

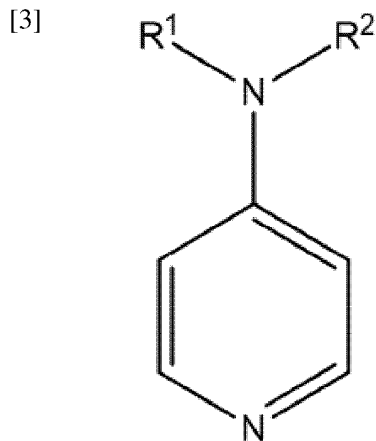
명세서

발명의 명칭: 신규한 전기화학발광 공반응물 및 이를 포함하는 전기화학발광 시스템

기술분야

- [1] 본 발명은 신규한 전기화학발광 공반응물 및 이를 포함하는 전기화학발광 시스템에 관한 것으로, 하기 화학식 I로 표시되는 화합물, 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염을 포함하는 전기화학발광(electrochemiluminescence, ECL) 공반응물(co-reactant)을 특정 발광화학종 (다환 방향족 탄화수소화합물, 금속착화합물, 양자점, 또는 나노입자 등)을 전기화학발광 라벨로 사용하여 전기화학발광 측정 시 검출 신호가 매우 우수하고, 전압 인가 조건의 개선이 가능하여 면역분석법 및 그에 기반한 진단기기, 및 화학분석법과 그에 기반한 진단기기 일반에 널리 적용될 수 있다.

[2] [화학식 I]



- [4] 상기 화학식 I에서, 상기 R¹ 또는 R²는 각각 동일하거나 다를 수 있으며, 수소 원자; 할로젠 원자; C₁~C₆ 직쇄 또는 분쇄 또는 고리형 알킬기; C₁~C₆ 알콕시기; 및 C₁~C₆ 할로알킬기로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나를 나타낸다.

배경기술

- [5] 화학적, 생화학 및 생물학적 물질을 검출하고 정량화하는 빠르고, 고도로 구체적이며, 민감하고 정확한 방법을 위해 연구가 계속 진행되고 있다. 일반적인 생물학적 시료 내에는 특정 분석물의 양이 상당히 적기 때문에 민감도와 같은 분석 성능 개선이 중요하게 여겨진다.
- [6] 분석 감도를 개선하기 위한 한 가지 접근 방식은 고감도 빛 검출에 사용할 수 있는 방법(예: photomultiplier tubes)을 이용하는 것이다. 이와 관련하여, 발광표시자 분자(luminescent indicator molecules)의 사용은 매우 중요한 요소로 여겨진다. 예를 들어, 관심 분석물(또는 관심분석물의 결합인자)과 관련된 발광

라벨을 사용하여 상기 분석물(또는 결합 파트너)의 존재를 정량적으로 검출할 수 있다.

- [7] 분석물(analyte)의 양은 아래 설명하는 바와 같이 분석물이 발광의 조절을 유도하는 반응에 참여할 때 정량적으로 결정될 수 있다. 상세하게, i) 분석물은 다른 종과 반응하여 두 번째 종의 발광 특성을 조절할 수 있고, ii) 분석물 자체의 발광 특성을 조절하는 화학적 변형을 겪을 수 있으며, iii) 분석물은 다른 종의 반응을 유도하는 촉매(예: 효소)일 수 있으며, iv) 분석물은 종을 생성하는 반응에 참여하고 이후 발광 조절을 유도하는 후속 반응에 참여할 수 있다.
- [8] 발광표시자 분자(luminescent indicator molecules)를 검출하는 방법에는 광발광(photoluminescence), 화학발광(chemiluminescence), 및 전기화학발광(electrochemiluminescence, ECL)이 있다.
- [9] 다양한 광검출 시스템 중 전기화학발광(electrochemiluminescence, ECL) 시스템은 부피가 크고 비싼 광원을 요하지 않기 때문에 저가의 소형 진단시스템 구축이 가능하며, 다른 간섭물의 배경신호에 의해 신호간섭을 최소화할 수 있다.
- [10] 보다 상세하게, 전기화학발광(electrochemiluminescence, ECL)은 약 1960년에 발견된 전기적인 빛 발생현상으로, 이러한 현상은 i) 전압 인가를 통해 특정 발광 물질의 산화 반응을 유도하며, ii) 그 후 생성된 중간 반응물질이 2차적인 화학반응을 통해 들뜬 상태의 최종 산물로 변화한 뒤, iii) 그 들뜬 상태가 기저 상태로 전환되면서 빛을 발생시키는 현상이다. 이러한 ECL은 하이-엔드(high-end) 급 의료면역진단기기에 검출법으로서 사용되고 있다.
- [11] 활용의 형태로서, 전기화학발광(electrochemiluminescence, ECL)에 기반한 면역진단기기는 Roche 社の Elecsys 방법을 이용하는 COBAS® 진단기기와 Mesoscale Discovery ECL Systems 시리즈가 유일하며, 전세계 하이엔드(high-end) 급 면역진단기기 시장을 독식하고 있는 상황이다. 이들 방법은 발광체인 루테튬 화합물[Ru(bpy)₃²⁺]과 공반응물인 트리프로필아민(tripropylamine, TPA)을 사용하여 ECL을 발생시키는데, 문제는 공반응물인 트리프로필아민이 소수성(hydrophobic)을 띄고 있어, 백금 및 금 전극 조건에서 발광 효율이 좋지 않은 단점을 지니고 있다. 나아가 지난 60 년간의 전기화학발광 역사상 아직 트리프로필아민 보다 우수한 발광 효율을 보이는 공반응물이 부재한 상태이다.
- [12] 상세하게, 트리프로필아민(Tripropylamine, TPrA)은 유기성 매체 뿐 아니라 수성 매체 및 생리적 pH 7.4에서도 효율적인 전기화학발광(ECL)을 허용하기 때문에 공반응물로서 일반적으로 사용되고 있다. 그러나 TPrA는 휘발독성을 지니고 있고, 높은 전기화학발광(ECL) 신호를 얻기 위해 고농도(일반적으로 최대 100 mM)로 사용해야 한다는 단점이 있다. 또한, TPrA는 전기 화학적 산화 속도가 느려 전기화학발광(ECL) 효율을 제한하고, 염기성을 띄므로, 용액을 제조하기 위해서는 고농도의 완충 용액(buffer solution)이 필요하다는 번거로움이 있다. 더불어, 동일 검출 신호 간의 편차가 비교적 크고, 공기 중 이산화탄소와 화학반응을 하는 단점을 지니고 있다.

- [13] 또한 루테늄 피리딘[Ru(bpy)₃²⁺] 및 트리프로필아민(TPrA)의 전기화학발광(ECL) 효율은 전극 재료(electrode materials)에 의존적이다. 전기화학발광이 발생하는 전위 영역에서 백금(Pt) 전극 및 금(Au) 전극은 양극 산화물 층으로 덮이게 되며, 이는 트리프로필아민의 직접 산화를 억제하는 것으로 나타났고 전기화학발광 강도는 더 낮게 산출된다. 반면에 연마된 유리질탄소(GC) 전극은 트리프로필아민의 전기화학적 산화 속도가 상대적으로 빠르며, 이에 따라 전극표면에서 산화되는 트리프로필아민 양이 많아져, 발광 강도가 훨씬 더 높다.
- [14] 이러한 배경 하에서, 본 발명자들은 전기화학발광(ECL) 시스템의 발광 강도와 검출 재현성을 향상시킬 수 있는 새로운 공반응물(new electrochemiluminescent co-reactant)을 개발하고자 하였다.

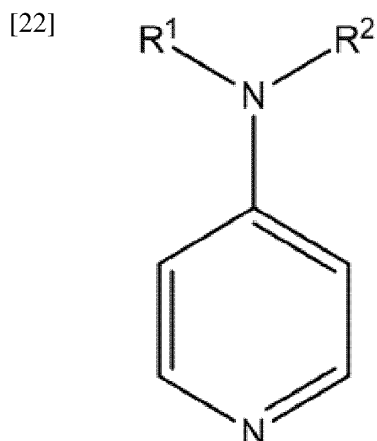
발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [15] 본 발명자들은 혈당, 콜레스테롤 센서, 분자 진단, 혹은 면역 분석법을 통한 항체 검출 등에 널리 적용 가능한 전기화학발광(electrochemiluminescence, ECL)과 관련하여, 공반응물로서 주로 사용되어 오고 있는 기존의 트리프로필아민을 대신하여 반응이 빠르고, 전극 물질에 영향을 덜 받으며, 발광 효율이 우수한 신규한 공반응물을 개발하고자 하던 중, 화학식 I로 표시되는 피리딘 유도체의 경우 루테늄 피리딘을 표지로 한 전기화학발광 시스템에서 발광 강도가 우수하다는 것을 알게 되어 본 발명을 완성하기에 이르렀다.
- [16] 따라서, 본 발명의 목적은 화학식 I로 표시되는 화합물, 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염을 포함하는 전기화학발광(ECL) 공반응물(co-reactant)을 제공하는 것이다.
- [17] 또한, 본 발명의 다른 목적은 상기 공반응물; 및 전기화학발광라벨을 여기(excitation)시키는 전기화학발광 시스템을 제공하는 것이다.
- [18] 또한, 본 발명의 다른 목적은 상기 전기화학발광 시스템을 이용한 검출방법을 제공하는 것이다.
- [19] 또한, 본 발명의 또 다른 목적은 상기 공반응물을 포함하는 전기화학발광 면역분석 또는 분자진단을 위한 키트를 제공하는 것이다.

과제 해결 수단

- [20] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 하기 화학식 I로 표시되는 화합물, 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염을 포함하는 전기화학발광(ECL) 공반응물(co-reactant)을 제공한다.
- [21] [화학식 1]



- [23] 상기 화학식 I에서, 상기 R¹ 또는 R²는 각각 동일하거나 다를 수 있으며, 수소 원자; 할로젠 원자; C₁~C₆ 직쇄 또는 분쇄 또는 고리형 알킬기; C₁~C₆ 알콕시기; 및 C₁~C₆ 할로알킬기로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나를 나타낸다.
- [24] 또한, 본 발명은 상기 화학식 I로 표시되는 화합물, 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염을 포함하는 전기화학발광(ECL) 공반응물 및 전기화학발광 라벨을 포함하는 전해질 용액으로 채워진 전기화학 셀(electrochemical cell); 및 상기 전기화학 셀과 연결된 광검출기(photodetector);를 포함하는 전기화학발광 시스템을 제공한다.
- [25] 또한, 본 발명은 (a) 상기 화학식 I로 표시되는 화합물, 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염을 포함하는 전기화학발광(ECL) 공반응물과 전기화학발광 라벨을 포함하는 전기화학발광 시스템에 시료를 넣고 반응시키는 단계; 및 (b) 상기 (a) 단계의 반응 시료를 전기화학발광 기반 검출기기로 입력전위 (또는 전압)에 따른 전기화학발광 강도(ECL intensity)를 측정하고 광학 신호를 검출하는 단계를 포함하는 전기화학발광 시스템의 검출방법을 제공한다.
- [26] 또한, 본 발명은 상기 공반응물; 및 전기화학발광 라벨;을 포함하는 전기화학발광 면역분석 또는 분자진단을 위한 키트를 제공한다.

발명의 효과

- [27] 본 발명에 따른 피리딘 유도체는 전기화학발광신호로 신속하고 정확하게 검출 가능하도록 하여, 종래의 공반응물인 트리프로필아민(tripropylamine, TPrA)을 대체할 수 있다.
- [28] 상세하게 고체 화합물로서 취급성이 우수하고, 발광을 위한 전위 (또는 전압) 조건 개선이 가능하며, 저농도의 사용으로 발광 효율을 개선할 수 있어 면역분석법 등 여러 가지 생체 분석에 있어서 넓은 응용 잠재성을 제공할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [29] 도 1은 본 발명의 일 구현예로서, 가변전위기(potentiostat) 및 광전증배관(photomultiplier tube)를 포함하는 전기화학발광 시스템의 모식도를 나타낸

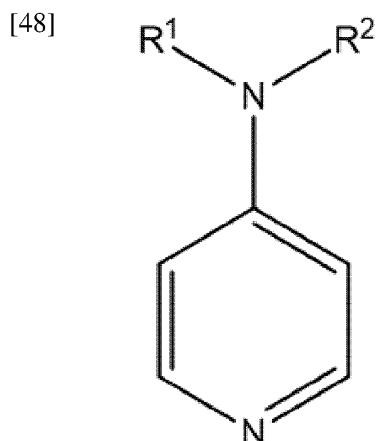
것이다.

- [30] 도 2는 1X PBS (pH 7.4) 내에서 5 mM 공반응물 및 1 μ M [Ru(bpy)₃]²⁺ 루테늄 피리딘을 포함하는 전기화학발광 시스템에서 순환전압전류곡선(cyclic voltammogram, CV)을 측정한 결과이다(Scan rate: 0.1 V/s, WE: GC, CE: Pt, RE: Ag/AgCl).
- [31] 도 3은 1X PBS (pH 7.4) 내에서 5 mM 공반응물 및 1 μ M [Ru(bpy)₃]²⁺ 루테늄 피리딘을 포함하는 전기화학발광 시스템에서 ECL 강도를 측정한 결과이다(Scan rate: 0.1 V/s, WE: GC, CE: Pt, RE: Ag/AgCl).
- [32] 도 4는 1X PBS (pH 7.4)에서 5 mM 공반응물 및 1 μ M [Ru(bpy)₃]²⁺을 포함하는 전기화학발광 시스템에서 순환전압전류곡선(cyclic voltammogram, CV)을 측정한 결과이다(Scan rate: 0.1 V/s, WE: Pt, CE: Pt, RE: Ag/AgCl).
- [33] 도 5는 1X PBS (pH 7.4)에서 5 mM 공반응물 및 1 μ M [Ru(bpy)₃]²⁺을 포함하는 전기화학발광 시스템에서 ECL 강도를 측정한 결과이다(Scan rate: 0.1 V/s, WE: Pt, CE: Pt, RE: Ag/AgCl).
- [34] 도 6은 1X PBS 에서 4-DMAP 및 TPrA(1 ~ 100 mM)의 농도에 따른 1 μ M [Ru(bpy)₃]²⁺ 루테늄 피리딘의 ECL 강도의 의존성을 나타내는 플롯이다(pH 7.4). 전위는 0 V에서 1.6 V 까지 단계적으로 증가시켰다(WE : Pt, CE : Pt, RE : Ag/AgCl).
- [35] 도 7은 1X PBS 에서 4-DMAP 및 TPrA의 농도(1 ~ 100mM)에 따른 10 μ M [Ru(bpy)₃]²⁺ 루테늄 피리딘의 ECL 강도의 의존성을 나타내는 플롯이다(pH 7.4). 전위는 0 V에서 1.6 V 까지 단계적으로 증가시켰다.(WE : Pt, CE : Pt, RE : Ag/AgCl).
- [36] 도 8은 [Ru(bpy)₃]²⁺ 루테늄 피리딘(1 μ M 및 10 μ M)을 사용하여 다양한 pH 조건에서 ECL 강도를 측정한 결과이다(WE : Pt, CE : Pt, RE : Ag/AgCl).
- [37] 도 9는 아세토니트릴(acetonitrile, ACN) 용액에서 4-DMAP 및 TPrA를 공반응물로 사용하되, 작업전극으로 유리질탄소(A), 백금(B) 및 금(C)을 사용한 경우의 전기화학발광 강도를 비교하여 나타낸 그래프이다(CE : Pt, RE : Ag/AgCl).
- [38] 도 10은 아세토니트릴 (acetonitrile, ACN) 용액에서 4-DMAP을 공반응물로 사용한 상황일때, 작업전극으로 유리질탄소로 사용한 경우의 선형주사전위곡선 및 전기화학발광 강도를 나타내는 그래프이다(CE: Pt, RE: Ag/Ag⁺ (3 M AgNO₃), scan rate: 0.1 V/s).
- [39] 도 11은 7 mM 4-DMAP과 7 mM 트리프로필아민을 공반응물로 각각 사용하였을 때, Ru(bpy)₃²⁺ 발광체의 농도를 변화에 따라 발생하는 전기화학발광 신호의 차이를 검정곡선(calibration curve) 형태로 얻은 결과이다.
- [40] 도 12는 4-DMAP 또는 트리프로필아민을 각각 공반응물로 사용하여, 백신을 접종한 10명의 타액 샘플에 존재하는 “중증급성호흡기증후군 (SARS-CoV-2) 중화항체 (anti-SARS-CoV-2)”에 대한 전기화학발광 면역진단을 수행한

결과이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [41] 전기화학발광은 전극에서 생성된 화합물이 들뜬 상태에서 빛을 형성하기 위한 고에너지로 전자 이동 반응하면서 나타나는 발광 과정이다. 전기화학발광에 사용되는 발광 라벨 시약은 전이금속 착화합물, 발광성 유기 반도체, 양자점 물질, 페로브스카이트 나노입자, 금속나노입자 또는 탄소 나노입자가 있다. 이러한 유기 및 무기 발광 라벨들을 사용하여 현재까지 생체분석에 폭넓게 응용이 되고 있다.
- [42] 전기화학발광의 기본 원리인 산화 반응은 반응 과정에서 발광 기질 및 조성물이 전극의 표면에서 전자(electrons)를 잃는 것이다. 전자 공여체(electron donor)는 여기 상태(excited state)로 발광 기질을 환원하는 강한 환원제(reducing agent)가 되기 위해 수소이온(H^+)을 잃고, 그 후 상기 발광 기질은 기저상태(ground state)로 돌아가기 위해 광자(photons)를 방출한다. 이 과정은 전극의 표면에서 반복적으로 수행되고, 그리고 광자는 일반적으로 기질 농도를 일정하게 유지하기 위해 계속적으로 방출된다.
- [43] 일례로서, 루테튬 피리딘(ruthenium pyridine) 및 트리프로필아민(tripropylamine)의 전기화학발광 시스템이 있다. 전기화학발광 반응은 전극(electrode)의 표면에서 전기화학(electrochemistry)에 의해 유인되는 특이적 화학발광 반응이다. 항원-항체(antigen-antibody) 복합체 및 루테튬 피리딘의 접합체(conjugate)는 트리프로필아민의 존재 하에 전기화학에 의해 여기(excited)되고, 산화환원반응(redox reaction)이 광자(photons)를 방출하기 위해 발생하고, 이는 광전증폭관(photomultiplier tube)에 의해 감지될 수 있다. 이 과정은 많은 광자를 생산하기 위해 반복적으로 수행되고, 이는 광학 신호(optical signal)를 증폭한다. 일반적으로 전기화학발광 분석에 사용되는 라벨들(labels)은 표지된 항체 또는 항원을 생산하기 위한, 다른 화학 구조를 가진 항체 또는 항원 분자에 결합할 수 있다.
- [44] 현재 사용 가능한 전기화학발광법은 주로 공반응물(co-reactant)로서 트리프로필아민(tripropylamine, TPrA)을 사용한다. TPrA의 단점은 액상으로 취급이 어려우며, 반응이 느리고, 높은 농도를 필요로 하며, 전극 물질에 의해 크게 영향을 받으며, 발광 효율이 제한되고, 독성 및 불안정성의 한계가 있다.
- [45] 본 발명자들은 고체화합물 4-디메틸아미노피리딘(4-Dimethylaminopyridine, 4-DMAP)을 전기화학발광의 공반응물로 사용 시 발광 반응에 매우 빠르게 관여하며, 발광 효율이 우수하다는 것을 확인하였다.
- [46] 따라서, 본 발명은 하기 화학식 I로 표시되는 화합물, 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염을 포함하는 전기화학발광(ECL) 공반응물(co-reactant)을 제공한다.
- [47] [화학식 I]



- [49] 상기 화학식 I에서, 상기 R¹ 또는 R²는 각각 동일하거나 다를 수 있으며, 수소 원자; 할로젠 원자; C₁~C₆ 직쇄 또는 분쇄 또는 고리형 알킬기; C₁~C₆ 알콕시기; 및 C₁~C₆ 할로알킬기로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나를 나타낸다.
- [50] 상기 화학식 I에서, 상기 R¹ 또는 R²는 각각 동일하거나 다를 수 있으며, 수소 원자; 할로젠 원자; C₁~C₄ 직쇄 또는 분쇄 또는 고리형 알킬기; C₁~C₄ 알콕시기; 및 C₁~C₄ 할로알킬기로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나를 나타낸다.
- [51] 바람직하게, 상기 R¹ 또는 R²는 각각 동일하거나 다를 수 있으며, C₁~C₄ 직쇄 또는 분쇄형 알킬기; 또는 C₁~C₄ 할로알킬기일 수 있다.
- [52] 더욱 바람직하게, 상기 화학식 I는 4-디메틸아미노피리딘(4-Dimethylaminopyridine)일 수 있다.
- [53]
- [54] 또한, 본 발명은 상기 공반응물 및 전기화학발광 라벨을 포함하는 전해질 용액으로 채워진 전기화학 셀(electrochemical cell); 및 상기 전기화학 셀과 연결된 광검출기(photodetector)를 포함하는 전기화학발광 시스템을 제공한다.
- [55] 상기 공반응물은 앞선 언급한 화학식 1의 구조를 갖는 화합물이다.
- [56] 상기 전기화학발광 라벨은 전이금속 착화합물, 발광성 유기 반도체, 양자점 물질, 페로브스카이트 나노입자, 금속나노입자 및 탄소 나노입자로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상일 수 있으나, 반드시 이에 제한되는 것은 아니다.
- [57] 상세하게, 상기 전이금속 화합물은 루테튬(ruthenium, Ru), 이리듐(iridium, Ir), 레늄(rhenium, Re), 백금(platinum, Pt), 오스뮴(osmium, Os), 구리(copper, Cu), 및 철(iron, Fe)로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상을 사용할 수 있다.
- [58] 상세하게, 상기 이온성 전이금속 착화합물은, 트리스(2,2'-비피리딘)루테튬(II)비스(헥사플루오로포스페이트)[tris(2,2'-bipyridine)ruthenium(II)bis(hexafluorophosphate), Ru(bpy)₃(PF₆)₂], 트리스(4,7-디페닐-1,10-페난트롤린)루테튬(II)비스(헥사플루오로포스페이트)[tris(4,7-diphenyl-1,10-phenanthroline)ruthenium(II) bis(hexafluorophosphate), Ru(dp-phen)₃(PF₆)₂],

비스(2-페닐피리딘)(2,2'-디피리딘)이리듐(III)(헥사플루오로포스페이트)[bis(2-phenylpyridine)(2,2'-dipyridine)iridium(III) (hexafluorophosphate), Ir(ppy)₂(bpy)PF₆],
 비스(2-페닐피리딘)(4,4'-디-tert-부틸-2,2'-디피리딜)이리듐(III)(헥사플루오로포스페이트)[bis(2-phenylpyridine)(4,4'-di-tert-butyl-2,2'-dipyridyl)iridium(III) (hexafluorophosphate), Ir(dtbbpy)(ppy)₂PF₆],
 4'-디-tert-부틸-2,2'-디피리딜-비스[2-(2',4'-디플루오로페닐)피리딘]이리듐(III)(헥사플루오로포스페이트){4'-di-tert-butyl-2,2'-dipyridyl-bis[2-(2',4'-difluorophenyl)pyridine]iridium(III)(hexafluorophosphate), Ir(ppy-F₂)₂(dtbbpy)PF₆}, 이리듐
 비스(5-(트리플루오로메틸페닐)-2-(4-트리플로로메틸)페닐)피리딘)
 피콜리네이트 {Iridium bis[5-(trifluoromethyl)-2-(4-(trifluoromethyl)phenyl)pyridine]picolinate, Ir(ppy-(CF₃)₂)₂(pico)}, 이리듐(III){Tris[2-(p-tolyl)pyridine]iridium(III), Ir(mppy)₃},
 1,10-[페난트롤린]레늄(I)(헥사플루오로포스페이트)[1,10-[phenanthroline]rhenium (I)(hexafluorophosphate), Re(phen)PF₆], 백금(II)코프로 포르피린[platinum(II) coproporphyrin, PtCP] 및
 트리스(2,2'-비피리딘)오스뮴(II)(헥사플루오로포스페이트)[tris(2,2'-bipyridine)osmium(II)(hexafluorophosphate), Os(bpy)₃(PF₆)₂]로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상을 포함하는 것일 수 있으나, 반드시 이에 제한되는 것은 아니다.

- [59] 상세하게, 상기 발광성 유기 반도체는 발광성 단분자 또는 고분자 등의 발광이 가능한 공액형 유기 반도체를 포함하는 것일 수 있다. 상세하게, 루미놀(luminol)과 루브린(rubrene) 및 그의 유도체들, 안트라센(anthracene)과 유도체들, 파이렌(pyrene)과 그 유도체들, 디시클로옥시페닐 치환된 폴리(1,4-페닐렌비닐렌)[decycloxyphenyl substituted poly(1,4-phenylene vinylene), super yellow], 폴리(2-메톡시-5-(2-에틸헥실옥시)-1,4-페닐렌비닐렌)[poly(2-methoxy-5-(2-ethylhexyloxy)-1,4-phenylenevinylene), MEH-PPV], 폴리(2-메톡시-5-(3',7'-디메틸옥틸옥시)-1,4-페닐렌비닐렌)[poly(2-methoxy-5-(3',7'-dimethyloctyloxy)-1,4-phenylenevinylene), MEMO-PPV], 및 폴리(9,9-디옥틸플루오렌-알트-벤조티아디아졸)[poly(9,9-dioctylfluorene-alt-benzothiadiazole), F8BT]로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상을 포함하는 것일 수 있으나, 반드시 이에 제한되는 것은 아니다.
- [60] 상기 양자점 물질은 13-15족 또는 12-15족 원소의 무기 화합물을 포함하는 것일 수 있다. 상세하게, 상기 무기 화합물을 포함하는 양자점 물질은 셀렌화카드뮴(CdSe), 황화카드뮴(CdS), 셀렌화아연(ZnSe), 인화인듐(InP), 황화납(PbS) 및 셀렌화납(PbSe)로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상을 포함하는 것일 수 있으나, 반드시 이에 제한되는 것은 아니다.
- [61] 상기 페로브스카이트 나노입자는 할라이드계 페로브스카이트를 포함하는 것일 수 있다. 상세하게, 상기 할라이드계 페로브스카이트는 ABX₃, A₂BX₆ 또는 A₃B₂X₉의 화학식으로 표시되는 것일 수 있다. 이때, 상기 A는 유기 양이온 또는

무기 양이온일 수 있으며, 상기 B는 금속 양이온일 수 있으며, 상기 X는 할라이드 음이온일 수 있다.

- [62] 상기 금속 나노입자는 불연속 에너지 레벨을 나타내는 1 nm 이하의 치수를 갖는 금속 원자 클러스터를 포함하는 것일 수 있다. 상세하게, 금(Au) 나노입자, 은(Ag), 구리(Cu), 또는 은(Ag)-금(Au) 이원금속 나노입자를 포함하는 것일 수 있다.
- [63] 상기 탄소 입자는 그래핀 양자점(GQD) 또는 탄소 양자점(CQD)을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [64] 또한, 상기 전해질 용액은 염(salt) 및 물, 유기용매를 포함하는 액체 전해질; 고분자에 염(salt)이 용해된 고체형 전해질; 고분자, 염(salt) 및 물, 유기용매를 포함하는 겔형 전해질; 또는 블록 공중합체(block copolymer) 및 이온성 액체(ionic liquid)를 포함하는 이온겔(ion gel) 전해질;을 포함할 수 있으나, 반드시 이에 제한되지는 않는다. 상기 염(salt)은 유무기 이온화합물 염으로서, 인산염, 질산염, 염산염, 황산염, 리튬염, 나트륨염, 칼륨염, 칼슘염, 마그네슘염, 암모늄염 등의 군에서 선택된 어느 하나 또는 둘 이상의 혼합물을 포함하는 것일 수 있으나, 반드시 이에 제한되지는 않는다.
- [65] 상세하게, 본 발명의 전기화학발광 시스템에서 사용하는 전해질 용액은 인산염 완충용액(phosphate buffer saline, PBS), 트리스 완충용액(Tris buffer solution), 아세토니트릴(acetonitrile, ACN), 다이클로로메탄(dichloromethane), 에탄올(ethanol), 메탄올(methanol), 테트라하이드로퓨란(tetrahydrofuran, THF), 디메틸설폭시드(dimethylsulfoxide, DMSO), 디메틸포름아마이드(dimethylformamide, DMF), 에틸렌 카보네이트(ethylene carbonate; EC) 및 프로필렌 카보네이트(propylene carbonate; PC)로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 물 혹은 유기용매를 포함하는 용액일 수 있으나, 반드시 이에 제한되지는 않는다.
- [66] 상기 전해질 용액의 pH가 5 내지 12 일 수 있으며, 바람직하게는 7.4 내지 10 이다.
- [67] 도 1은 본 발명에 따른 전기화학발광 측정을 수행하기 위한 전기화학발광 시스템을 도시한 일 구현예로서, 전해질 용액을 포함하는 전기화학 셀(electrochemical cell), 전위가변기(potentiostat) 및 광전증배관(PMT)을 포함한다. 이때, 광전증배관(PMT)은 전위가변기와 연결되어 동시에 구동한다. 따라서 전기화학발광 측정을 위해 전위가변기를 이용하여 전기화학 셀(electrochemical cell)에서의 반응을 유도함으로써 전기화학발광 반응을 야기할 수 있다. 전기화학발광 측정을 위해 전위가변기와 전기화학발광측정 소프트웨어를 실행하여 전기화학발광의 발광강도 등을 측정할 수 있다.
- [68] 상기 전기화학 셀을 구성하는 전극은 작업전극, 기준전극, 작업전극, 상대전극을 포함할 수 있으나, 반드시 이에 제한되지는 않는다.
- [69] 상기 작업전극은 탄소(carbon), 백금(platinum, Pt), 금(gold, Au), 은(silver, Ag),

- 니켈(nickel, Ni), 스테인레스(stainless), 팔라듐(palladium), 주석(tin), 인듐(indium), 및 규소(silicon) 원소로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 전극일 수 있으나, 반드시 이에 제한되지는 않는다.
- [70] 상기 상대전극은 탄소(carbon), 백금(platinum, Pt), 금(gold, Au), 은(silver, Ag), 니켈(nickel, Ni), 스테인레스(stainless), 팔라듐(palladium), 주석(tin), 인듐(indium), 및 규소(silicon) 원소로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 전극일 수 있으나, 반드시 이에 제한되지는 않는다.
- [71] 상기 기준전극은 은(silver, Ag) 기반의 은 유사 기준전극(Ag pseudo-reference), Ag/AgCl 전극, Ag/AgNO₃ 전극, 수은(mercury, Hg) 카로멜 전극, Hg/HgO 전극, 및 Hg₂SO₄ 전극으로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상일 수 있으나, 반드시 이에 제한되지는 않는다.
- [72] 또한, 본 발명은 (a) 상기 전기화학발광 시스템 내 전기화학 셀에 시료를 포함하는 전해질 용액을 넣고 반응시키는 단계; 및 (b) 상기 (a) 단계의 반응 시료를 전기화학발광 기반 검출기로 입력전압에 따른 전기화학발광 강도(ECL intensity)를 측정하고 광학 신호를 검출하는 단계를 포함하는 전기화학발광 시스템의 검출방법을 제공한다.
- [73] 상기 (a) 단계는 공반응물 및 전기화학발광 라벨인 루테튬 피리딘(ruthenium pyridine)을 포함하는 전해질 용액에 시료를 넣고 반응시키는 단계로서, 상기 시료는 혈청, 소변, 또는 조직액일 수 있으나 반드시 이에 제한되지는 않는다.
- [74] 상기 (b) 단계는 상기 (a) 단계의 반응 시료를 전기화학발광 기반 광 검출기로 입력전위(혹은 전압)에 따른 전기화학발광 강도(ECL intensity)를 측정하는 단계이다. 이러한 발광을 측정하기 위한 장비인 광검출기에는 여러 종류가 있다. 일례로서, 상기 광검출기는 규소, 게르마늄, 게르마늄-인화물, 인듐-갈륨-비소화물, 남-황화물 기반의 수광다이오드(photodiode); 광전증배관(photomultiplier tube, PMT); 전하결합소자(charge coupled device, CCD); 전자증강 전하결합소자(electron-multiplying charge coupled device, EMCCD); 및 과학적 상보형 금속 산화물 반도체(scientific complementary metal-oxide-semiconductor, sCMOS)로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상일 수 있으나, 반드시 이에 제한되지는 않는다.
- [75] 또한, 본 발명에서는 전기화학방법을 통해 전기화학발광 면역분석 검출방법을 제공할 수 있다. 따라서, 본 발명은 상기 공반응물; 및 전기화학발광 라벨을 포함하는 전기화학발광 면역분석 또는 분자진단을 위한 키트를 제공한다.
- [76] 상세하게, 본 발명의 전기화학발광 면역분석 또는 분자진단을 위한 키트는 전해질 용액을 포함할 수 있고, 상기 전해질 용액은 인산염 완충용액(phosphate buffer saline, PBS), 트리스 완충용액(Tris buffer solution), 아세토니트릴(acetonitrile, ACN), 다이클로로메탄(dichloromethane), 에탄올(ethanol), 메탄올(methanol), 테트라하이드로퓨란(tetrahydrofuran, THF), 디메틸설폭사이드(dimethylsulfoxide, DMSO),

다이메틸포름아마이드(dimethylformamide, DMF), 에틸렌 카보네이트(ethylene carbonate; EC) 및 프로필렌 카보네이트(propylene carbonate; PC)로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 물 혹은 유기용매를 포함하는 용액일 수 있으나, 반드시 이에 제한되지는 않는다.

- [77] 상기 전해질 용액의 pH가 5 내지 12 일 수 있으며, 바람직하게는 7.4 내지 10 이다.
- [78] 또한, 상기 키트는 0 mM 초과 20 mM 이하, 0 mM 초과 15 mM 이하, 0 mM 초과 10 mM 이하 또는 0 mM 초과 7 mM 이하 농도의 4-디메틸아미노피리딘(4-Dimethylaminopyridine)을 포함할 수 있다.
- [79] 본 발명의 일 구현예로서, 항원 또는 항체를 표지하기 위하여, 루테늄 화합물을 포함한 전기화학발광 라벨이 사용되고, 그리고 면역반응 및 ECL 반응에 의한 전기화학발광 면역분석을 수행할 수 있다. 전극의 표면에서 전기화학에 의해 유도되는 특이적 화학발광 반응을 위하여, 항체(Ab)는 전기화학발광 시약인 루테늄 피리딘에 의해 표지되고, 담체(carrier)는 샘플에서 상응하는 항원 또는 항체를 가지고 면역 반응의 특정 방식에 의해 복합체를 형성하는 항원 또는 항체로 코팅된다. 표지가 접합된 복합체는 분리기술에 의해 자유 표지들(free labels)로부터 분리된다. 항원(Ag) 또는 항체(Ab)는 전극에서 루테늄 피리딘의 발광 강도에 따라 정량적 또는 정성적으로 측정될 수 있다. 공반응물인 피리딘 유도체는 전기화학 셀에 유입이 되고 전압은 ECL 반응을 시작하기 위해 인가될 수 있다.
- [80] 본 발명에 따른 전기화학발광 면역분석 또는 분자진단을 위한 키트는 진단기기에 적용 시 항원 및 항체의 양을 매우 절약할 수 있다. 본 발명에 따른 피리딘 유도체와 루테늄 피리딘 간의 전기화학 반응에 따른 ECL 발광 강도는 트리프로필아민을 사용하는 것과 대비하여 20배 이상 우수한 바, 상당히 작은 양의 항원 및 항체를 사용하여도 검출될 수 있고, 따라서 항체의 양은 효율적으로 줄어들 수 있다. 또한 키트 또는 분석기기의 가격은 상대적으로 저렴해 질 수 있다.
- [81] 또한, 본 발명에 따른 전기화학발광 면역분석 또는 분자진단을 위한 키트는 트리프로필아민을 사용하는 것과 대비해 분석물(analyte)에 대한 더 우수한 검출 신호와 우수한 검출 민감도를 획득할 수 있다.
- [82] 상기 언급한 바와 같이, 본 발명에 따른 화학식 I로 표시되는 피리딘 유도체는 전기화학발광라벨인 루테늄 피리딘과 공반응하여 발광 강도를 현저하게 상승시킴으로써 면역분석법 등 체외진단기에 널리 적용될 수 있다.

발명의 실시를 위한 형태

- [83] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시 예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 하기 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

- [84]
- [85] <실험예> 공통실험 및 측정방법
- [86] 실시예의 ECL 검출 장치에서 전기화학발광 측정을 시작하기 전에 셀을 세정액(에탄올 및 물 및 N_2 가스로 건조)으로 세정하였다. 작업전극 표면도 알루미늄($0.05\ \mu m$) 슬러리로 연마하고, 탈이온수(DI)와 에탄올의 혼합물(1 : 1 v/v)로 5 분 안에 초음파 처리하여 헹구고 N_2 가스로 건조하였다.
- [87] 세척 후 전기화학 셀은 전해질 용액으로 채워지고 광전증배관(PMT)에 부착되었다. 그런 다음 작동전극과 기준전극 사이에 전원을 공급하여 전압을 인가하고, 이를 통해 셀의 액체 시료에 제어 신호에 의해 미리 결정된 전류가 충전되고 작동 전극에서 반응이 시작되었다. 작동전극에서 생성된 ECL 빛은 광전증배관(PMT)을 통과하고, 작업전극에 대한 ECL 반응으로부터 ECL 빛은 전기화학 셀(electrochemical cell) 위와 인접에 위치한 광전증배관(PMT)과 같은 광학 검출기로 감지되었다. 또한, 본체는 마쿠시 형식의 그림으로 도시되지 않은 암실 환경으로 완전히 둘러싸여 있고, 이를 통해 광전증배관(PMT)은 외부간섭 없이, 셀에서 생성된 ECL 빛을 받을 수 있다.
- [88] 도 1은 본 발명에 따른 전기화학발광 측정을 수행하기 위한 전기화학발광 시스템을 도시한 일 구현예로서, 전기화학발광 측정을 위해 전위가변기를 이용하여 전기화학 셀(electrochemical cell)에서의 반응을 유도하고, 전위가변기와 전기화학발광측정 소프트웨어를 실행하여 전기화학발광의 발광강도 등을 측정할 수 있다.
- [89] 상세하게, 본 발명자들은 실험을 통해 새로 발견된 공반응물인 4-DMAP의 성능과 영향력 있는 매개 변수를 조사하고 기존의 공반응물인 TPrA 및 DBAE와 성능을 비교하였다. ECL 발광의 측정은 7 mL의 전해질을 셀에 공급하고 전극에 전위를 가하여 수행되었고 ECL 광의 강도는 광전증배관(PMT)을 사용하여 기록되었다.
- [90] 아울러, 전위 제어를 통한 ECL 검출 방법은 $0.1\ V/sec$ 의 속도로 0 V에서 1.6 V 까지 스윕핑하여 수행되었다. 위의 전압 값은 작업전극(유리질 탄소 전극, 백금 전극 또는 금 전극)과 기준전극($Ag/AgCl$ 또는 Ag/Ag^+) 사이에 할당되었다. 다음은 모든 중요한 매개 변수를 나열한 것이다.
- [91]
- [92] <실시예 1> 다양한 전기화학발광 공반응물의 전기화학적 거동 확인
- [93] 전기화학발광 라벨인 $Ru(bpy)_3^{2+}$, 전기화학발광 공반응물인 트리프로필아민(tripropylamine, TPrA), 디부틸 에탄올아민(dimethyl ethanolamine, DBAE), 4-디메틸아미노피리딘(4-Dimethylaminopyridine, 4-DMAP)과 용매인 인산염 완충용액(PBS), 아세트니트릴(ACN)를 각각 준비하였다. 이들을 혼합하여 각각의 샘플을 제조하고, 이들 샘플에 대해 순환전압전류곡선(cyclic voltammogram, CV) 및 ECL을 측정하고 기록하였다. 이때 전위가변기(potentiostat)를 사용하여 실험을 수행하였다. 전압 스캔은 $0.1\ V/s$ 의

속도로 0.0 V에서 시작하였다. 이때, 작업전극(Working electrode)으로 유리질탄소 전극, 백금 전극 및 은 전극을 사용하였으며, 기준전극(Reference electrode)으로서 Ag/AgCl 또는 Ag/AgNO₃를 사용하였다. 상한 전압은 1.6 V이었고, 낮은 전압 한계는 0 V 이었으며, 최종 전압은 0 V 이었다. 다양한 전기화학발광 공반응물의 전기화학적 거동을 측정하여 도 2 내지 도 5에 나타냈다.

- [94] 도 2 및 도 3은 PBS 내에서 0 V에서 1.6 V 사이의 주기적 전위 스캐닝 동안 유리질탄소 재질을 작업전극으로 사용한 Ru(bpy)₃²⁺/TPrA 및 Ru(bpy)₃²⁺/4-DMAP의 전기화학발광 시스템에 대해 순환전압전류곡선(cyclic voltammogram, CV) 및 ECL 강도를 측정하여 각각 나타낸 결과이다. 도 2 및 도 3의 결과, Ru(bpy)₃²⁺/4-DMAP의 ECL 강도는 Ru(bpy)₃²⁺/TPrA 보다 높음을 확인할 수 있었다.
- [95] 한편, 도 4 및 도 5는 PBS 내에서 0 V에서 1.6 V 사이의 주기적 전위 스캐닝 동안 백금 재질을 작업전극으로 사용한 Ru(bpy)₃²⁺/TPrA 및 Ru(bpy)₃²⁺/4-DMAP의 전기화학발광 시스템에 대해 순환전압전류곡선(cyclic voltammogram, CV) 및 ECL 강도를 측정하여 각각 나타낸 결과이다.
- [96] 도 4 및 도 5의 결과, Ru(bpy)₃²⁺/4-DMAP의 양극 전류는 Ru(bpy)₃²⁺/TPrA의 양극 전류보다 높음을 확인할 수 있었다. 또한, Ru(bpy)₃²⁺/4-DMAP의 ECL 강도는 Ru(bpy)₃²⁺/TPrA의 ECL 강도보다 훨씬 높았다.
- [97] 이러한 결과를 통해, 백금 전극이 인산염 완충 식염수(PBS) 내에서 4-DMAP 산화에 가장 유리한 작업전극임을 확인할 수 있었으며, 유리질탄소 전극이 그 뒤를 따르는 것으로 확인할 수 있었다.
- [98]
- [99] <실시예 2> 전기화학발광 공반응물의 농도에 따른 ECL 특성
- [100] PBS 내 샘플을 Ru(bpy)₃²⁺ 농도를 일정하게 유지하면서 전기화학발광 공반응물인 4-DMAP의 농도로 다르게 하여 샘플 용액을 준비하였다. 전압 스캔은 실시예 1에 기술된 것과 동일한 절차를 사용하여 수행하였고, 전기화학발광 강도는 전기화학발광 공반응물의 각 농도에 대해 3 회 판독하여 측정하였다. 측정 결과를 도 6에 나타냈다.
- [101] 도 6은 백금 전극을 작업전극으로 사용하되, 4-DMAP 농도에 따른 ECL 강도를 측정한 결과이다. ECL 강도는 0 초과 내지 5mM 이하의 농도 범위에서 4-DMAP를 사용 시 극적으로 증가함을 확인할 수 있었다. 그러나 4-DMAP 농도가 5 mM 보다 높으면 ECL 강도가 감소하였는바 최적의 농도가 5 mM 이하임을 확인할 수 있었다. 한편, TPrA의 경우 TPrA 농도가 증가하면 ECL 강도가 계속 증가함을 확인할 수 있었다.
- [102] 이러한 결과를 통해, 전기화학 공반응물질로서 4-DMAP을 사용하는 경우 0 mM 초과 5 mM 이하의 농도 범위로 사용하는 것이 가장 우수한 발광 강도를 갖음을 확인할 수 있었다.

[103]

[104] <실시예 3> 다양한 Ru(bpy)₃²⁺ 농도에 따른 전기화학발광 공반응물의 ECL 특성

[105] 다양한 농도를 갖는 Ru(bpy)₃²⁺를 포함하는 PBS의 샘플을 준비하였다. 전압 스캔은 실시예 1에 기술된 것과 동일한 절차를 사용하였다. Ru(bpy)₃²⁺ 각 농도에 따른 전기화학발광 강도를 측정하여 그 결과를 도 7에 나타냈다. 도 7의 결과, 작업전극으로 백금(Pt) 전극을 사용하고 10 μM Ru(bpy)₃²⁺ 및 7 mM 4-DMAP 농도로 사용하여 ECL 측정 시 강도의 가장 높은 값을 보여 주었고 4-DMAP 농도가 7 mM을 초과하면 감소함을 확인할 수 있었다.

[106] 종합하여 보건데, 10 μM Ru(bpy)₃²⁺ 포함하는 PBS 용액에서 공반응물인 4-DMAP의 사용 농도는 7 mM 내외가 가장 적절함을 알 수 있었다.

[107]

[108] <실시예 4> pH에 따른 전기화학발광 공반응물의 ECL 특성

[109] 다양한 pH 값에서 전기화학발광 공반응물의 ECL 특성을 확인하고자 하였다. pH가 5에서 12로 변화된 것을 제외하고 일정한 농도의 Ru(bpy)₃²⁺를 포함하는 PBS 샘플에 대해 전기화학발광 공반응물에 따른 전기화학발광을 측정하였다. 전압 실시예 1에 기술된 것과 동일한 절차를 사용하여 스캔을 수행하였다. 상이한 pH 값에 대해 전기화학발광 강도를 3회 측정하였고, 그 결과를 도 8에 나타냈다.

[110] 도 8은 서로 다른 pH 값에서 4-DMAP 성능을 조사한 결과로서, 1 μM의 Ru(bpy)₃²⁺와 5 mM의 4-DMAP 사용 시 pH 7.4 내지 10 범위가 4-DMAP 성능을 위한 가장 최적의 pH 범위임을 확인할 수 있었다. 유사하게, 10 μM Ru(bpy)₃²⁺ 및 7 mM 4-DMAP를 사용 시 pH 값이 7.4 미만이고 10 이상일 때 ECL 강도가 열등함을 관찰할 수 있었다. 따라서 최적의 pH가 7.4 내지 10임을 확인할 수 있었다.

[111]

[112] <실시예 5> 다양한 용매 하에서 전기화학발광 공반응물의 ECL 특성

[113] PBS 용액 대신 아세토니트릴(ACN) 용액을 사용하여 시료 샘플을 준비하였다.

[114] 도 9는 PBS 대신 아세토니트릴(ACN) 용액을 사용하여 전기화학발광 강도를 측정한 결과이다. 유리질탄소 전극(도 9A), 백금 전극(도 9B) 및 금 전극(도 9C)을 각각 작업전극으로 사용하였을 때, 비교적 낮은 농도인 3 mM, 5 mM, 7 mM에서의 Ru(bpy)₃²⁺/4-DMAP의 ECL 강도가 Ru(bpy)₃²⁺/TPrA보다 높음을 확인할 수 있었다.

[115]

[116] <실시예 6> 다양한 발광 물질에 따른 전기화학발광 공반응물의 ECL 특성

[117] 전기화학발광 라벨로써 이리듐 기반의 전이금속 착화합물 이리듐 비스(5-(트리플루오로메틸페닐)-2-(4-트리플로로메틸)페닐)피리딘) 피콜리네이트 {Iridium bis[5-(trifluoromethyl)-2-(4-(trifluoromethyl)phenyl)pyridine] picolinate, (Ir(ppy-(CF₃)₂)(pico))},
비스(2-페닐피리딘)(4,4'-디-tert-부틸-2,2'-디피리딜)이리듐(III)(헥사플루오로포

스페이트) [bis(2-phenylpyridine)(4,4'-di-tert-butyl-2,2'-dipyridyl)iridium(III) (hexafluorophosphate), Ir(dtbbpy)(ppy)₂PF₆], 트리스 [2-(p-토릴)피리딘] 이리듐(III) {Tris[2-(p-tolyl)pyridine]iridium(III), Ir(mppy)₃} 과 4-디메틸아미노피리딘(4-Dimethylaminopyridine, 4-DMAP)과 지지전해질인 테트라부틸암모늄 헥사플로로포스페이트 (tetrabutylammonium hexafluorophosphate, TBAPF₆) 를 아세토니트릴에 혼합하여 각각의 샘플을 제조하였다. 이들 샘플은 산소 및 수분에 의해 발광 특성이 매우 민감하게 영향을 받으므로 측정은 질소환경의 글러브박스 하에서 진행되었다.

- [118] 이들 샘플에 대해 선형주사전위곡선(linear sweep voltammogram, LSV) 및 ECL을 측정하고 기록하였다. 주사속도는 0.1V/s의 속도로 0.0 V에서 시작하였으며, 2.0V 내의 전압범위에서 주사하였다. 이때 작업전극으로는 유리질탄소 전극을 사용하였으며, 기준전극으로써 Ag/Ag⁺(3M AgNO₃), 보조전극으로써 Pt를 사용하였으며, 그 결과는 도 10에 나타내었다.
- [119] 도 10은 아세토니트릴(ACN) 용액에서 4-DMAP을 공반응물 및 이리듐계 전이금속 착화합물을 사용하고, 작업전극으로 유리질탄소를 사용한 경우의 선형주사전위곡선 및 전기화학발광 강도를 나타낸 결과이다. 도 10의 결과, 이리듐계 전이금속 착화합물을 전기화학발광 라벨로 사용한 경우에도 ECL 강도가 높게 나타나고, 양극 전류도 높음을 확인하였다.
- [120] 이러한 결과를 통해, 전기화학발광 라벨은 다양한 종류의 전이금속 착화합물을 이용할 수 있는 것을 알 수 있다.
- [121]
- [122] <실시예 7> 전기화학발광 공반응물을 이용한 Ru(bpy)₃²⁺의 농도에 따른 ECL 검출 곡선 비교
- [123] 7 mM 농도의 공반응물을 포함하는 PBS 용액을 각각 준비하고 Ru(bpy)₃²⁺의 농도를 변화시켰을 때 발생하는 전기화학발광 신호를 관찰하였다. 전압 스캔은 실시예 1에 기술된 것과 동일한 절차를 사용하여 취하였다. 전기화학발광 강도는 각각의 조건에서 3 회 판독하여 측정하였다.
- [124] 도 11은 4-DMAP과 트리프로필아민을 공반응물로 사용하는 각각의 용액에서 Ru(bpy)₃²⁺의 농도에 따라 발생하는 전기화학발광 강도이다. 트리프로필아민 공반응물의 경우(오른쪽, 검은색 그래프), 0-10 nM 농도 범위의 Ru(bpy)₃²⁺에 대해 전기화학발광 검출 신호를 얻을 수 있으며, Ru(bpy)₃²⁺의 검출한계(Limit of Detection, LOD)는 0.63 nM(630 pM)로 나타났다. 반면 4-DMAP의 경우, 0-0.1 nM 농도의 Ru(bpy)₃²⁺에 대해 높은 전기화학발광 신호를 보이며, 검출한계는 0.0415 nM (41.5 pM)로써 트리프로필아민 대비 15배 이상 우수한 검출민감도를 나타낸다.
- [125] 이러한 결과를 통해, 트리프로필아민 대비 더 낮은 농도의 발광체에 대해 전기화학발광 신호를 제공할 수 있으며, 이는 통해 면역진단 또는 분자진단에 사용되었을 때 더 우수한 검출민감도를 제공할 수 있다는 것을 알 수 있다.

[126]

[127] <실시예 8> 전기화학발광 공반응물을 이용한 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 의 농도에 따른 ECL 검출 곡선 비교

[128]

4-DMAP과 트리프로필아민을 공반응물로 각각 사용하여 사람의 타액에 존재하는 “중증급성호흡기증후군 (SARS-CoV-2) 중화 항체 (anti-SARS-CoV-2)”에 대한 전기화학발광 면역진단을 수행하였다. 백신을 접종한 열명의 사람 타액 표본을 수집하고 총 3단계의 전기화학 면역분석을 실시하였다. 단계 1) 원심분리된 사람 타액(human saliva)의 30 μL 상등액을, 미리 준비한 SARS-CoV-2 항원이 붙어있는 자기구슬(magnetic bead, 2 μm 직경) 시약(포획시약)과 섞는다. 이 단계에서 사람 타액에 존재하는 중화 항체는 자기구슬에 미리 고정된 항원과 샌드위치 면역접합체를 형성한다. ii) 이 혼합액을 30 분 배양(incubation, 37 $^{\circ}\text{C}$) 후, 자기비드만을 채취하여 PBS로 2회 세척한다. 그런 다음 이들을 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 라벨이 부착된 5 $\mu\text{g/mL}$ human IgG 항체 시약 30 μL (ECL 신호 발생 시약)와 혼합한다. iii) 마지막으로 위 ii) 의 혼합액에서 자기구슬만을 수집하여 금 인쇄전극 위에 포집한다. 전극 표면의 자기구슬에 7 mM DMAP 혹은 7 mM의 트리프로필아민 완충 용액(PBS)을 떨어뜨리고 각각에 전압을 인가하여 전기화학발광 신호를 측정한다.

[129]

도 12는 백신을 접종한 10명의 타액 샘플을 이용한 anti-SARS-CoV-2 중화항체에 대한 전기화학 면역진단에서, 4-DMAP을 공반응물로 사용했을 때와 트리프로필아민을 공반응물로 사용했을 때 측정되는 전기화학발광신호의 세기를 나타낸다. 그 결과 동일한 10개의 타액 시료들에 대해 4-DMAP을 공반응물로 사용했을 때가, 트리프로필아민 대비 15배 이상 우수한 검출 신호를 나타남을 알 수 있었다.

[130]

이를 통해, 전기화학발광 면역진단 혹은 분자진단에서 4-DMAP을 공반응물로 사용했을 때 더 우수한 검출 민감도를 얻을 수 있음을 알 수 있다.

[131]

따라서, 본 발명에 따른 화학식 I로 표시되는 피리딘 유도체와 루테튬 피리딘 간의 발광 강도는 트리프로필아민을 사용함으로써 얻어지는 것의 최소 20배 이상으로 발광 감도가 우수함을 확인할 수 있었다. 따라서, 종래의 공반응물인 트리프로필아민을 대체할 수 있으며, 발광을 위한 전압 조절이 가능하여 발광 효율을 개선할 수 있는바, 면역분석법 등 여러 가지 생체 분석에 있어서 넓은 응용 잠재성을 제공할 수 있다.

[132]

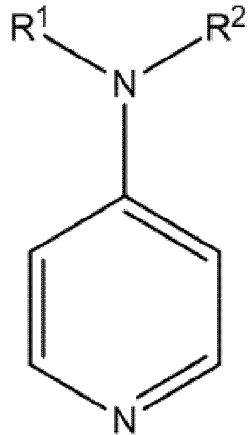
[133]

이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

청구범위

[청구항 1] 하기 화학식 I로 표시되는 화합물, 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염을 포함하는 전기화학발광용 공반응물(co-reactant):

[화학식 1]



상기 화학식 I에서, 상기 R¹ 또는 R²는 각각 동일하거나 다를 수 있으며, 수소 원자; 할로겐 원자; C₁~C₆ 직쇄 또는 분쇄 또는 고리형 알킬기; C₁~C₆ 알콕시기; 및 C₁~C₆ 할로알킬기로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나를 나타낸다.

[청구항 2] 제 1 항에 있어서,
상기 R¹ 또는 R²는 각각 동일하거나 다를 수 있으며, C₁~C₄ 직쇄 또는 분쇄형 알킬기; 또는 C₁~C₄ 할로알킬기인 것을 특징으로 하는 전기화학발광용 공반응물.

[청구항 3] 제 1 항에 있어서,
상기 화학식 I는 4-디메틸아미노피리딘(4-Dimethylaminopyridine, 4-DMAP)인 것을 특징으로 하는 전기화학발광용 공반응물.

[청구항 4] 제 1 항 내지 제 3 항 중에서 선택된 어느 한 항의 공반응물과 전기화학발광 라벨을 포함하는 전해질 용액으로 채워진 전기화학 셀(electrochemical cell); 및 상기 전기화학 셀과 연결된 광검출기(photodetector);를 포함하는 전기화학발광 시스템.

[청구항 5] 제 4 항에 있어서,
상기 전기화학 셀은 탄소(carbon), 백금(platinum, Pt), 금(gold, Au), 은(silver, Ag), 니켈(nickel, Ni), 스테인레스(stainless), 팔라듐(palladium), 주석(tin), 인듐(indium), 및 규소(silicon) 원소로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 작업전극을 포함하는 것을 특징으로 하는, 전기화학발광 시스템.

[청구항 6] 제 4 항에 있어서,

- 상기 전해질 용액은 인산염 완충용액(phosphate buffer saline, PBS), 아세토니트릴(acetonitrile, ACN), 다이클로로메탄(dichloromethane), 에탄올(ethanol), 메탄올(methanol), 테트라하이드로퓨란(tetrahydrofuran, THF), 디메틸설폭시드(dimethylsulfoxide, DMSO), 다이메틸포름아마이드(dimethylformamide, DMF), 에틸렌 카보네이트(ethylene carbonate; EC) 및 프로필렌 카보네이트(propylene carbonate; PC)로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상인 것을 특징으로 하는, 전기화학발광 시스템.
- [청구항 7] 제 4 항에 있어서,
상기 전해질 용액의 pH가 5 내지 12 인 것을 특징으로 하는, 전기화학발광 시스템.
- [청구항 8] 제 4 항에 있어서,
상기 전기화학발광 라벨은 전이금속 착화합물, 발광성 유기 반도체, 양자점 물질, 페로브스카이트 나노입자, 금속나노입자 및 탄소 나노입자로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상인 것을 특징으로 하는, 전기화학발광 시스템.
- [청구항 9] (a) 제 4 항의 전기화학발광 시스템 내의 전기화학 셀에 시료를 포함하는 전해질 용액을 넣고 반응시키는 단계; 및
(b) 상기 (a) 단계의 반응 시료를 전기화학발광 기반 검출기로 입력전압에 따른 전기화학발광 강도(ECL intensity)를 측정하여 광학 신호를 검출하는 단계;
를 포함하는 전기화학발광 시스템의 검출방법.
- [청구항 10] 제 1 항 내지 제 3 항 중에서 선택된 어느 한 항의 공반응물; 및
전기화학발광 라벨;을 포함하는 전기화학발광 면역분석 또는 분자진단을 위한 키트.
- [청구항 11] 제 10 항에 있어서,
상기 키트는 인산염 완충용액(phosphate buffer saline, PBS), 아세토니트릴(acetonitrile, ACN), 다이클로로메탄(dichloromethane), 에탄올(ethanol); 메탄올(methanol), 테트라하이드로퓨란(tetrahydrofuran, THF), 디메틸설폭시드(dimethylsulfoxide, DMSO), 다이메틸포름아마이드(dimethylformamide, DMF), 에틸렌 카보네이트(ethylene carbonate; EC) 및 프로필렌 카보네이트(propylene carbonate; PC)로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 전해질 용액을 포함하는 것을 특징으로 하는 키트.
- [청구항 12] 제 11 항에 있어서,
상기 전해질 용액은 pH가 5 내지 12 인 것을 특징으로 하는 키트.
- [청구항 13] 제 10 항에 있어서,
상기 키트는 0 mM 초과 20 mM 이하 농도의

4-디메틸아미노피리딘(4-Dimethylaminopyridine)을 포함하는 것을
특징으로 하는 키트.