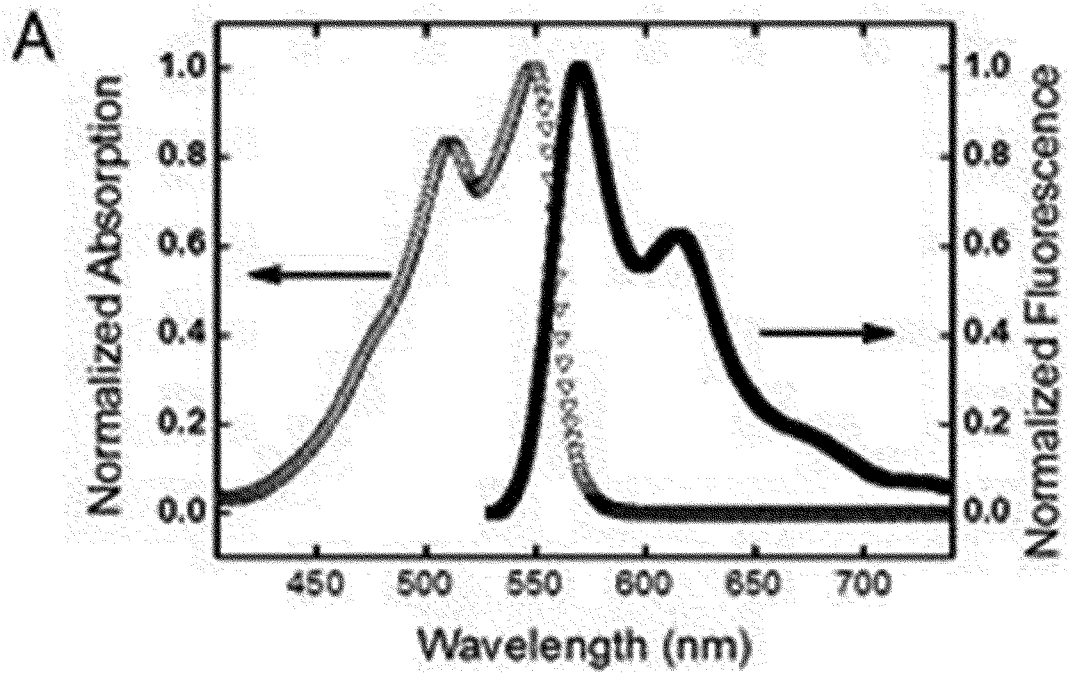
[청구항 26] 제13항에 있어서,
상기 진단 키트는 래피드 진단키트 또는 ELISA 키트인 생체물질 검출 시스템.

[청구항 27] 선형 업컨버전 형광 특성을 가지는 형광체를 포함하는 선형 업컨버전 기반의 생체물질 진단 키트.

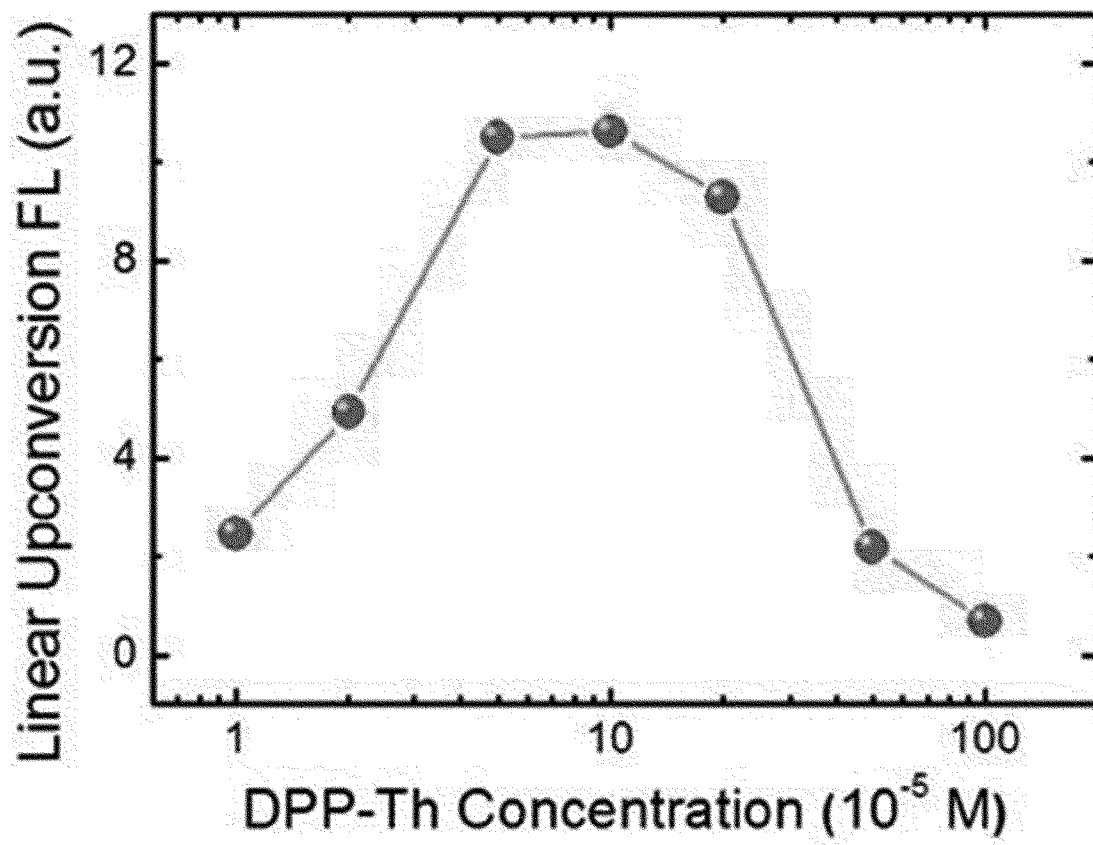
[도1]

10

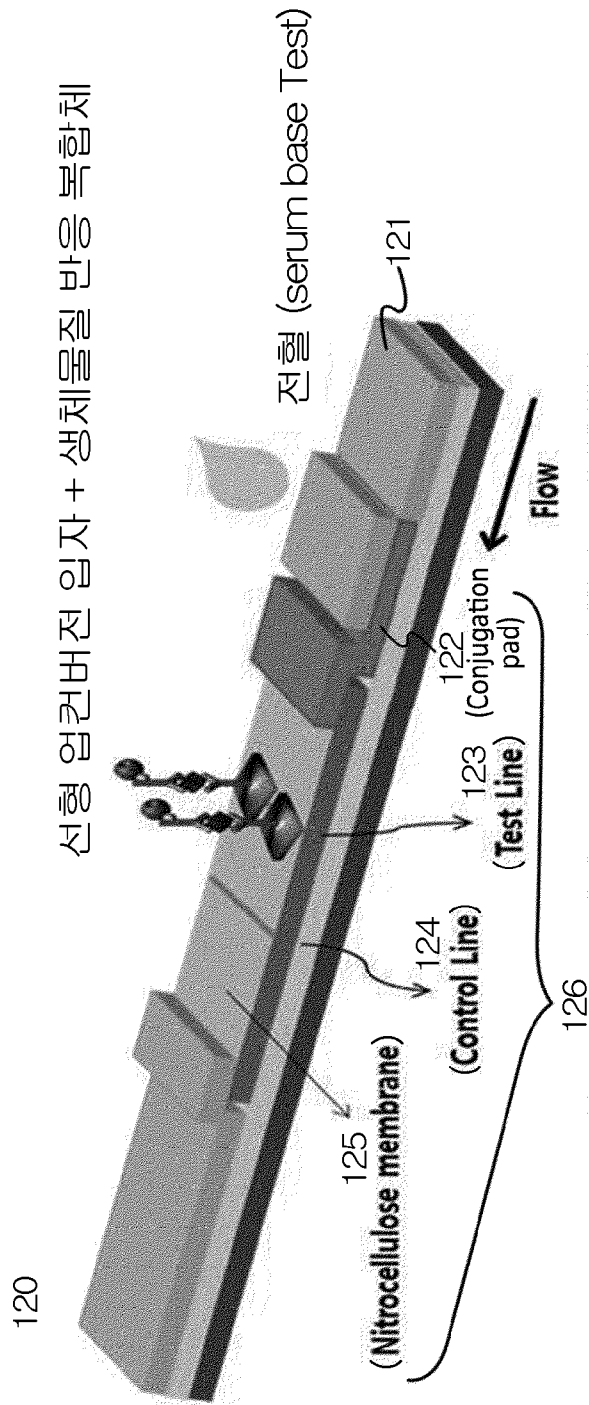
[도2]



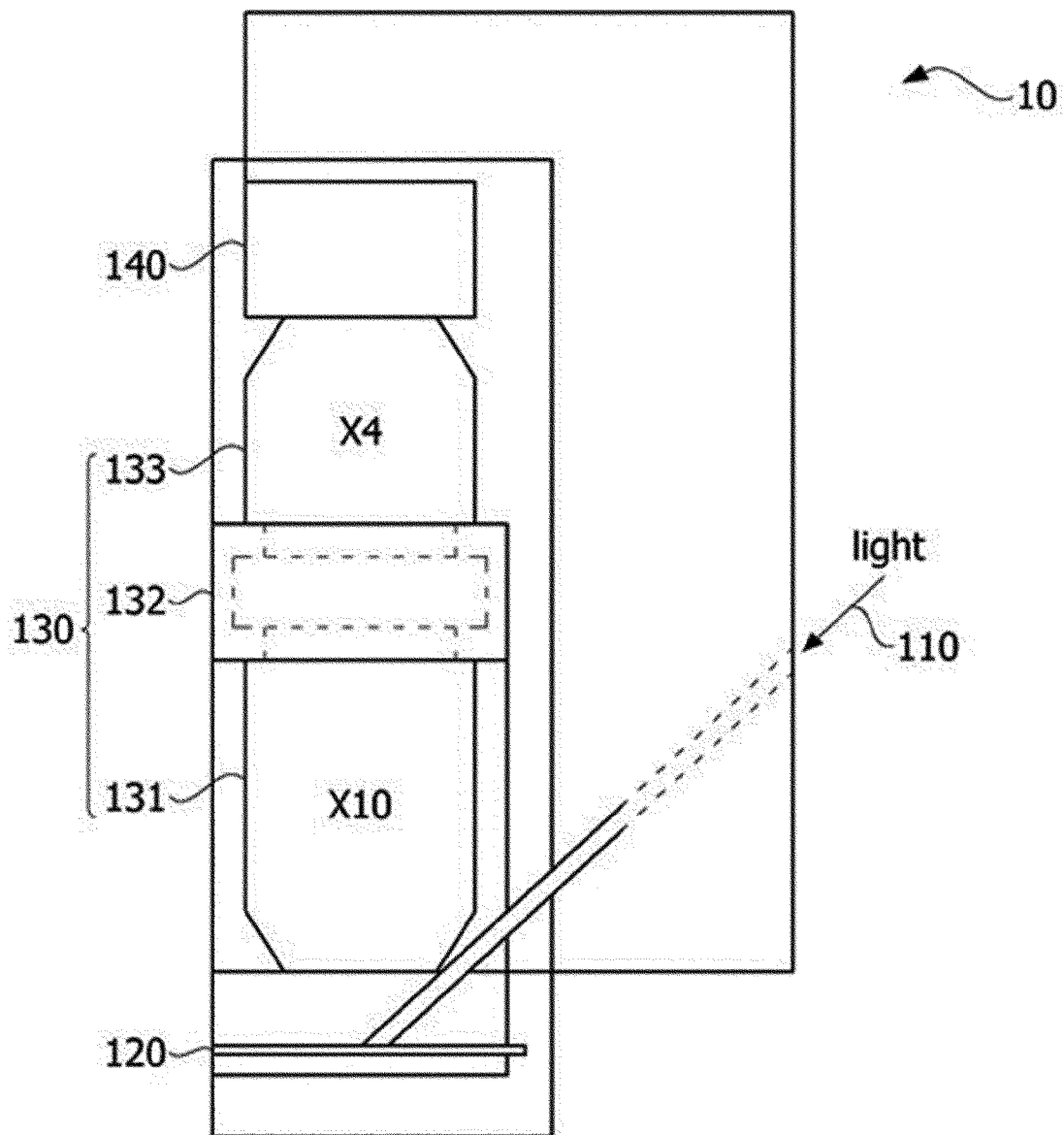
[도3]



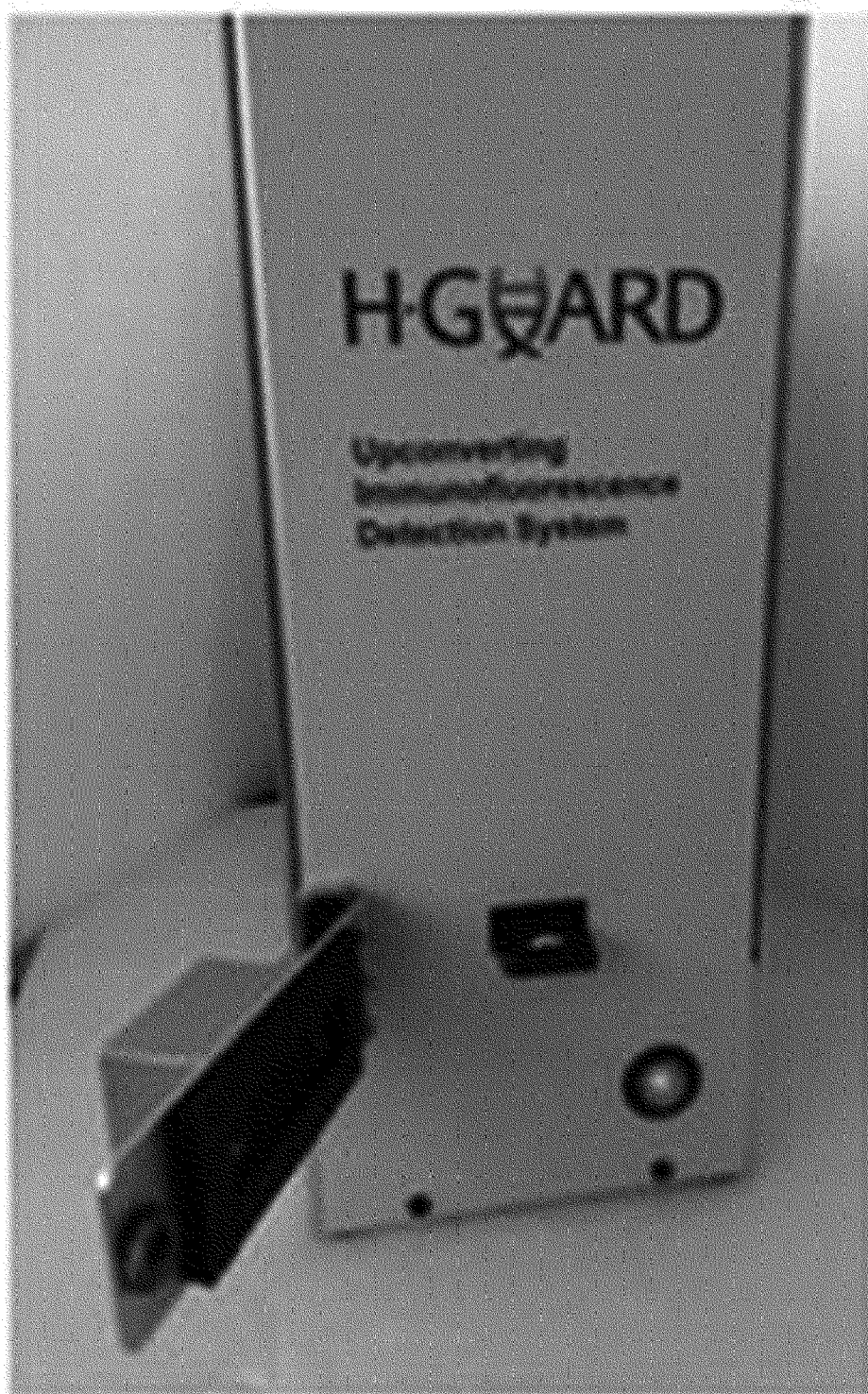
[도4]



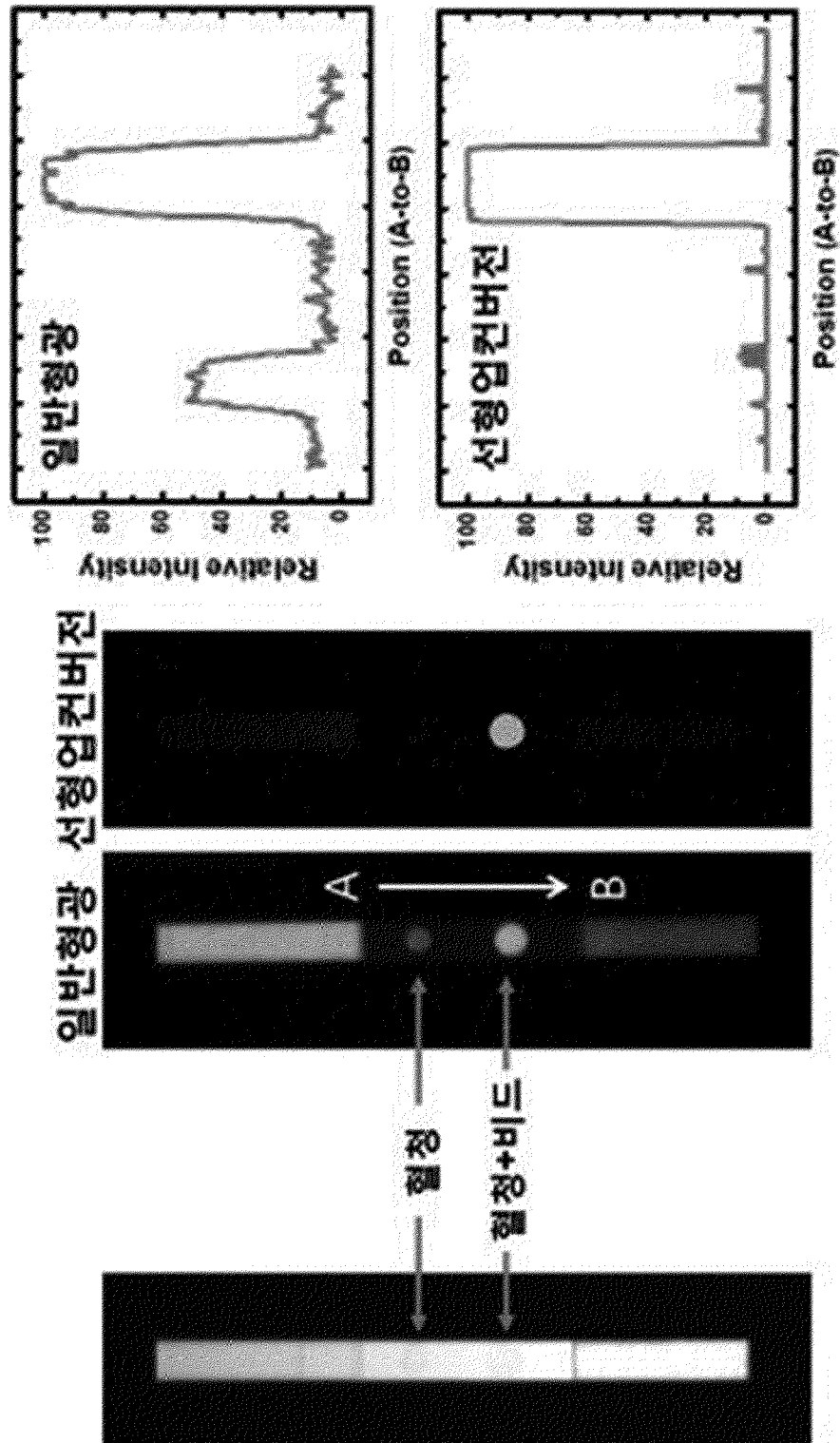
[도5]



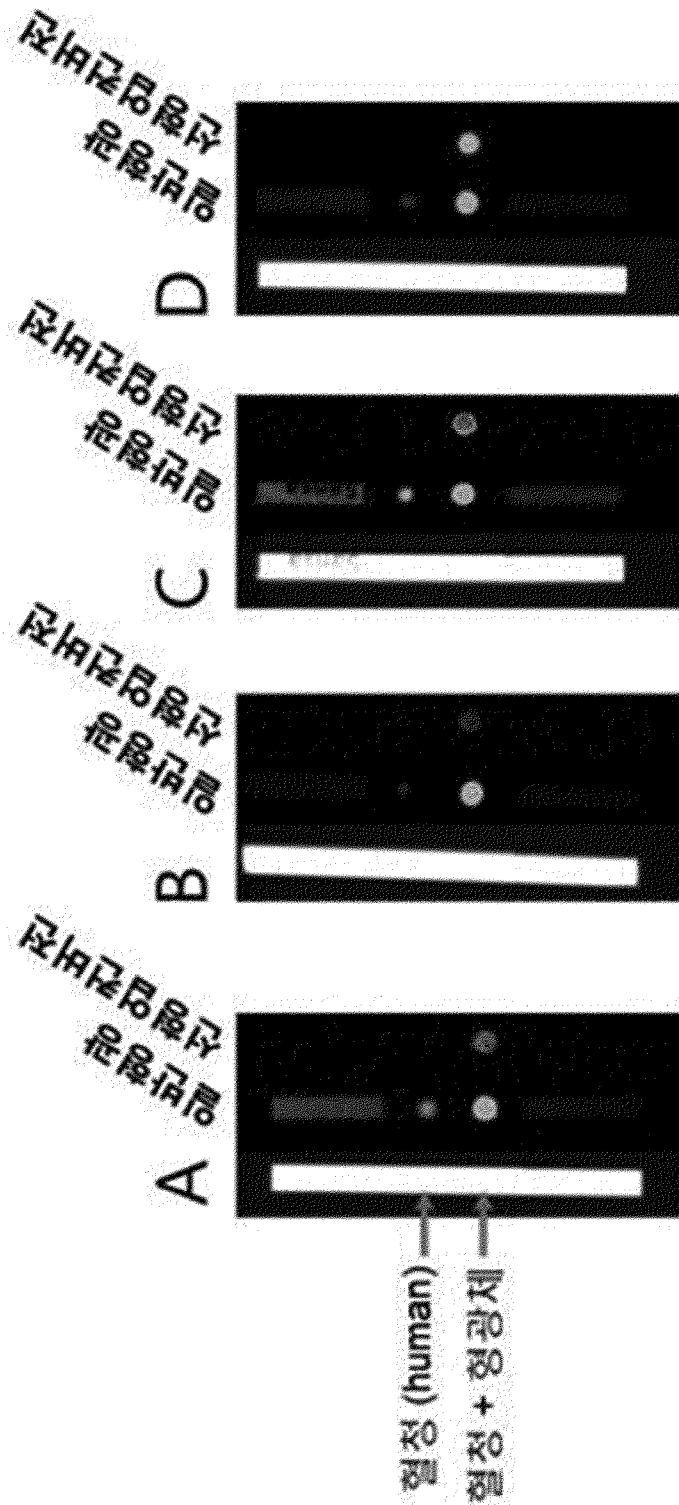
[도6]



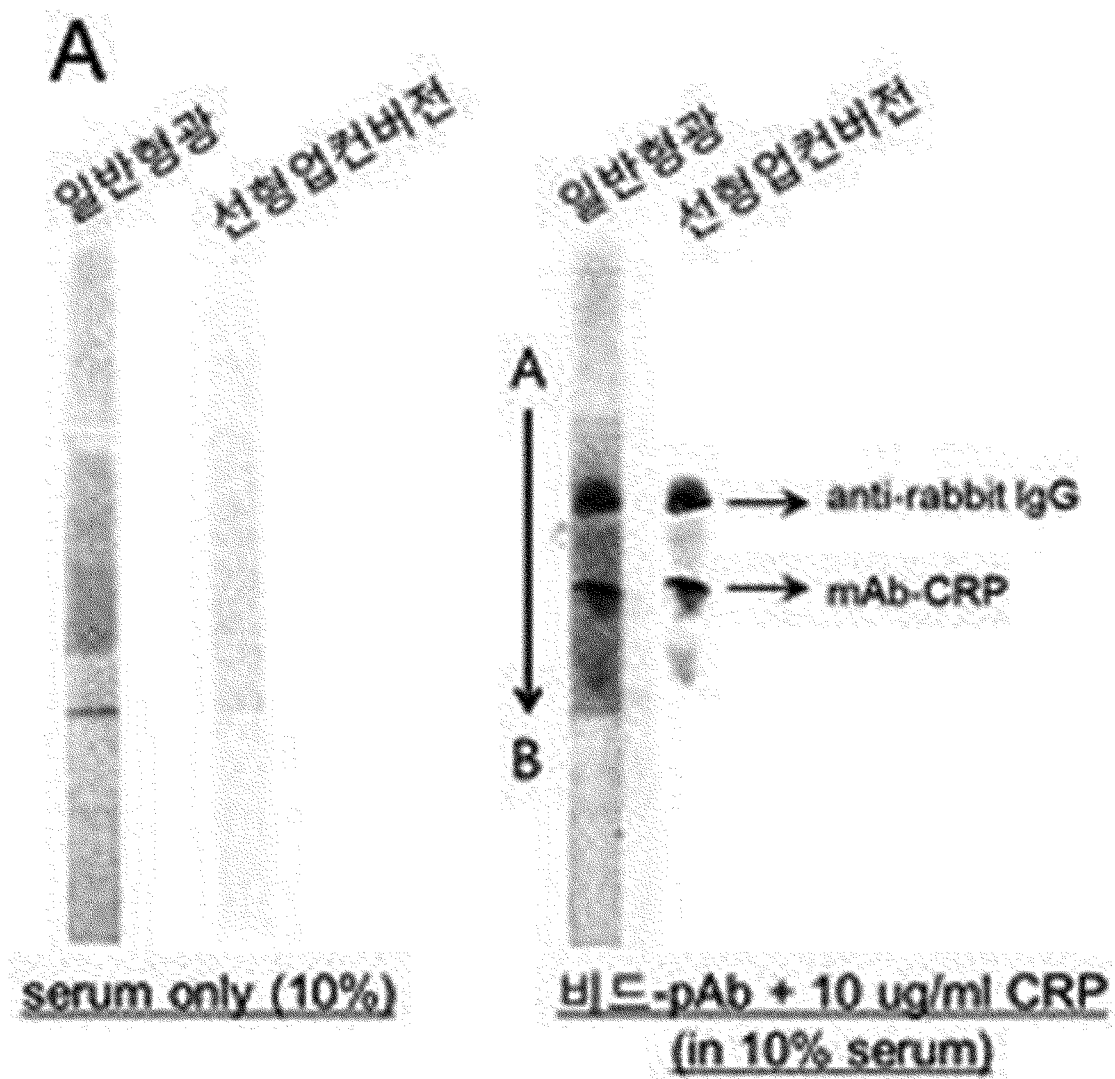
[도7]



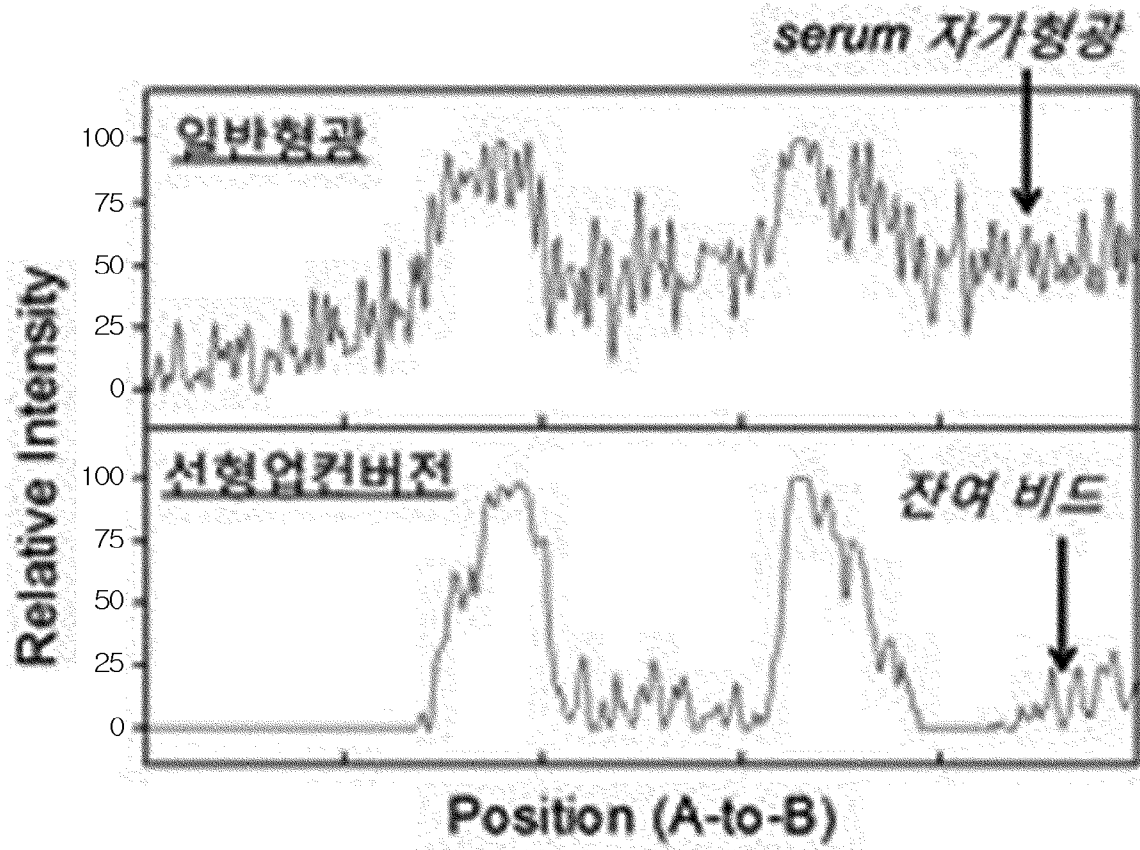
[도8]



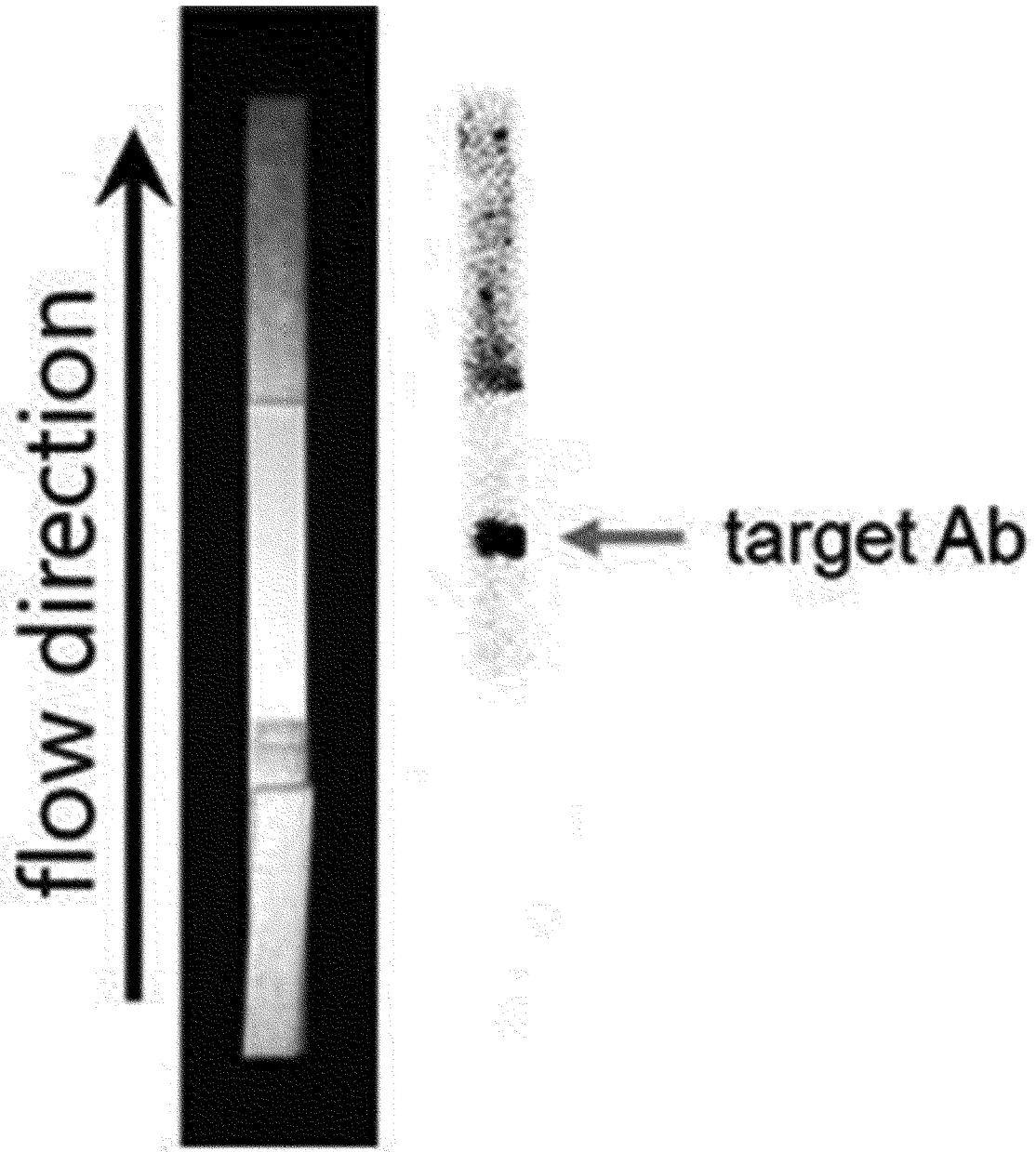
[도9a]



[도9b]

B

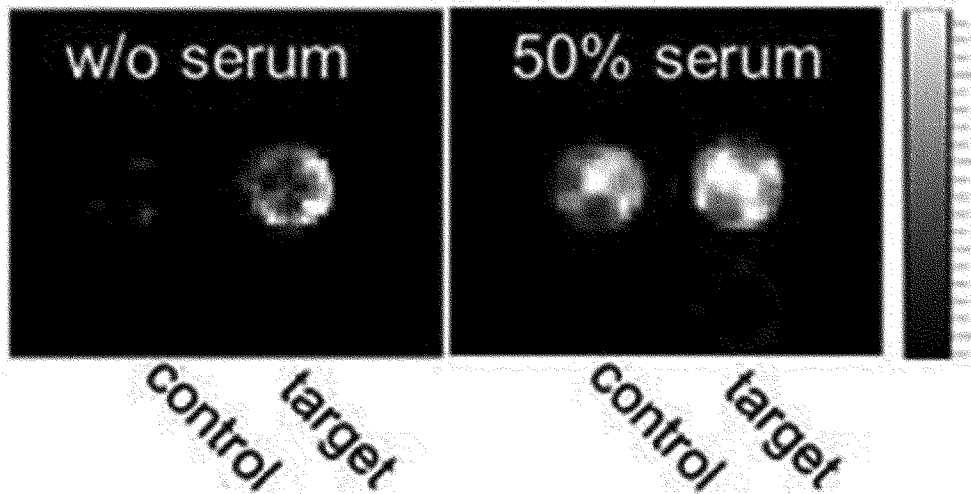
[도10]



[도11]

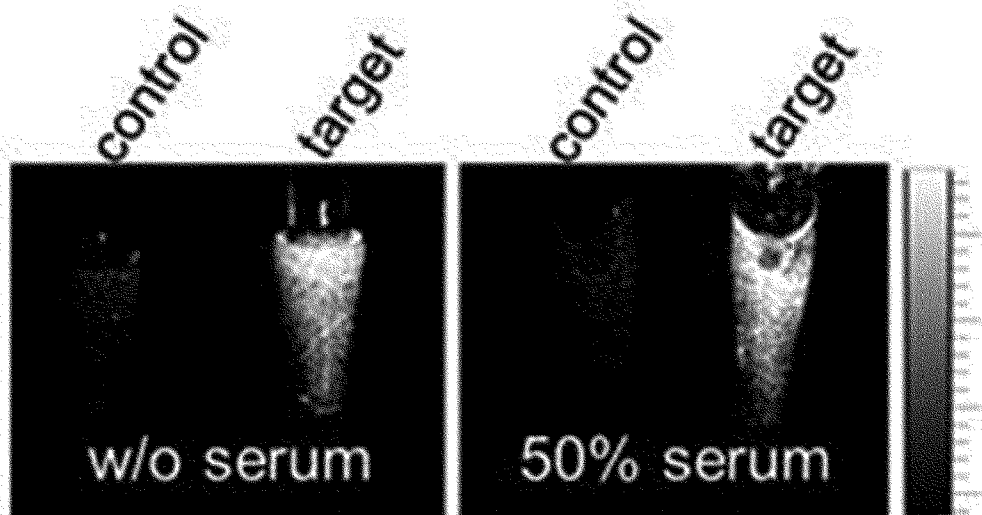
A

<일반 형광>



B

<선형 업컨버전 형광>



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2016/005166

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N 33/58(2006.01)i, G01N 33/543(2006.01)i, G01N 21/64(2006.01)i, C07D 409/14(2006.01)i, C07D 487/04(2006.01)i

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

G01N 33/58; G01N 30/84; G01N 33/543; G01N 21/64; C07D 409/14; C07D 487/04

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

Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

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

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: linear, upconversion, phosphor, single photon, absorption, diagnosis, Diketo Pyrrolo pyrrole, thiophene

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KAUR, Matinder et al., Diketopyrrolopyrrole: Brilliant Red Pigment Dye-based Fluorescent Probes and their Applications, Chemical Society Reviews, 2015 (Date of Online Publication: 04 September 2014), vol. 44, pages 58-77 See pages 58-76.	1-12,27
Y		13-26
Y	US 2009-0211345 A1 (NAHM, Kie - Bong et al.) 27 August 2009 See paragraphs [0073]-[0266]; and claims 1-15.	13-26
A	LIU, Shi - Yong et al., C-H Activation: Making Diketopyrrolopyrrole Derivatieves easily Accessible, Journal of Materials Chemistry A, 2013, vol. 1, pages 2795-2805 See pages 2795-2802; and figure 1.	1-27
A	LUNAK, Stanislav Jr. et al., Absorption and Fluorescence of Soluble Polar Diketo-pyrrolo-pyrroles, Dyes and Pigments, 2011, vol. 91, pages 269-278 See the entire document.	1-27
A	FTOUNI, Hussein et al., Functionalized Two-Photon Absorbing Diketopyrrolopyrrole-Based Fluorophores for Living Cells Fluorescent Microscopy, Bioconjugate Chemistry, 2013, vol. 24, pages 942-950 See the entire document.	1-27



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

02 SEPTEMBER 2016 (02.09.2016)

Date of mailing of the international search report

05 SEPTEMBER 2016 (05.09.2016)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,
Republic of Korea

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2016/005166

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
US 2009-0211345 A1	27/08/2009	EP 1550872 A2	06/07/2005
		EP 1550872 A3	02/11/2005
		EP 1550872 B1	26/08/2015
		KR 10-0639776 B1	27/10/2006
		KR 10-2005-0072015 A	08/07/2005
		US 8011228 B2	06/09/2011
		WO 2005-066624 A1	21/07/2005

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) G01N 33/58(2006.01)I, G01N 33/543(2006.01)I, G01N 21/64(2006.01)I, C07D 409/14(2006.01)I, C07D 487/04(2006.01)I																							
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) G01N 33/58; G01N 30/84; G01N 33/543; G01N 21/64; C07D 409/14; C07D 487/04 조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌 한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우)) eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 선행, 업컨버전, 형광, 단일 광자, 흡수, 진단, Diketo Pyrrolo pyrrole, thiophene																							
C. 관련 문헌 <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width: 10%;">카테고리*</th> <th style="width: 70%;">인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재</th> <th style="width: 20%;">관련 청구항</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align: center;">X</td> <td>KAUR, MATINDER 등, Diketopyrrolopyrrole: brilliant red pigment dye-based fluorescent probes and their applications, Chemical Society Reviews, 2015년 (온라인 공개일: 2014.09.04), 44권, 페이지 58-77 페이지 58-76 참조.</td> <td style="text-align: center;">1-12, 27</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">Y</td> <td></td> <td style="text-align: center;">13-26</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">Y</td> <td>US 2009-0211345 A1 (NAHM, KIE-BONG 등) 2009.08.27 단락 [0073]-[0266]; 및 청구항 1-15항 참조.</td> <td style="text-align: center;">13-26</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">A</td> <td>LIU, SHI-YONG 등, C-H activation: making diketopyrrolopyrrole derivatives easily accessible, Journal of Materials Chemistry A, 2013년, 1권, 페이지 2795-2805 페이지 2795-2802; 및 도면 1 참조.</td> <td style="text-align: center;">1-27</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">A</td> <td>LUNAK, STANISLAV JR. 등, Absorption and fluorescence of soluble polar diketo-pyrrolo-pyrroles, Dyes and Pigments, 2011년, 91권, 페이지 269-278 전체 문서 참조.</td> <td style="text-align: center;">1-27</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">A</td> <td>FTOUNI, HUSSEIN 등, Functionalized Two-Photon Absorbing Diketopyrrolopyrrole-Based Fluorophores for Living Cells Fluorescent Microscopy, Bioconjugate Chemistry, 2013년, 24권, 페이지 942-950 전체 문서 참조.</td> <td style="text-align: center;">1-27</td> </tr> </tbody> </table>			카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항	X	KAUR, MATINDER 등, Diketopyrrolopyrrole: brilliant red pigment dye-based fluorescent probes and their applications, Chemical Society Reviews, 2015년 (온라인 공개일: 2014.09.04), 44권, 페이지 58-77 페이지 58-76 참조.	1-12, 27	Y		13-26	Y	US 2009-0211345 A1 (NAHM, KIE-BONG 등) 2009.08.27 단락 [0073]-[0266]; 및 청구항 1-15항 참조.	13-26	A	LIU, SHI-YONG 등, C-H activation: making diketopyrrolopyrrole derivatives easily accessible, Journal of Materials Chemistry A, 2013년, 1권, 페이지 2795-2805 페이지 2795-2802; 및 도면 1 참조.	1-27	A	LUNAK, STANISLAV JR. 등, Absorption and fluorescence of soluble polar diketo-pyrrolo-pyrroles, Dyes and Pigments, 2011년, 91권, 페이지 269-278 전체 문서 참조.	1-27	A	FTOUNI, HUSSEIN 등, Functionalized Two-Photon Absorbing Diketopyrrolopyrrole-Based Fluorophores for Living Cells Fluorescent Microscopy, Bioconjugate Chemistry, 2013년, 24권, 페이지 942-950 전체 문서 참조.	1-27
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항																					
X	KAUR, MATINDER 등, Diketopyrrolopyrrole: brilliant red pigment dye-based fluorescent probes and their applications, Chemical Society Reviews, 2015년 (온라인 공개일: 2014.09.04), 44권, 페이지 58-77 페이지 58-76 참조.	1-12, 27																					
Y		13-26																					
Y	US 2009-0211345 A1 (NAHM, KIE-BONG 등) 2009.08.27 단락 [0073]-[0266]; 및 청구항 1-15항 참조.	13-26																					
A	LIU, SHI-YONG 등, C-H activation: making diketopyrrolopyrrole derivatives easily accessible, Journal of Materials Chemistry A, 2013년, 1권, 페이지 2795-2805 페이지 2795-2802; 및 도면 1 참조.	1-27																					
A	LUNAK, STANISLAV JR. 등, Absorption and fluorescence of soluble polar diketo-pyrrolo-pyrroles, Dyes and Pigments, 2011년, 91권, 페이지 269-278 전체 문서 참조.	1-27																					
A	FTOUNI, HUSSEIN 등, Functionalized Two-Photon Absorbing Diketopyrrolopyrrole-Based Fluorophores for Living Cells Fluorescent Microscopy, Bioconjugate Chemistry, 2013년, 24권, 페이지 942-950 전체 문서 참조.	1-27																					
☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. ☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.																							
* 인용된 문헌의 특별 카테고리: “A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌 “T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌 “E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 “X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신구성 또는 진보성이 없는 것으로 본다. “L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 “Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다. “O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 “&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌 “P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌																							
국제조사의 실제 완료일 2016년 09월 02일 (02.09.2016)	국제조사보고서 발송일 2016년 09월 05일 (05.09.2016)																						
ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578	심사관 박정민 전화번호 +82-42-481-3516 																						

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호

PCT/KR2016/005166

국제조사보고서에서
인용된 특허문헌

공개일

대응특허문헌

공개일

US 2009-0211345 A1

2009/08/27

EP 1550872 A2

2005/07/06

EP 1550872 A3

2005/11/02

EP 1550872 B1

2015/08/26

KR 10-0639776 B1

2006/10/27

KR 10-2005-0072015 A

2005/07/08

US 8011228 B2

2011/09/06

WO 2005-066624 A1

2005/07/21