



**(19) 대한민국특허청(KR)**  
**(12) 공개특허공보(A)**

(11) 공개번호 10-2019-0120325  
(43) 공개일자 2019년10월23일

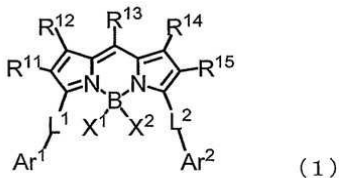
- |   |  |
|---|--|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)<br/>G01N 33/543 (2006.01) C07F 5/02 (2006.01)<br/>G01N 21/64 (2006.01) G01N 33/553 (2006.01)<br/>G01N 33/58 (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류<br/>G01N 33/54393 (2013.01)<br/>C07F 5/02 (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2019-7028398</p> <p>(22) 출원일자(국제) 2018년03월29일<br/>심사청구일자 2019년09월27일</p> <p>(85) 번역문제출일자 2019년09월27일</p> <p>(86) 국제출원번호 PCT/JP2018/013406</p> <p>(87) 국제공개번호 WO 2018/181796<br/>국제공개일자 2018년10월04일</p> <p>(30) 우선권주장<br/>JP-P-2017-066921 2017년03월30일 일본(JP)</p> | <p>(71) 출원인<br/>후지필름 가부시킴가이샤<br/>일본 도쿄도 미나토쿠 니시 아자부 2초메 26방 30고</p> <p>(72) 발명자<br/>치쿠 히로유키<br/>일본 카나가와켄 아시가라카미군 카이세이마치 미야노다이 798 후지필름 가부시킴가이샤 나이와타나베 쿄우스케<br/>일본 카나가와켄 아시가라카미군 카이세이마치 미야노다이 798 후지필름 가부시킴가이샤 나이와타나베 쿄우스케<br/>(뒷면에 계속)</p> <p>(74) 대리인<br/>하영욱</p> |
|---|--|

전체 청구항 수 : 총 27 항

(54) 발명의 명칭 생체 시료 중의 측정 대상 물질을 측정하기 위한 키트 및 방법

**(57) 요약**

본 발명의 과제는, 생체 시료 중의 측정 대상 물질을, 저농도역에서부터 고농도역까지의 측정 범위에 있어서 고정밀도로 측정할 수 있는, 키트 및 방법을 제공하는 것이다. 본 발명에 의하면, 생체 시료 중의 측정 대상 물질과 결합성을 갖는 제1 결합 물질을 갖는 표지 입자와, 상기 측정 대상 물질 또는 상기 제1 결합 물질 중 어느 하나와 결합성을 갖는 제2 결합 물질을 갖는 기관을 포함하는, 생체 시료 중의 측정 대상 물질을 측정하기 위한 키트로서, 상기 표지 입자는, 하기 식 (1)로 나타나는 적어도 1종의 화합물과 입자를 함유하는 발광성의 표지 입자인, 상기 키트가 제공된다.



(1) 중의 각 기호는, 본 명세서에 기재한 의미를 나타낸다.

(52) CPC특허분류

*C09K 11/06* (2013.01)  
*G01N 21/648* (2013.01)  
*G01N 33/553* (2013.01)  
*G01N 33/58* (2013.01)  
*G01N 33/585* (2013.01)

(72) 발명자

**카네코 카즈헤이**

일본 카나가와켄 아시가라카미군 카이세이마치 미  
야노다이 798 후지필름 가부시키키가이샤 나이

**하마다 카즈히로**

일본 카나가와켄 아시가라카미군 카이세이마치 미  
야노다이 798 후지필름 가부시키키가이샤 나이

**사사키 쿄우이츠**

일본 카나가와켄 아시가라카미군 카이세이마치 미  
야노다이 798 후지필름 가부시키키가이샤 나이

**요시오카 토모아키**

일본 카나가와켄 아시가라카미군 카이세이마치 미  
야노다이 798 후지필름 가부시키키가이샤 나이

**하나키 나오유키**

일본 카나가와켄 아시가라카미군 카이세이마치 미  
야노다이 798 후지필름 가부시키키가이샤 나이

## 명세서

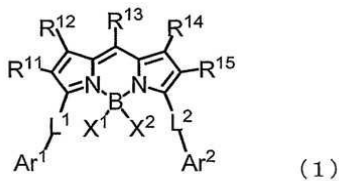
### 청구범위

#### 청구항 1

생체 시료 중의 측정 대상 물질과 결합성을 갖는 제1 결합 물질을 갖는 표지 입자와, 상기 측정 대상 물질 또는 상기 제1 결합 물질 중 어느 하나와 결합성을 갖는 제2 결합 물질을 갖는 기관을 포함하는, 생체 시료 중의 측정 대상 물질을 측정하기 위한 키트로서,

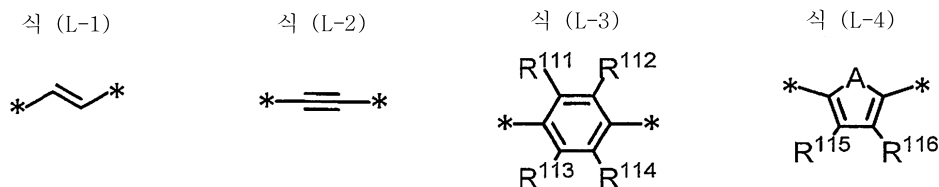
상기 표지 입자는, 하기 식 (1)로 나타나는 적어도 1종의 화합물과 입자를 함유하는 발광성의 표지 입자인, 상기 키트.

[화학식 1]



식 중, R<sup>11</sup>~R<sup>15</sup>는 각각 독립적으로, 수소 원자, 할로젠 원자, 알킬기, 아릴기, 헤테로환기, 에텐일기, 에타인일기, 아미노기, 아실기, 알콕시기, 아릴옥시기, 알킬싸이오기, 또는 아릴싸이오기를 나타내고, 이들은 치환기를 갖고 있어도 되며, R<sup>11</sup>~R<sup>15</sup> 중 적어도 3개는 수소 원자 이외의 원자 또는 기를 나타낸다. X<sup>1</sup> 및 X<sup>2</sup>는 각각 독립적으로, 할로젠 원자, 알킬기, 아릴기, 헤테로환기, 하이드록시기, 알콕시기, 아릴옥시기, 알킬싸이오기, 아릴싸이오기, 에텐일기, 또는 에타인일기를 나타내고, 이들은 치환기를 갖고 있어도 되며, X<sup>1</sup> 및 X<sup>2</sup>는 서로 연결되어 환을 형성해도 된다. Ar<sup>1</sup> 및 Ar<sup>2</sup>는 각각 독립적으로, 아릴기 또는 헤테로환기를 나타내고, 이들은 치환기를 갖고 있어도 된다. L<sup>1</sup> 및 L<sup>2</sup>는 각각 독립적으로, 식 (L-1)~식 (L-4) 중 어느 하나를 나타낸다.

[화학식 2]



식 중, R<sup>111</sup>~R<sup>116</sup>은 각각 독립적으로, 수소 원자, 할로젠 원자, 알킬기, 아릴기, 헤테로환기, 에텐일기, 에타인일기, 아미노기, 아실기, 알콕시기, 아릴옥시기, 알킬싸이오기, 또는 아릴싸이오기를 나타내고, 이들은 치환기를 갖고 있어도 된다. A는, -O-, -S-, 또는 -NH-를 나타낸다.

#### 청구항 2

청구항 1에 있어서,

상기 표지 입자가 표지 라텍스 입자인, 키트.

#### 청구항 3

청구항 1 또는 청구항 2에 있어서,

상기 표지 입자가, 카복실기를 갖는, 키트.

#### 청구항 4

청구항 1 내지 청구항 3 중 어느 한 항에 있어서,

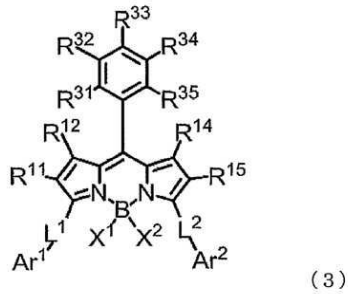
상기 표지 입자의 평균 입자경이 70~500nm인, 키트.

**청구항 5**

청구항 1 내지 청구항 4 중 어느 한 항에 있어서,

상기 식 (1)로 나타나는 화합물이, 하기 식 (3)으로 나타나는 화합물인, 키트.

[화학식 3]



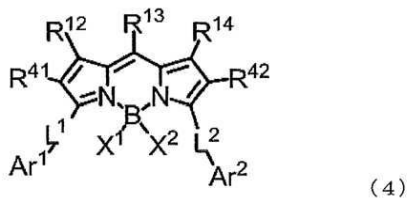
식 중,  $R^{11}$ ,  $R^{12}$ ,  $R^{14}$ ,  $R^{15}$ ,  $X^1$ ,  $X^2$ ,  $Ar^1$ ,  $Ar^2$ ,  $L^1$  및  $L^2$ 는, 식 (1)에 있어서의 정의와 동의이며, 단,  $R^{11}$ ,  $R^{12}$ ,  $R^{14}$  및  $R^{15}$  중 적어도 2개는 수소 원자 이외의 원자 또는 기이다.  $R^{31}$ ~ $R^{35}$ 는 각각 독립적으로, 수소 원자, 할로젠 원자, 알킬기, 아릴기, 헤테로환기, 에텐일기, 에타인일기, 아미노기, 아실기, 사이아노기, 알콕시기, 아릴옥시기, 알킬싸이오기, 또는 아릴싸이오기를 나타내고, 이들은 치환기를 갖고 있어도 되며,  $R^{31}$ ,  $R^{32}$ ,  $R^{34}$  및  $R^{35}$  중 어느 하나는 2원자 이상으로 이루어지는 기이다.

**청구항 6**

청구항 1 내지 청구항 4 중 어느 한 항에 있어서,

상기 식 (1)로 나타나는 화합물이, 하기 식 (4)로 나타나는 화합물인, 키트.

[화학식 4]



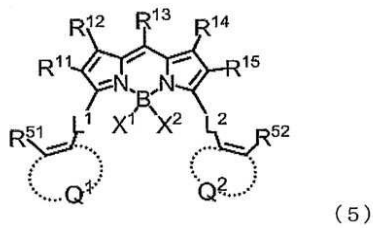
식 중,  $R^{12}$ ,  $R^{13}$ ,  $R^{14}$ ,  $X^1$ ,  $X^2$ ,  $Ar^1$ ,  $Ar^2$ ,  $L^1$  및  $L^2$ 는, 식 (1)에 있어서의 정의와 동의이며, 단,  $R^{12}$ ,  $R^{13}$  및  $R^{14}$  중 적어도 하나는 수소 원자 이외의 원자 또는 기이다.  $R^{41}$  및  $R^{42}$ 는 각각 독립적으로, 아릴기, 헤테로환기, 에텐일기, 또는 에타인일기를 나타내고, 이들은 치환기를 갖고 있어도 된다.

**청구항 7**

청구항 1 내지 청구항 4 중 어느 한 항에 있어서,

상기 식 (1)로 나타나는 화합물이, 하기 식 (5)로 나타나는 화합물인, 키트.

[화학식 5]



식 중,  $R^{11}$ - $R^{15}$ ,  $X^1$ ,  $X^2$ ,  $L^1$  및  $L^2$ 는, 식 (1)에 있어서의 정의와 동의이다.  $R^{51}$  및  $R^{52}$ 는 각각 독립적으로, 알킬기, 아릴기, 헤테로아릴기, 아미노기, 아실기, 알콕시기, 아릴옥시기, 알킬싸이오기, 또는 아릴싸이오기를 나타내고, 이들은 치환기를 갖고 있어도 된다.  $Q^1$  및  $Q^2$ 는 각각 독립적으로, 방향족 탄화 수소환 또는 방향족 헤테로환을 나타내고, 이들은 치환기를 갖고 있어도 된다.

**청구항 8**

청구항 1 내지 청구항 7 중 어느 한 항에 있어서,

상기 표지 입자가, 적어도 1종의 에너지 도너 화합물과, 적어도 1종의 에너지 억셉터 화합물과, 입자를 함유하는 발광성 입자이며, 상기 에너지 도너 화합물 및 상기 에너지 억셉터 화합물 중 적어도 1종이, 상기 식 (1)로 나타나는 화합물인, 키트.

**청구항 9**

청구항 8에 있어서,

상기 에너지 도너 화합물로서, 적어도 1종의 상기 식 (1)로 나타나는 화합물을 함유하고, 상기 에너지 억셉터 화합물로서, 적어도 1종의 상기 식 (1)로 나타나는 화합물을 함유하는, 키트.

**청구항 10**

청구항 8 또는 청구항 9에 있어서,

에너지 도너 화합물과 에너지 억셉터 화합물의 몰비가 1:10~10:1인, 키트.

**청구항 11**

청구항 8 내지 청구항 10 중 어느 한 항에 있어서,

에너지 도너 화합물과 에너지 억셉터 화합물의 스토크스 시프트가 40nm 이상인, 키트.

**청구항 12**

청구항 1 내지 청구항 11 중 어느 한 항에 있어서,

상기 기관이, 상기 제2 결합 물질을 갖는 검출 영역을 갖는, 키트.

**청구항 13**

청구항 12에 있어서,

상기 검출 영역이 금을 포함하는 금속막인, 키트.

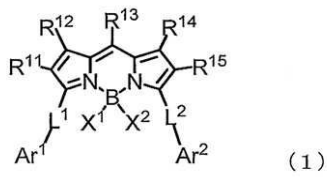
**청구항 14**

생체 시료 중의 측정 대상 물질을 측정하는 방법으로서,

생체 시료를, 측정 대상 물질과 결합성을 갖는 제1 결합 물질을 갖는 표지 입자와 반응시키는 반응 공정과, 상기 측정 대상 물질 또는 상기 제1 결합 물질 중 어느 하나와 결합성을 갖는 제2 결합 물질을 갖는 기관에, 상기 반응 공정에서 얻어진 반응 산물을 접촉시켜, 표지 입자를 기관 상에 포착시키는 포착 공정과,

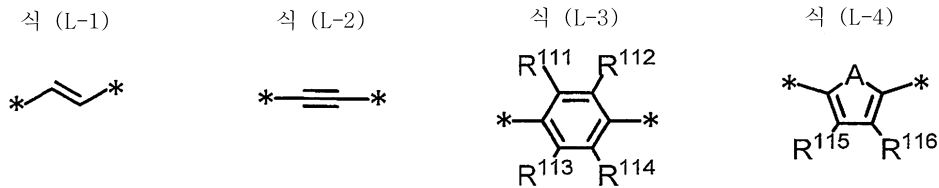
상기 측정 대상 물질에 관련된 표지 정보를 취득하는, 표지 정보 취득 공정을 포함하고, 상기 표지 입자는, 하기 식 (1)로 나타나는 적어도 1종의 화합물과 입자를 함유하는 발광성의 표지 입자인, 방법.

[화학식 6]



식 중, R<sup>11</sup>~R<sup>15</sup>는 각각 독립적으로, 수소 원자, 할로젠 원자, 알킬기, 아릴기, 헤테로환기, 에틸일기, 에타인일기, 아미노기, 아실기, 알콕시기, 아릴옥시기, 알킬싸이오기, 또는 아릴싸이오기를 나타내고, 이들은 치환기를 갖고 있어도 되며, R<sup>11</sup>~R<sup>15</sup> 중 적어도 3개는 수소 원자 이외의 원자 또는 기를 나타낸다. X<sup>1</sup> 및 X<sup>2</sup>는 각각 독립적으로, 할로젠 원자, 알킬기, 아릴기, 헤테로환기, 하이드록시기, 알콕시기, 아릴옥시기, 알킬싸이오기, 아릴싸이오기, 에틸일기, 또는 에타인일기를 나타내고, 이들은 치환기를 갖고 있어도 되며, X<sup>1</sup> 및 X<sup>2</sup>는 서로 연결되어 환을 형성해도 된다. Ar<sup>1</sup> 및 Ar<sup>2</sup>는 각각 독립적으로, 아릴기 또는 헤테로환기를 나타내고, 이들은 치환기를 갖고 있어도 된다. L<sup>1</sup> 및 L<sup>2</sup>는 각각 독립적으로, 식 (L-1)~식 (L-4) 중 어느 하나를 나타낸다.

[화학식 7]



식 중, R<sup>111</sup>~R<sup>116</sup>은 각각 독립적으로, 수소 원자, 할로젠 원자, 알킬기, 아릴기, 헤테로환기, 에틸일기, 에타인일기, 아미노기, 아실기, 알콕시기, 아릴옥시기, 알킬싸이오기, 또는 아릴싸이오기를 나타내고, 이들은 치환기를 갖고 있어도 된다. A는, -O-, -S-, 또는 -NH-를 나타낸다.

**청구항 15**

청구항 14에 있어서,  
상기 입자가 라텍스 입자인, 방법.

**청구항 16**

청구항 14 또는 청구항 15에 있어서,  
상기 입자가, 카복실기를 갖는, 방법.

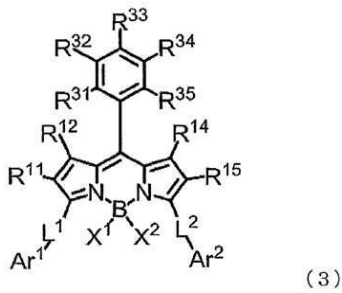
**청구항 17**

청구항 14 내지 청구항 16 중 어느 한 항에 있어서,  
상기 표지 입자의 평균 입자경이 70~500nm인, 방법.

**청구항 18**

청구항 14 내지 청구항 17 중 어느 한 항에 있어서,  
상기 식 (1)로 나타나는 화합물이, 하기 식 (3)으로 나타나는 화합물인, 방법.

[화학식 8]



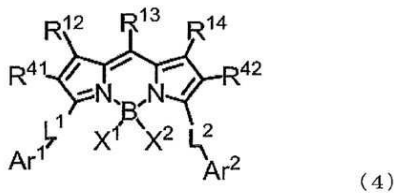
식 중,  $R^{11}$ ,  $R^{12}$ ,  $R^{14}$ ,  $R^{15}$ ,  $X^1$ ,  $X^2$ ,  $Ar^1$ ,  $Ar^2$ ,  $L^1$  및  $L^2$ 는, 식 (1)에 있어서의 정의와 동의이며, 단,  $R^{11}$ ,  $R^{12}$ ,  $R^{14}$  및  $R^{15}$  중 적어도 2개는 수소 원자 이외의 원자 또는 기이다.  $R^{31}$ ~ $R^{35}$ 는 각각 독립적으로, 수소 원자, 할로젠 원자, 알킬기, 아릴기, 헤테로환기, 에틸일기, 에타인일기, 아미노기, 아실기, 사이아노기, 알콕시기, 아릴옥시기, 알킬싸이오기, 또는 아릴싸이오기를 나타내고, 이들은 치환기를 갖고 있어도 되며,  $R^{31}$ ,  $R^{32}$ ,  $R^{34}$  및  $R^{35}$  중 어느 하나는 2원자 이상으로 이루어지는 기이다.

**청구항 19**

청구항 14 내지 청구항 17 중 어느 한 항에 있어서,

상기 식 (1)로 나타나는 화합물이, 하기 식 (4)로 나타나는 화합물인, 방법.

[화학식 9]



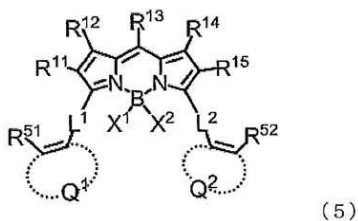
식 중,  $R^{12}$ ,  $R^{13}$ ,  $R^{14}$ ,  $X^1$ ,  $X^2$ ,  $Ar^1$ ,  $Ar^2$ ,  $L^1$  및  $L^2$ 는, 식 (1)에 있어서의 정의와 동의이며, 단,  $R^{12}$ ,  $R^{13}$  및  $R^{14}$  중 적어도 하나는 수소 원자 이외의 원자 또는 기이다.  $R^{41}$  및  $R^{42}$ 는 각각 독립적으로, 아릴기, 헤테로환기, 에틸일기, 또는 에타인일기를 나타내고, 이들은 치환기를 갖고 있어도 된다.

**청구항 20**

청구항 14 내지 청구항 17 중 어느 한 항에 있어서,

상기 식 (1)로 나타나는 화합물이, 하기 식 (5)로 나타나는 화합물인, 방법.

[화학식 10]



식 중,  $R^{11}$ ~ $R^{15}$ ,  $X^1$ ,  $X^2$ ,  $L^1$  및  $L^2$ 는, 식 (1)에 있어서의 정의와 동의이다.  $R^{51}$  및  $R^{52}$ 는 각각 독립적으로, 알킬기, 아릴기, 헤테로아릴기, 아미노기, 아실기, 알콕시기, 아릴옥시기, 알킬싸이오기, 또는 아릴싸이오기를

나타내고, 이들은 치환기를 갖고 있어도 된다.  $Q^1$  및  $Q^2$ 는 각각 독립적으로, 방향족 탄화 수소환 또는 방향족 헤테로환을 나타내고, 이들은 치환기를 갖고 있어도 된다.

**청구항 21**

청구항 14 내지 청구항 20 중 어느 한 항에 있어서,

상기 표지 입자가, 적어도 1종의 에너지 도너 화합물과, 적어도 1종의 에너지 억셉터 화합물과, 입자를 함유하는 발광성 입자이며, 상기 에너지 도너 화합물 및 상기 에너지 억셉터 화합물 중 적어도 1종이, 상기 식 (1)로 나타나는 화합물인, 방법.

**청구항 22**

청구항 21에 있어서,

상기 에너지 도너 화합물로서, 적어도 1종의 상기 식 (1)로 나타나는 화합물을 함유하고, 상기 에너지 억셉터 화합물로서, 적어도 1종의 상기 식 (1)로 나타나는 화합물을 함유하는, 방법.

**청구항 23**

청구항 21 또는 청구항 22에 있어서,

에너지 도너 화합물과 에너지 억셉터 화합물의 몰비가 1:10~10:1인, 방법.

**청구항 24**

청구항 21 내지 청구항 23 중 어느 한 항에 있어서,

에너지 도너 화합물과 에너지 억셉터 화합물의 스토크스 시프트가 40nm 이상인, 방법.

**청구항 25**

청구항 14 내지 청구항 24 중 어느 한 항에 있어서,

상기 기관이, 상기 제2 결합 물질을 갖는 검출 영역을 갖는, 방법.

**청구항 26**

청구항 25에 있어서,

상기 검출 영역이 금을 포함하는 금속막인, 방법.

**청구항 27**

청구항 26에 있어서,

표면 플라즈몬 여기에 의한 형광 검출에 의하여, 상기 측정 대상 물질에 관련된 표지 정보를 취득하는, 방법.

**발명의 설명**

**기술 분야**

[0001] 본 발명은, 생체 시료 중의 측정 대상 물질을 측정하기 위한 키트, 및 생체 시료 중의 측정 대상 물질을 측정하는 방법에 관한 것이다.

**배경 기술**

[0002] 단백질, 효소 또는 무기 화합물 등을 정량하기 위한 고감도이고 또한 용이한 측정법으로서 형광 검출법이 널리 이용되고 있다. 형광 검출법은, 특정 파장의 광에 의하여 여기되어 형광을 발하는 측정 대상 물질을 포함한다고 생각되는 시료에 상기 특정 파장의 여기광을 조사했을 때에 발하는 형광을 검출함으로써 측정 대상 물질의 존재를 확인하는 방법이다. 측정 대상 물질이 형광체가 아닌 경우에는, 예를 들면 측정 대상 물질과 특이적으로 결합하는 물질을 형광 색소로 표지한 물질을, 시료에 접촉시키고, 그 후 상기와 동일하게 하여, 여기광을 조사했

을 때에 발하는 형광을 검출함으로써, 측정 대상 물질의 존재를 확인할 수 있다.

[0003] 상기와 같은 형광 검출법에 있어서, 미량으로 존재하는 측정 대상 물질을 검출하기 위한 감도를 향상시키기 위하여, 플라즈몬 공명에 의한 전장 증강의 효과를 이용하는 방법이 알려져 있다. 이 방법에서는, 플라즈몬 공명을 발생시키기 위하여, 투명한 지지체 상의 소정 영역에 금속층을 마련한 센서 칩을 준비하고, 지지체와 금속막과의 계면에 대하여 지지체의 금속층 형성면과 반대의 면측으로부터, 전체 반사각 이상의 소정의 각도로 여기광을 입사시킨다. 이러한 여기광의 조사에 의하여 금속층에 표면 플라즈몬이 발생하지만, 이 표면 플라즈몬의 발생에 의한 전장 증강 작용에 의하여, 형광을 증강시킴으로써 시그널/노이즈비(S/N비)가 향상되어 고감도인 측정이 가능해진다. 표면 플라즈몬 여기에 의한 형광 검출법(이하, "SPF법"이라고 함)은, 낙사(落射) 여기에 의한 형광 검출법(낙사 형광법이라고도 칭함)에 대하여, 신호 증강도가 약 10배 얻어져, 고감도로 측정할 수 있다.

[0004] 특허문헌 1에는, 바람직한 여기 피크를 갖는 초기 공여체 염료와, 바람직한 발광 피크를 갖는 최종 수용체 염료를 폴리머 미소(微小) 입자 중에 배합시킴으로써 제조되는 형광 미소 입자가 기재되어 있다. 특허문헌 1에서는, 상기 염료로서 폴리아자인다센 염료를 사용하는 것이 기재되어 있다.

[0005] 비특허문헌 1에는, 신규 다이스타이릴 BODIPY<sup>R</sup>(등록 상표, boron-dipyrromethene의 약칭임) 염료를 설계 및 합성한 것이 기재되고, 합성한 다이스타이릴 BODIPY<sup>R</sup> 염료에 대하여, 클로로메테인 용액 중에서의 흡수 및 발광 스펙트럼이 분석되어 있다.

### 선행기술문헌

#### 특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 특허문헌 1: 일본 특허공보 제3442777호

#### 비특허문헌

[0007] (비특허문헌 0001) 비특허문헌 1: Olivier Galangau et al., Org. Biomol. Chem., 2010, 8, 4546-4553

### 발명의 내용

#### 해결하려는 과제

[0008] 상기한 바와 같이, 간이적인 측정 방법으로 고감도로 측정이 가능한 방법으로서 SPF법이 알려져 있지만, 매우 미량인 측정 대상 물질의 측정에 대해서는 충분히 만족스러운 것은 아니었다. 검출법 중에서, 항체로 샌드위치할 수 없는 저분자를 측정하는 결합법에 있어서는, 검출 감도를 높이기 위해서는 반응계 중의 입자량을 줄일 필요가 있지만, 그 경우, 형광 강도가 부족하여, 고농도역을 양호한 정밀도로 측정할 수 없는 문제가 있었다. 특허문헌 1에 기재된 형광 미소 입자는, 바람직한 유효 스토크스 시프트를 갖지만, 양자 수율이 낮다는 문제가 있었다. 비특허문헌 1에서는, 염료 용액의 흡수 및 발광 스펙트럼이 분석되어 있지만, 염료를 입자에 도입하는 것에 대해서는 기재가 없다.

[0009] 본 발명은, 저농도로부터 고농도에 걸친 광범위한 농도역에 있어서 생체 시료 중의 측정 대상 물질의 고정밀도의 측정을 실현할 수 있는 키트 및 방법을 제공하는 것을 해결해야 할 과제로 했다.

#### 과제의 해결 수단

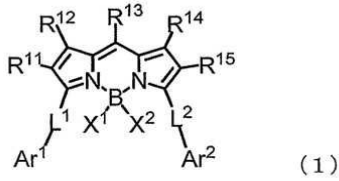
[0010] 본 발명자들은 상기 과제를 해결하기 위하여 예의 검토한 결과, 측정 대상 물질과 결합성을 갖는 제1 결합 물질을 갖는 표지 입자와, 상기 측정 대상 물질 또는 상기 제1 결합 물질 중 어느 하나와 결합성을 갖는 제2 결합 물질을 갖는 기관을 포함하는 키트에 있어서, 상기 표지 입자로서, 680nm 이상이라는 장파장 영역에 발광 극대파장을 갖고, 또한 높은 양자 수율을 나타내는 표지 입자를 이용함으로써, 상기 과제를 해결할 수 있는 것을 발견했다. 본 발명은 이들 지견에 근거하여 완성한 것이다. 즉, 본 발명에 의하면, 이하의 발명이 제공된다.

[0011] <1> 생체 시료 중의 측정 대상 물질과 결합성을 갖는 제1 결합 물질을 갖는 표지 입자와, 상기 측정 대상 물질 또는 상기 제1 결합 물질 중 어느 하나와 결합성을 갖는 제2 결합 물질을 갖는 기관을 포함하는, 생체 시료 중

의 측정 대상 물질을 측정하기 위한 키트로서,

[0012] 상기 표지 입자는, 하기 식 (1)로 나타나는 적어도 1종의 화합물과 입자를 함유하는 발광성의 표지 입자인, 상기 키트.

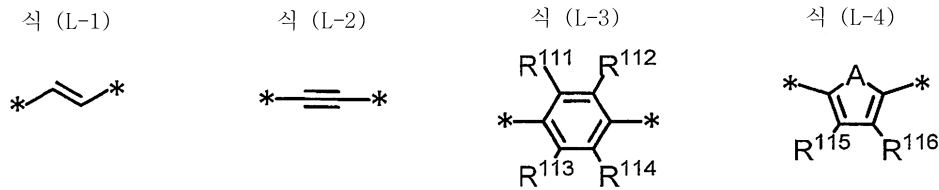
[0013] [화학식 1]



[0014]

[0015] 식 중, R<sup>11</sup>~R<sup>15</sup>는 각각 독립적으로, 수소 원자, 할로젠 원자, 알킬기, 아릴기, 헤테로환기, 에텐일기, 에타인일기, 아미노기, 아실기, 알콕시기, 아릴옥시기, 알킬싸이오기, 또는 아릴싸이오기를 나타내고, 이들은 치환기를 갖고 있어도 되며, R<sup>11</sup>~R<sup>15</sup> 중 적어도 3개는 수소 원자 이외의 원자 또는 기를 나타낸다. X<sup>1</sup> 및 X<sup>2</sup>는 각각 독립적으로, 할로젠 원자, 알킬기, 아릴기, 헤테로환기, 하이드록시기, 알콕시기, 아릴옥시기, 알킬싸이오기, 아릴싸이오기, 에텐일기, 또는 에타인일기를 나타내고, 이들은 치환기를 갖고 있어도 되며, X<sup>1</sup> 및 X<sup>2</sup>는 서로 연결되어 환을 형성해도 된다. Ar<sup>1</sup> 및 Ar<sup>2</sup>는 각각 독립적으로, 아릴기 또는 헤테로환기를 나타내고, 이들은 치환기를 갖고 있어도 된다. L<sup>1</sup> 및 L<sup>2</sup>는 각각 독립적으로, 식 (L-1)~식 (L-4) 중 어느 하나를 나타낸다.

[0016] [화학식 2]



[0017]

[0018] 식 중, R<sup>111</sup>~R<sup>116</sup>은 각각 독립적으로, 수소 원자, 할로젠 원자, 알킬기, 아릴기, 헤테로환기, 에텐일기, 에타인일기, 아미노기, 아실기, 알콕시기, 아릴옥시기, 알킬싸이오기, 또는 아릴싸이오기를 나타내고, 이들은 치환기를 갖고 있어도 된다. A는, -O-, -S-, 또는 -NH-를 나타낸다.

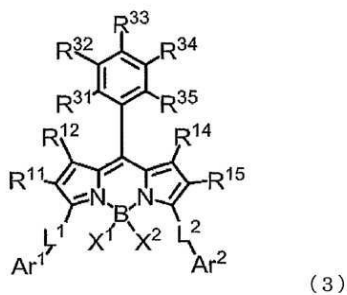
[0019] <2> 상기 표지 입자가 표지 라텍스 입자인, <1>에 기재된 키트.

[0020] <3> 상기 표지 입자가, 카복실기를 갖는, <1> 또는 <2>에 기재된 키트.

[0021] <4> 상기 표지 입자의 평균 입자경이 70~500nm인, <1> 내지 <3> 중 어느 하나에 기재된 키트.

[0022] <5> 상기 식 (1)로 나타나는 화합물이, 하기 식 (3)으로 나타나는 화합물인, <1> 내지 <4> 중 어느 하나에 기재된 키트.

[0023] [화학식 3]



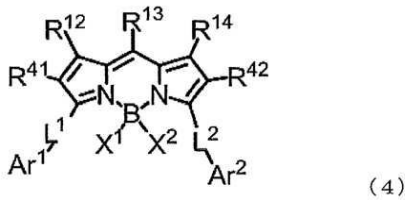
[0024]

[0025] 식 중, R<sup>11</sup>, R<sup>12</sup>, R<sup>14</sup>, R<sup>15</sup>, X<sup>1</sup>, X<sup>2</sup>, Ar<sup>1</sup>, Ar<sup>2</sup>, L<sup>1</sup> 및 L<sup>2</sup>는, 식 (1)에 있어서의 정의와 동의이며, 단, R<sup>11</sup>, R<sup>12</sup>, R<sup>14</sup>

및 R<sup>15</sup> 중 적어도 2개는 수소 원자 이외의 원자 또는 기이다. R<sup>31</sup>~R<sup>35</sup>는 각각 독립적으로, 수소 원자, 할로젠 원자, 알킬기, 아릴기, 헤테로환기, 에텐일기, 에타인일기, 아미노기, 아실기, 사이아노기, 알콕시기, 아릴옥시기, 알킬싸이오기, 또는 아릴싸이오기를 나타내고, 이들은 치환기를 갖고 있어도 되며, R<sup>31</sup>, R<sup>32</sup>, R<sup>34</sup> 및 R<sup>35</sup> 중 어느 하나는 2원자 이상으로 이루어지는 기이다.

[0026] <6> 상기 식 (1)로 나타나는 화합물이, 하기 식 (4)로 나타나는 화합물인, <1> 내지 <4> 중 어느 하나에 기재된 키트.

[0027] [화학식 4]

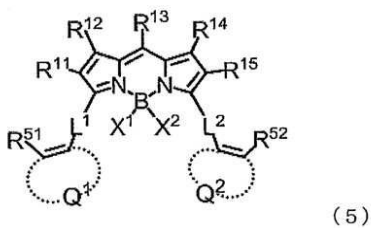


[0028]

[0029] 식 중, R<sup>12</sup>, R<sup>13</sup>, R<sup>14</sup>, X<sup>1</sup>, X<sup>2</sup>, Ar<sup>1</sup>, Ar<sup>2</sup>, L<sup>1</sup> 및 L<sup>2</sup>는, 식 (1)에 있어서의 정의와 동의이며, 단, R<sup>12</sup>, R<sup>13</sup> 및 R<sup>14</sup> 중 적어도 하나는 수소 원자 이외의 원자 또는 기이다. R<sup>41</sup> 및 R<sup>42</sup>는 각각 독립적으로, 아릴기, 헤테로환기, 에텐일기, 또는 에타인일기를 나타내고, 이들은 치환기를 갖고 있어도 된다.

[0030] <7> 상기 식 (1)로 나타나는 화합물이, 하기 식 (5)로 나타나는 화합물인, <1> 내지 <4> 중 어느 하나에 기재된 키트.

[0031] [화학식 5]



[0032]

[0033] 식 중, R<sup>11</sup>~R<sup>15</sup>, X<sup>1</sup>, X<sup>2</sup>, L<sup>1</sup> 및 L<sup>2</sup>는, 식 (1)에 있어서의 정의와 동의이다. R<sup>51</sup> 및 R<sup>52</sup>는 각각 독립적으로, 알킬기, 아릴기, 헤테로아릴기, 아미노기, 아실기, 알콕시기, 아릴옥시기, 알킬싸이오기, 또는 아릴싸이오기를 나타내고, 이들은 치환기를 갖고 있어도 된다. Q<sup>1</sup> 및 Q<sup>2</sup>는 각각 독립적으로, 방향족 탄화 수소환 또는 방향족 헤테로환을 나타내고, 이들은 치환기를 갖고 있어도 된다.

[0034] <8> 상기 표지 입자가, 적어도 1종의 에너지 도너 화합물과, 적어도 1종의 에너지 억셉터 화합물과, 입자를 함유하는 발광성 입자이며, 상기 에너지 도너 화합물 및 상기 에너지 억셉터 화합물 중 적어도 1종이, 상기 식 (1)로 나타나는 화합물인, <1> 내지 <7> 중 어느 하나에 기재된 키트.

[0035] <9> 상기 에너지 도너 화합물로서, 적어도 1종의 상기 식 (1)로 나타나는 화합물을 함유하고, 상기 에너지 억셉터 화합물로서, 적어도 1종의 상기 식 (1)로 나타나는 화합물을 함유하는, <8>에 기재된 키트.

[0036] <10> 에너지 도너 화합물과 에너지 억셉터 화합물의 몰비가 1:10~10:1인, <8> 또는 <9>에 기재된 키트.

[0037] <11> 에너지 도너 화합물과 에너지 억셉터 화합물의 스토크스 시프트가 40nm 이상인, <8> 내지 <10> 중 어느 하나에 기재된 키트.

[0038] <12> 상기 기관이, 상기 제2 결합 물질을 갖는 검출 영역을 갖는, <1> 내지 <11> 중 어느 하나에 기재된 키트.

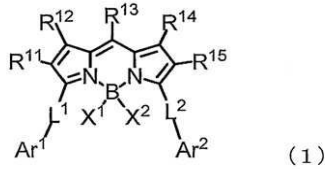
[0039] <13> 상기 검출 영역이 금을 포함하는 금속막인, <12>에 기재된 키트.

[0040] <14> 생체 시료 중의 측정 대상 물질을 측정하는 방법으로서,

[0041] 생체 시료를, 특정 대상 물질과 결합성을 갖는 제1 결합 물질을 갖는 표지 입자와 반응시키는 반응 공정과, 상기 특정 대상 물질 또는 상기 제1 결합 물질 중 어느 하나와 결합성을 갖는 제2 결합 물질을 갖는 기관에, 상기 반응 공정에서 얻어진 반응 산물을 접촉시켜, 표지 입자를 기관 상에 포착시키는 포착 공정과,

[0042] 상기 특정 대상 물질에 관련된 표지 정보를 취득하는, 표지 정보 취득 공정을 포함하고, 상기 표지 입자는, 하기 식 (1)로 나타나는 적어도 1종의 화합물과 입자를 함유하는 발광성의 표지 입자인, 방법.

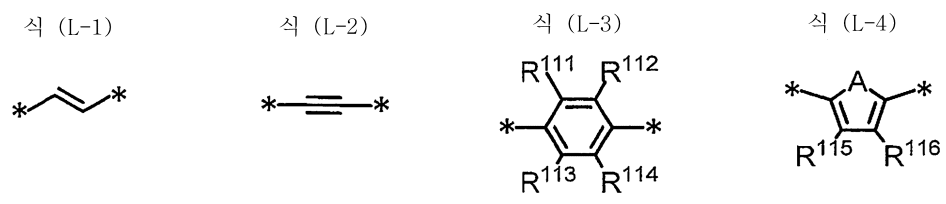
[0043] [화학식 6]



[0044]

[0045] 식 중, R<sup>11</sup>~R<sup>15</sup>는 각각 독립적으로, 수소 원자, 할로젠 원자, 알킬기, 아릴기, 헤테로환기, 에텐일기, 에타인일기, 아미노기, 아실기, 알콕시기, 아릴옥시기, 알킬싸이오기, 또는 아릴싸이오기를 나타내고, 이들은 치환기를 갖고 있어도 되며, R<sup>11</sup>~R<sup>15</sup> 중 적어도 3개는 수소 원자 이외의 원자 또는 기를 나타낸다. X<sup>1</sup> 및 X<sup>2</sup>는 각각 독립적으로, 할로젠 원자, 알킬기, 아릴기, 헤테로환기, 하이드록시기, 알콕시기, 아릴옥시기, 알킬싸이오기, 아릴싸이오기, 에텐일기, 또는 에타인일기를 나타내고, 이들은 치환기를 갖고 있어도 되며, X<sup>1</sup> 및 X<sup>2</sup>는 서로 연결되어 환을 형성해도 된다. Ar<sup>1</sup> 및 Ar<sup>2</sup>는 각각 독립적으로, 아릴기 또는 헤테로환기를 나타내고, 이들은 치환기를 갖고 있어도 된다. L<sup>1</sup> 및 L<sup>2</sup>는 각각 독립적으로, 식 (L-1)~식 (L-4) 중 어느 하나를 나타낸다.

[0046] [화학식 7]



[0047]

[0048] 식 중, R<sup>111</sup>~R<sup>116</sup>은 각각 독립적으로, 수소 원자, 할로젠 원자, 알킬기, 아릴기, 헤테로환기, 에텐일기, 에타인일기, 아미노기, 아실기, 알콕시기, 아릴옥시기, 알킬싸이오기, 또는 아릴싸이오기를 나타내고, 이들은 치환기를 갖고 있어도 된다. A는, -O-, -S-, 또는 -NH-를 나타낸다.

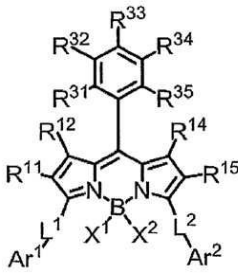
[0049] <15> 상기 입자가 라텍스 입자인, <14>에 기재된 방법.

[0050] <16> 상기 입자가, 카복실기를 갖는, <14> 또는 <15>에 기재된 방법.

[0051] <17> 상기 표지 입자의 평균 입자경이 70~500nm인, <14> 내지 <16> 중 어느 하나에 기재된 방법.

[0052] <18> 상기 식 (1)로 나타나는 화합물이, 하기 식 (3)으로 나타나는 화합물인, <14> 내지 <17> 중 어느 하나에 기재된 방법.

[0053] [화학식 8]



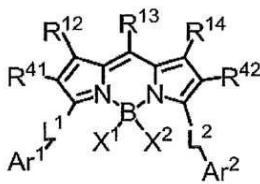
(3)

[0054]

[0055] 식 중,  $R^{11}$ ,  $R^{12}$ ,  $R^{14}$ ,  $R^{15}$ ,  $X^1$ ,  $X^2$ ,  $Ar^1$ ,  $Ar^2$ ,  $L^1$  및  $L^2$ 는, 식 (1)에 있어서의 정의와 동의이며, 단,  $R^{11}$ ,  $R^{12}$ ,  $R^{14}$  및  $R^{15}$  중 적어도 2개는 수소 원자 이외의 원자 또는 기이다.  $R^{31}$ ~ $R^{35}$ 는 각각 독립적으로, 수소 원자, 할로젠 원자, 알킬기, 아릴기, 헤테로환기, 에텐일기, 에타인일기, 아미노기, 아실기, 사이아노기, 알콕시기, 아릴옥시기, 알킬싸이오기, 또는 아릴싸이오기를 나타내고, 이들은 치환기를 갖고 있어도 되며,  $R^{31}$ ,  $R^{32}$ ,  $R^{34}$  및  $R^{35}$  중 어느 하나는 2원자 이상으로 이루어지는 기이다.

[0056] <19> 상기 식 (1)로 나타나는 화합물이, 하기 식 (4)로 나타나는 화합물인, <14> 내지 <17> 중 어느 하나에 기재된 방법.

[0057] [화학식 9]



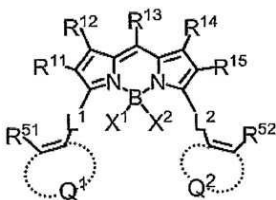
(4)

[0058]

[0059] 식 중,  $R^{12}$ ,  $R^{13}$ ,  $R^{14}$ ,  $X^1$ ,  $X^2$ ,  $Ar^1$ ,  $Ar^2$ ,  $L^1$  및  $L^2$ 는, 식 (1)에 있어서의 정의와 동의이며, 단,  $R^{12}$ ,  $R^{13}$  및  $R^{14}$  중 적어도 하나는 수소 원자 이외의 원자 또는 기이다.  $R^{41}$  및  $R^{42}$ 는 각각 독립적으로, 아릴기, 헤테로환기, 에텐일기, 또는 에타인일기를 나타내고, 이들은 치환기를 갖고 있어도 된다.

[0060] <20> 상기 식 (1)로 나타나는 화합물이, 하기 식 (5)로 나타나는 화합물인, <14> 내지 <17> 중 어느 하나에 기재된 방법.

[0061] [화학식 10]



(5)

[0062]

[0063] 식 중,  $R^{11}$ ~ $R^{15}$ ,  $X^1$ ,  $X^2$ ,  $L^1$  및  $L^2$ 는, 식 (1)에 있어서의 정의와 동의이다.  $R^{51}$  및  $R^{52}$ 는 각각 독립적으로, 알킬기, 아릴기, 헤테로아릴기, 아미노기, 아실기, 알콕시기, 아릴옥시기, 알킬싸이오기, 또는 아릴싸이오기를 나타내고, 이들은 치환기를 갖고 있어도 된다.  $Q^1$  및  $Q^2$ 는 각각 독립적으로, 방향족 탄화 수소환 또는 방향족 헤테로환을 나타내고, 이들은 치환기를 갖고 있어도 된다.

[0064] <21> 상기 표지 입자가, 적어도 1종의 에너지 도너 화합물과, 적어도 1종의 에너지 억셉터 화합물과, 입자를 함

유하는 발광성 입자이며, 상기 에너지 도너 화합물 및 상기 에너지 억셉터 화합물 중 적어도 1종이, 상기 식 (1)로 나타나는 화합물인, <14> 내지 <20> 중 어느 하나에 기재된 방법.

- [0065] <22> 상기 에너지 도너 화합물로서, 적어도 1종의 상기 식 (1)로 나타나는 화합물을 함유하고, 상기 에너지 억셉터 화합물로서, 적어도 1종의 상기 식 (1)로 나타나는 화합물을 함유하는, <21>에 기재된 방법.
- [0066] <23> 에너지 도너 화합물과 에너지 억셉터 화합물의 몰비가 1:10~10:1인, <21> 또는 <22>에 기재된 방법.
- [0067] <24> 에너지 도너 화합물과 에너지 억셉터 화합물의 스토크스 시프트가 40nm 이상인, <21> 내지 <23> 중 어느 하나에 기재된 방법.
- [0068] <25> 상기 기관이, 상기 제2 결합 물질을 갖는 검출 영역을 갖는, <14> 내지 <24> 중 어느 하나에 기재된 방법.
- [0069] <26> 상기 검출 영역이 금을 포함하는 금속막인, <25>에 기재된 방법.
- [0070] <27> 표면 플라즈몬 여기에 의한 형광 검출에 의하여, 상기 측정 대상 물질에 관련된 표지 정보를 취득하는, <26>에 기재된 방법.

**발명의 효과**

- [0071] 본 발명의 키트 및 방법에 의하면, 저농도로부터 고농도에 걸친 광범위한 농도역에 있어서 생체 시료 중의 측정 대상 물질의 고정밀도의 측정을 실현할 수 있다.

**도면의 간단한 설명**

- [0072] 도 1은, 화합물 (4)의 400MHz <sup>1</sup>H NMR 스펙트럼을 나타낸다.
- 도 2는, 화합물 (7)의 400MHz <sup>1</sup>H NMR 스펙트럼을 나타낸다.
- 도 3은, 센서 칩의 개략도를 나타낸다.
- 도 4는, 센서 칩의 분해도를 나타낸다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

- [0073] 이하, 본 발명의 실시형태에 대하여 상세하게 설명한다.
- [0074] 본 명세서에 있어서 "~"를 이용하여 나타난 수치 범위는, "~"의 전후에 기재되는 수치를 각각 최솟값 및 최댓값 으로서 포함하는 범위를 의미한다.
- [0075] [생체 시료 중의 측정 대상 물질을 측정하기 위한 키트]
- [0076] 본 발명에 의한 생체 시료 중의 측정 대상 물질을 측정하기 위한 키트는, 생체 시료 중의 측정 대상 물질과 결합성을 갖는 제1 결합 물질을 갖는 표지 입자와, 측정 대상 물질 또는 제1 결합 물질 중 어느 하나와 결합성을 갖는 제2 결합 물질을 갖는 기관을 포함하는 키트로서, 표지 입자는, 후술하는 식 (1)로 나타나는 적어도 1종의 화합물과 입자를 함유하는 발광성의 표지 입자이다.
- [0077] (생체 시료)
- [0078] 생체 시료로서는, 측정 대상 물질을 포함하는 가능성이 있는 시료인 한, 특별히 한정되는 것은 아니고, 예를 들면 생물학적 시료, 특히 동물(예를 들면, 인간, 개, 고양이, 말 등)의 체액(예를 들면, 혈액, 혈청, 혈장, 수액, 눈물, 땀, 소변, 고름, 콧물, 또는 가래) 혹은 배설물(예를 들면, 분변), 장기, 조직, 점막이나 피부 등을 들 수 있다.
- [0079] (측정 대상 물질)
- [0080] 측정 대상 물질로서는, 특별히 한정되지 않지만, 예를 들면 티록신(T4), 트라이아이오도사이로닌(T3), 에스트라 디올(E2), 알도스테론, 대칭성 다이메틸아르지닌(SDMA), 담즙산, 코르티솔, 콜레스테롤, 코르티코스테론, 프로게스테론, 테스토스테론, 에스트로젠, 비타민류, 크레아티닌, 아미노산, β 카로틴, 크레아티닌, 디곡신, 테오 필린, 엽산, 염증 마커나 패혈증 마커 등의 단백질 등을 들 수 있다.
- [0081] 프로게스테론은, 난소와 태반으로부터 분비되고, 황체 기능이나 임신에 관계하는 성호르몬이다. 월경의 주기 이

상, 불임증의 진단에 이용된다. 또, 개의 교배 시기, 고양이의 난소 유잔(遺殘) 확인에도 사용된다.

[0082] (제1 결합 물질)

[0083] 본 발명에서 이용하는 제1 결합 물질은, 측정 대상 물질과 결합성을 갖는 물질이다. 제1 결합 물질로서는, 항원, 항체, 또는 이들의 복합체를 사용할 수 있지만, 이들에 한정되는 것은 아니다. 바람직하게는, 제1 결합 물질은 항체이다. 제1 결합 물질이 항체인 경우는, 측정 대상 물질과 결합성을 갖는 항체로서, 예를 들면 그 측정 대상 물질에 의하여 면역된 동물의 혈청으로부터 조제하는 항혈청이나, 항혈청으로부터 정제된 면역 글로블린 분획, 그 측정 대상 물질에 의하여 면역된 동물의 비장 세포를 이용하는 세포 융합에 의하여 얻어지는 모노클로날 항체, 혹은 그들의 단편(斷片)[예를 들면, F(ab')<sub>2</sub>, Fab, Fab', 또는 Fv] 등을 이용할 수 있다. 이들 항체의 조제는, 통상의 방법에 의하여 행할 수 있다. 또한, 그 항체가 키메라 항체 등의 경우와 같이, 수식이 더해진 것이어도 되고, 또 시판 중인 항체여도, 동물 혈청 또는 배양 상등액으로부터 공지의 방법에 의하여 조제한 항체여도 사용 가능하다.

[0084] 예를 들면, 측정 대상 물질이 프로게스테론인 경우, 제1 결합 물질로서는, 프로게스테론에 결합성을 갖는(바람직하게는, 프로게스테론을 특이적으로 인식하는) 항프로게스테론 항체를 사용한다.

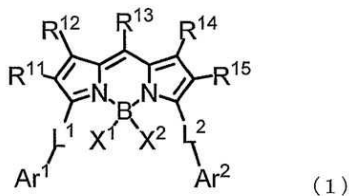
[0085] 항프로게스테론 항체의 제작 방법의 하나를 예로 들어 이하에 설명한다.

[0086] 프로게스테론과, 소 혈청 알부민(Bovine Serum Albumin, 이하 BSA라고 약기함)과, 축합제를 혼합하여 프로게스테론-BSA 결합체를 제작할 수 있다. 결합체를 마우스 면역감작 항원으로서 이용하여, 수회, 마우스 배부(背部) 피하에 면역한다. 이 경우, 완전 애주번트(Complete Freund's Adjuvant: CFA), 및/또는 불완전 애주번트(Incomplete Freund's Adjuvant: IFA)를 적절히 선택하여 면역감작 항원과 혼합하여 사용할 수 있다. 완전 애주번트란, 면역을 자극하는 물질이며, 파라핀과 알라셀의 혼합물이다. 불완전 애주번트란, 완전 애주번트에 사멸한 마이코박테리아 또는 결핵균의 사균을 첨가하여, 항원성을 보다 더 증강시킨 것이다. 수주동안 수회, 적절히 면역감작을 행한 후에 마우스로부터 채혈하여 항체검사의 측정을 실시한다. 항체검사의 충분한 상승이 확인된 경우에 복강 내에 항원을 투여하고, 수일 후에 비장을 적출한다. 이렇게 하여 면역 마우스로부터 적출한 비장 세포를, 변이주 골수종 세포(미엘로마)와 융합시킴으로써, 항체 산생(產生) 능력을 구비한 융합 세포를 제작할 수 있다. 이 융합 세포 중에서 목적으로 하는 항원에 대한 항체 산생 세포만을 선택하고, 추가로 그 세포주만을 증식하기 위하여 한계 희석을 행한다. 희석 후의 세포의 배양(클로닝)을 행할 수 있다. 이와 같이 하여 얻어지는 융합 세포주를, 마우스의 복강 내에 주사하고, 복수형의 항체 산생 세포를 증식시킴으로써 모노클로날 항체를 복수 중에 산생하는 것이 가능해지고, 이들 항체를 회수함으로써, 목적의 항체를 입수할 수 있다.

[0087] (표지 입자)

[0088] 본 발명에서 사용되는 표지 입자는, 하기 식 (1)로 나타나는 적어도 1종의 화합물과 입자를 함유하는 발광성의 표지 입자이며, 형광 표지 입자라고도 한다.

[0089] [화학식 11]



[0090] 식 (1) 중의 각 기호의 의미는, 본 명세서 중에 정의한 바와 같다.

[0092] 통상의 색소 화합물은, 입자에 대한 도입량을 늘리면 회합의 영향을 받아, 양자 수율이 저하되어 가는 것이 알려져 있다(이것을 농도 소광이라고도 한다). 특히, 흡수 파장이 650nm 이상의 장파장인 형광 색소 화합물은 입자에 도입되면 농도 소광하기 쉬워, 양자 수율을 유지하는 것은 곤란하다.

[0093] 본 발명에서 사용하는 식 (1)로 나타나는 화합물은, 공액계 치환기를 가짐으로써 장파장 발광을 가능하게 하고 있고, 또한 다이피로메텐 골격에 복수의 치환기를 갖게 함으로써 폴리머 입자 중에서의 양자 수율의 저하를 억제할 수 있다. 양자 수율 저하 억제의 요인으로서, 다이피로메텐 골격에 대하여 수직 방향으로 돌출되는 복수의 치환기에 의한 분자 간의 상호 작용(예를 들면 π-π 상호 작용)의 억제가 생각된다. 식 (1)로 나타나는 화

합물에 의하면, 특히 장파장 영역에 있어서 휘도가 높은 발광성의 표지 입자(바람직하게는 형광 입자, 보다 바람직하게는 형광 나노 입자)를 제조할 수 있다. 또한, 표지 입자가 형광 입자인 경우, 휘도관, 형광 강도이다. 본 발명에 의하면, 생체의 창(窓)의 영역(생체를 투과하기 쉬운 근적외 파장역인 650~900nm 부근)에서 발광 양자 수율이 높은 점에서, 발광을 이용한 센싱의 감도 향상이 가능하다.

- [0094] 본 명세서에 있어서, 알킬기란, 직쇄, 분기쇄, 환상 또는 이들의 조합 중 어느 하나여도 되고, 직쇄 또는 분기쇄 알킬기의 탄소수는 바람직하게는 1~36이며, 보다 바람직하게는 1~18이고, 더 바람직하게는 1~12이며, 특히 바람직하게는 1~6이다. 환상의 알킬기로서는, 예를 들면 탄소수 3~8의 사이클로알킬 등을 들 수 있다. 알킬기의 구체예로서는, 메틸기, 에틸기, n-프로필기, 아이소프로필기, n-뷰틸기, iso-뷰틸기, sec-뷰틸기, t-뷰틸기, n-펜틸기, n-헥실기, n-헵틸기, n-옥틸기, n-노닐기, n-데실기, n-운데실기, n-도데실기, n-트라이데실기, n-테트라데실기, n-펜타데실기, n-헥사데실기, n-헵타데실기, n-옥타데실기, 및 사이클로헥실기 등을 들 수 있다.
- [0095] 본 명세서에 있어서, 아릴기란, 탄소수가 6~48인 아릴기가 바람직하고, 탄소수가 6~24인 아릴기가 보다 바람직하며, 탄소수가 6~14인 아릴기가 더 바람직하고, 예를 들면 페닐기, 나프틸기, 안트릴기, 피렌일기, 페난트렌일기, 바이페닐기, 플루오렌일기 등을 들 수 있다.
- [0096] 본 명세서에 있어서, 헤테로환기로서는, 바람직하게는 5~7원의 치환 혹은 무치환, 포화 혹은 불포화, 방향족 혹은 비방향족, 단환 혹은 축환의 헤테로환기 중 어느 것이어도 된다. 헤테로환기는, 바람직하게는, 환 구성 원자가 탄소 원자, 질소 원자, 산소 원자 및 황 원자로부터 선택되고, 또한 질소 원자, 산소 원자 및 황 원자 중 어느 하나의 헤테로 원자를 적어도 1개 갖는 헤테로환기이며, 더 바람직하게는, 탄소수 3~30의 5 혹은 6원의 방향족의 헤테로환기이다. 헤테로환기로서는, 예를 들면 퓨릴기, 벤조퓨릴기, 다이벤조퓨릴기, 싸이엔일기, 벤조싸이엔일기, 다이벤조싸이엔일기, 피리딘기, 피리미딘일기, 퀴놀일기, 아이소퀴놀일기, 아크리딘일기, 페난트리딘일기, 프테리딘일기, 피라진일기, 퀴놀살린일기, 피리미딘일기, 퀴나졸일기, 피리다진일기, 신놀린일기, 프탈라진일기, 트리아진일기, 옥사졸일기, 벤즈옥사졸일기, 싸이아졸일기, 벤조싸이아졸일기, 이미다졸일기, 벤즈이미다졸일기, 피라졸일기, 인다졸일기, 아이소옥사졸일기, 벤즈아이소옥사졸일기, 아이소싸이아졸일기, 벤즈아이소싸이아졸일기, 옥사다이아졸일기, 싸이아다이아졸일기, 트리아졸일기, 테트라졸일기, 퓨릴기, 싸이엔일기, 피롤일기, 인돌일기, 이미다조피리딘일기, 카바졸일기 등을 들 수 있다.
- [0097] 본 명세서에 있어서, 아실기로서는, 바람직하게는 탄소수 2~15의 직쇄, 또는 분기 알칸오일기이며, 예를 들면 아세틸기, 프로피온일기, 뷰티릴기, 아이소뷰티릴기, 발레릴기, 아이소발레릴기, 피발로일기, 헥산오일기, 헵탄오일기, 벤조일기 등을 들 수 있다.
- [0098] 본 명세서에 있어서, 알콕시기로서는, 바람직하게는, 탄소수 1~20의 알콕시기이며, 예를 들면 메톡시기, 에톡시기, 프로폭시기, n-뷰톡시기, 펜틸옥시기, 헥실옥시기, 헵틸옥시기 등을 들 수 있다.
- [0099] 본 명세서에 있어서, 아릴옥시기로서는, 바람직하게는 탄소수 6~14의 아릴옥시기이며, 예를 들면 페녹시기, 나프톡시기, 안트릴옥시기 등을 들 수 있다.
- [0100] 알킬싸이오기로서는, 바람직하게는, 탄소수 1 내지 30의 알킬싸이오기이며, 예를 들면 메틸싸이오기, 에틸싸이오기, n-헥사데실싸이오기 등을 들 수 있다.
- [0101] 아릴싸이오기로서는, 바람직하게는, 탄소수 6 내지 30의 아릴싸이오기이며, 예를 들면 페닐싸이오기, p-클로로페닐싸이오기, m-메톡시페닐싸이오기 등을 들 수 있다.
- [0102] 본 명세서에 있어서, 할로젠 원자로서는, 불소 원자, 염소 원자, 브로민 원자 및 아이오딘 원자를 들 수 있다.
- [0103] 본 명세서에 있어서, 방향환이란, 벤젠환, 나프탈렌환, 안트라센환, 페난트렌환, 피렌환, 페릴렌환 및 테릴렌환 등의 방향족 탄화 수소환; 인덴환, 아줄렌환, 피리딘환, 피라진환, 피리미딘환, 피라졸환, 피라졸리딘환, 싸이아졸리딘환, 옥사졸리딘환, 피란환, 크로멘환, 피롤환, 피롤리딘환, 벤즈이미다졸환, 이미다졸린환, 이미다졸리딘환, 이미다졸환, 피라졸환, 트리아졸환, 트리아진환, 다이아졸환, 인돌린환, 싸이오펜환, 티에노싸이오펜환, 퓨란환, 옥사졸환, 옥사다이아졸환, 싸이아진환, 싸이아졸환, 인돌환, 벤조싸이아졸환, 벤조싸이아다이아졸환, 나프토싸이아졸환, 벤즈옥사졸환, 나프토옥사졸환, 인돌레닌환, 벤즈인돌레닌환, 피라진환, 퀴놀린환 및 퀴나졸린환 등의 방향족 헤테로환과; 플루오렌환 및 카바졸환 등의 축합형 방향환 등을 들 수 있고, 탄소수 5~16의 방향환(방향환 및 방향환을 포함하는 축합환)이 바람직하다.
- [0104] 또한, 방향환은 치환기를 갖고 있어도 되고, "방향환"이라는 용어는, 치환기를 갖는 방향환, 및 치환기를 갖지 않는 방향환의 양쪽 모두를 의미한다. 방향환이 갖는 치환기로서는, 하기하는 치환기군 A에 기재된 치환기를 들

수 있다.

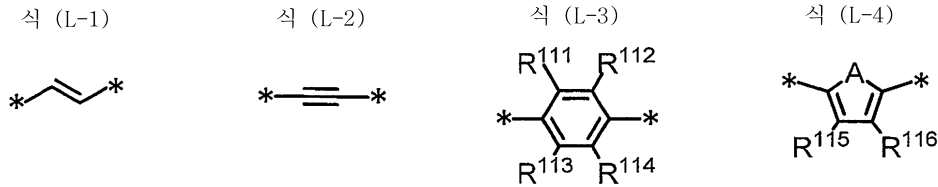
- [0105] 본 명세서에 있어서, 아미노기로서는, 아미노기; 모노 또는 다이메틸아미노기, 모노 또는 다이에틸아미노기와 모노 또는 다이(n-프로필)아미노기 등의 알킬 치환 아미노기; 모노 또는 다이페닐아미노기와 모노 또는 다이나프틸아미노기 등의 방향족 잔기로 치환된 아미노기; 모노알킬모노페닐아미노기 등의 알킬기와 방향족 잔기가 1 개씩 치환한 아미노기; 벤질아미노기, 아세틸아미노기, 페닐아세틸아미노기 등을 들 수 있다. 여기에서 방향족 잔기란, 방향환으로부터 수소 원자 1개를 제거한 기를 의미하고, 방향환은 본 명세서 중 상기한 바와 같다.
- [0106]  $R^{11}\sim R^{15}$ 가 나타내는 알킬기, 아릴기, 헤테로환기, 에텐일기, 에타인일기, 아미노기, 아실기, 알콕시기, 아릴옥시기, 알킬싸이오기, 또는 아릴싸이오기는, 치환기를 갖고 있어도 되고, 상기 치환기로서는, 하기의 치환기군 A에 기재된 치환기를 들 수 있다.
- [0107] 치환기군 A:
- [0108] 설과모일기, 사이아노기, 아이소사이아노기, 싸이오사이아네이토기, 아이소싸이오사이아네이토기, 나이트로기, 나이트로실기, 할로젠 원자, 하이드록시기, 아미노기, 머캡토기, 아마이드기, 알콕시기, 아릴옥시기, 알킬싸이오기, 아릴싸이오기, 카바모일기, 아실기, 알데하이드기, 카보닐기, 아릴기, 알킬기, 할로젠 원자로 치환된 알킬기, 에텐일기, 에타인일기, 실릴기, 및 트라이알킬실릴기(트라이메틸실릴기 등).
- [0109]  $X^1$  및  $X^2$ 가 나타내는 알킬기, 아릴기, 헤테로환기, 하이드록시기, 알콕시기, 아릴옥시기, 알킬싸이오기, 아릴싸이오기, 에텐일기, 또는 에타인일기는, 치환기를 갖고 있어도 되고, 상기 치환기로서는, 치환기군 A에 기재된 치환기를 들 수 있다.
- [0110]  $Ar^1$  및  $Ar^2$ 가 나타내는 아릴기 또는 헤테로환기는, 치환기를 갖고 있어도 되고, 상기 치환기로서는, 치환기군 A에 기재된 치환기를 들 수 있다.
- [0111]  $R^{111}\sim R^{116}$ 이 나타내는 알킬기, 아릴기, 헤테로환기, 에텐일기, 에타인일기, 아미노기, 아실기, 알콕시기, 아릴옥시기, 알킬싸이오기, 또는 아릴싸이오기는, 치환기를 갖고 있어도 되고, 상기 치환기로서는, 치환기군 A에 기재된 치환기를 들 수 있다.
- [0112] <식 (1)로 나타나는 화합물>
- [0113] 식 (1) 중,  $R^{11}\sim R^{15}$ 는 각각 독립적으로, 수소 원자, 할로젠 원자, 알킬기, 아릴기, 헤테로환기, 에텐일기, 에타인일기, 아미노기, 아실기, 알콕시기, 아릴옥시기, 알킬싸이오기, 또는 아릴싸이오기를 나타내고, 이들은 치환기를 갖고 있어도 된다.  $R^{11}\sim R^{15}$  중 적어도 3개는 수소 원자 이외의 원자 또는 기를 나타내고, 바람직하게는  $R^{11}\sim R^{15}$  중 적어도 4개는 수소 원자 이외의 원자 또는 기를 나타내며, 보다 바람직하게는  $R^{11}\sim R^{15}$ 의 모두가 수소 원자 이외의 원자 또는 기를 나타낸다.
- [0114]  $R^{11}$  및  $R^{15}$ 는, 동일하거나 또는 다른 원자 또는 기여도 되지만, 바람직하게는 동일한 원자 또는 기이다.  $R^{12}$  및  $R^{14}$ 는, 동일하거나 또는 다른 원자 또는 기여도 되지만, 바람직하게는 동일한 원자 또는 기이다.
- [0115]  $R^{11}$  및  $R^{15}$ 는, 바람직하게는, 수소 원자, 할로젠 원자, 알킬기, 아릴기, 헤테로환기, 에텐일기, 또는 에타인일기를 나타내고, 이들은 치환기를 갖고 있어도 된다.
- [0116]  $R^{12}$  및  $R^{14}$ 는, 바람직하게는, 알킬기를 나타내고, 이들은 치환기를 갖고 있어도 된다.
- [0117]  $R^{13}$ 은, 바람직하게는, 아릴기를 나타내고, 이것은 치환기를 갖고 있어도 된다.
- [0118] 식 (1) 중,  $X^1$  및  $X^2$ 는 각각 독립적으로, 할로젠 원자, 알킬기, 아릴기, 헤테로환기, 하이드록시기, 알콕시기, 아릴옥시기, 알킬싸이오기, 아릴싸이오기, 에텐일기, 또는 에타인일기를 나타내고, 이들은 치환기를 갖고 있어도 되며,  $X^1$  및  $X^2$ 는 서로 연결되어 환을 형성해도 된다.
- [0119]  $X^1$  및  $X^2$ 는, 바람직하게는, 할로젠 원자, 또는 알콕시기를 나타낸다.  $X^1$  및  $X^2$ 는, 불소 원자, 메톡시기, 에톡시기, 아이소프로필옥시기, t-부틸옥시기인 것이 보다 바람직하고, 이들은 불소 원자, 알콕시기에 의하여 치환되

어 있는 것도 바람직하다.

[0120] 식 (1) 중,  $Ar^1$  및  $Ar^2$ 는 각각 독립적으로, 아릴기 또는 헤테로환기를 나타내고, 이들은 치환기를 갖고 있어도 된다.

[0121] 식 (1) 중,  $L^1$  및  $L^2$ 는 각각 독립적으로, 식 (L-1)~식 (L-4) 중 어느 하나를 나타낸다.

[0122] [화학식 12]



[0123]

[0124] 식 중,  $R^{111} \sim R^{116}$ 은 각각 독립적으로, 수소 원자, 할로젠 원자, 알킬기, 아릴기, 헤테로환기, 에텐일기, 에타인일기, 아미노기, 아실기, 알콕시기, 아릴옥시기, 알킬싸이오기, 또는 아릴싸이오기를 나타내고, 이들은 치환기를 갖고 있어도 된다. A는, -O-, -S-, 또는 -NH-를 나타낸다.

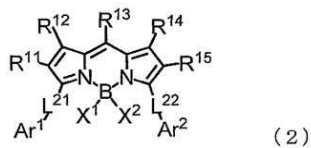
[0125]  $L^1$  및  $L^2$ 는, 바람직하게는, 식 (L-1) 또는 식 (L-2) 중 어느 하나를 나타낸다.

[0126]  $R^{111} \sim R^{116}$ 은, 바람직하게는 수소 원자이다.

[0127] <식 (2)로 나타나는 화합물에 대하여>

[0128] 식 (1)로 나타나는 화합물의 바람직한 예로서는, 하기 식 (2)로 나타나는 화합물을 들 수 있다.

[0129] [화학식 13]



[0130]

[0131] 식 중,  $R^{11} \sim R^{15}$ ,  $X^1$ ,  $X^2$ ,  $Ar^1$  및  $Ar^2$ 는 식 (1)에 있어서의 정의와 동의이며, 바람직한 범위도, 식 (1)에 있어서의 바람직한 범위와 동일하다.  $L^{21}$  및  $L^{22}$ 는 각각 독립적으로, 식 (L-1) 또는 식 (L-2)로 나타나는 기를 나타낸다.

[0132] [화학식 14]

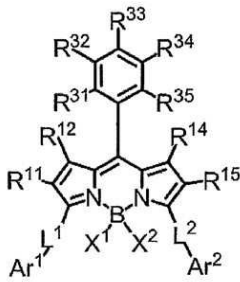


[0133]

[0134] <식 (3)으로 나타나는 화합물에 대하여>

[0135] 식 (1)로 나타나는 화합물의 바람직한 예로서는, 하기 식 (3)으로 나타나는 화합물을 들 수 있다.

[0136] [화학식 15]



(3)

[0137]

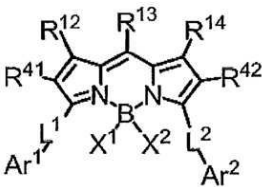
[0138] 식 (3) 중,  $R^{11}$ ,  $R^{12}$ ,  $R^{14}$ ,  $R^{15}$ ,  $X^1$ ,  $X^2$ ,  $Ar^1$ ,  $Ar^2$ ,  $L^1$  및  $L^2$ 는, 식 (1)에 있어서의 정의와 동의이며, 바람직한 범위도, 식 (1)에 있어서의 바람직한 범위와 동일하다. 단,  $R^{11}$ ,  $R^{12}$ ,  $R^{14}$  및  $R^{15}$  중 적어도 2개는 수소 원자 이외의 원자 또는 기이며, 바람직하게는,  $R^{11}$ ,  $R^{12}$ ,  $R^{14}$  및  $R^{15}$  중 적어도 3개는 수소 원자 이외의 원자 또는 기이고, 보다 바람직하게는,  $R^{11}$ ,  $R^{12}$ ,  $R^{14}$  및  $R^{15}$ 는, 수소 원자 이외의 원자 또는 기이다.

[0139] 식 (3) 중,  $R^{31}$ ~ $R^{35}$ 는 각각 독립적으로, 수소 원자, 할로젠 원자, 알킬기, 아릴기, 헤테로환기, 에텐일기, 에타인일기, 아미노기, 사이아노기, 아실기, 알콕시기, 아릴옥시기, 알킬싸이오기, 또는 아릴싸이오기를 나타내고, 이들은 치환기(상기 치환기로서는, 치환기군 A에 기재된 치환기를 들 수 있음)를 갖고 있어도 되며,  $R^{31}$ ,  $R^{32}$ ,  $R^{34}$  및  $R^{35}$  중 어느 하나는 2원자 이상으로 이루어지는 기이다. 2원자 이상으로 이루어지는 기로서는, 알킬기, 아릴기, 에텐일기, 에타인일기, 아미노기, 사이아노기, 알콕시기가 바람직하고, 알킬기가 보다 바람직하다. 알킬기 중에서도, 탄소 원자와 수소 원자만으로 구성되는 알킬기, 할로젠 원자로 치환된 알킬기가 바람직하고, 탄소 수 1~6의 탄소 원자와 수소 원자만으로 구성되는 알킬기, 불소 원자로 치환된 알킬기가 보다 바람직하며, 메틸기, 아이소프로필기, t-부틸기, 트라이플루오로메틸기가 보다 더 바람직하고, 메틸기가 특히 바람직하다.

[0140] <식 (4)로 나타나는 화합물에 대하여>

[0141] 식 (1)로 나타나는 화합물의 바람직한 예로서는, 하기 식 (4)로 나타나는 화합물을 들 수 있다.

[0142] [화학식 16]



(4)

[0143]

[0144] 식 (4) 중,  $R^{12}$ ,  $R^{13}$ ,  $R^{14}$ ,  $X^1$ ,  $X^2$ ,  $Ar^1$ ,  $Ar^2$ ,  $L^1$  및  $L^2$ 는, 식 (1)에 있어서의 정의와 동의이며, 바람직한 범위도, 식 (1)에 있어서의 바람직한 범위와 동일하다. 단,  $R^{12}$ ,  $R^{13}$  및  $R^{14}$  중 적어도 1개는 수소 원자 이외의 원자 또는 기이며, 바람직하게는,  $R^{12}$ ,  $R^{13}$  및  $R^{14}$  중 적어도 2개는 수소 원자 이외의 원자 또는 기이고, 보다 바람직하게는,  $R^{12}$ ,  $R^{13}$  및  $R^{14}$ 는 수소 원자 이외의 원자 또는 기이다.

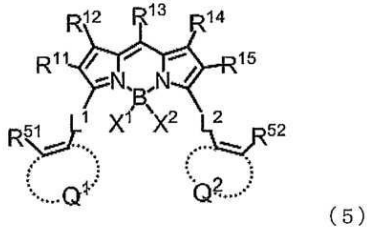
[0145] 식 (4) 중,  $R^{41}$  및  $R^{42}$ 는 각각 독립적으로, 아릴기, 헤테로환기, 에텐일기, 또는 에타인일기를 나타내고, 이들은 치환기를 갖고 있어도 된다. 상기 치환기로서는, 치환기군 A에 기재된 치환기를 들 수 있다.  $R^{41}$  및  $R^{42}$ 는 각각 독립적으로, 아릴기, 에텐일기, 또는 에타인일기인 것이 바람직하고, 양자 수율 향상의 관점에서는, 아릴기가 바람직하고, 장과장화의 관점에서는, 에텐일기, 에타인일기인 것이 바람직하다. 아릴기인 경우, 아릴기의 오쏘위 또는 메타위에 적어도 하나의 치환기를 갖고 있는 것이 바람직하고, 오쏘위에 적어도 하나의 치환기를 갖고 있는 것이 보다 바람직하다. 아릴기로 치환하는 치환기의 수는, 1~3개가 바람직하고, 2개 또는 3개가 보다 바람

직하다. 아릴기로 치환하는 치환기로서는, 알킬기인 것이 바람직하고, 메틸기, 아이소프로필기, t-부틸기인 것이 보다 바람직하며, 메틸기인 것이 더 바람직하다.

[0146] <식 (5)로 나타나는 화합물에 대하여>

[0147] 식 (1)로 나타나는 화합물의 바람직한 예로서는, 하기 식 (5)로 나타나는 화합물을 들 수 있다.

[0148] [화학식 17]



[0149]

[0150] 식 (5) 중, R<sup>11</sup>~R<sup>15</sup>, X<sup>1</sup>, X<sup>2</sup>, L<sup>1</sup> 및 L<sup>2</sup>는, 식 (1)에 있어서의 정의와 동의이며, 바람직한 범위도, 식 (1)에 있어서의 바람직한 범위와 동일하다.

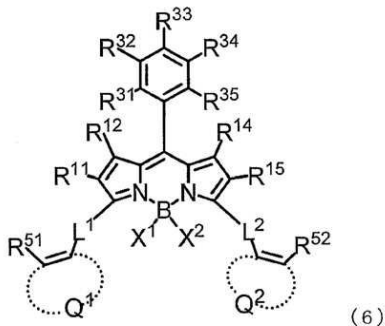
[0151] 식 (5) 중, R<sup>51</sup> 및 R<sup>52</sup>는 각각 독립적으로, 알킬기, 아릴기, 헤테로아릴기, 아미노기, 아실기, 알콕시기, 아릴옥시기, 알킬싸이오기, 또는 아릴싸이오기를 나타내고, 이들은 치환기를 갖고 있어도 된다. 상기 치환기로서는, 치환기군 A에 기재된 치환기를 들 수 있다. R<sup>51</sup> 및 R<sup>52</sup>는 각각 독립적으로, 알킬기, 알콕시기인 것이 바람직하고, 양자 수율 향상의 관점에서는, 알킬기인 것이 보다 바람직하며, 메틸기, 에틸기, 아이소프로필기, t-부틸기인 것이 더 바람직하고, 메틸기인 것이 특히 바람직하다. 장파장화의 관점에서는, 알콕시기인 것이 보다 바람직하고, 메톡시기, 에톡시기, 아이소프로필옥시기, t-부틸옥시기인 것이 더 바람직하며, 메톡시기인 것이 특히 바람직하다.

[0152] Q<sup>1</sup> 및 Q<sup>2</sup>는 각각 독립적으로, 방향족 탄화 수소환 또는 방향족 헤테로환을 나타내고, 이들은 치환기를 갖고 있어도 된다. 상기 치환기로서는, 치환기군 A에 기재된 치환기를 들 수 있다. Q<sup>1</sup> 및 Q<sup>2</sup>는, 방향족 탄화 수소환인 것이 바람직하고, 벤젠환, 나프탈렌환, 안트라센환, 페난트렌환, 피렌환인 것이 보다 바람직하며, 벤젠환, 나프탈렌환인 것이 더 바람직하고, 벤젠환인 것이 특히 바람직하다. R<sup>51</sup>을 포함하고 Q<sup>1</sup>을 형성하는 기, 및 R<sup>52</sup>를 포함하고 Q<sup>1</sup>을 형성하는 기로서는, 톨릴기, 자일릴기, 메시틸기가 바람직하고, 자일릴기, 메시틸기인 것이 보다 바람직하며, L<sup>1</sup> 혹은 L<sup>2</sup>와의 결합 위치에 대하여 오쏘위의 양쪽 모두에 메틸기를 갖는 자일릴기, L<sup>1</sup> 혹은 L<sup>2</sup>와의 결합 위치에 대하여 오쏘위의 양쪽 모두 및 파라위에 메틸기를 갖는 메시틸기인 것이 더 바람직하고, L<sup>1</sup> 혹은 L<sup>2</sup>와의 결합 위치에 대하여 오쏘위의 양쪽 모두 및 파라위에 메틸기를 갖는 메시틸기인 것이 특히 바람직하다.

[0153] <식 (6)으로 나타나는 화합물에 대하여>

[0154] 식 (5)로 나타나는 화합물은, 하기 식 (6)으로 나타나는 화합물인 것이 보다 바람직하다.

[0155] [화학식 18]

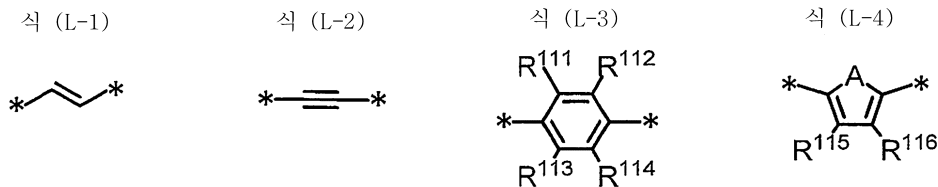


[0156]

[0157] 식 중,  $R^{11}$ ,  $R^{12}$ ,  $R^{14}$  및  $R^{15}$ 는 각각 독립적으로, 수소 원자, 할로젠 원자, 알킬기, 아릴기, 헤테로환기, 에텐일기, 에타인일기, 아미노기, 아실기, 알콕시기, 아릴옥시기, 알킬싸이오기, 또는 아릴싸이오기를 나타내고, 이들은 치환기를 갖고 있어도 되며,  $R^{11}$ ,  $R^{12}$ ,  $R^{14}$  및  $R^{15}$  중 적어도 2개는 수소 원자 이외의 원자 또는 기이다.  $X^1$  및  $X^2$ 는 각각 독립적으로, 할로젠 원자, 알킬기, 아릴기, 헤테로환기, 하이드록시기, 알콕시기, 아릴옥시기, 알킬싸이오기, 아릴싸이오기, 에텐일기, 또는 에타인일기를 나타내고, 이들은 치환기를 갖고 있어도 되며,  $X^1$  및  $X^2$ 는 서로 연결되어 환을 형성해도 된다.  $R^{31}$ ~ $R^{35}$ 는 각각 독립적으로, 수소 원자, 할로젠 원자, 알킬기, 아릴기, 헤테로환기, 에텐일기, 에타인일기, 아미노기, 아실기, 사이아노기, 알콕시기, 아릴옥시기, 알킬싸이오기, 또는 아릴싸이오기를 나타내고, 이들은 치환기를 갖고 있어도 되며,  $R^{31}$ ~ $R^{35}$  중 어느 하나는 수소 원자이다.  $R^{51}$  및  $R^{52}$ 는 각각 독립적으로, 알킬기, 아릴기, 헤테로아릴기, 아미노기, 아실기, 알콕시기, 아릴옥시기, 알킬싸이오기, 또는 아릴싸이오기를 나타내고, 이들은 치환기를 갖고 있어도 된다.  $Q^1$  및  $Q^2$ 는 각각 독립적으로, 방향족 탄화 수소환 또는 방향족 헤테로환을 나타내고, 이들은 치환기를 갖고 있어도 된다.

[0158]  $L^1$  및  $L^2$ 는 각각 독립적으로, 식 (L-1)~식 (L-4) 중 어느 하나를 나타낸다.

[0159] [화학식 19]



[0160]

[0161] 식 중,  $R^{111}$ ~ $R^{116}$ 은 각각 독립적으로, 수소 원자, 할로젠 원자, 알킬기, 아릴기, 헤테로환기, 에텐일기, 에타인일기, 아미노기, 아실기, 알콕시기, 아릴옥시기, 알킬싸이오기, 또는 아릴싸이오기를 나타내고, 이들은 치환기를 갖고 있어도 된다. A는, -O-, -S-, 또는 -NH-를 나타낸다.

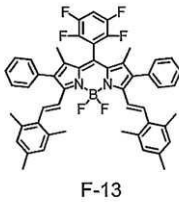
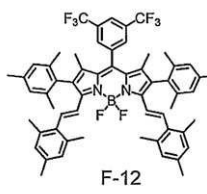
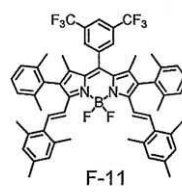
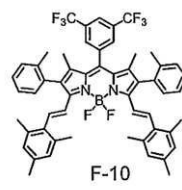
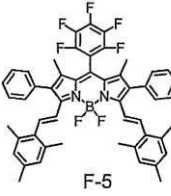
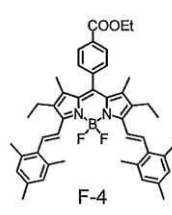
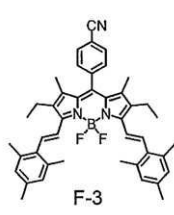
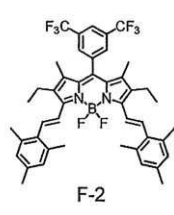
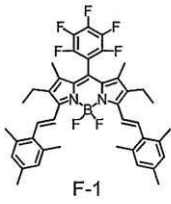
[0162]  $R^{11}$  및  $R^{15}$ 는 각각 독립적으로, 알킬기, 아릴기, 헤테로환기, 에텐일기, 에타인일기, 아미노기인 것이 바람직하고, 상기  $R^{41}$  및  $R^{42}$ 와 동의인 것, 즉 아릴기, 헤테로환기, 에텐일기, 또는 에타인일기인 것이 보다 바람직하며, 아릴기, 에텐일기, 에타인일기인 것이 더 바람직하다. 양자 수율 향상의 관점에서는, 아릴기가 보다 바람직하고, 장과장화의 관점에서는, 에텐일기, 에타인일기인 것이 보다 바람직하다. 아릴기인 경우, 아릴기의 오쏘위 또는 메타위에 적어도 하나의 치환기를 갖고 있는 것이 바람직하고, 오쏘위에 적어도 하나의 치환기를 갖고 있는 것이 보다 바람직하다. 아릴기로 치환하는 치환기의 수는, 1~3개가 바람직하고, 2개 또는 3개가 보다 바람직하다. 아릴기로 치환하는 치환기로서는, 알킬기인 것이 바람직하고, 메틸기, 아이소프로필기, t-부틸기인 것이 보다 바람직하며, 메틸기인 것이 더 바람직하다.

[0163] <식 (1)~식 (6)으로 나타나는 화합물의 구체예>

[0164] 식 (1)~식 (6)으로 나타나는 화합물의 구체예를 이하에 기재한다. Me는 메틸기를 나타내고, Et는 에틸기를 나타내며, iPr은 아이소프로필기를 나타낸다.

[0165]

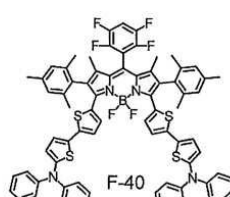
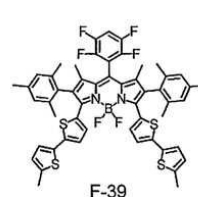
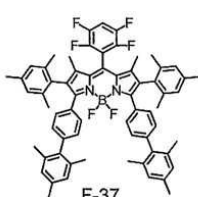
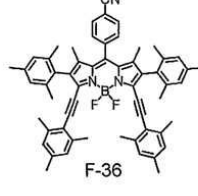
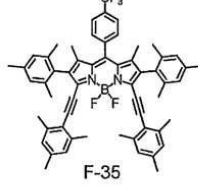
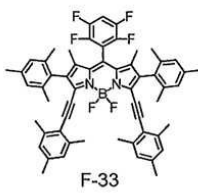
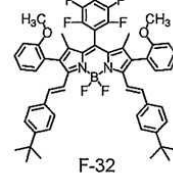
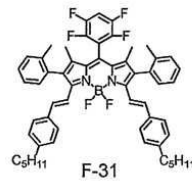
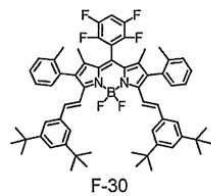
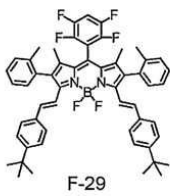
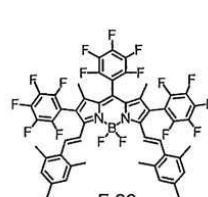
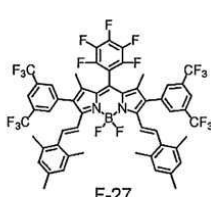
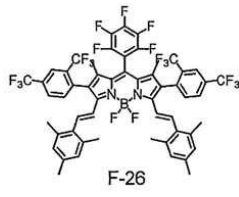
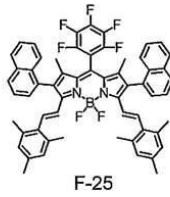
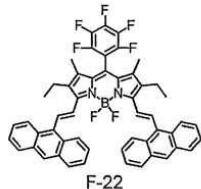
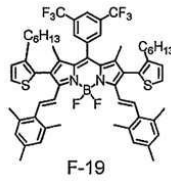
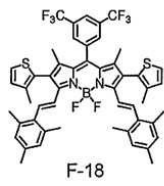
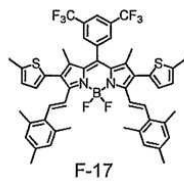
[화학식 20]



[0166]

[0167]

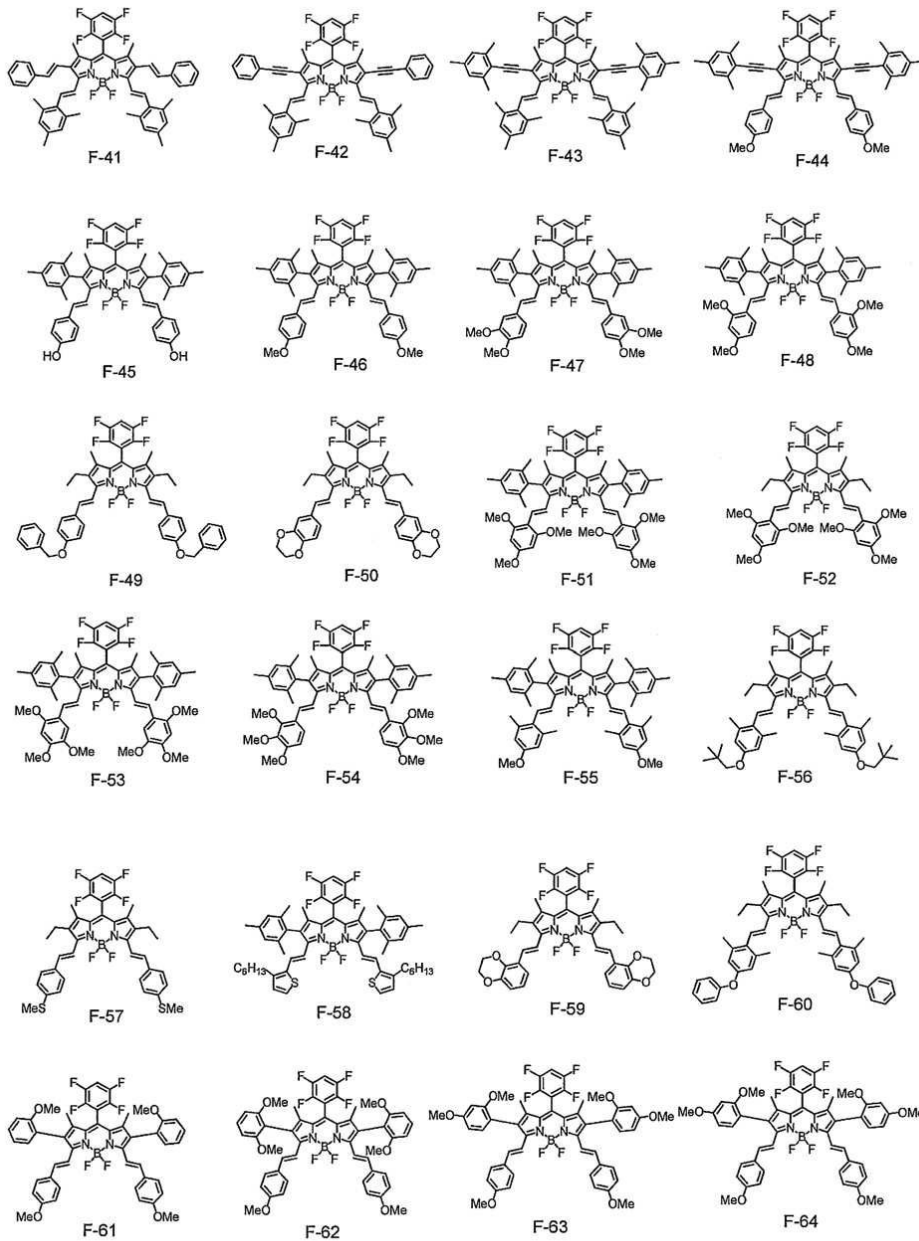
[화학식 21]



[0168]

[0169]

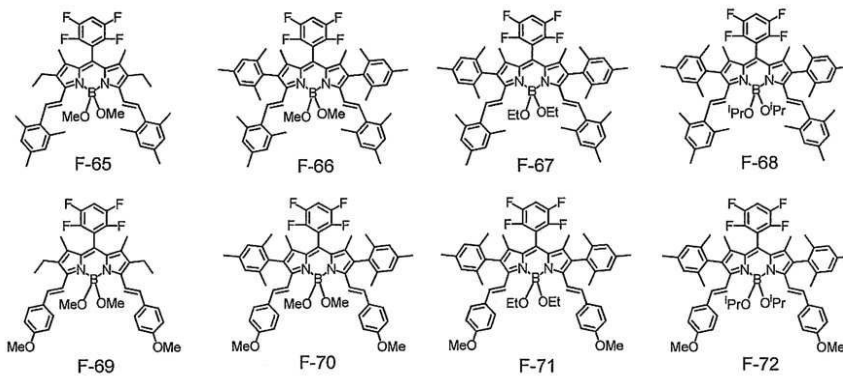
[화학식 22]



[0170]

[0171]

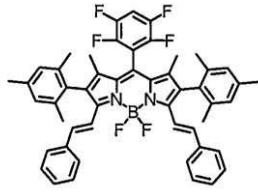
[화학식 23]



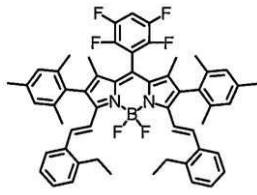
[0172]

[0173]

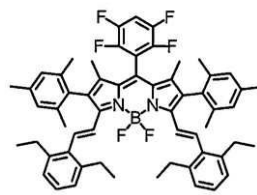
[화학식 24]



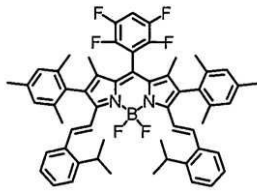
F-73



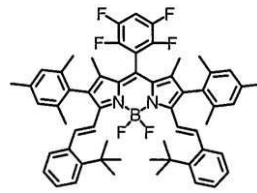
F-73



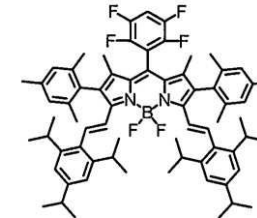
F-73



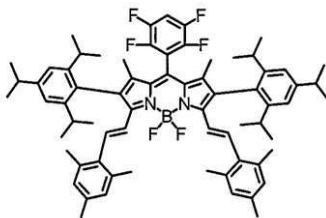
F-73



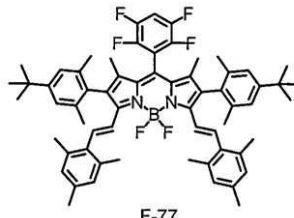
F-74



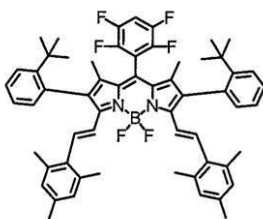
F-75



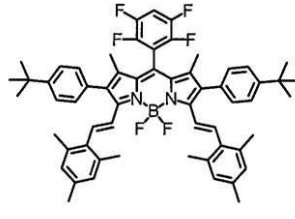
F-76



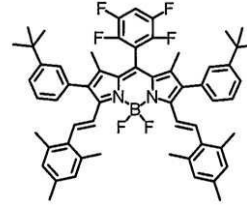
F-77



F-78



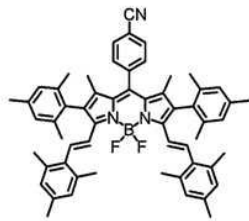
F-79



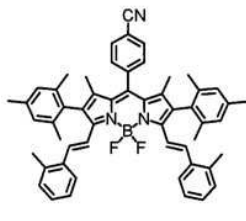
F-80

[0174]

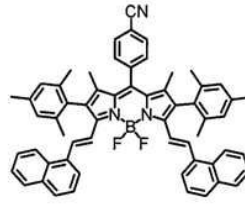
[0175] [화학식 25]



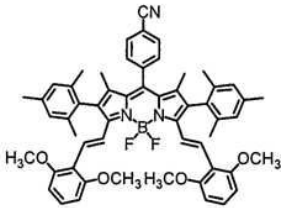
F-81



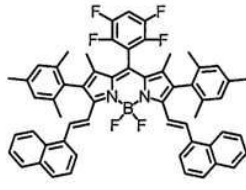
F-82



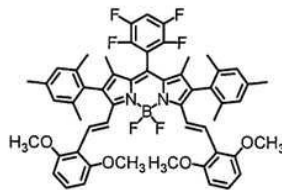
F-83



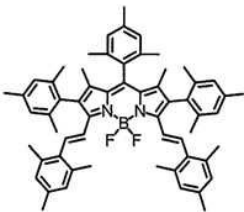
F-84



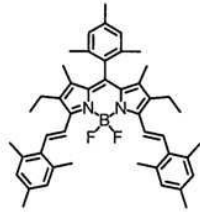
F-85



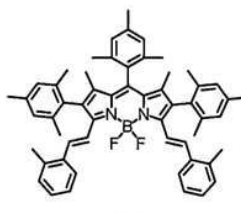
F-86



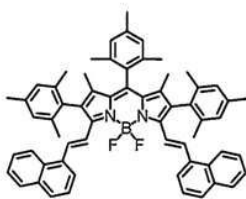
F-87



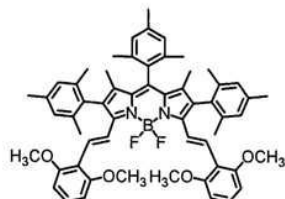
F-88



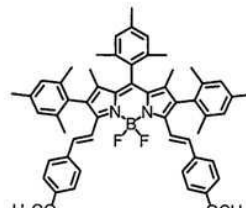
F-89



F-90



F-91



F-92

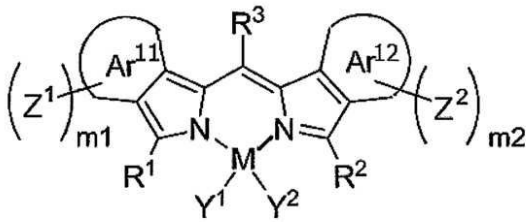
[0176]

[0177] 표지 입자는, 적어도 1종의 에너지 도너 화합물과, 적어도 1종의 에너지 억셉터 화합물과, 입자를 함유하는 표지 입자여도 되고, 그 경우, 상기 에너지 도너 화합물 및 상기 에너지 억셉터 화합물 중 적어도 1종이, 상기 식 (1)로 나타나는 화합물이면 된다.

[0178] 본 발명의 다른 예에 있어서는, 발광성의 표지 입자는, 에너지 도너 화합물 및 에너지 억셉터 화합물 중 어느 한 쪽으로서, 식 (1)로 나타나는 화합물을 함유하고, 에너지 도너 화합물 및 에너지 억셉터 화합물 중 어느 다른 쪽으로서, 하기하는 식 (10)으로 나타나는 화합물을 함유한다. 즉, 발광성의 표지 입자로서는, 에너지 도너 화합물로서 식 (1)로 나타나는 화합물을 함유하고, 에너지 억셉터 화합물로서 식 (10)으로 나타나는 화합물을 함유하는 발광성의 표지 입자여도 되며, 에너지 억셉터 화합물로서 식 (1)로 나타나는 화합물을 함유하고, 에너지 도너 화합물로서 식 (10)으로 나타나는 화합물을 함유하는 발광성의 표지 입자여도 된다.

[0179] <식 (10)으로 나타나는 화합물>

[0180] [화학식 26]



(10)

[0181]

[0182]

식 (10) 중,  $m_1$  및  $m_2$ 는 각각 독립적으로 0~4의 정수를 나타내고,  $m_1$  및  $m_2$  중 어느 하나는 적어도 1 이상이다. M은 반금속 원자 또는 금속 원자를 나타낸다.  $R^1$ ,  $R^2$  및  $R^3$ 은 각각 독립적으로 수소 원자, 알킬기, 아릴기, 헤테로환기, 에틸일기, 에타인일기, 아실기, 알콕시기, 아릴옥시기, 알킬싸이오기, 또는 아릴싸이오기를 나타내고, 이들은 치환기를 갖고 있어도 된다.  $Y^1$  및  $Y^2$ 는 각각 독립적으로 할로젠 원자, 알킬기, 아릴기, 헤테로환기, 하이드록시기, 알콕시기, 아릴옥시기, 알킬싸이오기, 아릴싸이오기, 에틸일기, 또는 에타인일기를 나타내고, 이들은 치환기를 갖고 있어도 되며,  $Y^1$  및  $Y^2$ 는 서로 연결되어 환을 형성해도 된다.  $Ar^{11}$  및  $Ar^{12}$ 는 각각 독립적으로, 치환기를 갖고 있어도 되는 방향환을 나타낸다.  $Z^1$  및  $Z^2$ 는 각각 독립적으로 아릴기, 헤테로환기 또는 아미노기를 나타내고, 이들은 치환기를 갖고 있어도 된다.  $m_1$ 이 2 이상인 경우, 복수의  $Z^1$ 은 동일한 기여도 되고 다른 기여도 되며,  $m_2$ 가 2 이상인 경우, 복수의  $Z^2$ 는 동일한 기여도 되고 각각 다른 기여도 된다.

[0183]

식 (10) 중,  $m_1$  및  $m_2$ 는 각각 독립적으로 0~4의 정수를 나타내고, 바람직하게는,  $m_1$  및  $m_2$ 는 모두 1 이상이다.  $m_1$  및  $m_2$ 는 동일해도 되고 다른 정수여도 되지만, 바람직하게는 동일한 정수이다. 바람직하게는,  $m_1$  및  $m_2$ 는 각각 독립적으로 1 또는 2이며, 보다 바람직하게는,  $m_1$  및  $m_2$ 는 모두 1 또는 모두 2이고, 특히 바람직하게는  $m_1$  및  $m_2$ 는 모두 1이다.

[0184]

식 (10) 중, M은 반금속 원자 또는 금속 원자를 나타내고, 바람직하게는 반금속 원자를 나타내며, 특히 바람직하게는, 붕소 원자를 나타낸다.

[0185]

식 (10) 중,  $R^1$ ,  $R^2$  및  $R^3$ 은 각각 독립적으로 수소 원자, 알킬기, 아릴기, 헤테로환기, 에틸일기, 에타인일기, 아실기, 알콕시기, 아릴옥시기, 알킬싸이오기, 또는 아릴싸이오기를 나타내고, 이들은 치환기를 갖고 있어도 된다.

[0186]

바람직하게는,  $R^1$  및  $R^2$ 는 각각 독립적으로, 아릴기 또는 헤테로환기이며, 이들은 치환기를 갖고 있어도 된다.

[0187]

$R^1$  및  $R^2$ 는 각각 동일해도 되고 달라도 되지만, 바람직하게는 동일하다.

[0188]

$R^1$  및  $R^2$ 는, 연결하여 환을 형성하는 경우는 없다.

[0189]

바람직하게는,  $R^3$ 은, 수소 원자, 알킬기, 아릴기 또는 헤테로환기이며, 이들은 치환기를 갖고 있어도 된다. 보다 바람직하게는,  $R^3$ 은, 수소 원자이다.

[0190]

식 (10) 중,  $Y^1$  및  $Y^2$ 는 각각 독립적으로 할로젠 원자, 알킬기, 아릴기, 헤테로환기, 하이드록시기, 알콕시기, 아릴옥시기, 알킬싸이오기, 아릴싸이오기, 에틸일기, 또는 에타인일기를 나타내고, 이들은 치환기를 갖고 있어도 되며,  $Y^1$  및  $Y^2$ 는 서로 연결되어 환을 형성해도 된다.

[0191]

바람직하게는,  $Y^1$  및  $Y^2$ 는 각각 독립적으로, 할로젠 원자, 알킬기, 아릴기, 하이드록시기, 알콕시기, 또는 아릴옥시기를 나타내고, 이들은 치환기를 갖고 있어도 되며,  $Y^1$  및  $Y^2$ 는 서로 연결되어 환을 형성해도 된다.

[0192]

보다 바람직하게는,  $Y^1$  및  $Y^2$ 는 각각 독립적으로, 할로젠 원자이다.

[0193]

더 바람직하게는,  $Y^1$  및  $Y^2$ 는 불소 원자이다.

[0194]  $Y^1$  및  $Y^2$ 는 각각 동일해도 되고 달라도 되지만, 바람직하게는 동일하다.

[0195] 식 (10) 중,  $Ar^1$  및  $Ar^2$ 는 각각 독립적으로, 치환기를 갖고 있어도 되는 방향환을 나타낸다.

[0196] 바람직하게는,  $Ar^1$  및  $Ar^2$ 는 벤젠환을 나타낸다.

[0197] 식 (10) 중,  $Z^1$  및  $Z^2$ 는 각각 독립적으로, 할로젠 원자, 알킬기, 아릴기, 헤테로환기, 에텐일기, 에타인일기, 아실기, 알콕시기, 아릴옥시기, 알킬싸이오기, 아릴싸이오기, 또는 아미노기를 나타내고, 이들은 치환기를 갖고 있어도 된다.  $m_1$ 이 2 이상인 경우, 복수의  $Z^1$ 은 동일한 기여도 되고 다른 기여도 되며,  $m_2$ 가 2 이상인 경우, 복수의  $Z^2$ 는 동일한 기여도 되고 각각 다른 기여도 된다.

[0198] 바람직하게는,  $Z^1$  및  $Z^2$ 는, 각각 독립적으로, 치환기를 갖고 있어도 되는 아릴기를 나타낸다.

[0199] 보다 바람직하게는,  $Z^1$  및  $Z^2$ 는, 각각 독립적으로, 페닐기, 나프틸기, 또는 안트릴기를 나타내고, 이들은 치환기를 갖고 있어도 된다.

[0200] 바람직하게는,  $m_1$ 이 2 이상인 경우, 복수의  $Z^1$ 은 동일한 기이다.

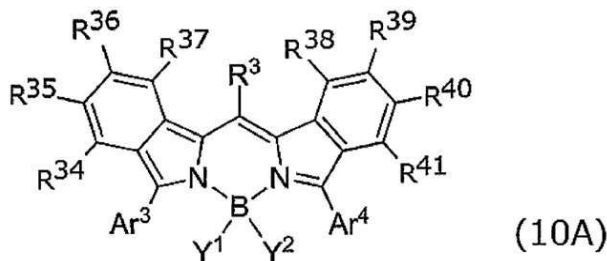
[0201] 바람직하게는,  $m_2$ 가 2 이상인 경우, 복수의  $Z^2$ 는 동일한 기이다.

[0202] 식 (2)로 나타나는 화합물은, 분자 내에, 카복실산기, 인산기, 설폰산기 등의 산성기를 갖지 않는 것이 바람직하다.

[0203] <식 (10A)로 나타나는 화합물에 대하여>

[0204] 식 (10)으로 나타나는 화합물의 바람직한 예로서는, 하기 식 (10A)로 나타나는 화합물을 들 수 있다.

[0205] [화학식 27]



[0206]

[0207] 식 (10A) 중,  $Y^1$  및  $Y^2$ 는 각각 독립적으로 할로젠 원자, 알킬기, 아릴기, 헤테로환기, 하이드록시기, 알콕시기, 아릴옥시기, 알킬싸이오기, 아릴싸이오기, 에텐일기, 또는 에타인일기를 나타내고, 이들은 치환기를 갖고 있어도 된다. 상기 치환기로서는, 치환기군 A에 기재된 치환기를 들 수 있다.

[0208] 바람직하게는,  $Y^1$  및  $Y^2$ 는 각각 독립적으로 할로젠 원자를 나타낸다.

[0209] 특히 바람직하게는,  $Y^1$  및  $Y^2$ 는 불소 원자이다.

[0210] 식 (10A) 중,  $R^3$ 은 수소 원자, 알킬기, 아릴기, 헤테로환기, 에텐일기, 에타인일기, 또는 아실기를 나타내고, 이들은 치환기를 갖고 있어도 된다.

[0211] 바람직하게는,  $R^3$ 은, 수소 원자, 알킬기, 아릴기 또는 헤테로환기이며, 이들은 치환기를 갖고 있어도 된다.

[0212] 보다 바람직하게는,  $R^3$ 은, 수소 원자이다.

[0213] 식 (10A) 중,  $Ar^3$  및  $Ar^4$ 는 각각 독립적으로 아릴기 또는 헤테로환기를 나타내고, 이들은 치환기를 갖고 있어도 된다. 상기 치환기로서는, 치환기군 A에 기재된 치환기를 들 수 있다.

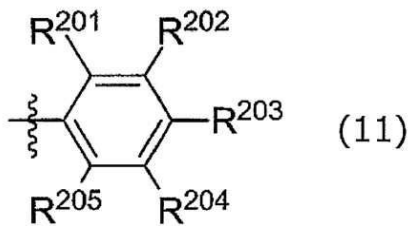
[0214] 식 (10A) 중, R<sup>34</sup>~R<sup>41</sup>은 각각 독립적으로 수소 원자, 할로젠 원자, 알킬기, 아릴기, 헤테로환기, 에텐일기, 에타인일기, 아실기, 알콕시기, 아릴옥시기, 알킬싸이오기, 아릴싸이오기, 또는 아미노기를 나타내고, 이들은 치환기를 갖고 있어도 된다. 상기 치환기로서는, 치환기군 A에 기재된 치환기를 들 수 있다.

[0215] 식 (10A) 중, 바람직하게는, R<sup>34</sup>~R<sup>41</sup> 중 적어도 하나 이상이, 치환기를 갖고 있어도 되는 아릴기이다.

[0216] 보다 더 바람직하게는, R<sup>34</sup>~R<sup>37</sup> 중 적어도 하나 이상이, 치환기를 갖고 있어도 되는 아릴기이며, R<sup>38</sup>~R<sup>41</sup> 중 적어도 하나 이상이, 치환기를 갖고 있어도 되는 아릴기이다.

[0217] 보다 바람직하게는, R<sup>34</sup>~R<sup>41</sup> 중 적어도 하나 이상이, 식 (11)로 나타나는 기이다. 더 바람직하게는, R<sup>34</sup>~R<sup>37</sup> 중 적어도 하나 이상이, 식 (11)로 나타나는 기이며, R<sup>38</sup>~R<sup>41</sup> 중 적어도 하나 이상이, 식 (11)로 나타나는 기이다.

[0218] [화학식 28]

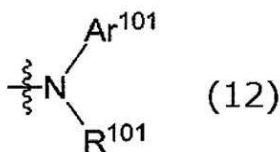


[0219]

[0220] 식 (11) 중, R<sup>201</sup>~R<sup>205</sup>는 수소 원자, 할로젠 원자, 알킬기, 아릴기, 헤테로환기, 에텐일기, 에타인일기, 아실기, 알콕시기, 아릴옥시기, 알킬싸이오기, 아릴싸이오기, 또는 아미노기이며, R<sup>201</sup> 및 R<sup>205</sup> 중 적어도 한쪽은 수소 원자 이외의 원자 또는 기이다. R<sup>201</sup>과 R<sup>202</sup>는 서로 연결되어 환을 형성해도 되고, R<sup>202</sup>와 R<sup>203</sup>은 서로 연결되어 환을 형성해도 되며, R<sup>203</sup>과 R<sup>204</sup>는 서로 연결되어 환을 형성해도 되고, R<sup>204</sup>와 R<sup>205</sup>는 서로 연결되어 환을 형성해도 된다.

[0221] 다른 바람직한 양태에 의하면, R<sup>34</sup>~R<sup>41</sup> 중 적어도 하나 이상이, 식 (12)로 나타나는 기이다. 더 바람직하게는, R<sup>34</sup>~R<sup>37</sup> 중 적어도 하나 이상이, 식 (12)로 나타나는 기이며, R<sup>38</sup>~R<sup>41</sup> 중 적어도 하나 이상이, 식 (12)로 나타나는 기이다.

[0222] [화학식 29]



[0223]

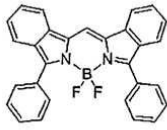
[0224] 식 (12) 중, R<sup>101</sup>은, 수소 원자, 알킬기, 아릴기, 헤테로환기, 에텐일기, 에타인일기, 또는 아실기를 나타내고, 이들은 치환기를 갖고 있어도 된다. 상기 치환기로서는, 치환기군 A에 기재된 치환기를 들 수 있다. Ar<sup>101</sup>은 아릴기, 또는 헤테로환기를 나타내고, 이들은 치환기를 갖고 있어도 된다. 상기 치환기로서는, 치환기군 A에 기재된 치환기를 들 수 있다. Ar<sup>101</sup>과 R<sup>101</sup>은 서로 연결되어 환을 형성해도 된다.

[0225] 식 (10)으로 나타나는 화합물은, 분자 내에, 카복실산기, 인산기, 설폰산기 등의 산성기를 갖지 않는 것이 바람직하다.

[0226] <식 (10) 또는 식 (10A)로 나타나는 화합물의 구체예>

[0227] 식 (10) 또는 식 (10A)로 나타나는 화합물의 구체예를 이하에 기재한다. Me는 메틸기를 나타내고, Bu는 n-부틸기를 나타내며, Ph는 페닐기를 나타낸다.

[0228] [화학식 30]



E-1



E-2



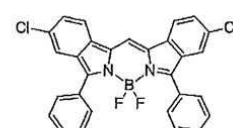
E-3



E-4



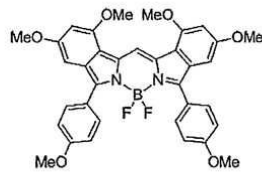
E-5



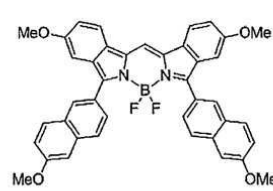
E-6



E-7



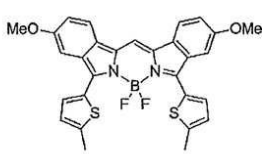
E-8



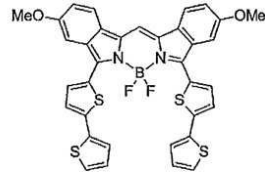
E-9

[0229]

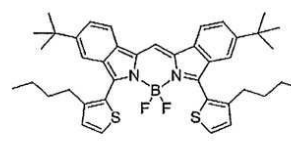
[0230] [화학식 31]



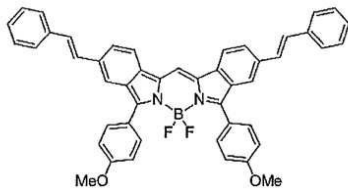
E-10



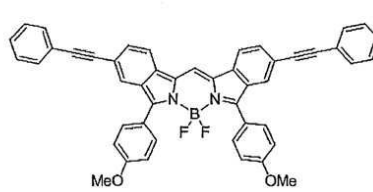
E-11



E-12



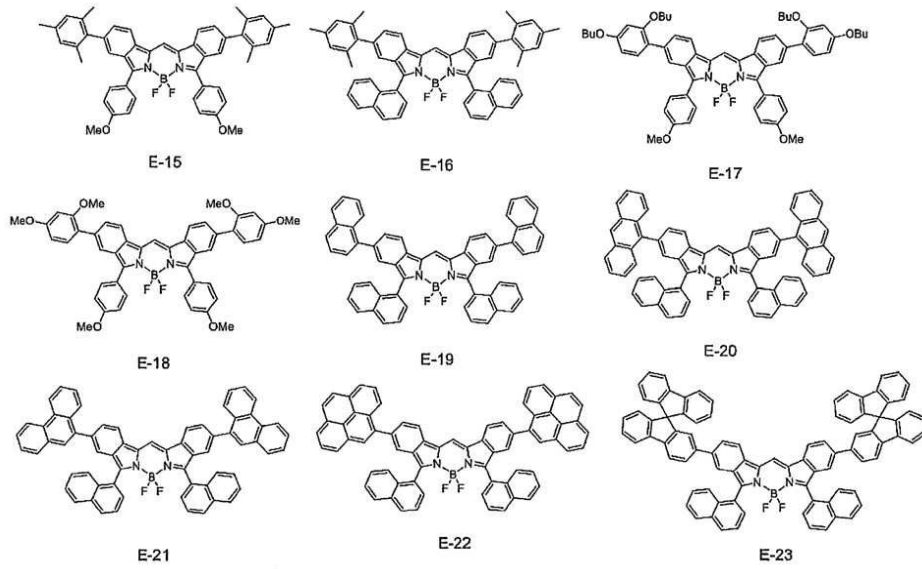
E-13



E-14

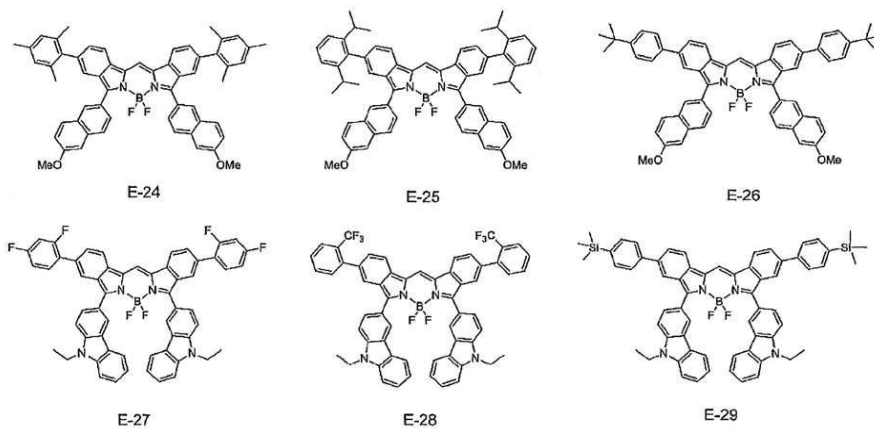
[0231]

[0232] [화학식 32]



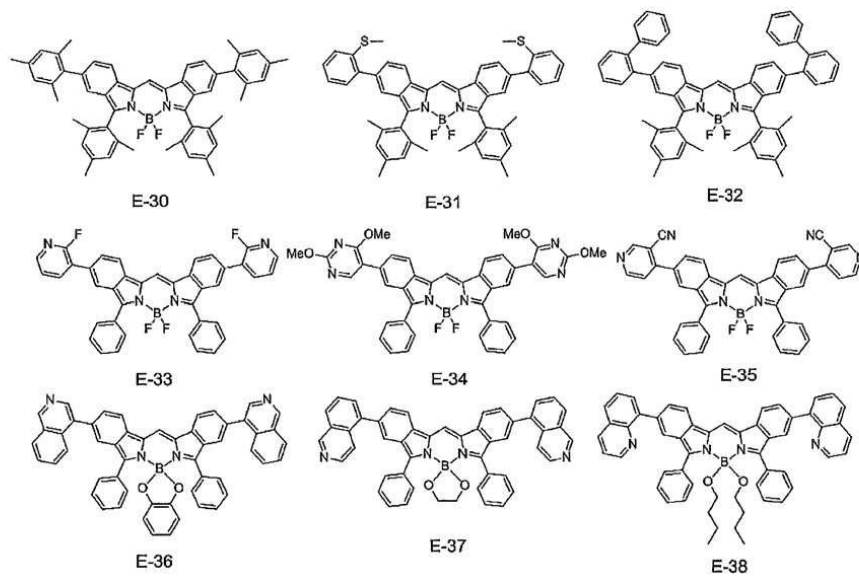
[0233]

[0234] [화학식 33]



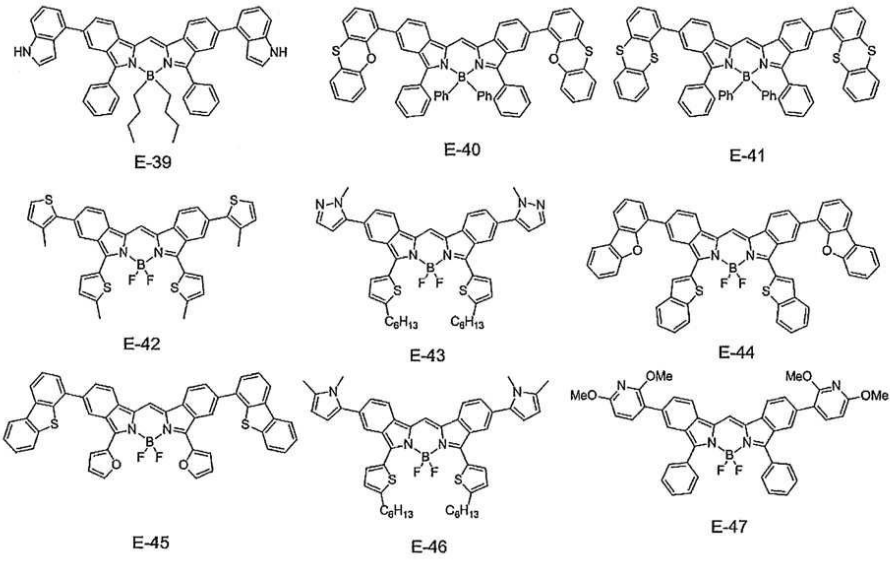
[0235]

[0236] [화학식 34]



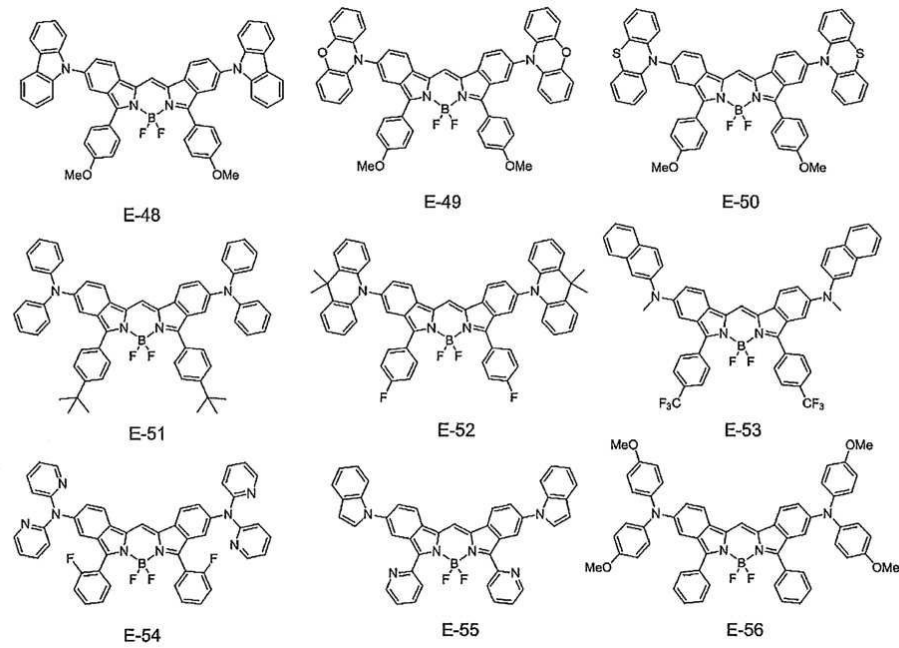
[0237]

[0238] [화학식 35]



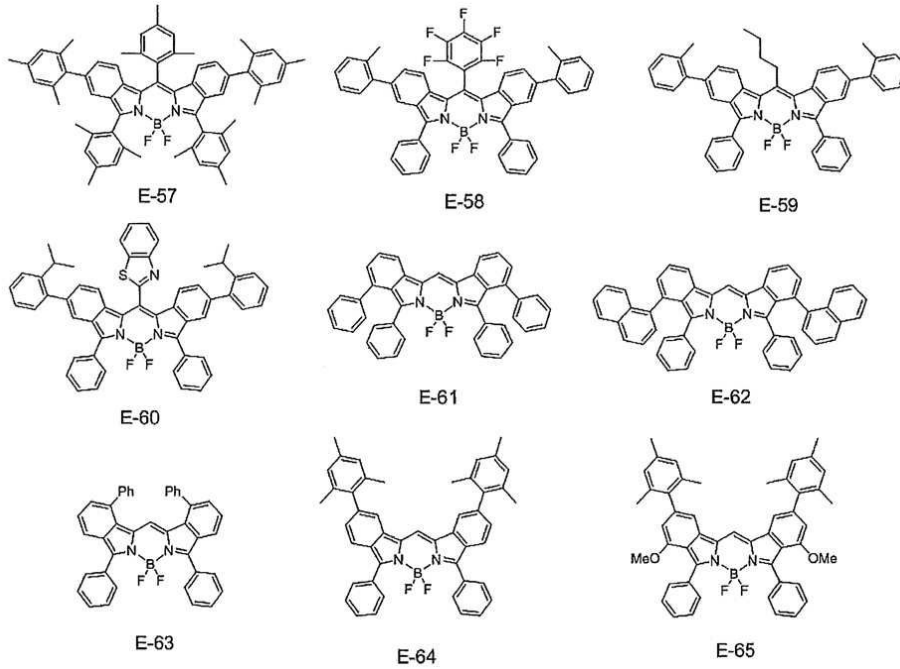
[0239]

[0240] [화학식 36]



[0241]

[0242] [화학식 37]



[0243]

[0244] <에너지 도너 화합물과 에너지 억셉터 화합물의 조합의 구체예에 대하여>

[0245] 에너지 도너 화합물과 에너지 억셉터 화합물의 조합의 구체예를 이하에 기재한다.

[0246] [표 1]

F-2	F-43	F-16	F-64	F-37	F-43
F-2	F-44	F-16	F-69	F-37	F-44
F-2	F-46	F-16	F-70	F-37	F-46
F-2	F-51	F-16	F-71	F-37	F-51
F-2	F-55	F-16	F-72	F-37	F-55
F-2	F-69	F-24	F-43	F-65	F-43
F-16	F-38	F-24	F-44	F-65	F-44
F-16	F-39	F-24	F-46	F-65	F-46
F-16	F-41	F-24	F-51	F-65	F-51
F-16	F-42	F-24	F-55	F-65	F-55
F-16	F-43	F-24	F-69	F-65	F-69
F-16	F-45	F-27	F-43	F-66	F-43
F-16	F-46	F-27	F-44	F-66	F-44
F-16	F-48	F-27	F-46	F-66	F-46
F-16	F-49	F-27	F-51	F-66	F-51
F-16	F-50	F-27	F-55	F-66	F-55
F-16	F-51	F-27	F-69	F-66	F-69
F-16	F-52	F-29	F-43	F-67	F-43
F-16	F-53	F-29	F-44	F-67	F-44
F-16	F-54	F-29	F-46	F-67	F-46
F-16	F-55	F-29	F-51	F-67	F-51
F-16	F-56	F-29	F-55	F-67	F-55
F-16	F-57	F-29	F-69	F-67	F-69
F-16	F-58	F-33	F-43	F-68	F-43
F-16	F-59	F-33	F-44	F-68	F-44
F-16	F-60	F-33	F-46	F-68	F-46
F-16	F-61	F-33	F-51	F-68	F-51
F-16	F-62	F-33	F-55	F-68	F-55
F-16	F-63	F-33	F-69	F-68	F-69

[0247]

[0248] [표 2]

도너	억셉터	도너	억셉터	도너	억셉터
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

[0249]

[0250]

에너지 도너 화합물과 에너지 억셉터 화합물의 선택에 관해서는, 흡수가 단파장인 화합물이 에너지 도너 화합물이며, 흡수가 장파장인 화합물이 에너지 억셉터 화합물이고, 에너지 도너 화합물의 발광과 에너지 억셉터 화합물의 흡수가 조금이라도 중첩되어 있는 경우에는, 발광성의 표지 입자에 있어서 사용할 수 있을 가능성이 있다. 에너지 억셉터 화합물의 흡수의 극대 파장이, 에너지 도너 화합물의 흡수의 파장보다 10~100nm 정도 장파장 측에 있는 경우가 바람직하다. 에너지 억셉터 화합물의 흡수의 극대 파장이, 에너지 도너 화합물의 흡수의 파장보다 10~70nm 장파장 측에 있는 경우가 보다 바람직하다.

[0251]

에너지 도너 화합물의 발광이 흡수의 어느 정도 장파장으로 나오는지(스토크스 시프트의 크기)는 화합물에 따라 다르기 때문에, 일률적으로는 말할 수 없지만, 식 (1)로 나타나는 화합물에서는 흡수 극대 파장 +30nm 정도에 발광의 극대가 있고, 거기에서 +100nm 정도까지는 발광 스펙트럼이 존재하기 때문에, 그 부근에 흡수를 갖는 억셉터 화합물을 병용함으로써 에너지 이동의 계(系)가 실현할 수 있는 것이 상정된다.

[0252]

또한, 각 화합물의 흡수 파장에 관해서는, 화합물을 합성하여 측정할뿐만 아니라, Gaussian 등에 의한 계산으로부터 예측하는 것도 가능하고, 계산값의 관계로부터, 에너지 도너 화합물과 에너지 억셉터 화합물의 조합을 추정할 수도 있다.

[0253]

본 발명에 있어서는, 스토크스 시프트의 크기가, 바람직하게는 25nm 이상이며, 보다 바람직하게는 30nm 이상이고, 보다 더 바람직하게는 35nm 이상이며, 더 바람직하게는 40nm 이상이고, 보다 더 바람직하게는 45nm 이상이며, 특히 바람직하게는 50nm 이상이고, 가장 바람직하게는 60nm 이상이다. 스토크스 시프트의 크기의 상한은 특별히 한정되지 않지만, 일반적으로는, 150nm 이하이다.

[0254]

<식 (1)~식 (6)으로 나타나는 화합물의 사용량>

[0255]

본 발명에서 이용하는 입자(즉, 식 (1)로 나타나는 화합물을 첨가하기 전의 입자)에 대한 식 (1)로 나타나는 화합물의 함유량은, 본 발명의 효과를 저해하지 않는 한 특별히 한정되지 않지만, 바람직하게는 0.5 μmol/g~400 μmol/g이며, 보다 바람직하게는 1 μmol/g~300 μmol/g이고, 더 바람직하게는 2 μmol/g~200 μmol/g이며, 특히 바람직하게는 3 μmol/g~100 μmol/g이다.

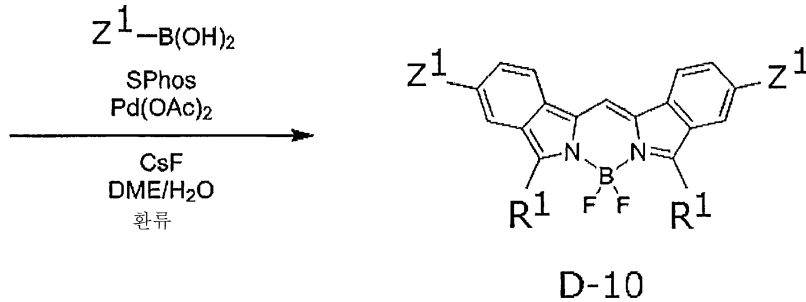
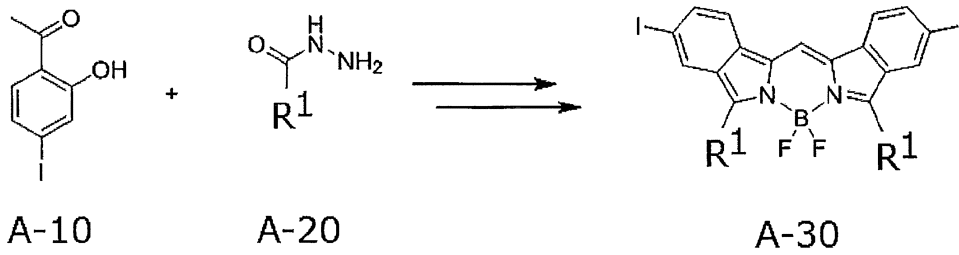
[0256]

본 발명에서 이용하는 입자(즉, 식 (1)~식 (6)으로 나타나는 화합물을 첨가하기 전의 입자)에 대한 식 (1)~식 (6)으로 나타나는 화합물의 함유량은, 본 발명의 효과를 저해하지 않는 한 특별히 한정되지 않지만, 바람직하게

는 0.1질량%~30질량%이며, 보다 바람직하게는 0.2질량%~20질량%이고, 더 바람직하게는 0.3질량%~10질량%이며, 특히 바람직하게는 0.4질량%~8질량%이다.

- [0257] 발광성의 표지 입자에 있어서, 식 (1)~식 (6)으로 나타나는 화합물은 적어도 1종 사용하지만, 2종 이상의 식 (1)~식 (6)으로 나타나는 화합물을 사용해도 된다. 2종 이상의 식 (1)~식 (6)으로 나타나는 화합물을 사용하는 경우에는, 합계량이, 상기의 범위 내가 되는 것이 바람직하다.
- [0258] 에너지 도너 화합물과 에너지 억셉터 화합물의 조합을 사용하는 경우에는, 에너지 도너 화합물과 에너지 억셉터 화합물의 몰비는, 1:10~20:1인 것이 바람직하고, 1:10~10:1인 보다 바람직하며, 1:5~10:1인 것이 더 바람직하다.
- [0259] 에너지 도너 화합물로서 식 (1)로 나타나는 적어도 1종의 화합물을 사용하고, 에너지 억셉터 화합물로서, 식 (1)로 나타나는 적어도 1종의 화합물을 사용하는 경우에 있어서는, 에너지 도너 화합물로서 2종 이상의 식 (1)로 나타나는 화합물을 사용해도 되며, 또 에너지 억셉터 화합물로서 2종 이상의 식 (1)로 나타나는 화합물을 사용해도 된다. 상기의 경우, 사용되는 식 (1)로 나타나는 화합물의 합계량이, 상기의 범위 내가 되는 것이 바람직하다.
- [0260] <식 (1)~식 (6)으로 나타나는 화합물의 제조 방법>
- [0261] 식 (1)~식 (6)으로 나타나는 화합물은, 예를 들면 하기하는 실시예에 나타내는 합성 스킴에 의하여 제조할 수 있다.
- [0262] 일례로서, 화합물 (1)의 합성의 개요를 이하에 나타낸다. 3,5-비스(트라이플루오로메틸)벤즈알데하이드 및 다이클로로메테인의 혼합물에, 수랭하면서 3-에틸-2,4-다이메틸피롤과 트라이플루오로아세트산을 첨가한 후, 실온에서 교반하고, 수랭하면서 클로라닐을 첨가하여 실온에서 교반한 후, 수랭하면서 다이아이소프로필에틸아민을 적하하며, 실온에서 교반하고, 계속해서, 수랭하면서 삼불화 붕소 다이에틸에터 착체를 적하하며, 실온에서 교반하여 반응을 행함으로써, 화합물 (1-A)를 합성할 수 있다. 계속해서, 화합물 (1-A), 2,4,6-트라이메틸벤즈알데하이드 115mg, 및 탈수 톨루엔을 혼합하고, 실온에서 교반한다. 피페리딘 및 p-톨루엔설폰산 1수화물 1편(片)을 첨가하고 용매를 증류 제거하면서 교반하며, 방랭 후에 탈수 톨루엔을 첨가하고 용매를 증류 제거하면서 교반하여 반응을 행함으로써, 화합물 (1)을 제조할 수 있다.
- [0263] 다른 예로서는, 화합물 (3)은, 하기하는 실시예에 있어서의 <합성예 2>의 합성 스킴에 따라, 3,5-비스(트라이플루오로메틸)벤즈알데하이드와 2,4-다이메틸피롤을 출발 화합물로 하여, 화합물 (3-A), 화합물 (3-B), 및 화합물 (3-C)를 경유하여 제조할 수 있다.
- [0264] 화합물 (1) 및 화합물 (3)은, 식 (1)로 나타나는 화합물의 정의의 범위 내이다. 화합물 (1) 및 화합물 (3) 이외의 식 (1)로 나타나는 화합물에 대해서도, 반응에 사용하는 화합물을, 원하는 식 (1)로 나타나는 목적 화합물에 대응하는 치환기를 갖는 화합물로 치환함으로써, 제조할 수 있다.
- [0265] <식 (10)으로 나타나는 화합물의 제조 방법>
- [0266] 식 (10)으로 나타나는 화합물은, 예를 들면 이하에 나타내는 합성 스킴에 의하여 제조할 수 있다.

[0267] [화학식 38]



[0268]

[0269] 상기 합성 스킴에 있어서의 R<sup>1</sup> 및 Z<sup>1</sup>의 정의는, 식 (10)에 있어서의 R<sup>1</sup> 및 Z<sup>1</sup>의 정의와 동의이다.

[0270] 화합물 A-10과 화합물 A-20을 Macromolecules 2010, 43, 193-200에 기재된 방법에 따라 반응시킴으로써, 화합물 A-30을 합성할 수 있다. 이어서, 화합물 A-30, 식: Z<sup>1</sup>-B(OH)<sub>2</sub>로 나타나는 화합물, 및 불화 세슘(CsF)을 다이메톡시에테인(DME)과 물과의 혼합 용액에 첨가하고, 진공 흡인하며, 질소 치환을 반복하여 탈기를 행한다. 아세트산 팔라듐(Pd(OAc)<sub>2</sub>), 및 2-다이사이클로헥실포스피노-2',6'-다이메톡시바이페닐(SPhos)을 첨가하고, 승온하여, 환류하, 소정의 시간(예를 들면, 2~24시간) 반응시킴으로써, 화합물 D-10을 제조할 수 있다.

[0271] 화합물 D-10은, 식 (10)으로 나타나는 화합물의 정의의 범위 내이다. 화합물 D-10 이외의 식 (10)으로 나타나는 화합물에 대해서도, 화합물 A-10, 화합물 A-20, 및 식: Z<sup>1</sup>-B(OH)<sub>2</sub>로 나타나는 화합물 중 어느 1종 이상의 화합물을, 대응하는 화합물로 치환함으로써, 제조할 수 있다.

[0272] <입자>

[0273] 표지 입자는, 입자를 포함한다. 입자의 재질 및 형태는 특별히 한정되지 않고, 예를 들면 폴리스타이렌 비즈 등의 유기 고분자 입자, 또는 글라스 비즈 등의 무기 입자를 이용할 수 있다. 입자의 재질의 구체예로서는, 스타이렌, 메타크릴산, 글리시딜(메트)아크릴레이트, 뷰타다이엔, 염화 바이닐, 아세트산 바이닐아크릴레이트, 메틸 메타크릴레이트, 에틸메타크릴레이트, 페닐메타크릴레이트, 또는 뷰틸메타크릴레이트 등의 모노머를 중합시킨 호모 폴리머, 및 2종 이상의 모노머를 중합시킨 코폴리머 등을 들 수 있고, 상기의 호모 폴리머 또는 코폴리머를 균일하게 현탁시킨 라텍스여도 된다. 또, 입자로서는, 그 외의 유기 고분자 분말, 무기 물질 분말, 미생물, 혈구, 세포막편, 리포솜, 마이크로 캡슐 등을 들 수 있다. 입자로서는, 라텍스 입자가 바람직하다.

[0274] 라텍스 입자를 사용하는 경우, 라텍스의 재질의 구체예로서는, 폴리스타이렌, 스타이렌-아크릴산 공중합체, 스타이렌-메타크릴산 공중합체, 스타이렌-글리시딜(메트)아크릴레이트 공중합체, 스타이렌-스타이렌술폰산염 공중합체, 메타크릴산 중합체, 아크릴산 중합체, 아크릴로나이트릴-뷰타다이엔-스타이렌 공중합체, 염화 바이닐-아크릴산 에스터 공중합체, 폴리아세트산 바이닐아크릴레이트 등을 들 수 있다. 라텍스로서는, 단량체로서 스타이렌을 적어도 포함하는 공중합체가 바람직하고, 스타이렌과, 아크릴산 또는 메타크릴산과의 공중합체가 특히 바람직하다. 라텍스의 제작 방법은 특별히 한정되지 않고, 임의의 중합 방법에 의하여 제작할 수 있다. 단, 발광성의 표지 입자에 항체를 표지하여 사용하는 경우에는, 계면활성제가 존재하면 항체 고정화가 곤란해지기 때문에, 라텍스의 제작에는, 무유화제 유화 중합, 즉 계면활성제 등의 유화제를 이용하지 않는 유화 중합이 바람직하다.

- [0275] <발광성의 표지 입자>
- [0276] 본 발명에 있어서의 발광성의 표지 입자는, 식 (1)로 나타나는 화합물을 포함함으로써, 680nm 이상이라는 장파장 영역의 발광 극대 파장을 갖고, 높은 양자 수율을 나타낸다.
- [0277] 발광 극대 파장이란, 흡수 스펙트럼에 있어서 흡광도가 가장 커지는 파장을 나타낸다.
- [0278] 발광성의 표지 입자의 발광 극대 파장은, 바람직하게는 680nm 이상이며, 보다 바람직하게는 700nm 이상이고, 특히 바람직하게는 720nm 이상이다. 본 발명의 발광성의 표지 입자의 발광 극대 파장의 상한은 특별히 한정되지 않지만, 바람직하게는 900nm 이하이며, 보다 바람직하게는 800nm 이하이다.
- [0279] 발광성의 표지 입자의 발광 극대 파장은, 시판 중인 형광 분광 광도계를 사용하여 측정할 수 있고, 예를 들면 시마즈 세이사쿠쇼제의 형광 분광 광도계 RF-5300PC를 사용하여 측정할 수 있다.
- [0280] 발광성의 표지 입자의 양자 수율이란, 발광성의 표지 입자가 흡수한 광자수에 대한 형광으로서 발광한 광자수의 비율이다.
- [0281] 발광성의 표지 입자가 나타내는 양자 수율은, 바람직하게는 0.25 이상이며, 보다 바람직하게는 0.4 이상이고, 더 바람직하게는 0.5 이상이며, 보다 더 바람직하게는 0.6 이상이고, 특히 바람직하게는 0.7 이상이다. 양자 수율의 상한은 특별히 한정되지 않지만, 일반적으로는, 1.0 이하이다.
- [0282] 발광성의 표지 입자의 양자 수율은, 시판 중인 양자 수율 측정 장치를 사용하여 측정할 수 있고, 예를 들면 하마마쓰 포토닉스사제의 절대 PL 양자 수율 측정 장치 C9920-02를 사용하여 측정할 수 있다.
- [0283] (발광성의 표지 입자의 평균 입경(평균 입자경)의 측정 방법)
- [0284] 발광성의 표지 입자의 평균 입경은, 입자의 재질이나 피검물질을 측정하는 농도 범위, 측정 기기 등에 따라 다르지만, 0.001~10 μm(보다 바람직하게는 0.01~1 μm)의 범위가 바람직하고, 30~500nm의 범위가 보다 바람직하며, 50~300nm의 범위가 더 바람직하고, 80~200nm의 범위가 특히 바람직하며, 100~150nm의 범위가 가장 바람직하다. 본 발명에 이용하는 것이 가능한 발광성의 표지 입자의 평균 입경은, 시판 중인 입도 분포계 등으로 측정할 수 있다. 입도 분포의 측정 방법으로서, 광학 현미경법, 공초점 레이저 현미경법, 전자 현미경법, 원자간력 현미경법, 정적 광산란법, 레이저 회절법, 동적 광산란법, 원심 침강법, 전기 펄스 계측법, 크로마토그래피법, 초음파 감쇠법 등이 알려져 있고, 각각의 원리에 대응한 장치가 시판되고 있다. 이들 측정 방법 중, 입자경 범위 및 측정의 용이성으로부터, 동적 광산란법을 이용하여 발광성의 표지 입자의 평균 입경을 측정하는 것이 바람직하다. 동적 광산란을 이용한 시판 중인 측정 장치로서는, 나노 트랙 UPA(닛키소(주)), 동적 광산란식 입경 분포 측정 장치 LB-550((주)호리바 세이사쿠쇼), 농후계 입경 애널라이저 FPAR-1000(오쓰카 텐시(주)) 등을 들 수 있다. 본 발명에서는, 평균 입경은, 25℃에서, 점도 0.8872CP, 물의 굴절률 1.330의 조건에서 측정된 메디안 직경(d=50)으로 하여 구하는 것으로 한다.
- [0285] <발광성의 표지 입자의 제조 방법>
- [0286] 발광성의 표지 입자의 제조 방법은 특별히 한정되지 않지만, 식 (1)로 나타나는 적어도 1종의 화합물과 입자를 혼합함으로써 제조할 수 있다. 예를 들면, 라텍스 입자 등의 입자에, 식 (1)로 나타나는 화합물을 첨가함으로써, 발광성의 표지 입자를 제작할 수 있다. 보다 구체적으로는, 물 및 수용성 유기 용제(테트라하이드로퓨란, 메탄올 등) 중 어느 1종 이상을 포함하는 입자의 분산액에, 식 (1)로 나타나는 화합물을 포함하는 용액을 첨가하여 교반함으로써, 발광성의 표지 입자를 제조할 수 있다.
- [0287] 본 발명에 있어서는, 상기한 본 발명의 발광성의 표지 입자를 포함하는 분산액을 조제해도 된다.
- [0288] 분산액은, 본 발명의 발광성의 표지 입자를 분산매로 분산함으로써 제조할 수 있다. 분산매로서는, 물, 유기 용매, 또는 물과 유기 용매와의 혼합물 등을 들 수 있다. 유기 용매로서는, 메탄올, 에탄올, 아이소프로판올 등의 알코올, 테트라하이드로퓨란 등의 에터계 용매 등을 사용할 수 있다.
- [0289] 분산액에 있어서의 발광성의 표지 입자의 고형분 농도는 특별히 한정되지 않지만, 일반적으로는 0.1~20질량%이며, 바람직하게는 0.5~10질량%이고, 보다 바람직하게는 1~5질량%이다.
- [0290] (제1 결합 물질에 의한 발광성의 표지 입자의 수식)
- [0291] 제1 결합 물질을 발광성의 표지 입자에 고정화하는 방법은, 예를 들면 일본 특허공개공보 2000-206115호나 Thermo Fisher사 FluoSpheres(등록 상표) 폴리스타이렌 마이크로스피어 F8813에 첨부된 프로토콜 등에 기재되어

있고, 면역 응집 반응용 시약을 조제하는 공지의 방법이 모두 사용 가능하다. 또, 결합 물질로서 항체를 입자에 고정화하는 원리로서, 물리 흡착 및 공유 결합에 의한 화학 결합 중 어느 원리도 채용 가능하다. 항체를 입자에 고정시킨 후에 항체가 피복되어 있지 않은 입자 표면을 덮는 블로킹제(즉, 제1 블로킹제)로서는, 예를 들면 알부민(BSA 등), 스킵 밀크, 카제인, 대두 유래 성분, 물고기 유래 성분, 또는 폴리에틸렌글라이콜 등과, 상기 물질 또는 상기 물질과 성질이 동일한 물질을 포함하는 시판 중인 면역 반응용 블로킹제 등이 사용 가능하다. 이들 블로킹제는, 필요에 따라 열이나 산·알칼리 등에 의하여 부분 변성 등의 전처리를 실시하는 것도 가능하다. 또한, 제1 블로킹제로서는, 측정 대상 물질과 결합성을 갖지 않는 항체(글로불린), 혹은 테스트 에어리어에 사용하지 않는 단백질(Protein A, Protein G) 등을 사용할 수도 있다.

[0292] 항체를 입자에 고정화하는 구체적인 방법을, 이하에 예시한다. 입자의 고형분 농도가 0.1~10질량%가 되도록 분산시킨 액에, 0.01~20mg/mL의 농도로 조정된 항체 용액을 첨가하여, 혼합한다. 온도 4~50℃의 조건하에서 5분간~48시간 교반을 계속한다. 이어서 원심 분리, 그 외의 방법에 의하여 입자와 용액을 분리하고, 용액에 포함되어 있는, 입자에 결합하지 않았던 항체를 충분히 제거한다. 그 후, 입자를 완충액으로 세정하는 조작을 0~10회 반복한다. 입자와 항체를 혼합하고, 입자에 항체를 결합시키는 조작을 실시한 후에, 항원 항체 반응에 관여하지 않는 성분, 바람직하게는 단백질, 보다 바람직하게는 글로불린, 알부민, 블록 에이스(등록 상표), 스킵 밀크 및 카제인 등의 블로킹제를 사용하여 입자 표면의 항체가 결합하고 있지 않는 부분을 보호하는 것이 바람직하다.

[0293] 항원이나 항체 등을 입자에 고정화할 때에, 안정화제를 필요에 따라 첨가 가능하다. 안정화제란, 자당이나 다당류 등의 합성 고분자 혹은 천연 고분자 등, 항원이나 항체를 안정화하는 것이면 특별히 제한되지 않고, Immunoassay Stabilizer(Advanced Biotechnologies Inc(ABI사)) 등의 시판 중인 안정화제도 사용 가능하다.

[0294] 제1 결합 물질을 갖는 표지 입자는 본 발명의 키트에 포함되어 있고, 키트의 일부인 용기, 예를 들면 컵에 포함되어 있는 양태가 바람직하다. 이 경우, 생체 시료를, 표지 입자를 포함하는 용기에 주입하여 혼합, 교반함으로써, 생체 시료 중의 측정 대상 물질과 제1 결합 물질을 결합시킬 수 있다.

[0295] (기관)

[0296] 본 발명에서는, 고감도인 측정을 달성하기 위하여, 후술하는 표면 플라즈몬 형광(SPF) 검출을 행하는 측정법을 채용하는 것이 바람직하다. 이 경우에 있어서의 기관으로서, 표면에 금속막을 갖는 기관을 사용하는 것이 바람직하다. 금속막을 구성하는 금속으로서, 표면 플라즈몬 공명이 발생할 수 있는 것이면 특별히 한정되지 않는다. 바람직하게는 금, 은, 구리, 알루미늄, 또는 백금 등의 자유 전자 금속을 들 수 있고, 특히 금이 바람직하다. 금을 사용하는 경우, 하기하는 검출 영역은, 금막 상에 있다. 상기의 금속은 단독 또는 조합하여 사용할 수 있다. 또, 상기 기관에 대한 부착성을 고려하여, 기관과 금속으로 이루어지는 층과의 사이에 크로姆 등으로 이루어지는 개재층을 마련해도 된다. 금속막의 막두께는 임의이지만, 예를 들면 1nm 이상 500nm 이하인 것이 바람직하고, 특히 10nm 이상 200nm 이하인 것이 바람직하다. 500nm를 초과하면, 매질의 표면 플라즈몬 현상을 충분히 검출할 수 없다. 또, 크로姆 등으로 이루어지는 개재층을 마련하는 경우, 그 개재층의 두께는, 0.1nm 이상, 10nm 이하인 것이 바람직하다.

[0297] 금속막의 형성은 통상의 방법에 따라 행하면 되고, 예를 들면 스퍼터링법, 증착법, 이온 플레이팅법, 전기 도금법, 또는 무전해 도금법 등에 의하여 행할 수 있지만, 기관 재질과 금속막과의 혼합층을 마련하고, 금속막의 밀착성을 양호하게 하기 위해서는, 스퍼터링법에 의하여 금속막을 제작하는 것이 바람직하다. 이 경우, 기관 재질과 금속막과의 혼합층의 두께는 충분한 밀착성을 확보할 수 있으면 특별히 제한은 없지만, 10nm 이하가 바람직하다.

[0298] 금속막은 바람직하게는 기관 상에 배치되어 있다. 여기에서, "기관 상에 배치된다"란, 금속막이 기관 상에 직접 접촉하도록 배치되어 있는 경우 외에, 금속막이 기관에 직접 접촉하지 않고, 다른 층을 통하여 배치되어 있는 경우도 포함한다. 본 발명에서 사용할 수 있는 기관의 재질로서는 예를 들면, 일반적인 광학 유리의 1종인 BK7(붕규산 유리) 등의 광학 유리, 혹은 합성 수지, 구체적으로는 폴리메틸메타크릴레이트, 폴리에틸렌테레프탈레이트, 폴리카보네이트, 또는 사이클로올레핀 폴리머 등의 레이저광에 대하여 투명한 재료로 이루어지는 것을 사용할 수 있다. 이와 같은 기관은, 편광에 대하여 이방성을 나타내지 않고 또한 가공성이 우수한 재료가 바람직하다.

[0299] SPF 검출을 위한 기관의 바람직한 양태로서는, 폴리메틸메타크릴레이트(PMMA)에 금속막을 증착한 기관 등을 들 수 있다.

[0300] 기관은, 측정 대상 물질 또는 제1 결합 물질 중 어느 하나와 결합성을 갖는 제2 결합 물질을 갖는 검출 영역을

구비하고 있다.

- [0301] (제2 결합 물질)
- [0302] 제2 결합 물질은, 측정 대상 물질과 결합성을 갖는 물질이거나, 또는 제1 결합 물질과 결합성을 갖는 물질이다. 정량을 샌드위치 상등액법으로 행하는 경우에는, 제2 결합 물질로서, 측정 대상 물질과 결합성을 갖는 물질을 사용할 수 있다. 정량을 경합법으로 행하는 경우에는, 제2 결합 물질로서, 제1 결합 물질과 결합성을 갖는 물질을 사용할 수 있다. 본 발명에 있어서는, 정량을 경합법으로 행하는 것이 바람직하고, 제2 결합 물질로서, 제1 결합 물질과 결합성을 갖는 물질을 사용하는 것이 바람직하다.
- [0303] 제2 결합 물질로서는, 특별히 한정되지 않지만, 바람직한 예로서는, 항원, 항체, 또는 이들의 복합체를 들 수 있지만, 바람직하게는, 항원이며, 제2 결합 물질로서, 측정 대상 물질(이것은, 제1 결합 물질과 결합성을 갖는 물질임)을 사용하는 것이 특히 바람직하다.
- [0304] 제2 결합 물질로서, 측정 대상 물질을 사용하는 경우에는, 제2 결합 물질은, 측정 대상 물질과 캐리어와의 결합체인 것이 바람직하다. 캐리어란, 측정 대상 물질의 복수의 분자가 결합 가능한 물질을 의미한다. 바람직한 캐리어의 일례로서는, 단백질 등을 들 수 있고, 그 중에서도 구체적으로는, 소 혈청 알부민 등을 들 수 있다.
- [0305] 측정 대상 물질이 담즙산인 경우, 제2 결합 물질은, 콜산 및/또는 콜산 알부민 결합체, 데옥시콜산 및/또는 데옥시콜산·알부민 결합체와, 케노데옥시콜산 및/또는 케노데옥시콜산·알부민 결합체를 포함하는 것이 특히 바람직하다. 또, 측정 대상 물질이 프로게스테론인 경우는, 제2 결합 물질은, 프로게스테론·알부민 결합체인 것이 바람직하다.
- [0306] (제2 결합 물질을 기관에 고정화하는 방법)
- [0307] 제2 결합 물질을 기관에 고정화하는 방법은, 예를 들면 Nunc사가 제공하는 Tech Notes Vol. 2-12 등에 기재되어 있고, 일반적인 ELISA(Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay: 효소 결합 면역 흡착법) 시약을 조제하는 공지의 방법이 모두 사용 가능하다. 또, 기관 상에 자체 조직화 단분자막(SAM: Self-Assembled Monolayer) 등을 배치하는 것에 의한 표면 수식을 실시해도 되고, 제2 결합 물질을 기관에 고정화하는 방법으로서, 물리 흡착을 이용한 방법, 및 공유 결합에 의한 화학 결합을 이용한 방법 중 어느 방법도 채용 가능하다. 제2 결합 물질을 기관에 고정시킨 후에, 제2 결합 물질이 피복되어 있지 않은 기관 표면을 덮는 블로킹제(제2 블로킹제)로서는, 공지의 물질, 예를 들면 BSA, 글로불린, 스킵 밀크, 카제인, 대두 유래 성분, 물고기 유래 성분 또는 폴리에틸렌글라이콜 등과, 상기 물질 또는 상기 물질과 성질이 동일한 물질을 포함하는 시판 중인 면역 반응용 블로킹제 등이 사용 가능하다. 이들 블로킹제는, 필요에 따라 열이나 산·알칼리 등에 의하여 부분 변성 등의 전처리를 실시하는 것도 가능하다.
- [0308] (검출 영역 <테스트 에어리어>)
- [0309] 본 발명에 있어서는, 기관 상에 생체 시료 중의 측정 대상 물질의 유무를 검출하는 테스트 에어리어를 마련할 수 있다. 이 테스트 에어리어에서는, 예를 들면 측정 대상 물질인 항원을 잡아, 항원에 결합한 표지의 양을 검출하여 정량함으로써, 항원을 정량하는 것이 가능해진다. 혹은, 항원에 결합한 표지만을 결합할 수 없게 하고, 항원에 결합하고 있지 않는 표지만을 포획하여, 항원의 결합한 표지의 양을 산출하는 방법에 의하여, 항원을 정량하는 것이 가능해진다. 이 검출 방법은 경합법으로 불리고 있지만, 여기에서는, 경합법에 관한 기관에 대하여 설명한다.
- [0310] 기관의 테스트 에어리어에는, 표지 입자 상에 존재하는 결합 물질(예를 들면 항체)과 반응하는 사이트를 갖는 것이 바람직하다. 본 발명의 바람직한 일 양태로서는, 생체 시료 중에 존재하는 항원을, 기관의 테스트 에어리어 상에 갖는 양태가 바람직하다. 이 경우, 항원과 BSA를 축합체의 존재하에서 반응시켜, 항원·BSA 결합체를 제작하고, 이 결합체를 테스트 에어리어 상에 흡착시킴으로써 테스트 에어리어를 제작하는 것이 가능해진다. 측정 대상 물질인 항원-BSA 결합체는, 완충액에 용해시켜, 기관 상에 점착하고, 일정 시간 방치한 후, 상등액을 흡인하여, 건조시키는 등의 방법으로 기관 상의 테스트 에어리어에 결합시키는 것이 가능하다.
- [0311] (참조 영역 <컨트롤 에어리어>)
- [0312] 본 발명에서는, 측정 환경, 특히 측정 온도의 영향을 최대한 억제하기 위하여, 기관 상에 컨트롤 에어리어를 갖고, 테스트 에어리어의 정보를, 컨트롤 에어리어의 정보로 규격화함으로써, 환경 의존성을 매우 낮게 억제하는 것이 가능해진다. 컨트롤 에어리어로서는, 사용하는 생체 시료 중에 존재하는 측정 대상 물질의 양에 의존하지 않고, 모든 표지와 결합하는 것이 가능하도록 설계되어 있는 것이 바람직하다. 표지 입자 상에 존재하는 항체

전체에 상호 작용하는 항체를 갖는 것이 바람직하다. 이와 같이 설계하는 것에 의하여, 테스트 에어리어의 정보를 컨트롤 에어리어의 정보로 규격화함으로써, 예를 들면 저온 환경에서, 생체 시료의 흐름이나, 반응 속도가 영향을 받았을 경우에도, 규격화에 의하여 그 영향을 캔슬하여, 항상 양호한 정밀도로, 측정 환경에 영향을 받지 않는 결과를 얻는 것이 가능하게 된다.

[0313] 컨트롤 에어리어에 존재시키는 바람직한 항체로서는, 표지 입자 상에 존재하는 결합 물질(예를 들면, 항체)을 인식하는 기능을 갖고, 그 항체가 마우스 유래이면, 항마우스 항체인 것이 바람직하며, 표지 입자상의 항체가, 염소 유래이면, 항염소 항체인 것이 바람직하다. 이들 컨트롤 에어리어 상의 항체는, 완충액에 용해시켜, 기관 상에 점착하고, 일정 시간 방치한 후, 상등액을 흡인하여, 건조시키는 등의 방법으로 기관에 결합시키는 것이 가능하다.

[0314] (블로킹제)

[0315] 예를 들면, 경합법에 있어서, 측정 대상 물질을 포함하지 않는 음성이 되는 생체 시료뿐만 아니라, 측정 대상 물질을 포함하는 양성인 생체 시료에 대해서도 반응하여 음성이 되는 생체 시료가 존재하고 있고, 고치(高値) 피리(乖離)의 문제의 해결이 과제로서 인식되고 있다. 이와 같은 의음성(擬陰性)을 나타내는 원인은 명확하게는 되어 있지 않지만, 항체에 덮여 있지 않은 표지 입자 표면과, 검출 영역(테스트 에어리어)과의 비특이적인 상호 작용에 의하여, 본래 결합을 원하지 않는 표지 입자가 존재하는 것이 원인의 하나가 아닐까 생각된다. 또, 테스트 에어리어 상에 존재하는 물질과, 동일한 물질이 표지 입자 표면 상에 존재하는 경우에도, 유리(遊離)한 항체 등이 생체 시료 중에 존재하는 경우에는, 그 항체가, 테스트 에어리어 상에 존재하는 물질과, 표지 입자 표면 상의 물질 중 어느 쪽에도 결합함으로써, 측정 대상 물질을 포함하는 양성인 생체 시료를 측정하는 경우에 있어서도 음성으로서 검출되는 경우가 있다.

[0316] 일반적으로, 고상(高相) 표면(예를 들면 표지 입자 표면, 기관의 금막 표면)에 대한 비특이 흡착 억제를 위하여 BSA를 이용한 블로킹이 이용되고 있다.

[0317] 측정 대상 물질과 결합성을 갖는 면역 글로불린 이외의 면역 글로불린으로서 구체적으로는, 측정 대상 물질과는 다른 항원에 의하여 면역된 동물의 혈청으로부터 조제하는 항혈청, 항혈청으로부터 정제된 면역 글로불린 분획, 그 측정 대상 물질에 의하여 면역된 동물의 비장 세포를 이용하는 세포 융합에 의하여 얻어지는 모노클로날 항체, 혹은 그들의 단편[예를 들면,  $F(ab')_2$ , Fab, Fab', 또는 Fv] 등을 이용하는 것이 가능하다. 이들 항체의 조제는, 통상의 방법에 의하여 행할 수 있다. 또한, 그 항체가 키메라 항체 등의 경우와 같이, 수식을 더한 것이어도 되고, 또 시판 중인 항체여도 되며, 동물 혈청이나 배양 상등액으로부터 공지의 방법에 의하여 조제한 항체도 사용 가능하다.

[0318] (항체)

[0319] 본 발명에 있어서, 항체는, 그 동물종이나 서브 클래스 등에 관계없이 사용할 수 있다. 예를 들면, 본 발명에 이용하는 것이 가능한 항체는, 마우스, 래트, 햄스터, 염소, 토끼, 양, 소, 닭 등 면역 반응이 일어날 수 있는 생물에서 유래하는 항체, 구체적으로는, 마우스 IgG, 마우스 IgM, 래트 IgG, 래트 IgM, 햄스터 IgG, 햄스터 IgM, 토끼 IgG, 토끼 IgM, 염소 IgG, 염소 IgM, 양 IgG, 양 IgM, 소 IgG, 소 IgM, 닭 IgY 등이며, 폴리클로날 또는 모노클로날 모두 사용 가능하다. 단편화 항체는, 적어도 하나의 항원 결합 부위를 갖는, 완전형 항체로부터 유도된 분자이며, 구체적으로는 Fab,  $F(ab')_2$  등이다. 이들 단편화 항체는, 효소 혹은 화학적 처리에 의하여, 혹은 유전자 공학적 수법을 이용하여 얻어지는 분자이다.

[0320] (키트의 다른 요소)

[0321] 본 발명의 키트는, 측정 대상 물질을 측정하는 방법에 이용되는 것이며, 측정 대상 물질이 담즙산인 경우에는, 담즙산 측정 진단용 키트로서, 측정 대상 물질이 프로게스테론인 경우에는, 프로게스테론 측정 진단용 키트이다. 본 발명에 있어서, 측정 대상 물질의 측정을 실시할 때에, 제2 결합 물질을 고정된 기관과, 형광 입자 등의 표지 입자를 유지한 부재를 포함하는 센서 칩을 포함하는 것이지만, 표면 플라즈몬 여기 장치, 및 형광 측정 디바이스 등의, 측정 대상 물질의 측정에 사용되는 각종 기재 또는 장치를 포함해도 된다. 또한, 키트의 요소로서, 이미 알려진 양의 측정 대상 물질을 포함하는 시료, 취급 설명서 등을 포함해도 된다.

[0322] [생체 시료 중의 측정 대상 물질을 측정하는 방법]

[0323] 본 발명에 의한 생체 시료 중의 측정 대상 물질을 측정하는 방법은,

- [0324] 생체 시료를, 측정 대상 물질과 결합성을 갖는 제1 결합 물질을 갖는 표지 입자와 반응시키는 반응 공정과,
- [0325] 상기 측정 대상 물질 또는 상기 제1 결합 물질 중 어느 하나와 결합성을 갖는 제2 결합 물질을 갖는 기관에, 상기 반응 공정에서 얻어진 반응 산물을 접촉시켜, 표지 입자를 기관 상에 포착시키는 포착 공정과,
- [0326] 상기 측정 대상 물질에 관련된 표지 정보를 취득하는, 표지 정보 취득 공정을 포함하는 방법이며, 상기 표지 입자는, 식 (1)로 나타나는 적어도 1종의 화합물과 입자를 함유하는 발광성의 표지 입자이다.
- [0327] 본 발명에 있어서는, 측정 대상 물질의 양에 관련된 표지 정보를 취득하는 측정 대상 물질 관련 표지 정보 취득 공정에 의하여, 측정 대상 물질을 측정한다.
- [0328] 본 발명에 있어서의 측정은, 측정 대상 물질의 양의 측정인 한, 가장 넓은 개념으로서 해석된다. 측정 방법의 구체적인 실시형태로서는, 경합법 및 샌드위치법을 들 수 있지만, 경합법이 바람직하다.
- [0329] 경합법의 일례로서, 프로게스테론을 정량하는 경우를 이하에 설명한다. 프로게스테론 이외의 물질을 정량하는 경우도, 동일하게 실시할 수 있다.
- [0330] 경합법에서는, 먼저, 프로게스테론·알부민 결합체가 고정화되어 있는 프로게스테론 면역 측정용 기관에, 프로게스테론을 포함하는 생체 시료 및 항프로게스테론 항체 표지 형광 입자를 접촉시킨다. 그 생체 시료 중에 프로게스테론이 존재하지 않는 경우에는, 항프로게스테론 항체 표지 형광 입자와, 기관 상의 프로게스테론(즉, 프로게스테론·알부민 결합체 중의 프로게스테론)에 의하여, 기관 상에서 항원 항체 반응이 일어난다. 한편, 생체 시료 중에 프로게스테론이 존재하는 경우에는, 생체 시료 중의 프로게스테론과 항프로게스테론 항체 표지 형광 입자와의 사이에서 항원 항체 반응이 일어나, 항프로게스테론 항체 표지 형광 입자와, 기관 상의 프로게스테론(즉, 프로게스테론·알부민 결합체 중의 프로게스테론)과의 사이의 항원 항체 반응이 저해된다. 상기의 반응이 종료된 후, 기관 상의 알부민에 결합하지 않았던 항프로게스테론 항체 표지 형광 입자를 제거한다. 이어서 기관 상의 면역 복합체(즉, 항프로게스테론 항체 표지 형광 입자와, 기관 상의 프로게스테론·알부민 결합체 중의 프로게스테론과의 복합체)의 형성의 정도를 형광 강도로서 검출함으로써, 생체 시료 중의 프로게스테론의 농도를 측정할 수 있다.
- [0331] 경합법에 있어서의 형광의 측정 형태는, 플레이트 리더 측정, 혹은 플로 측정 중 어느 하나의 측정을 채용하는 것이 가능하고, 예를 들면 이하의 방법에 의하여 측정할 수 있다. 미리, 프로게스테론 농도가 다른 프로게스테론양이 이미 알려진 시료를 복수 준비하고, 이 시료 및 항프로게스테론 항체 표지 형광 입자를 미리 혼합한다. 이 혼합액을, 프로게스테론·알부민 결합체가 고정화되어 있는 영역에 접촉시킨다. 프로게스테론·알부민 결합체가 고정화되어 있는 영역으로부터의 형광 신호를, 특정 시간 간격으로 혼합액이 결합체에 접촉하고 있는 동안, 복수의 형광 신호로서 측정한다. 이 복수의 형광 신호로부터, 각 프로게스테론 농도에 있어서, 형광량의 시간 변화(기울기)를 구한다. 이 시간 변화를 Y축, 프로게스테론 농도를 X축으로 하여 플롯하고, 최소 제곱법 등의 적절히 어울리는 피팅 방법을 이용하여, 형광량의 시간 변화에 대한 프로게스테론 농도의 관계식을 취득한다. 이와 같이 취득한 관계식에 근거하여, 검사 목적으로 하는 생체 시료를 이용한 형광량의 시간 변화의 결과를 이용하여, 생체 시료에 포함되는 프로게스테론양을 정량할 수 있다.
- [0332] 이 프로게스테론양의 정량은, 단시간에 행하는 것이 바람직하다. 구체적으로는, 10분 이내에 행해지는 것이 바람직하고, 8분 이내가 보다 바람직하며, 나아가서는 6분 이내에서 행해지는 것이 바람직하다. 이 정량 시간에는, 최소 제곱법 등의 적절히 어울리는 피팅 방법을 이용하여 미리 취득한 형광량의 시간 변화와 프로게스테론 농도와의 관계식을 이용하여, 시료 및 항프로게스테론 항체 표지 형광 입자를, 프로게스테론·알부민 결합체가 고정화되어 있는 검출 영역에 접촉시킨 후에, 검사 목적으로 하는 생체 시료를 이용한 형광량의 시간 변화의 결과를 바탕으로 생체 시료에 포함되는 프로게스테론양을 환산하는 시간이 포함되어 있는 것이 바람직하다.
- [0333] 샌드위치법에서는, 특별히 한정되는 것은 아니지만, 예를 들면 이하의 순서에 의하여 측정 대상 물질을 측정할 수 있다. 측정 대상 물질을 포함하는 가능성이 있는 생체 시료와, 측정 대상 물질과 결합성을 갖는 제1 결합 물질을 갖는 형광 입자를, 기관 상에서 접촉시킨다. 생체 시료에 측정 대상 물질이 존재하는 경우에는, 측정 대상 물질과 형광 입자와 기관과의 사이에서 결합 반응(항원 항체 반응 등)이 발생한다. 그 결과, 생체 시료 중에 측정 대상 물질이 존재하는 경우에는, 기관에 결합한 제2 결합 물질과, 측정 대상 물질과, 제1 결합 물질을 갖는 형광 입자로 이루어지는 면역 복합체가 형성된다. 샌드위치법에서는, 제2 결합 물질과, 측정 대상 물질과, 제1 결합 물질을 갖는 형광 입자와의 반응이 종료된 후, 상기 면역 복합체를 형성하지 않았던, 제1 결합 물질을 갖는 형광 입자를 제거하여, 세정한다. 이어서 면역 복합체의 형성의 정도를 형광 강도로서 검출함으로써, 측정

대상 물질의 농도 등을 측정할 수 있다. 또한, 형광 강도와 측정 대상 물질의 농도는, 정(正)의 상관 관계가 있다.

[0334] (유료)

[0335] 본 발명의 바람직한 양태에 있어서는, 측정 대상 물질을 포함하는 가능성이 있는 생체 시료와, 제1 결합 물질을 갖는 표지 입자를 혼합한 혼합액을, 기관 상에 적용하여, 유료에 전개할 수 있다. 유료란, 생체 시료와, 제1 결합 물질을 갖는 표지 입자를, 검출 영역까지 유하(流下)하는 통로이면, 특별히 제한은 없다. 바람직한 유로의 양태로서는, 제1 결합 물질을 갖는 표지 입자를 포함하는 생체 시료액을 점착하는 점착구, 검출 영역으로서의 금속막, 및 금속막을 넘어 유로가 존재하고, 생체 시료가, 금속막 상을 통과할 수 있는 구조를 갖는 것이다. 바람직하게는, 금속막에 대하여, 점착구와는 반대 측에, 흡인구를 마련할 수 있다.

[0336] (표면 플라즈몬 형광 측정)

[0337] 본 발명에 있어서의 형광 등의 표지의 검출 방법으로서, 특별히 한정되지 않지만, 예를 들면 형광 강도를 검출할 수 있는 기기, 구체적으로는, 마이크로 플레이트 리더, 또는 표면 플라즈몬 여기에 의한 형광 검출(SPF)을 행하기 위한 바이오 센서 등을 이용하여 형광 강도를 검출하는 것이 바람직하다. 바람직하게는, 표면 플라즈몬 공명에 의한 형광 검출에 의하여, 측정 대상 물질의 양에 관련된 표지 정보를 취득할 수 있다.

[0338] 또한, 형광의 측정의 형태는, 플레이트 리더 측정이어도 되고, 플로 측정이어도 된다. 표면 플라즈몬 여기에 의한 형광 검출법(SPF법)은, 낙사 여기에 의한 형광 검출법(낙사 형광법)보다 고감도로 측정할 수 있다.

[0339] 표면 플라즈몬 형광(SPF) 바이오 센서로서는, 예를 들면 일본 특허공개공보 2008-249361호에 기재되어 있는 바와 같은, 소정 파장의 여기광을 투과시키는 재료로 형성된 광도파로와, 이 광도파로의 일 표면에 형성된 금속막과, 광빔을 발생시키는 광원과, 상기 광빔을 광도파로에 통과시켜, 상기 광도파로와 금속막과의 계면에 대하여 표면 플라즈몬을 발생시키는 입사각으로 입사시키는 광학계와, 상기 표면 플라즈몬에 의하여 증강된 에바네센트 파에 의하여 여기됨으로써 발생하는 형광을 검출하는 형광 검출 수단을 구비한 센서를 이용할 수 있다.

[0340] 본 발명의 형광 입자를 이용한 표면 플라즈몬 여기에 의한 형광 검출(SPF)계는, 바람직하게는, 기관 상의 금속막 상에 고정화된 측정 대상 물질의 양에 의존한 형광 물질로부터의 형광을 검출하는 어세이 방법이며, 예를 들면 용액 중에서의 반응의 진행에 의하여, 광학적인 투명도의 변화를 탁도로서 검출하는, 이른바 라텍스 응집법과는 다른 방법이다. 라텍스 응집법은, 라텍스 시약 중의 항체 감작 라텍스와 생체 시료 중의 항원이, 항체 반응에 의하여 결합하여 응집한다. 이 응집괴(凝集塊)는 시간과 함께 증대되고, 이 응집괴에 근적외광을 조사하여 얻어진 단위 시간당 흡광도 변화로부터, 항원 농도를 정량화하는 방법이다. 본 발명에서는, 라텍스 응집법에 비하여, 매우 간편한 측정 대상 물질의 검출 방법을 제공할 수 있다.

[0341] (규격화)

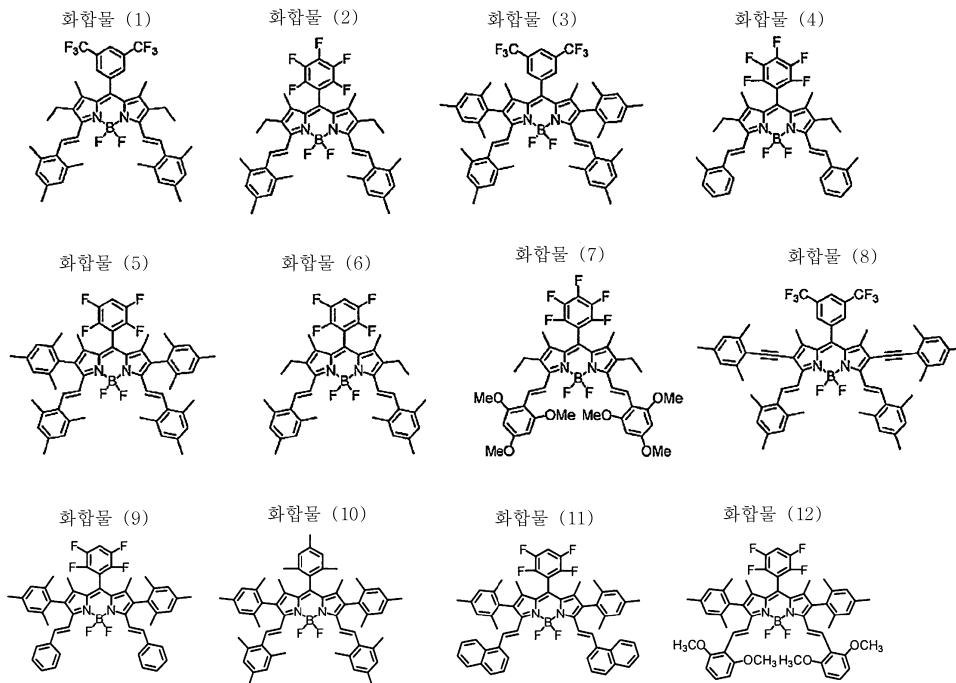
[0342] 또한 본 발명의 방법은, 표지 입자의 양에 관련된 표지 정보를 취득하는, 표지 입자 관련 표지 정보 취득 공정; 및 측정 대상 물질의 양에 관련된 표지 정보를 취득하는 측정 대상 물질 관련 표지 정보 취득 공정에서 취득한 표지 정보를, 표지 입자 관련 표지 정보 취득 공정에서 취득한 표지 정보에 의하여 규격화하는, 규격화 공정을 포함하는 방법이어도 된다.

[0343] 여기에서, 생체 시료와, 측정 대상 물질과 결합성을 갖는 제1 결합 물질을 갖는 표지 입자를 포함하는 혼합액을, 검출 영역(테스트 에어리어)과 참조 영역(컨트롤 에어리어)을 갖는 기관에 접촉시켜 검출 영역과 참조 영역 상에 표면 플라즈몬을 발생시키고, 방출된 형광의 강도를 측정하는 공정 중, 검출 영역 상에서 발생하는 표면 플라즈몬에 의한 형광의 강도를 측정하는 공정이, 측정 대상 물질의 양에 관련된 표지 정보를 취득하는 측정 대상 물질 관련 표지 정보 취득 공정이며, 참조 영역 상에서 발생하는 표면 플라즈몬에 의한 형광의 강도를 측정하는 공정이, 표지 입자 관련 표지 정보 취득 공정이다. 이 2개의 공정에서 취득한 형광 강도의 단위 시간에 있어서의 증가 속도를 형광 시그널값의 변화율로서 구하고, 검출 영역의 시그널값의 변화율을 참조 영역의 시그널값의 변화율로 나누는 공정이 규격화 공정이다.

[0344] 이하에, 본 발명의 실시예를 들어 본 발명을 더 구체적으로 설명한다. 또한, 이하의 실시예에 나타나는 재료, 사용량, 비율, 처리 내용, 처리 순서 등은, 본 발명의 취지를 벗어나지 않는 한 적절히 변경할 수 있다. 따라서, 본 발명의 범위는 이하에 나타내는 구체예에 의하여 한정적으로 해석되어야 할 것은 아니다.

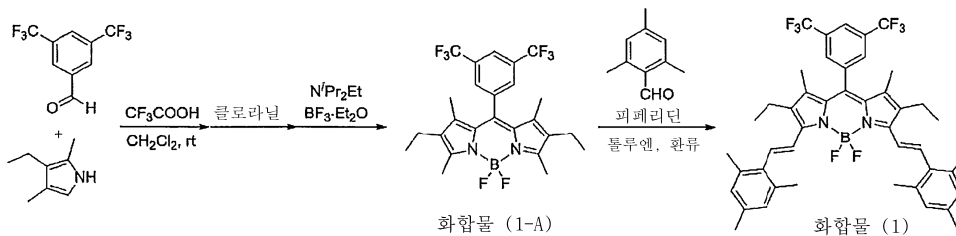
[0345] 실시예

- [0346] <1-1> 화합물의 합성
- [0347] 용어는 이하의 의미를 나타낸다.
- [0348] MS: 질량 분석(mass spectrometry)
- [0349] ESI: 일렉트로스프레이 이온화(electrospray ionization)
- [0350] NMR: 핵자기 공명(nuclear magnetic resonance)
- [0351] Me: 메틸기
- [0352] Et: 에틸기
- [0353] Bu: n-부틸기
- [0354] PL: 포토 루미네선스
- [0355] THF: 테트라하이드로퓨란
- [0356] 화합물 (1)~화합물 (12)의 구조를 이하에 나타낸다.
- [0357] [화학식 39]



- [0358]
- [0359] <화합물 (1)의 합성>

[0360] [화학식 40]



- [0361]
- [0362] 화합물 (1-A)의 합성

[0363] 100mL 3구 플라스크에, 질소 분위기하, 3,5-비스(트라이플루오로메틸)벤즈알데하이드 1.00g 및 다이클로로메테인 20mL를 도입하고, 실온에서 교반했다. 수행하면서 3-에틸-2,4-다이메틸피롤 0.98g을 적하하고, 계속해서, 트라이플루오로아세트산을 2방울 첨가한 후, 실온에서 30분간 교반했다. 수행하면서 클로라닐 1.0g을 첨가하고,

실온에서 10분간 교반한 후, 수랭하면서 다이아이소프로필에틸아민( $N^iPr_2Et$ ) 3.67g을 적하하며, 실온에서 15분간 교반했다. 계속해서, 수랭하면서 삼불화 붕소 다이에틸에터 착체 5.6mL를 적하하고, 실온에서 30분간 교반했다. 포화 탄산 수소나트륨 및 톨루엔을 적하하고, 추출·분액하여 얻어진 유기층을 무수 황산 나트륨으로 예비 건조한 후, 감압 농축했다. 이 조생성물(粗生成物)을 실리카겔 칼럼 크로마토그래피(전개 용매: 헥세인/아세트산 에틸)로 정제한 후, 메탄올로 재결정함으로써, 화합물 (1-A)를 1.28g 얻었다.

[0364]  $^1H$  NMR( $CDCl_3$ , 400MHz):  $\delta$  8.03(s, 1H), 7.83(s, 2H), 2.54(s, 6H), 2.31(q, J=7.6Hz, 4H), 1.21(s, 6H), 1.00(t, J=7.6Hz, 6H).

[0365] 화합물 (1)의 합성

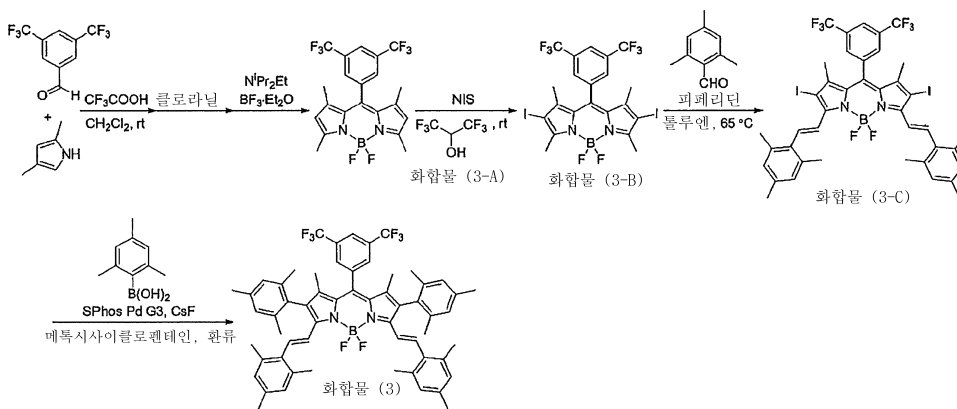
[0366] 100mL 3구 플라스크에, 화합물 (1-A) 100mg, 2,4,6-트라이메틸벤즈알데하이드 115mg, 및 탈수 톨루엔 5mL를 도입하고, 실온에서 교반했다. 피페리딘 1mL 및 p-톨루엔설포산 1수화물(와코 준야쿠 고교(주)사제, 시약 특급) 1편을 첨가하고 140°C에서 용매를 증류 제거하면서 1시간 교반하며, 방랭 후에 탈수 톨루엔 5mL를 첨가하고 140°C에서 용매를 증류 제거하면서 1시간 교반했다. 반응액을 감압 농축하여 얻어진 조생성물을 분취 TLC(전개 용매: 헥세인/아세트산 에틸)로 정제한 후, 메탄올로 재결정함으로써, 화합물 (1)을 71mg 얻었다. 화합물의 동정 은,  $^1H$ -NMR과 ESI-MS에 의하여 행했다.

[0367]  $^1H$  NMR( $CDCl_3$ , 400MHz):  $\delta$  8.06(s, 1H), 7.87(s, 2H), 7.38(d, J=17.2Hz, 2H), 7.32(d, J=17.2Hz, 2H), 6.93(s, 4H), 2.63(q, J=7.6Hz, 4H), 2.44(s, 12H), 2.30(s, 6H), 1.27(s, 6H), 1.17(t, J=7.6Hz, 6H).

[0368] ESI-MS:  $[M-H]^- = 775.8$

[0369] <화합물 (3)의 합성>

[0370] [화학식 41]



[0371]

[0372] 화합물 (3-A)의 합성

[0373] 1L 3구 플라스크에, 질소 분위기하, 3,5-비스(트라이플루오로메틸)벤즈알데하이드 16.22g, 및 다이클로로메테인 200mL를 도입하고, 실온에서 교반했다. 수랭하면서 2,4-다이메틸피롤 15.75g을 적하하고, 계속해서, 트라이플루오로아세트산을 5방울 첨가한 후, 실온에서 30분간 교반했다. 수랭하면서 클로라닐(Chloranil) 19.45g을 첨가하고, 실온에서 30분간 교반한 후, 수랭하면서 다이아이소프로필에틸아민( $N^iPr_2Et$ ) 80mL를 적하하며, 실온에서 30분간 교반했다. 계속해서, 수랭하면서 삼불화 붕소 다이에틸에터 착체( $BF_3 \cdot Et_2O$ ) 85mL를 적하하고, 실온에서 30분간 교반했다. 포화 탄산 수소나트륨 400mL를 적하하고, 추출·분액하여 얻어진 유기층을 무수 황산 나트륨으로 예비 건조한 후, 감압 농축했다. 이 조생성물을 실리카겔 칼럼 크로마토그래피(전개 용매: 헥세인/아세트산 에틸)로 정제한 후, 에탄올로 재결정함으로써, 화합물 (3-A)를 4.40g 얻었다.

[0374] 화합물 (3-B)의 합성

[0375] 300mL 3구 플라스크에, 화합물 (3-A)를 3.05g, 및 1,1,1,3,3,3-헥사플루오로-2-프로판올 60mL를 도입하고, 실온에서 교반했다. N-아이오도석신이미드 3.60g을 도입하고, 실온에서 1시간 반 교반했다. 반응액을 감압 농축한

후, 싸이오 황산 나트륨 수용액 50mL(싸이오 황산 나트륨 10g 용해), 및 염화 메틸렌 100mL를 첨가하고, 추출·분액하여 얻어진 유기층을 무수 황산 나트륨으로 예비 건조한 후, 감압 농축했다. 이 조생성물을 에탄올로 재결정함으로써, 화합물 (3-B)를 3.90g 얻었다.

[0376] 화합물 (3-C)의 합성

[0377] 100mL 3구 플라스크에, 화합물 (3-B)를 2.2g, 2,4,6-트라이메틸벤즈알데하이드 2.6g 및 탈수 톨루엔 40mL를 도입하고, 실온에서 교반했다. 피페리딘 4mL를 도입하고 65°C에서 1시간 교반했다. 반응액을 감압 농축하여 얻어진 조생성물을 실리카젤 칼럼 크로마토그래피(전개 용매: 헥세인/아세트산 에틸)로 정제한 후, 에탄올로 재결정함으로써, 화합물 (3-C)를 2.4g 얻었다.

[0378] 화합물 (3)의 합성

[0379] 100mL 3구 플라스크에, 화합물 (3-C)를 96mg, 2,4,6-트라이메틸페닐보론산 64mg, 불화 세슘 130mg, 및 메톡시 사이클로펜테인 10mL를 도입하고, 실온에서 교반하면서, 감압 탈기 후에, 질소 분위기로 했다. 여기에, SPhos Pd G3(Aldrich제) 63mg을 첨가하고, 1시간 가열 환류했다. 포화 염화 암모늄 수용액 10mL, 및 아세트산 에틸 10mL를 첨가하고, 추출·분액하여 얻어진 유기층을 무수 황산 나트륨으로 예비 건조한 후, 감압 농축했다. 이 조생성물을 분취 TLC(전개 용매: 헥세인/아세트산 에틸)로 정제한 후, 에탄올로 재결정함으로써, 화합물 (3)을 16mg 얻었다. 화합물의 동정은, <sup>1</sup>H-NMR과 ESI-MS에 의하여 행했다.

[0380] <sup>1</sup>H NMR(CDC1<sub>3</sub>, 400MHz): δ 8.02(s, 1H), 8.00(s, 2H), 7.42(d, J=22.4Hz, 2H), 6.92(s, 4H), 6.80(s, 4H), 6.67(d, J=22.4Hz, 2H), 2.27(s, 6H), 2.17(s, 6H), 2.16(s, 6H), 2.11(s, 12H), 2.01(s, 12H).

[0381] ESI-MS: [M-H]<sup>-</sup>=955.8

[0382] <화합물 (2)의 합성>

[0383] 화합물 (3)의 합성에 있어서, 3,5-비스(트라이플루오로메틸)벤즈알데하이드를 2,3,4,5,6-펜타플루오로벤즈알데하이드로 치환하고, 추가로 2,4-다이메틸피롤을 2,4-다이메틸-3-에틸피롤로 치환한 것 이외에는, 동일하게 하여 합성을 행하여, 조생성물을 실리카젤 칼럼 크로마토그래피(전개 용매: 헥세인/아세트산 에틸)로 정제한 후, 다이클로로메테인/메탄올로 재결정함으로써, 화합물 (2)를 8mg 얻었다. 화합물의 동정은 <sup>1</sup>H-NMR 측정으로 행하고, Org. Biomol. Chem., 2010, 8, 4546-4553과 동일한 NMR 스펙트럼인 것을 확인했다.

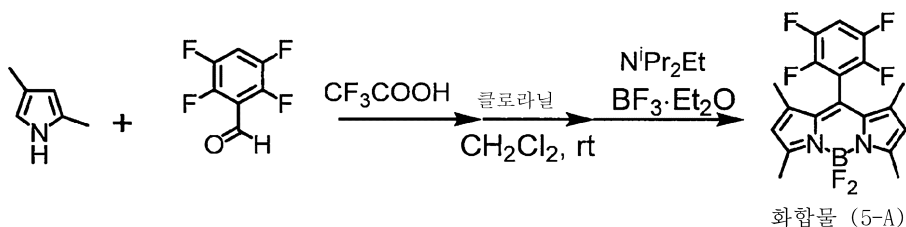
[0384] <화합물 (4)의 합성>

[0385] 화합물 (2)의 합성에 있어서, 2,4,6-트라이메틸벤즈알데하이드를 *o*-톨루알데하이드로 치환한 것 이외에는 동일하게 하여 합성하여, 화합물 (4)를 합성했다. 화합물의 동정은, <sup>1</sup>H-NMR과 ESI-MS에 의하여 행했다. 400MHz <sup>1</sup>H-NMR 스펙트럼은 도 1에 나타낸다.

[0386] ESI-MS: [M-H]<sup>-</sup>=673.3

[0387] <화합물 (5)의 합성>

[0388] [화학적식 42]



[0389]

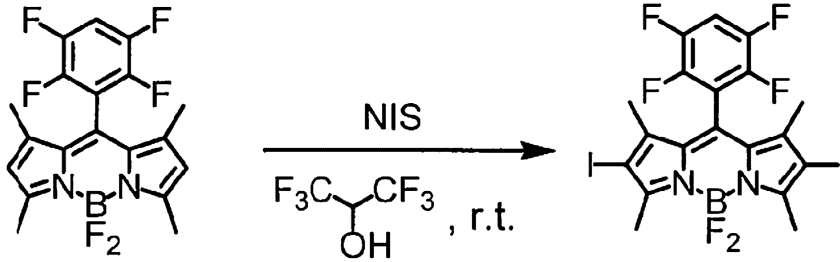
[0390] 화합물 (5-A)의 합성

[0391] 500mL 3구 플라스크에, 질소 분위기하, 2,4-다이메틸피롤 1.16ml 및 다이클로로메테인 140mL를 도입하고, 실온에서 교반했다. 2,3,5,6-테트라플루오로벤즈알데하이드 1.0g, 트라이플루오로아세트산 1방울을 첨가한 후, 실온에서 15분간 교반했다. 클로라닐(Chloranil) 1.38g을 첨가하고, 실온에서 15분간 교반한 후, 수행하면서 다이아

이소프로필에틸아민( $N^iPr_2Et$ ) 6.8mL를 적하하며, 실온에서 20분간 교반했다. 계속해서, 수랭하면서 삼불화 붕소 다이에틸에터 착체( $BF_3 \cdot Et_2O$ ) 7.8mL를 적하하고, 실온에서 30분간 교반했다. 포화 탄산 수소나트륨 400mL를 적하하고, 다이클로로메테인으로 추출·분액하여 얻어진 유기층을 무수 황산 나트륨으로 예비 건조한 후, 감압 농축했다. 이 조생성물을 실리카겔 칼럼 크로마토그래피(전개 용매: 헥세인/아세트산 에틸)로 정제한 후, 메탄올로 재결정함으로써, 화합물 (5-A)를 360mg 얻었다.

[0392] 화합물 (5-B)의 합성

[0393] [화학식 43]



화합물 (5-A)

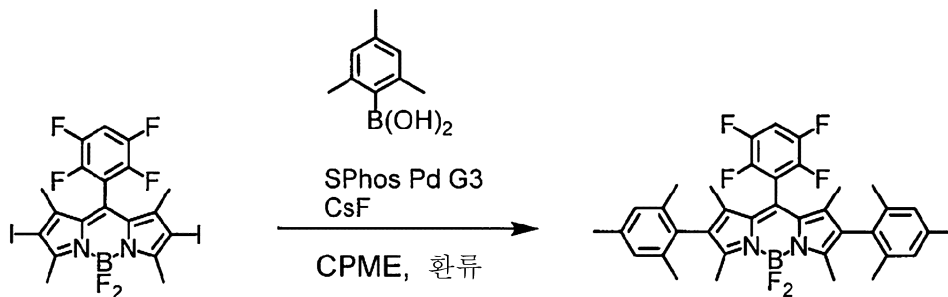
화합물 (5-B)

[0394]

[0395] 300mL 3구 플라스크에, 화합물 (5-A)를 300mg, 및 1,1,1,3,3,3-헥사플루오로-2-프로판올 8mL를 도입하고, 실온에서 교반했다. N-아이오도석신이미드 409mg을 도입하고, 실온에서 1시간 반 교반했다. 반응액을 감압 농축한 후, 염화 메틸렌 40mL를 첨가하고, 추출·분액하여 얻어진 유기층을 무수 황산 나트륨으로 예비 건조한 후, 여과를 실시하여 감압 농축했다. 이 조생성물에 에탄올을 첨가하고 분산 세정 및 여과를 실시함으로써, 화합물 (5-B)를 382mg 얻었다.

[0396] 화합물 (5-C)의 합성

[0397] [화학식 44]



화합물 (5-B)

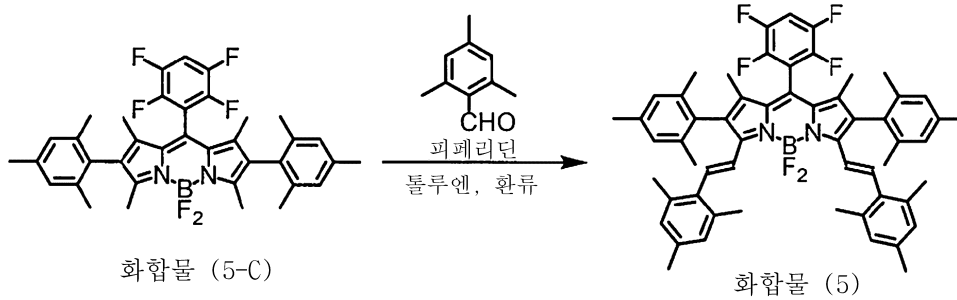
화합물 (5-C)

[0398]

[0399] 100mL 3구 플라스크에, 화합물 (5-B)를 278mg, 2,4,6-트라이메틸페닐보론산 564mg, 불화 세슘 653mg, 및 메톡시사이클로펜테인 43mL를 도입하고, 실온에서 교반하면서, 감압 탈기 후에, 질소 분위기로 했다. 여기에, SPhos Pd G3(Aldrich제) 269mg을 첨가하고, 1시간 가열 환류했다. 아세트산 에틸 250mL를 첨가하고, 추출·분액하여 얻어진 유기층을 무수 황산 나트륨으로 예비 건조한 후, 감압 농축했다. 이 조성물을 실리카겔 칼럼 크로마토그래피(전개 용매: 헥세인/아세트산 에틸)로 정제한 후, 다이클로로메테인 5mL에 용해시키고, 추가로 메탄올 15mL를 첨가한 후에 다이클로로메테인을 증류 제거하여, 재침전시켰다. 침전물을 여과하여, 화합물 (5-C) 206mg을 얻었다.

[0400] 화합물 (5)의 합성

[0401] [화학식 45]



[0402]

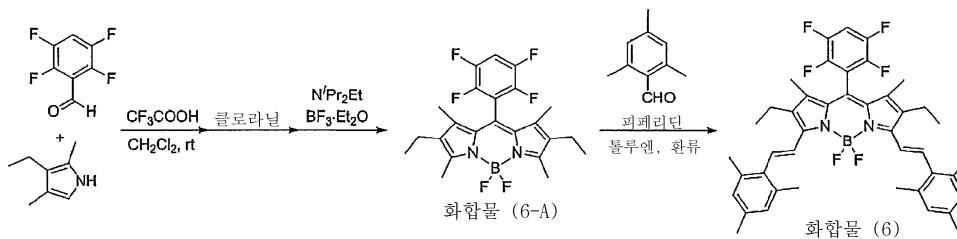
[0403] 100mL 3구 플라스크에, 화합물 (5-C)를 50mg, 톨루엔 5ml, 2,4,6-트라이메틸벤즈알데하이드 46  $\mu$ l, 피페리딘 400  $\mu$ l, p-톨루엔설폰산 1편을 도입하고, 질소하에서 1시간 가열 환류했다. 2,4,6-트라이메틸벤즈알데하이드 46  $\mu$ l를 추적(追添)하고 1시간 가열 환류시킨 후, 피페리딘 200  $\mu$ l를 추적하며 추가로 1시간 가열 환류시켰다. 반응 종료 후, 감압 농축하고, 이 조생성물을 실리카겔 칼럼 크로마토그래피(전개 용매: 헥세인/톨루엔)로 정제한 후, 다이클로로메테인 3ml에 용해시키며, 메탄올 15ml를 첨가한 후에 다이클로로메테인을 증류 제거하여, 재침 전시킴으로써, 화합물 (5)를 16mg 얻었다. 화합물의 동정은,  $^1\text{H-NMR}$ 과 ESI-MS에 의하여 행했다.

[0404]  $^1\text{H NMR}(\text{CDCl}_3, 400\text{MHz})$ :  $\delta$  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).

[0405] ESI-MS:  $[\text{M-H}]^- = 891.4$

[0406] <화합물 (6)의 합성>

[0407] [화학식 46]



[0408]

[0409] 화합물 (6-A)의 합성

[0410] 100mL 3구 플라스크에, 질소 분위기하, 2,3,5,6-테트라플루오로벤즈알데하이드 1.00g 및 다이클로로메테인 20mL를 도입하고, 실온에서 교반했다. 수행하면서 3-에틸-2,4-다이메틸피롤 0.98g을 적하하고, 계속해서, 트라이플루오로아세트산을 2방울 첨가한 후, 실온에서 15분간 교반했다. 수행하면서 클로라닐 1.0g을 첨가하고, 실온에서 10분간 교반한 후, 수행하면서 다이아이스프로필에틸아민 3.67g을 적하하고, 실온에서 15분간 교반했다. 계속해서, 수행하면서 삼불화 붕소 다이에틸에터 착체 5.6mL를 적하하고, 실온에서 60분간 교반했다. 포화 탄산수소나트륨 및 톨루엔을 적하하고, 추출·분액하여 얻어진 유기층을 무수 황산 나트륨으로 예비 건조한 후, 감압 농축했다. 이 조생성물을 실리카겔 칼럼 크로마토그래피(전개 용매: 톨루엔)로 정제한 후, 메탄올로 재결정함으로써, 화합물 (6-A)를 0.76g 얻었다.

[0411]  $^1\text{H NMR}(\text{CDCl}_3, 400\text{MHz})$ :  $\delta$  7.20-7.30(m, 1H), 2.54(s, 6H), 2.33(q, J=7.6Hz, 4H), 1.51(s, 6H), 1.01(t, J=7.6Hz, 6H).

[0412] 화합물 (6)의 합성

[0413] 100mL 3구 플라스크에, 화합물 (6-A)를 181mg, 2,4,6-트라이메틸벤즈알데하이드 237mg, 및 탈수 톨루엔 10mL를 도입하고, 실온에서 교반했다. 피페리딘 2mL 및 p-톨루엔설폰산 1수화물(와코 준야쿠 고교(주)사제, 시약 특급) 2편을 첨가하고 140 $^{\circ}$ C에서 용매를 증류 제거하면서 1시간 교반했다. 반응액을 감압 농축하여 얻어진 조생성물을 실리카겔 칼럼 크로마토그래피(전개 용매: 톨루엔)로 정제한 후, 아세트나이트릴로 재결정함으로써, 화합물

(6)을 194mg 얻었다. 화합물의 동정은, <sup>1</sup>H-NMR과 ESI-MS에 의하여 행했다.

[0414] <sup>1</sup>H NMR(CDC1<sub>3</sub>, 400MHz): δ 7.40(d, J=17.2Hz, 2H), 7.32(d, J=17.2Hz, 2H), 7.20-7.30(m, 1H), 6.93(s, 4H), 2.66(q, J=7.6Hz, 4H), 2.44(s, 12H), 2.30(s, 6H), 1.55(s, 6H), 1.19(t, J=7.6Hz, 6H).

[0415] ESI-MS: [M-H]<sup>-</sup>=711.7

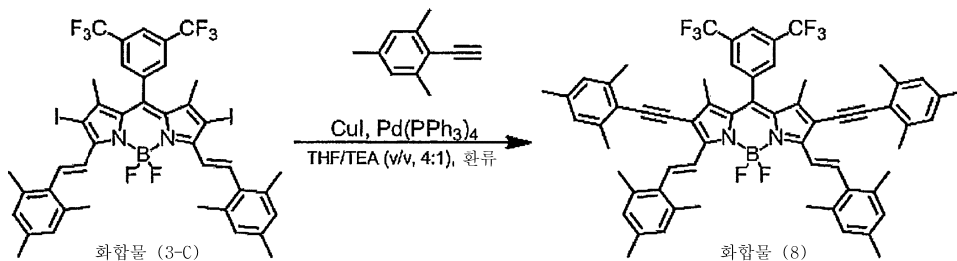
[0416] <화합물 (7)의 합성>

[0417] 화합물 (2)의 합성에 있어서, 2,4,6-트라이메틸벤즈알데하이드를 2,4,6-트라이메톡시벤즈알데하이드로 치환한 것 이외에는 동일하게 하여 합성하여, 화합물 (7)을 합성했다. 화합물의 동정은, <sup>1</sup>H-NMR과 ESI-MS에 의하여 행했다. 400MHz <sup>1</sup>H-NMR 스펙트럼을 도 2에 나타낸다.

[0418] ESI-MS: [M+H]<sup>+</sup>=825.3

[0419] <화합물 (8)의 합성>

[0420] [화학식 47]



[0421]

[0422] 화합물 (8)의 합성

[0423] 50mL 3구 플라스크에, 화합물 (3-C)를 97mg, 2-에타인일-1,3,5-트라이메틸벤젠 58mg, 아이오딘화 구리(I) 3.8mg, THF 4mL, 및 트라이에틸아민 1mL를 도입하고, 실온에서 교반하면서, 감압 탈기 후에, 질소 분위기로 했다. 여기에 테트라키스(트라이페닐포스핀)팔라듐(0)(Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>)을 첨가하고 2시간 가열 환류했다. 감압 증류 제거로 용매를 제거하고, 거기에 다이클로로메테인 30mL를 첨가하며, 물 20mL와 포화 염화 나트륨 수용액 20mL로 세정하고, 유기층을 무수 황산 나트륨으로 예비 건조한 후, 감압 농축했다. 이 조생성물을 실리카젤 칼럼 크로마토그래피(전개 용매: 헥세인/톨루엔)로 정제한 후, 메탄올로 재결정함으로써, 화합물 (8)을 26mg 얻었다. 화합물의 동정은, <sup>1</sup>H-NMR과 ESI-MS에 의하여 행했다.

[0424] <sup>1</sup>H NMR(CDC1<sub>3</sub>, 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).

[0425] ESI-MS: [M-H]<sup>-</sup>=1003.5

[0426] <화합물 (9)의 합성>

[0427] 화합물 (5-A)~화합물 (5-C)를 경유하여 화합물 (5)를 합성하는 방법에 있어서, 화합물 (5)의 합성에 있어서의 2,4,6-트라이메틸벤즈알데하이드를 벤즈알데하이드로 치환하고, 그 외는 동일한 방법으로 합성함으로써, 화합물 (9)를 합성했다.

[0428] <화합물 (10)의 합성>

[0429] 화합물 (5-A)~화합물 (5-C)를 경유하여 화합물 (5)를 합성하는 방법에 있어서, 화합물 (5-A)의 합성에 있어서의 2,3,5,6-테트라플루오로벤즈알데하이드를 2,4,6-트라이메틸벤즈알데하이드로 치환하고, 그 외는 동일한 방법으로 합성함으로써, 화합물 (10)을 합성했다.

[0430] <화합물 (11)의 합성>

[0431] 화합물 (5-A)~화합물 (5-C)를 경유하여 화합물 (5)를 합성하는 방법에 있어서, 화합물 (5)의 합성에 있어서의

2,4,6-트라이메틸벤즈알데하이드를 2-포밀나프탈렌으로 치환하고, 그 외는 동일한 방법으로 합성함으로써, 화합물 (11)을 합성했다.

[0432] <화합물 (12)의 합성>

[0433] 화합물 (5-A)~화합물 (5-C)를 경유하여 화합물 (5)를 합성하는 방법에 있어서, 화합물 (5)의 합성에 있어서의 2,4,6-트라이메틸벤즈알데하이드를 2,6-다이메톡시벤즈알데하이드로 치환하고, 그 외는 동일한 방법으로 합성함으로써, 화합물 (12)를 합성했다.

[0434] <1-2> 고휘도 형광 라텍스 분산액의 제작

[0435] 형광 라텍스 입자의 제작을 행했다. 라텍스 입자로서는 스타이렌과 아크릴산의 9/1(질량비) 혼합물을 수중에 분산시킨 상태로 중합시켜 제작한, 평균 입경 150nm의 입자를 이용했다. 평균 입경은 동적 광산란법을 이용하여 측정했다. 상기에서 제작한 고형분 2%의 라텍스 입자 분산액(라텍스 분산액)(25mL, 고형 500mg)에 대하여 THF(5mL)를 적하하고 10분 교반했다. 거기에, 화합물 (1) 24 μmol/g을 포함하는 THF 용액(2.5mL)을 15분 동안 적하했다. 표 중의 화합물량의 μmol/g은 라텍스의 고형 1g에 대한 사용한 화합물의 몰수, 질량%는 라텍스의 고형 1g에 대한 사용한 화합물의 질량%를 나타낸다. 화합물의 적하 종료 후, 30분 교반한 후, 감압 농축하여 THF를 제거했다. 그 후, 원심 분리하여 입자를 침전시킨 후, 초순수를 첨가하여 다시 분산시킴으로써 고형분 농도 2%의 고휘도 형광 라텍스 분산액을 제조했다.

[0436] 또, 화합물 (1) 대신에 화합물 (5)를 이용하여 동일한 조작을 행하여, 화합물 (5)를 포함하는 고형분 농도 2%의 고휘도 형광 라텍스 분산액을 제조했다.

[0437] 또한, 화합물 (1) 24 μmol/g과 화합물 (5) 12 μmol/g을 혼합한 것을 이용하여 동일한 조작을 행하여, 화합물 (1)과 화합물 (5)를 포함하는 고형분 농도 2%의 고휘도 형광 라텍스 분산액을 제조했다.

[0438] <2-1> 항프로게스테론 항체로 표지한 형광 입자의 조제

[0439] 항프로게스테론 항체로 표지한 고휘도 형광 라텍스 입자(평균 입경 150nm)를, 이하와 같이 조제했다.

[0440] <1-2>에서 제작한 고형분 농도가 2질량%인 고휘도 형광 라텍스 분산액 375 μL에, 50mM의 MES(2-모폴리노에테인 설펜산, 도진 가가쿠 겐큐쇼사제) 완충액(pH6.0)을 117 μL, 10mg/mL의 WSC(수용성 카보다이이미드) 수용액을 5 μL 첨가하고, 실온에서 15분간 교반했다. 그 후, 0.5mg/mL의 항프로게스테론모노클로날 항체(GeneTex사제)를 182.4 μL 첨가하고, 실온에서 1.5시간 교반했다. 2mol/L의 Glycine(와코 준야쿠사제) 수용액을 37.5 μL 첨가하고, 15분간 교반한 후, 원심 분리(15,000rpm, 4℃, 30분)로, 형광 라텍스 입자를 침강시켰다. 상등액을 제거하고, PBS(Phosphate Buffered Saline 인산 완충 생리 식염수; 와코 준야쿠사제) 용액(pH7.4)을 750 μL 첨가하며, 초음파 세척기에 의하여 형광 라텍스 입자를 재분산시켰다. 또한 원심 분리(15,000rpm, 4℃, 15분)를 행하고, 상등액을 제거한 후, 1질량% BSA를 포함하는 PBS(pH7.4) 용액 750 μL를 첨가하며, 형광 라텍스 입자를 재분산시킴으로써, 항프로게스테론 항체 결합 형광 라텍스 입자의 1질량% 용액을 얻었다.

[0441] <2-2> 프로게스테론-BSA 결합체의 시트르산 완충액의 용액의 조제

[0442] 프로게스테론-BSA 결합체(BIO-RAD사제) 150 μg을, 50mM 농도의 시트르산 완충액 1mL(pH5.2, 150mM NaCl)에 첨가하여 용해시켜, 시트르산 완충액의 용액을 얻었다.

[0443] <2-3> 프로게스테론-BSA 결합체 고정 기관의 제조

[0444] 폴리메틸메타크릴레이트(PMMA)의 기체(基體)(미쓰비시 레이온(주)사제, 아크리젯(등록 상표) VH)를 준비하고, 증착법에 의하여, 두께 50nm의 금막을 편면에 증착하며 7mm의 폭으로 재단하여, 동일한 기관을 7매 제작했다. 이 기관의 금 증착면 상에, 1.에서 조제한 프로게스테론-BSA 결합체의 시트르산 완충액에 의한 용액을 점착하고 건조시켜, 프로게스테론-BSA 결합체를 고정화한 기관을 제작했다.

[0445] <2-4> 기관의 세정 및 블로킹

[0446] 이와 같이 조제한 기관을 센서 칩의 유로에 장착하기 전에, Tween20(폴리옥시에틸렌(20) 소비탄모노라우레이트, 와코 준야쿠사제)을 0.05질량%의 농도로 포함하는 PBS 용액(pH7.4)을 미리 조제하고, 이 용액 300 μL를 이용하여 3회 반복 세정했다. 세정 종료 후, 금 증착막 상의 T4-BSA 결합체의 미흡착 부분의 블로킹을 행하기 위하여, 1질량% 카제인(Thermo Scientific사제)을 포함하는 PBS 용액(pH7.4)을 300 μL 첨가하고, 1시간, 실온에서 정지했다. 상기의 세정용 용액으로 세정 후, 안정화제로서 Immunoassay Stabilizer(ABI사제) 300 μL를 첨가하고, 실

온에서 30분간 방치하여, 용액을 제거하며 건조기를 이용하여 수분을 완전히 제거했다.

- [0447] <2-5> 센서 칩의 제작
- [0448] 일본 특허공개공보 2010-190880호의 제2 실시형태의 구성이 되도록, 유로형 센서 칩을 제작했다. 그 개략도를 도 3 및 도 4에 나타냈다. 도 3은, 센서 칩(1)의 개략도이며, 도 4는, 센서 칩(1)의 분해도이다. 센서 칩(1)은, 상부 부재(2), 중간 부재(3) 및 기판(4)으로 구성되어 있다. 상부 부재(2)에는, 제1 용기(5) 및 제2 용기(6)가 마련되어 있다. 또한, 제1 용기(5) 및 제2 용기(6)를 아울러, 용기군(7)이라고 칭한다. 기판(4)에는, 유로(10)가 형성되어 있고, 유로(10) 상에는, 검출 영역(8) 및 참조 영역(9)이 형성되어 있다.
- [0449] <3-1> 대형기(이미 알려진 프로게스테론 측정 시약)를 이용한 측정
- [0450] 면역 측정에서, 당업자에 의하여 널리 사용되고 있는 대형기인 이뮤라이즈 1000(주식회사 LSI 메디언스)에 의하여, 취급 설명서에 따라, 프로게스테론의 양이 이미 알려진 시료의 측정을 행하여, 프로게스테론의 측정값을 얻었다.
- [0451] <3-2> 항체 표지 입자를 이용한 프로게스테론의 측정
- [0452] 각종 농도(0.00ng/mL, 0.5ng/mL, 2.0ng/mL, 15.0ng/mL, 30.0ng/mL, 45.0ng/mL)의 프로게스테론을 포함하는 시료를 준비했다. 다음으로, <2-1>에서 조제한 항프로게스테론 항체로 표지한 항체 표지 입자와 각종 시료의 혼합액을 제작한 시점에서의 항체 표지 입자의 농도가, 0.080%, 0.040%, 0.020%, 0.010%, 0.005%, 0.002%, 0.001%가 되도록, 각 항체 표지 입자의 농도의 곱을 복수 준비하고, 각각의 농도의 곱에 상기에서 준비한 각종 농도의 시료를 첨가하며, 항체 표지 입자와 시료와의 혼합액을 10분간 교반하면서 조제했다. 다음으로, 2-5.에서 제작한 기판을 봉입한 유로형 센서 칩에 항체 표지 입자와 시료와의 혼합액을 각각 점착했다. 점착 후, 펌프 흡인을 행하면서 혼합액을 10 μL/min의 속도로 혼합액을 유하시키고, 프로게스테론-BSA 결합체를 고정한 금막면 상에 접촉시킨 후에, 형광 강도를 1.5분간 계속하여 측정했다. 각 기판에 있어서 얻어진 검출 영역과 참조 영역의 각각의 형광 강도의 단위 시간에 있어서의 증가 속도를 형광 시그널값으로서 구하고, 검출 영역의 시그널값을 참조 영역의 시그널값으로 나눔으로써 규격화를 행했다. 또, 프로게스테론 농도 0의 시료를 준비하고 마찬가지로 하여, 프로게스테론을 포함하지 않는 시료로부터의 시그널값의 규격화를 행했다.
- [0453] <4> 검량선의 제작
- [0454] <3-2>에서 구한 프로게스테론의 양이 이미 알려진 시료로부터 규격화한 형광 시그널값과, <3-1>에서 구한 대형기를 이용한 측정값과의 대응 관계를 구함으로써, <2-2>에서 조제한, 프로게스테론-BSA 결합체를 이용한 기판에 대하여, 검량선을 제작했다. 문헌 "The Immunoassay Handbook Third Edition Edited by David Wild(2005)"에 경합법의 검량선으로서, 시그모이드 함수의 4파라미터 로지스틱 곡선 모델을 적용할 수 있는 것이 기재되어 있고, 이 방법에 따라, 근사선을 얻는 방법으로서 일반적으로 알려져 있는 최소 제곱법을 이용하여, 3-2.에서 측정한 각 프로게스테론 농도에 있어서의 형광 시그널값의 각 점의 최근방을 통과하는 4파라미터 로지스틱 곡선을 구하여 검량선으로 했다.
- [0455] 이상과 같이 하여 구한 검량선으로부터, 각 프로게스테론 농도의 시료의 측정값을 산출했다.
- [0456] 성능은 검량선의 규격을 충족시키는지 여부로 판정했다. 검량선은 2개소에서 규정했다. 1번째는 저농도역의 검량선의 기울기이며, 역수를 취하여, 2.0 이내인 것을 규격으로 했다. 2번째는 고농도역의 측정점의 검량선으로부터의 괴리(편차)이며, 4% 이내를 규격으로 했다. 이 범위 내에서는, 측정값의 변동 계수가 10% 이내이고, 또한 정확도가 10% 이내인 것을 달성할 수 있어, 고정밀의 측정이 가능해진다.
- [0457] 저농도역으로서, 임상적으로 의의가 있는 프로게스테론의 최소 농도인 0.5ng/mL에 있어서의 검량선의 기울기를 구했다. 또, 고농도역으로서 프로게스테론 농도가 30.0ng/mL와 45.0ng/mL의 각각의 검량선으로부터의 괴리(편차)를 구하고, 평균값을 산출하여 평가했다. 결과를 표 3에 정리했다.
- [0458] <5> 비교용 입자의 조제
- [0459] <5-1> 비교 형광 라텍스 입자 분산액의 제작
- [0460] <1-2>에서 제작한 라텍스 입자 분산액의 고형분 농도 2질량%의 수분산액 100mL에 메탄올 100mL를 첨가하고 10분간, 실온에서 교반했다. 한편, 별도로 준비한 형광 색소(비교 화합물: 일본 특허공보 3442777호 기재된 화합물 5) 용액(N,N-다이메틸폼아마이드 1mL, CHCl<sub>3</sub> 9mL, 에탄올 16mL에 용해)을 60분 동안 천천히 라텍스 입자 분산액에 적하했다. 적하 완료 후, 이배퍼레이터로 유기 용매를 감압 증류 제거한 후, 원심 분리와 PBS 수용액에 대한

재분산을 3회 반복하여, 정제를 행함으로써, 비교용 형광 라텍스 입자 분산액을 조제했다.

[0461] <5-2> 향프로게스테론 향체로 표지한 비교용 향체 표지 입자의 조제

[0462] <2-1>에서 조제한 형광 라텍스 입자의 조제에 있어서, 형광 라텍스 입자 대신에, <5-1>에서 조제한 2질량%(고형분 농도)의 비교용 형광 라텍스 입자로 치환하고, 그것 이외의 작업은 동일하게 행하여, 비교용 향체 표지 입자를 조제했다. 그것 이외의 작업은 동일하게 하여 <4>의 측정까지 실시했다.

[0463] <6> 입자 형광 강도의 측정

[0464] 상기에서 고형분 농도 2질량%의 형광 라텍스 분산액을 초순수로 200배로 희석하고, 형광 분광 광도계 RF-5300PC(시마즈 세이사쿠쇼제)의 여기광을 658nm으로 설정하여, 측정을 행했다. 형광 라텍스 분산액의 형광 강도가 측정 범위를 초과할 정도로 높은 경우에는, 형광 강도의 극댓값이 측정 가능한 범위까지 초순수로 희석을 행했다. 7-1.에서 제작한 형광 라텍스 분산액의 발광 스펙트럼의 형광 강도의 적분값에 대한, 형광 라텍스 분산액의 발광 스펙트럼의 형광 강도의 적분값을 입자 형광 강도(상댓값)로 했다. 산출에 이용한 계산식을 이하에 나타낸다.

[0465]  $\text{형광 강도(상댓값)} = (\text{형광 라텍스 분산액의 발광 스펙트럼의 형광 강도의 적분값}) / (\text{비교예에서 제작한 형광 라텍스 분산액의 발광 스펙트럼의 형광 강도의 적분값})$

[0466] <평가 기준>

[0467] 저농도역의 검량선 기울기의 역수는, 2.0 이하인 경우의 판정을 A로 하고, 2.0보다 큰 경우의 판정을 B로 했다.

[0468] 고농도역에서의 검량선으로부터의 편차는, 4% 이하인 경우의 판정을 A로 하고, 4%보다 큰 경우의 판정을 B로 했다.

[0469] [표 3]

	화합물	입자 농도	입자 형광 강도 (상댓값)	저농도역의 검량선 기울기의 역수		고농도역에서의 검량선으로부터의 편차	
					판정		판정
실시예 1	(1), (5)	0.080질량%	12.1	1.7	A	1.8%	A
실시예 2	(1), (5)	0.040질량%	12.1	1.6	A	1.9%	A
실시예 3	(1), (5)	0.020질량%	12.1	1.5	A	2.0%	A
실시예 4	(1), (5)	0.010질량%	12.1	1.4	A	2.4%	A
실시예 5	(1), (5)	0.005질량%	12.1	1.3	A	2.9%	A
실시예 6	(1), (5)	0.002질량%	12.1	1.2	A	3.3%	A
실시예 7	(1), (5)	0.001질량%	12.1	1.1	A	3.4%	A
실시예 8	(1)	0.080질량%	5.8	2.0	A	2.0%	A
실시예 9	(1)	0.040질량%	5.8	1.9	A	2.4%	A
실시예 10	(1)	0.020질량%	5.8	1.8	A	2.8%	A
실시예 11	(1)	0.010질량%	5.8	1.7	A	3.2%	A
실시예 12	(1)	0.005질량%	5.8	1.6	A	3.4%	A
실시예 13	(1)	0.002질량%	5.8	1.5	A	3.6%	A
실시예 14	(1)	0.001질량%	5.8	1.4	A	3.8%	A
실시예 15	(5)	0.080질량%	7.0	1.9	A	1.9%	A
실시예 16	(5)	0.040질량%	7.0	1.8	A	2.2%	A
실시예 17	(5)	0.020질량%	7.0	1.7	A	2.5%	A
실시예 18	(5)	0.010질량%	7.0	1.6	A	3.1%	A
실시예 19	(5)	0.005질량%	7.0	1.5	A	3.3%	A
실시예 20	(5)	0.002질량%	7.0	1.4	A	3.5%	A
실시예 21	(5)	0.001질량%	7.0	1.3	A	3.6%	A
비교예 1	비교 화합물	0.080질량%	1.0	3.8	B	2.0%	A
비교예 2	비교 화합물	0.040질량%	1.0	2.0	A	4.1%	B
비교예 3	비교 화합물	0.020질량%	1.0	1.9	A	4.5%	B
비교예 4	비교 화합물	0.010질량%	1.0	1.8	A	5.2%	B
비교예 5	비교 화합물	0.005질량%	1.0	1.7	A	7.2%	B
비교예 6	비교 화합물	0.002질량%	1.0	1.6	A	9.0%	B
비교예 7	비교 화합물	0.001질량%	1.0	1.5	A	10.2%	B

[0470]

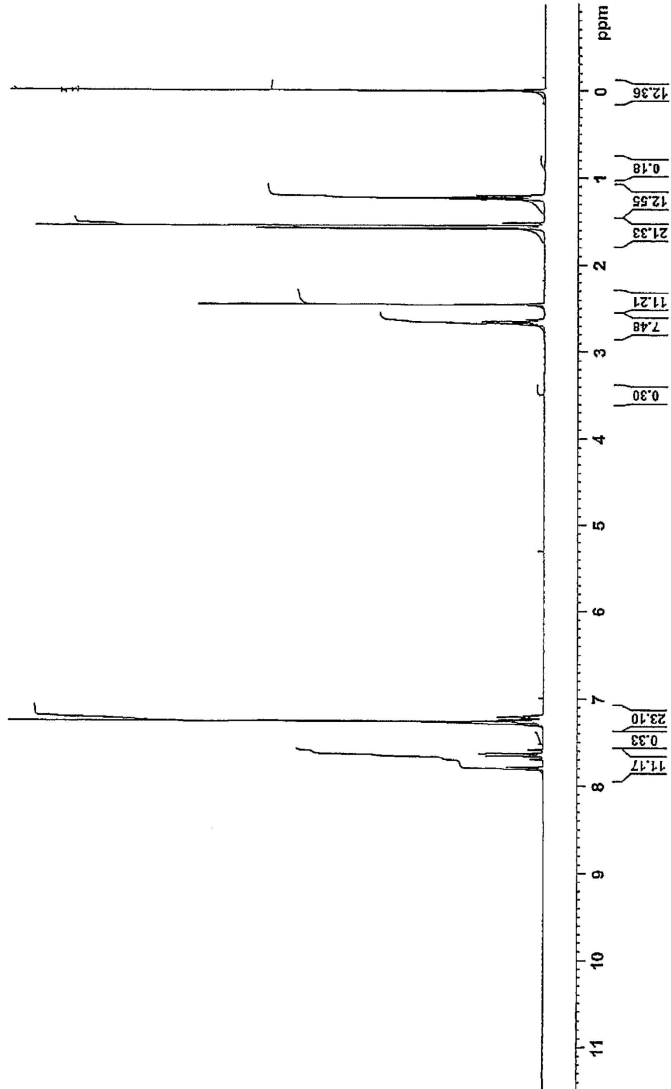
[0471] 표 3의 결과로부터, 입자 형광 강도가 낮은 비교예의 입자에 있어서는, 입자 농도가 높으면 저농도역의 검량선 기울기를 구할 수 없게 되고, 입자 농도가 낮으면 고농도역에서의 검량선으로부터의 편차가 커졌기 때문에, 측정 범위 전반에 걸쳐 고정밀도로 측정할 수 있는 조건이 없었다. 이에 대하여 본 발명의 고휘도 형광 입자에서는, 측정 범위 전반에 걸쳐 고정밀도로 측정할 수 있는 것을 알 수 있어, 본 발명의 효과가 확인되었다.

**부호의 설명**

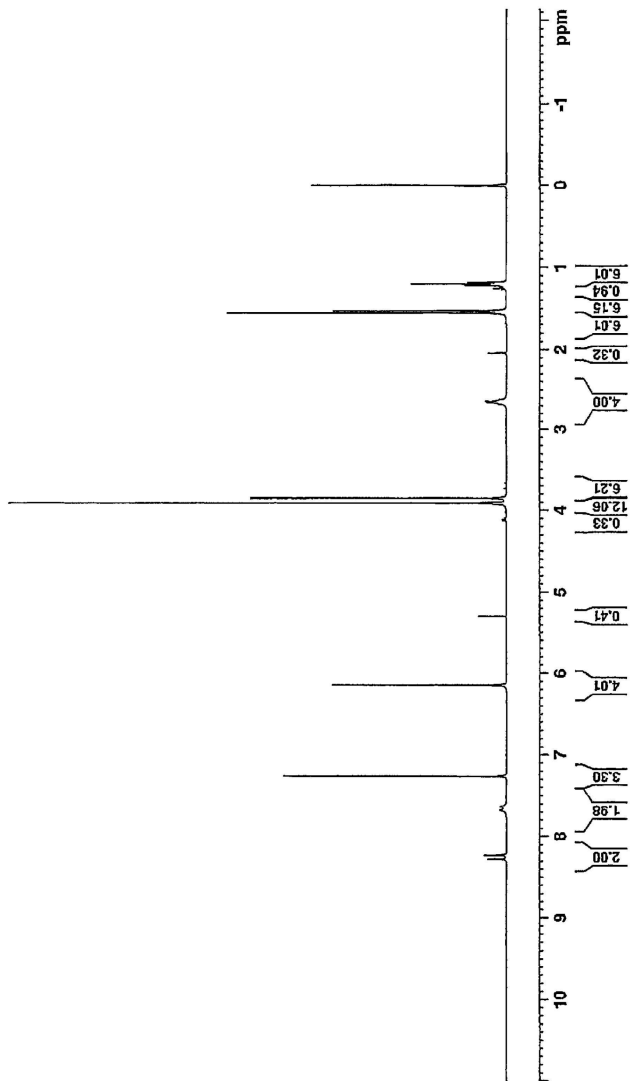
[0472]

- 1 센서 칩
- 2 상부 부재
- 3 중간 부재
- 4 기관
- 5 제1 용기
- 6 제2 용기
- 7 용기군
- 8 검출 영역
- 9 참조 영역
- 10 유로

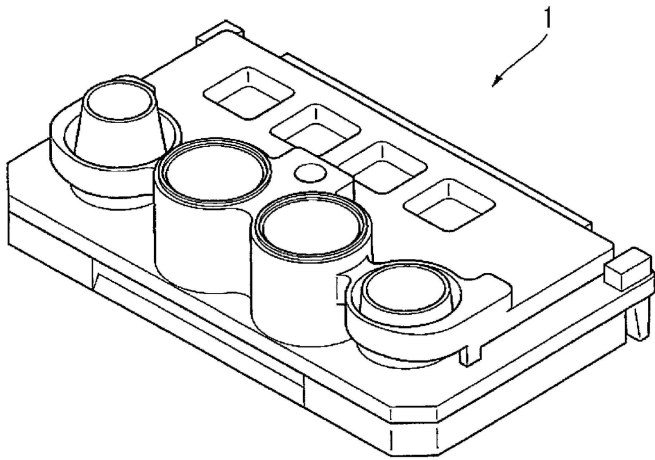
도면  
도면1



도면2



도면3



도면4

