

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6374860号
(P6374860)

(45) 発行日 平成30年8月15日 (2018. 8. 15)

(24) 登録日 平成30年7月27日 (2018. 7. 27)

(51) Int. Cl.

F I

A 6 1 B 5/1486 (2006. 01)

A 6 1 B 5/1486

G O 1 N 27/327 (2006. 01)

G O 1 N 27/327 3 5 3 Z

請求項の数 28 (全 28 頁)

(21) 出願番号	特願2015-502344 (P2015-502344)	(73) 特許権者	501205108
(86) (22) 出願日	平成25年3月27日 (2013. 3. 27)		エフ ホフマンーラ ロッシュ アクチェ ン ゲゼルシャフト
(65) 公表番号	特表2015-515305 (P2015-515305A)		スイス連邦、ツェーハー ー 4 0 7 0 パー ゼル、グレンツァッハーシュトラーセ 1 2 4
(43) 公表日	平成27年5月28日 (2015. 5. 28)		
(86) 国際出願番号	PCT/EP2013/056619	(74) 代理人	110001896
(87) 国際公開番号	W02013/144255		特許業務法人朝日奈特許事務所
(87) 国際公開日	平成25年10月3日 (2013. 10. 3)	(72) 発明者	シュタイプ、アルヌルフ
審査請求日	平成27年6月17日 (2015. 6. 17)		ドイツ連邦共和国、6 4 6 4 6 ヘッペン ハイム、ジルフアナーヴェーク 4
(31) 優先権主張番号	PCT/EP2012/055406	(72) 発明者	ティーレ、マルセル
(32) 優先日	平成24年3月27日 (2012. 3. 27)		ドイツ連邦共和国、6 8 3 0 9 マンハイ ム、マンハイマー シュトラーセ 9 5
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 インビボ酵素センサー用の改良されたスパーサーメンブレン

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

酵素分子が固定化された電極を備える *in vivo* 条件下で分析物の濃度を測定するための電極システムであって、

スパーサーメンブレンが、前記電極システムの外層の少なくとも一部分を形成しており、前記スパーサーメンブレンが、アクリルおよび／またはメタアクリルモノマーの親水性コポリマーから形成されており、前記親水性コポリマーが、50モル-%より多い親水性モノマーユニットを含むことを特徴とする電極システム。

【請求項 2】

電極システムの外側から酵素分子への分析物の拡散を制御する拡散バリアをさらに備える請求項 1 記載の電極システム。

【請求項 3】

前記スパーサーメンブレンが、少なくとも2つまたは3つのアクリルおよび／またはメタアクリルモノマーからの親水性コポリマーである請求項 1 または 2 記載の電極システム。

【請求項 4】

前記親水性モノマーユニットが、極性基をもつ親水性の（メタ）アクリル酸エステル、親水性の（メタ）アクリルアミド、（メタ）アクリル酸またはそれらの組み合わせより選択される請求項 1 ～ 3 のいずれか 1 項に記載の電極システム。

【請求項 5】

前記極性基が、OH、OCH₃またはOC₂H₅基より選択される請求項 4 記載の電極シス

10

20

テム。

【請求項 6】

前記親水性モノマーユニットが、
 2-ヒドロキシエチルアクリレート、
 2-ヒドロキシエチルメタクリレート（HEMA）、
 2-メトキシエチルアクリレート、
 2-メトキシエチルメタクリレート、
 2-エトキシエチルアクリレート、
 2-エトキシエチルメタクリレート、
 2-または3-ヒドロキシプロピルアクリレート、
 2-または3-ヒドロキシプロピルメタクリレート（2-または3-HPMA）、
 2-または3-メトキシプロピルアクリレート、
 2-または3-メトキシプロピルメタクリレート、
 2-または3-エトキシプロピルアクリレート、
 2-または3-エトキシプロピルメタクリレート、
 1-または2-グリセロールアクリレート、
 1-または2-グリセロールメタクリレート、
 アクリルアミド、
 メタクリルアミド、
 N-アルキルまたはN、N-ジアルキルアクリルアミドおよび
 N-アルキルまたはN、N-ジアルキルメチルアミドであって、
 前記アルキル基は1～3個の炭素原子を有し、
 アクリル酸、
 メタクリル酸
 およびそれらの組み合わせ
 より選択される請求項4または5記載の電極システム。

10

20

【請求項 7】

前記親水性モノマーユニットが、2-ヒドロキシエチルメタクリレート（HEMA）、2-ヒドロキシプロピルメタクリレート（2-HPMA）およびそれらの組み合わせより選択される請求項6記載の電極システム。

30

【請求項 8】

前記スペーサーメンブレンの前記親水性コポリマーが、少なくとも60モル-%の親水性モノマーユニットを含む請求項1～7のいずれか1項に記載の電極システム。

【請求項 9】

前記スペーサーメンブレンの前記親水性コポリマーが、少なくとも70モル-%の親水性モノマーユニットを含む請求項1～7のいずれか1項に記載の電極システム。

【請求項 10】

前記スペーサーメンブレンの前記親水性コポリマーが、40モル-%以下の疎水性モノマーユニットをさらに含む請求項1～9のいずれか1項に記載の電極システム。

【請求項 11】

前記スペーサーメンブレンの前記親水性コポリマーが、30モル-%以下の疎水性モノマーユニットをさらに含む請求項1～9のいずれか1項に記載の電極システム。

40

【請求項 12】

前記疎水性モノマーユニットが、
 メチルアクリレート、
 メチルメタクリレート（MMA）、
 エチルアクリレート、
 エチルメタクリレート（EMA）、
 n-またはi-プロピルアクリレート、
 n-またはi-プロピルメタクリレート、

50

n-ブチルアクリレート、
n-ブチルメタクリレート（BUMA）、
ネオペンチルアクリレート、
ネオペンチルメタクリレート
およびそれらの組み合わせ
より選択される請求項10または11記載の電極システム。

【請求項13】

前記疎水性モノマーユニットが、メチルメタクリレート（MMA）、n-ブチルメタクリレート（BUMA）およびそれらの組み合わせより選択される請求項12記載の電極システム。

10

【請求項14】

前記疎水性モノマーユニットが、メチルメタクリレート（MMA）またはn-ブチルメタクリレート（BUMA）であり、および、前記親水性モノマーユニットが、2-ヒドロキシエチルメタクリレート（HEMA）および／または2-ヒドロキシプロピルメタクリレート（2-HPMA）である請求項10～13のいずれか1項に記載の電極システム。

【請求項15】

前記スペーサーメンブレンが、n-ブチルメタクリレート（BUMA）、2-ヒドロキシエチルメタクリレート（2-HEMA）および2-ヒドロキシプロピルメタクリレート（2-HPMA）であるモノマーユニットを含むコポリマーから形成されている電極システムであって、前記コポリマーが、80モル-%の2-HEMAモノマーユニットを含む請求項10～14のいずれか1項に記載の電極システム。

20

【請求項16】

前記親水性ポリマーが、ランダムコポリマーまたはブロックコポリマーである請求項1～15のいずれか1項に記載の電極システム。

【請求項17】

前記スペーサーメンブレンの厚みが、20 μm 未満である請求項1～16のいずれか1項に記載の電極システム。

【請求項18】

前記スペーサーメンブレンの厚みが、5 μm 未満である請求項17記載の電極システム。

【請求項19】

前記スペーサーメンブレンの厚みが、1～3 μm である請求項17記載の電極システム。

30

【請求項20】

前記親水性コポリマーの相対的水分取り込み量が、コポリマーの総重量に対して50重量%を超えない請求項1～19のいずれか1項に記載の電極システム。

【請求項21】

前記親水性コポリマーの相対的水分取り込み量が、コポリマーの総重量に対して40重量%を超えない請求項20記載の電極システム。

【請求項22】

前記親水性コポリマーの相対的水分取り込み量が、コポリマーの総重量に対して30重量%を超えない請求項20記載の電極システム。

40

【請求項23】

前記拡散バリアが、親水性ポリウレタン、または、少なくとも一つの親水性ブロックと少なくとも一つの疎水性ブロックとを有するブロックコポリマーを含む請求項2～22のいずれか1項に記載の電極システム。

【請求項24】

導電体（2a）を有する対電極（2）、および導電体（1a）を有する作用電極（1）を基板（4）上に含み、さらに、作用電極（1）上に配置される固定化された酵素分子を含む酵素層（5）と、酵素層（5）を被覆する拡散バリア（8）と、拡散バリア（8）および対電極（2）を被覆するスペーサーメンブレン（9）と、を含む請求項1～23のいずれか1項に記載の電極システム。

50

【請求項 25】

請求項 1～24 のいずれか 1 項に記載の電極システムを含む、身体内に挿入可能または埋め込み可能であるセンサー。

【請求項 26】

グルコースの測定のための請求項 25 記載のセンサー。

【請求項 27】

アクリルおよび／またはメタアクリルモノマーの親水性コポリマーの使用であって、前記親水性コポリマーが、酵素的電極システムのためのスペーサーメンブレンとして、50 モル-% より多い親水性モノマーユニットを含む使用。

【請求項 28】

酵素的電極システムに対する異物反応 (FRB) を最小限にするための請求項 27 記載の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、酵素分子が固定化された電極と、電極システムの周りの体液から酵素分子への分析物の拡散を制御する改良された拡散バリアと、を備える *in vivo* 条件下で分析物の濃度を測定するための電極システムに関する。

【0002】

さらに、本発明は、酵素分子が固定化された電極と、任意には、電極システムの外側から酵素分子への分析物の拡散を制御する拡散バリアおよび電極システムの外層の少なくとも一部分を形成する改良されたスペーサーメンブレンと、を備える *in vivo* 条件下で分析物の濃度を測定するための電極システムに関する。

【0003】

埋め込み可能なまたは挿入可能な電極システムを備えるセンサーは、生理学的に重要な分析物、例えば患者の身体内の乳酸またはグルコースなどの測定を容易にする。この種類のシステムの作用電極は、その中に酵素分子が結合されている導電性の酵素層であって分析物分子の触媒的変換によって電荷キャリアを遊離する酵素層を備える。その過程において、測定シグナルとして電流が生成され、その大きさは、分析物濃度と相関する。

【0004】

このような電極システムとしては、例えば国際公開第 2007/147475 号および国際公開第 2010/028708 号などで公知であり、これらの内容は参照によって本明細書に組み込まれる。

【0005】

電極システムの作用電極には、電極システムの周りの体液または組織から、酵素層中に固定化されている酵素分子への、測定される分析物の拡散を制御する拡散バリアが設けられる。国際公開第 2010/028708 号によれば、電極システムの拡散バリアは、少なくとも 2 つの異なるポリマー、好ましくはアクリレート の固溶体である。ポリマーは、コポリマー、例えば、メタクリル酸メチルとヒドロキシエチルメタクリレートとのコポリマーまたはブチルメタクリレートとヒドロキシエチルメタクリレートとのコポリマーなど、であってもよい。

【0006】

国際公開第 2007/147475 号は、双性イオン構造を有するポリマーから作製される拡散バリアを開示する。このようなポリマーの例としては、ポリ(2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン-*n*-ブチルメタクリレート)が挙げられる。双性イオンポリマーは、別のポリマー、例えばポリウレタンなどと混合されてもよい。

【0007】

しかしながら、ポリマーまたはコポリマー混合物の使用は、混合物の調製およびセンサーへのその適用が、面倒であり、潜在的に問題があるという難点がある。通常、混合されるポリマーは、個々に溶解され、そして得られた溶液がその後所望の比率で混合される。

10

20

30

40

50

しかしながら、これは、成分のうちの一つの沈殿をもたらし得、結果的に、例えば噴霧プロセスなどにおける加工性の問題点をもたらし得る。混合物がイオン性の特性をもつポリマーを含んでいる場合、すなわち、混合されるポリマーのうちの一つがアニオン性またはカチオン性基を有するモノマーを含んでいる場合に困難性は増大する。このような荷電基の存在は、しかしながら、溶解性に強く影響を及ぼし、荷電ポリマーおよび非荷電ポリマーの両方に適切な溶媒を見つけることを困難にさせる。

【0008】

特許文献1は、少なくとも一つのポリマー材料を含む一体化された拡散層および酵素層を備える酵素系センサー、そして、粒子が酵素を担持しており、前記粒子がポリマー材料中に分散されていることを開示する。ポリマーは、親水性および疎水性ポリマー鎖配列を含んでいてもよく、例えば、ポリマーは、高いまたは低い水分取り込み性のポリエーテルポリウレタンコポリマーであってもよい。拡散層として、少なくとも一つの親水性ブロックおよび少なくとも一つの疎水性ブロックを有するブロックコポリマーの使用は開示されていない。

10

【0009】

特許文献2は、導電体を備えた対電極と、導電体を備えた作用電極であって、その上に固定された酵素分子を含む酵素層が局在している作用電極と、を備える分析物の濃度の *in vivo* での測定のための電極システムを記載する。拡散バリアは、周囲の体液から酵素分子への分析物の拡散を制御する。拡散バリアは、4, 4'-メチレンビス(シクロヘキシルイソシアネート)およびジオール混合物(ポリエチレングリコールおよびポリプロピレングリコールであってもよい)の縮合重合によって得られ得る親水化されたポリウレタンを含んでいてもよい。親水性ポリウレタン層は、スパーサー、例えばブチルメタクリレートと2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルクロリンとのコポリマーなどで覆われ得る。少なくとも一つの親水性ブロックおよび少なくとも一つの疎水性ブロックを有するブロックコポリマーの拡散層としての使用は開示されていない。50モル%より多い親水性モノマーを含む、(メタ)アクリル酸モノマーの親水性コポリマーの使用もまた開示されていない。

20

【先行技術文献】

【特許文献】

【0010】

【特許文献1】国際公開第2006/058779号

【特許文献2】欧州特許出願公開第2163190号明細書

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0011】

本発明の目的は、所望の物理化学的特性を提供し、および、容易に製造され得る、酵素的 *in vivo* センサーの電極システムにおける拡散バリアを提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0012】

この目的は、少なくとも一つの親水性ブロックおよび少なくとも一つの疎水性ブロックを有する単一のブロックコポリマーからなる拡散バリアを提供することによって達成される。親水性および疎水性ブロックは、互いに共有結合的に結合されている。好ましくは、ブロックは、(メタ)アクリル酸ポリマーブロックである。

40

【0013】

ブロックコポリマーベースの拡散バリアは、以下のような、非常に優れた物理化学的特性を提供する：

(i) 拡散バリアの測定される分析物透過性

(ii) 電極の短期的挙動(濡れ性)および長期的挙動(センサーのドリフト)に適切である拡散バリアの透過特性

(iii) 延長された複数の電極を備える *in vivo* センサーの製造を可能にする、拡

50

散バリアの機械的柔軟性

(iv) 拡散層へのイオン性基の効率の良い組み込み、すなわち、ポリマー内のカチオン性またはアニオン性電荷密度が効率良く調整され得、これは、荷電性分析物の反発または親和性、および／または、例えば周りの体液または組織からの単球などの細胞の接着の制御に関連する。

【0014】

本発明の主題は、酵素分子が固定化された電極と、電極システムの外側から酵素分子への分析物の拡散を制御する拡散バリアと、を備える *in vivo* 条件下で分析物の濃度を測定するための電極システムであって、拡散バリアが、少なくとも一つの親水性ブロックおよび少なくとも一つの疎水性ブロックを有するブロックコポリマーを含むことを特徴とする電極システムである。

10

【0015】

好ましくは、拡散バリアは、少なくとも一つの親水性ブロックおよび少なくとも一つの疎水性ブロックを有する、単一の、すなわちただ一つの、ブロックコポリマーを含み、すなわち、さらなるポリマーまたはコポリマーは存在しない。より好ましくは、拡散バリアは、少なくとも一つの親水性ブロックおよび少なくとも一つの疎水性ブロックを有する、単一のブロックコポリマーからなる。

【0016】

本発明の電極システムは、身体内への、例えば、ヒトの身体内などの哺乳類の身体内への、挿入または埋め込みに適する。電極システムは、例えば、細胞外空間（間質）内、血管もしくはリンパ管内、または細胞間の間隙内などの体液および／または身体組織内の所望の分析物を測定するために適合される。

20

【0017】

挿入されたまたは埋め込まれた電極システムは、短期の適用、例えば3～14日間など、また、長期の適用、例えば6～12か月間などに適する。挿入または埋め込みの期間のあいだ、所望の分析物が、継続的または非継続的な測定によって測定され得る。

【0018】

本発明の電極システムは、好ましくは、酵素的、非流体的 (enzymatic, non-fluidic) (ENF) センサーの一部であって、ここで分析物の酵素的変換が測定される。好ましくは、センサーは、分析物の変換のための酵素分子が固定化された作用電極であって、電気的信号の生成をもたらす作用電極を含む。酵素は、電極を被覆する層中に存在し得る。追加で、酸化還元メディエーターおよび／または電解触媒や導電性粒子およびポア形成剤が存在していてもよい。この種の電極は、例えば、国際公開第2007/147475号に記載されており、その開示は本明細書中に参照によって組み込まれる。

30

【0019】

作用電極の領域は、センサーの感度領域である。この感度領域には、外側、例えば電極システムのまわりの体液および／または組織など、からの酵素分子への分析物の拡散を制御する拡散バリアが設けられる。拡散バリアは、例えば、酵素層を覆うカバー層、すなわち酵素を含まない層であり得る。しかしながら、拡散制御粒子が拡散バリアとして機能するように酵素層中に組み込まれていることもまた可能である。例えば、酵素層のポアが、分析物分子の拡散を制御するポリマーで充填され得る。拡散バリアの厚みは、通常、約2～20 μm、例えば、約2～15 μm、または約5～20 μm、特には約5～10 μm、または約10～15 μmのあいだ（乾燥状態で）である。

40

【0020】

本発明の電極システムの拡散バリアは、ブロックコポリマー、好ましくは、少なくとも一つの親水性ブロックおよび少なくとも一つの疎水性ブロックを有する単一のブロックコポリマーを含む。ブロックコポリマーは、ブロックの交互配列、すなわち親水性ブロックが疎水性ブロックへと結合されている配列を含んでいてもよい。親水性および疎水性ブロックは、ポリマー分子内で互いに共有結合的に結合する。ポリマーの（重量）平均分子量は、通常20～70 kD、特には25～60 kDおよびより特には30～50 kDである

50

。ブロックコポリマー中の、親水性部分の疎水性部分に対するモル比は、通常約 75 % (親水性) : 25 % (疎水性) ~ 約 25 % (親水性) : 75 % (疎水性) の範囲、約 65 % (親水性) : 35 % (疎水性) ~ 約 35 % (親水性) : 65 % (疎水性) の範囲、または、約 60 % (親水性) : 40 % (疎水性) ~ 約 40 % (親水性) : 60 % (疎水性) の範囲である。

【0021】

ブロックコポリマーの親水性ブロックは、少なくとも 90 % の、少なくとも 95 % のおよび特には完全に、親水性モノマーユニットからなる。これは通常、50 ~ 400 の、例えば 50 ~ 200 の、または 150 ~ 300 の、特には 100 ~ 150 の、または 200 ~ 250 などの、モノマー分子長を有する。コポリマーの疎水性ブロックは、少なくとも 90 % の、少なくとも 95 % のおよび特には完全に、疎水性モノマーユニットからなる。これは通常、50 ~ 300 の、例えば 50 ~ 200 の、または 150 ~ 250 の、特には 80 ~ 150 の、または 170 ~ 200 などの、モノマーユニット長を有する。

10

【0022】

親水性ブロックおよび/または疎水性ブロックは好ましくは、(メタ) アクリル系のユニットからなる。より好ましくは、親水性ブロックおよび疎水性ブロックの両方が、(メタ) アクリル系のモノマーユニットからなる。

【0023】

親水性ブロックの親水性モノマーユニットは、好ましくは、親水性の(メタ) アクリル酸エステル、すなわち極性基をもつエステル、すなわち OH、OCH₃ または OC₂H₅ 基をエステルのアルコール部分内にもつエステル、親水性の(メタ) アクリルアミドであって、アミド(NH₂) または N-アルキルまたは N, N-ジアルキルアミド基を有し、アルキル基が 1 ~ 3 個の炭素原子および任意には例えば OH、OCH₃ または OC₂H₅ 基などの親水性基を含む(メタ) アクリルアミド、ならびに、例えばアクリル酸(アクリレート) またはメタクリル酸(メタクリレート) などの荷電性の基、例えばアニオン性基またはカチオン性基などをもつ適切な(メタ) アクリル酸ユニットから選択される。さらに、モノマーユニットの組み合わせも使用され得る。

20

【0024】

親水性ブロックのための好ましいモノマーユニットの具体的な例は以下から選択される：

30

2-ヒドロキシエチルアクリレート、
 2-ヒドロキシエチルメタクリレート (HEMA)、
 2-メトキシエチルアクリレート、
 2-メトキシエチルメタクリレート、
 2-エトキシエチルアクリレート、
 2-エトキシエチルメタクリレート、
 2-または 3-ヒドロキシプロピルアクリレート、
 2-または 3-ヒドロキシプロピルメタクリレート (2-または 3-HPMA)、
 2-または 3-メトキシプロピルアクリレート、
 2-または 3-メトキシプロピルメタクリレート
 2-または 3-エトキシプロピルアクリレート、
 2-または 3-エトキシプロピルメタクリレート、
 1-または 2-グリセロールアクリレート、
 1-または 2-グリセロールメタクリレート、
 アクリルアミド、
 メタクリルアミド、
 N-アルキルまたは N, N-ジアルキルアクリルアミドおよび
 N-アルキルまたは N, N-ジアルキルメチルアミドであって、アルキル基は例えばメチル、エチルまたはプロピルなどの 1 ~ 3 個の炭素原子を含む、
 アクリル酸(アクリレート)、

40

50

メタクリル酸（メタクリレート）
およびそれらの組み合わせ。

【0025】

好ましい親水性モノマーは、2-ヒドロキシエチルメタクリレート（HEMA）および／または2-または3-ヒドロキシプロピルメタクリレート（2-または3-HPMA）である。より好ましくは、親水性ブロックは、少なくとも2つの異なる親水性モノマーユニットからなる。例えば、HEMAおよび2-HPMAなどの少なくとも2つの異なる親水性モノマーユニットのランダムコポリマーであってもよい。

【0026】

イオン性基をモノマー中に導入するために、荷電性モノマーユニット、例えばアクリル酸（アクリレート）および／またはメタクリル酸（メタクリレート）が親水性ブロック中に組み込まれてもよい。したがって、本発明の特定の実施形態において、親水性ブロックは、少なくとも一つの非イオン性親水性モノマーユニット（例えば上述されているもの）および少なくとも一つのイオン性親水性モノマーユニットから作製され得、ここでイオン性モノマーユニットは、好ましくは1～20モル-%のモル量で存在する。親水性ブロックが例えばアクリル酸またはメタクリル酸などのイオン性モノマーユニットを含む場合、特にN、N-ジアルキルアクリルまたはメタクリルアミドなどの（メタ）アクリルアミドの群より選択される親水性モノマーとの共重合化が好ましい。

【0027】

疎水性ブロックの疎水性モノマーユニットは、好ましくは、疎水性のアクリル酸および／またはメタクリル酸ユニット、スチレン系のモノマーユニット、またはそれらの組み合わせより選択される。好ましくは、疎水性モノマーユニットは、例えば、親水性基を有さない1～3個の炭素原子をもつアルコール部位を有するエステルなどの、疎水性の（メタ）アクリル酸エステルより選択される。疎水性ブロックのためのモノマーユニットの具体的な例は以下から選択される：

メチルアクリレート、
メチルメタクリレート（MMA）、
エチルアクリレート、
エチルメタクリレート（EMA）、
n-またはi-プロピルアクリレート、
n-またはi-プロピルメタクリレート、
n-ブチルアクリレート、
n-ブチルメタクリレート（BUMA）、
ネオペンチルアクリレート、
ネオペンチルメタクリレート
およびそれらの組み合わせ。

【0028】

疎水性ブロックは、例えばランダムなコポリマーとして存在する、少なくとも2つの異なる疎水性モノマーユニットを含む。好ましい実施形態において、疎水性ブロックは、メチルメタクリレート（MMA）およびn-ブチルメタクリレート（BUMA）を含む。特に好ましい実施形態において、疎水性ブロックは、MMAおよびBUMAのランダムコポリマーである。MMAおよびBUMAのあいだのモル比は、好ましくは、約60%（MMA）：40%（BUMA）～約40%（MMA）：60%（BUMA）、例えば、約50%（MMA）：50%（BUMA）などである。疎水性ブロックのガラス転位温度は、好ましくは100℃以下、90℃以下、または80℃以下、例えば約40～80℃である。代替的な実施形態において、疎水性ブロックは、スチレンユニット、例えば約95℃のガラス転位温度を有するポリスチレンなどからなってもよい。

【0029】

本発明において使用されるブロックコポリマーは、公知の方法にしたがって製造され得る（Boeker et al., Macromolecules 34 (2001), 7477-7488）。

10

20

30

40

50

【0030】

ブロックコポリマーは、通常の手法によって、例えば、エーテルなどの有機溶媒などの適切な溶媒または溶媒混合物中のブロックコポリマーの溶液を提供し、それが、既成の電極システムに適用され、そしてその上で乾燥されることなどによって、電極システムに適用され得る。

【0031】

ブロックコポリマーが水と接触される場合、37℃の温度およびpH7.4（10mM KH_2PO_4 、10mM NaH_2PO_4 、および147mM NaCl の水性リン酸緩衝液）で、好ましくは約15～30重量%（ポリマーの乾燥重量に基づいて）の水分取り込みを示す。

10

【0032】

ブロックコポリマーに加えて、拡散バリアはまた、さらなる成分、特に非ポリマー性成分を含んでいてもよく、これらはポリマー中に分散および／または溶解されていてもよい。これらさらなる成分としては、例えば、可塑剤、特に生体適合性の可塑剤、例えばトリ（2-エチルヘキシル）トリメリテートおよび／またはグリセロールなどが挙げられる。

【0033】

本発明の拡散バリアは、37℃の温度およびpH7.4で、好ましくは $\geq 10^{-10} \text{ cm}^2/\text{s}$ である、より好ましくは $\geq 5 \times 10^{-10} \text{ cm}^2/\text{s}$ である、およびさらにより好ましくは $\geq 10^{-9} \text{ cm}^2/\text{s}$ である、および例えば 10^{-7} または $10^{-8} \text{ cm}^2/\text{s}$ までである、グルコースに対する高い実効拡散係数 D_{eff} を有する。実効拡散係数は、好ましくは、実施例4に記載されるように以下の式：

20

【数1】

$$D_{\text{eff}} = S E_m / F \cdot L_m \cdot 5182 \cdot 10^{-8}$$

（ここで、 $S E_m$ は作用電極の感度であり、 F は作用電極の面積であり、および、 L_m は拡散バリアの層厚である）

によって決定される。 $S E_m$ および L_m は実施例に記載されるように決定され得る。

【0034】

本発明の電極システムは、*in vivo*条件下での分析物の濃度の測定に、すなわち、身体内に挿入されるまたは埋め込まれる場合に適する。分析物は、組織または体液内に存在する任意の分子またはイオン、例えば、酸素、二酸化炭素、塩（カチオンおよび／またはアニオン）、脂肪もしくは脂肪成分、炭水化物もしくは炭水化物成分、タンパク質もしくはタンパク質成分、または他の種類の生体分子などであり得る。特に好ましくは、例えば血液などの体液および組織のあいだで効率よく移動され得る、例えば酸素、二酸化炭素、ナトリウムカチオン、塩素アニオン、グルコース、尿素、グリセロール、乳酸およびピルビン酸などの分析物が測定される。

30

【0035】

電極システムは、電極上に固定された酵素を含む。酵素は所望の分析物の測定に適切である。好ましくは、酵素は、分析物を触媒的に変換することができ、およびこれによって、作用電極の導電体によって検出可能な電気信号を生成する。分析物を測定するための酵素は、好ましくは、例えばグルコースオキシダーゼもしくは乳酸オキシダーゼなどの酸化酵素、または、例えばグルコースデヒドロゲナーゼもしくは乳酸デヒドロゲナーゼなどの脱水素酵素である。酵素に加えて、酵素層はまた、作用電極の導電性成分例えば黒鉛粒子などへの電子の移動を助ける電解触媒または酸化還元メディエーターを含んでいてもよい。適切な電解触媒は、例えば二酸化マンガンなどの金属酸化物、または、例えばコバルトフタロシアニンなどの有機金属系化合物である。好ましい実施態様において、酸化還元メディエーターは、過酸化水素を分解する能力をもち、これゆえ作用電極の周りにおける酸素の枯渇を相殺する。別の実施態様において、酸化還元メディエーターは、酵素に共有結合的に結合されてもよく、そしてこれによって、作用電極への直接的な電子移動に効果を

40

50

及ぼす。直接的な電子移動に適切な酸化還元メディエーターは、補欠分子族、例えばピロロキノリンキノン（PQQ）、フラビンアデニンジヌクレオチド（FAD）または他の公知の補欠分子族などである。電極上に固定された酵素は、例えば、国際公開第2007/147475号に記載されており、その内容は本明細書中に参照によって組み込まれる。

【0036】

電極システムの好ましい実施態様は、導電体を備えた対電極と、導電体を備えた作用電極であって、その上に酵素層および拡散バリアが配置されている作用電極と、を備える。酵素層は、好ましくは、互いに例えば少なくとも0.3mmまたは少なくとも0.5mmなどの距離で、作用電極の導体上に配置されている複数のフィールドの形にデザインされる。作用電極の個々のフィールドは、一連の個々の作用電極を形成していてもよい。これらのフィールドのあいだにおいて、作用電極の導体は、絶縁層によって被覆されていてもよい。酵素層のフィールドを、電氣的絶縁層の開口部の上に配置することによって、信号対雑音比が改善され得る。このような配置は、国際公開第2010/028708号に開示されており、その内容は参照によって本明細書に組み込まれる。

【0037】

本発明の電極システムは、追加で、例えばAg/Ag-Cl参照電極などの、作用電極のための参照電位を提供することが可能である参照電極を備える。さらに、本発明の電極システムは、追加の対電極および／または作用電極を有し得る。

【0038】

電極システムは、例えば、ポテンシオスタットおよび電極システムの測定シグナルの増幅のための増幅器に連結されることなどによって、センサーの一部分とされてもよい。センサーは好ましくは、酵素的、非流体的（ENF）センサーであり、より好ましくは、電気化学的ENFセンサーである。電極システムの電極は、ポテンシオスタットを担持する基板上に配置されてもよく、また、ポテンシオスタットを担持する回路基板へと接着されていてもよい。

【0039】

本発明のさらなる主題は、少なくとも一つの親水性ブロックおよび少なくとも一つの疎水性ブロックを有するブロックコポリマーの、酵素的電極のための拡散バリアとしての使用に関する。ブロックコポリマーは、好ましくは、上述されるように、例えば単一のブロックコポリマーである。拡散バリアおよび酵素的電極もまた、好ましくは上で記載されているようなものである。

【0040】

本発明のさらなる詳細および利点は、添付の図面を参照して、例示的な実施態様にもとづいて説明される。

【図面の簡単な説明】

【0041】

【図1】本発明の電極システムの例示的な実施態様を示す。

【図2】図1の詳細図である。

【図3】図1の別の詳細図である。

【図4】図2の断面線CCに沿った断面図を示す。

【図5】バリア層として異なるブロックポリマー（C、F、D、B）が設けられた4つのグルコースセンサーの（10mMグルコースでの）感度を（標準偏差と共に）示す。

【図6】バリア層として異なるブロックポリマー（A、C、D、F）が設けられた4つのグルコースセンサーのセンサードリフトを示す。

【図7】ブロックコポリマーAの時間依存性伝導度を示す（2つの実験）。

【図8】ブロックコポリマーFの時間依存性伝導度を示す（3つの実験）。

【図9】それぞれ2.77μmまたは4.43μmの層厚であるブロックコポリマーHの、時間依存性伝導度を示す。

【図10】コーティングされていないプレート（対照）に対する、種々のスペーサーメンブレンポリマー（Adapt（登録商標）およびEudragit（登録商標） E10

10

20

30

40

50

0) の *in vitro*でのフィブリノゲン接着を示す。

【図11】スパーサーメンブレン (Adapt (登録商標) および Lipidure (登録商標) CM5206) でコーティングされているセンサーまたはコーティングされていない (対照=未処理の細胞) センサーとのインキュベーション後の THP-1 細胞による表面タンパク質 CD54 の発現を示す。

【図12a】スパーサーメンブレン (Adapt (登録商標) および Lipidure (登録商標) CM5206) でコーティングされているセンサーまたはコーティングされていない (対照=未処理の細胞) センサーとのインキュベーション後の THP-1 細胞による、サイトカイン IL-8 の分泌を示す。

【図12b】スパーサーメンブレン (Adapt (登録商標) および Lipidure (登録商標) CM5206) でコーティングされているセンサーまたはコーティングされていない (対照=未処理の細胞) センサーとのインキュベーション後の THP-1 細胞による、MCP-1 の分泌を示す。

【図13】スパーサーメンブレン (Adapt (登録商標)、Lipidure (登録商標) CM5206 および Eudragit (登録商標) E100) でコーティングされているまたはコーティングされていない (Polyst.) 組織培養プレートとのインキュベーション後の THP-1 細胞による、サイトカイン IL-8 の分泌を示す。

【図14】センサーなしのスパーサーポリマー Adapt (登録商標) (負の対照=インキュベーション培養液のみ; 陽の対照=100%の浸透圧溶解) と比較された、スパーサーメンブレン (Adapt (登録商標) および Lipidure (登録商標) CM5206) でコーティングされているセンサーまたはコーティングされていないセンサーとのインキュベーション後の溶血を示す。

【発明を実施するための形態】

【0042】

図1は、例えば皮膚または皮下の脂肪組織などのヒトまたは動物の身体組織内への挿入のための電極システムの例示的实施態様を示す。Aの拡大された詳細図が、図2に示されており、Bの拡大された詳細図が、図3に示されている。図4は、図2の断面線CCに沿った対応する断面図を示す。

【0043】

示されている電極システムは、作用電極1、対電極2、および参照電極3を備える。電極の導電体1a、2a、3aは、基板4上に好ましくはパラジウムまたは金で作製される金属導体のパスの形状で配置される。示されている例示的な実施態様において、基板4は、例えばポリエステルから作製される柔軟性のあるプラスチックプレートである。基板4は、0.5mm未満、例えば100~300マイクロメートルの厚さであり、そしてこれゆえ、その挿入後に周囲の身体組織の動きに適合することができるように屈曲し易い。基板4は、患者の身体組織内への挿入のための狭い軸部と、身体の外側に位置される電気システムへの接続のための幅の広い上端部とを備える。基板4の軸部は好ましくは、少なくとも1cmの長さ、特には2cm~5cmの長さである。

【0044】

示されている例示的な実施態様において、測定機構の一部分、すなわち、基板の上端部は、使用のあいだ患者の身体から突き出ている。代替的には、しかしながら、測定機構の全体を埋め込むことおよび測定データを無線形式で身体の外側に配置されている受信機へと伝達することもまた可能である。

【0045】

作用電極1は、分析物の触媒的変換のための固定化された酵素分子を含む酵素層5を担持する。酵素層5は、例えば、カーボン粒子の硬化ペースト、高分子結合剤、酸化還元メディエーターまたは電解触媒、および、酵素分子の形態で、適用され得る。この種の酵素層5の製造の詳細は、例えば、国際公開第2007/147475号に開示されており、参照によって本明細書に組み込まれる。

【0046】

示されている例示的な実施態様において、酵素層 5 は、作用電極 1 の導電体 1 a に連続的には適用されず、むしろ、互いに距離を隔てて配置される個々のフィールドの形状で適用される。示されている例示的な実施態様における酵素層 5 の個々のフィールドは、一連のシリーズとしては配置される。

【0047】

作用電極 1 の導電体 1 a は、図 2 で特によく示されているように、酵素層フィールドのあいだに狭い部位をもつ。対電極 2 の導電体 2 a は、作用電極 1 の導電体 1 a のパスに沿う外形をもつ。この手段は、有利に短い電流経路および低い電流密度をとまなう、作用電極 1 および対電極 2 がインターカレートしている配置または互いに組み合わせられた配置をもたらす。

10

【0048】

その実効表面を増大させるために、対電極 2 には、対電極 2 の導電体 2 a 上に個々のフィールドの形状で位置している、多孔性の導電層 6 が設けられ得る。作用電極 1 の酵素層 5 と同様に、この層 6 は、カーボン粒子の硬化ペーストおよび高分子結合剤の形態で適用され得る。層 6 のフィールドは好ましくは、酵素層 5 のフィールドと同じ大きさをもつが、これは必須なわけではない。しかしながら、対電極の表面を増加させるための手段がとられなくてもよく、そして、対電極 2 が、いかなる種類のコーティングもなしに、または、上述のブロックコポリマーから作製されるコーティングおよび任意にはスペーサーとともに、直線的な伝導体パスであるようにデザインされてもよい。

20

【0049】

参照電極 3 は作用電極 1 の導電体 1 a および対電極 2 の導電体 2 a とのあいだに配置される。図 3 に示されている参照電極は、その上に導電性の銀／塩化銀ペーストのフィールド 3 a が配置されている、導電体 3 a からなる。

【0050】

図 4 は、図 2 の断面線 C C に沿った断面図を示す。断面線 C C は、作用電極 1 の酵素層フィールド 5 の一つを通して、そして、対電極 2 の導電層のフィールド 6 間まで及ぶ。酵素層 5 のフィールド間で、作用電極 1 の導電体 1 a は、導電層 6 のフィールド間の対電極 2 の導電体 2 a と同様に、導電パス 1 a、2 a の金属によって触媒されるかもしれない干渉反応を防ぐために、電気的な絶縁層 7 によって被覆され得る。酵素層 5 のフィールドは、したがって、絶縁層 7 の開口部内に位置されている。同様に、対電極 2 の導電層 6 のフィールドもまた、絶縁層 7 の開口部の上に位置され得る。

30

【0051】

酵素層 5 は、測定される分析物に対する拡散抵抗を示し、これゆえ拡散バリアとして作用するカバー層 8 によって被覆される。拡散バリア 8 は、上述されるように、交互に親水性および疎水性ブロックを有する単一のコポリマーからなる。

【0052】

カバー層 8 の好ましい厚さは、例えば、3～30 μm 、特には約 5～10 μm または約 10～15 μm である。その拡散抵抗に起因して、カバー層 8 は、単位時間あたり、わずかな数の分析物分子しか酵素層 5 へと到達させない。したがって、カバー層 8 は、分析物分子が変換される速度を低下させ、そしてしたがって、作用電極のまわりの分析物濃度の枯渇に対抗する。

40

【0053】

カバー層 8 は、作用電極 1 の導電体 1 a の実質的に全体のエリアにわたって、連続的に広がる。カバー層 8 上において、生体適合性のメンブレンが、酵素層 5 と身体組織のまわりの細胞とのあいだに最小の距離を確立するスペーサー 9 として配置され得る。この手段は、有利には、酵素層フィールド 5 のまわりにおける流体交換の一過性の障害の場合に、そこから分析物分子が対応する酵素層フィールド 5 へと到達できるような、分析物分子の貯留槽を生成する。電極システムのまわりにおける体液の交換が一時的に制限される、または妨げられる場合、スペーサー 9 内に保管された分析物分子が、そこで分子が変換される作用電極 1 の酵素層 5 へ、拡散し続ける。したがって、スペーサー 9 は、分析物濃度の

50

著しい減少を引き起こすが、対応する測定結果の歪曲は、顕著により長い期間後にしか起こらない。示されている例示的な実施態様において、スペーサー9を形成しているメンブレンはまた、対電極2および参照電極3を被覆する。

【0054】

スペーサーメンブレン9は、例えば、透析メンブレンであってもよい。この意味において、透析メンブレンとは、最大の大きさよりも大きな分子が透過することのできないメンブレンであると理解される。透析メンブレンは、別個の製造プロセスにおいて先に製造され得、そして、その後電極システムの製造のあいだに適用されてもよい。透析メンブレンが透過させることのできる分子の最大の大きさは、分析物分子は通過できるが、より大きな分子は保持されるように選択される。

10

【0055】

代替的には、透析メンブレンの代わりに、例えばポリウレタンまたはアクリレートベースとした、分析物および水に対して非常に透過性であるポリマーから作られるコーティングが、スペーサーメンブレン9として電極システム上に適用され得る。

【0056】

好ましくは、スペーサーは、(メタ)アクリレートのコポリマーで作製される。好ましくは、スペーサーメンブレンは、少なくとも2つまたは3つの(メタ)アクリレートからのコポリマーである。より好ましくは、スペーサーメンブレンは、50モル-%より多い、少なくとも60モル-%、または、少なくとも70モル-%の親水性モノマーユニット、例えばHEMAおよび/または2-HPMAなど、ならびに、40モル-%までの、または30モル-%までの疎水性ユニット、例えばBUMAおよび/またはMMAなどを含む。スペーサーは、ランダムまたはブロックコポリマーであり得る。特に好ましいスペーサーメンブレンは、疎水性成分としてMMAまたはBUMA、ならびに、親水性成分として2-HEMAおよび/または2-HPMAを含む。好ましくは、親水性モノマーHEMAおよび/またはHPMAの量は、80モル-%~85モル-%のあいだ、および、疎水性成分MMAおよび/またはBUMAの量は、15モル-%~20モル-%のあいだである。

20

【0057】

本発明の極めて好ましいスペーサーメンブレンは、Adapt (登録商標) (BioInteractions Ltd, Reading, England) コポリマーから作製される。Adapt (登録商標) は、疎水性部位としてBUMA、および、親水性部位として2-HEMAおよび2-HPMAを含み、ここで、2-HEMA親水性モノマーの量は約80モル-%である。

30

【0058】

スペーサーメンブレンは、分析物に対して非常に透過性であり、すなわち、作用電極の単位面積あたりの感度を顕著に、例えば、約20 μm 未満、好ましくは約5 μm 未満の層厚で、20%以下、または5%以下などに低下させる。特に好ましいスペーサーメンブレンの厚さは、約1~約3 μm である。

【0059】

電極システムの酵素層5は、金属酸化物粒子、好ましくは二酸化マンガン粒子を、触媒的酸化還元メディエーターとして含み得る。二酸化マンガンは、例えばグルコースおよび他の生体分析物の酵素的酸化によってなどで形成される過酸化水素を触媒的に変換する。過酸化水素の分解のあいだ、二酸化マンガン粒子は、電子を作用電極1の導電性成分へ、例えば酵素層5内の黒鉛粒子などへ電子を移動する。過酸化水素の触媒的分解は、酵素層5における酸素濃度のいかなる低下も相殺する。有利には、これは、酵素層5において検出されるべき分析物の変換が局所的な酸素濃度によって制限されないことを可能にする。触媒的な酸化還元メディエーターの使用は、したがって、酸素濃度が低くなったことによってもたらされる測定結果の歪曲に対抗する。触媒的な酸化還元メディエーターの別の有利な点は、細胞に障害をもたらし得る濃度の過酸化水素の産生を防止することである。

40

【0060】

本明細書において記載される好ましいスペーサーメンブレンポリマーは、本発明の拡散

50

バリアのための外側のコーティングとして使用されてもよいが、一般的な電極システムの、特に、酵素分子が固定化された電極と、電極システムの外側から酵素分子への分析物の拡散を制御する拡散バリアとを備える *in vivo* 条件下で分析物の濃度を測定するための電極システムの、外側のコーティングとしても使用され得る。したがって、スパーサーメンブレンは、拡散バリア上に配置され得るが、スパーサーメンブレンはまた、酵素層上に直接的に配置されてもよい。この最後の意味において、スパーサーメンブレンはまた、拡散バリア自身としても作用し得、そして、分析物分子の酵素層への拡散を低下させ得る。

【0061】

本発明の電極システムが身体内に挿入されるまたは埋め込まれる場合、スパーサーメンブレンは、埋め込まれたセンサーと、まわりの体液または組織とのあいだの境界となる。結果的に、体液または組織に暴露された場合、本発明のスパーサーメンブレンは、それがセンサーを変形させたり、または、押し動かしたりしないように、機械的に強固でなければならない。この目的を達成するために、コポリマーの固有の親水性にかかわらず、スパーサーメンブレンコポリマーの水分取り込み量およびこれに付随するコポリマーの膨潤は、制限されなければならない。

【0062】

好ましくは、スパーサーメンブレンコポリマーの相対的水分取り込み量は、コポリマーの全比率に対して50重量%、好ましくは40重量%、より好ましくは30重量%を超えるべきではない。本発明の意味において、相対的水分取り込み量の測定は、乾燥コポリマーを37℃の温度で48時間、過剰のリン酸緩衝液(pH7.4)に付することによって行われた。相対的水分取り込み量(WU%)は、好ましくは以下の式：

【数2】

$$WU\% = (m_2 - m_1) / m_1 \times 100,$$

(式中、 m_1 および m_2 は、それぞれ、乾燥コポリマーおよび上記の測定条件にしたがった水和後のコポリマーの重量を示す)

にしたがい決定される。

【0063】

本発明の発明者らは、コポリマーAdapt(登録商標)で作製された好ましいスパーサーメンブレンは、37℃で48時間でそれ自身の重量に対して33±1.8重量%のリン酸緩衝液(pH7.4)を取り込むことを見つけ出した。同条件下、ポリマーLipidure(登録商標)CM5206(NOF Corporation, Japan)のメンブレンは、それ自身の重量に対して157±9.7重量%のリン酸緩衝液を取り込む。ポリマーのより低い水分取り込みは、本発明のスパーサーメンブレンの機械的安定性を有利に向上させる。対照的に、Lipidure(登録商標)CM5206は、より高い水分取り込みを示し、および、特に酵素的*in vivo*センサーの電極システム上に適用された場合に、よりもろく、容易に変形するまたは押し動かされるハイドロゲルへと膨潤する。

【0064】

さらに、電極システムの挿入および埋め込みのあいだ、スパーサーは組織および／または例えば間質液または血液などの、タンパク質および細胞などの生体分子を含む体液と直接的に接触している。有利には、スパーサーメンブレンは、組織および／または体液環境に挿入されたおよび埋め込まれたセンサーを保護すべきであり、したがって、インプラントに対する身体の組織反応を最小限にしなければならない。実際、埋め込まれた材料に対する身体の反応は、「異物反応(foreign body response)」(FBR)として知られている。FBRによって、身体はインプラントを破壊しようとするか、またはそれが可能でない場合、それを周囲の組織から分離するためにカプセルを作り出そうと試みる(異物肉芽腫)。FBR反応の最初の段階は、タンパク質(例えば、フィブリノゲン、アルブミン、イミューングロブリン、相補体など)の、先の材料、すなわちインプラントの表面への結合である。このタンパク質コートは、免疫細胞上のレセプターに対する結合部位を呈示

10

20

30

40

50

する。例えば、フィブリノゲンはモノサイトレセプターMAC-1に結合する構造モチーフを含む。フィブリノゲンがインプラントの表面に結合した場合、そのコンフォメーションが変化し、そして、MAC-1のための結合部位が露出する。結果的に、単球などの免疫細胞がインプラントに補充され、そして活性化され、インプラントを攻撃する酵素およびラジカルを分泌する。加えて、免疫細胞は、他の免疫細胞を補充しそして活性化するために、可溶性因子、すなわちサイトカインを分泌し、そしてこれによって免疫反応が増幅される。インプラントが除去され得ないと、線維性被膜が結合組織細胞およびタンパク質によって形成される。しかしながら、このカプセルは、分析物にとってセンサーに到達することを妨げる拡散バリアである。これらをまとめると、上述されるような異物反応という事象は、*in vivo*における電極システムの機能およびその寿命を妨害すると考えられる。

10

【0065】

したがって、酵素的*in vivo*センサーの電極システムの改良されたスペーサーメンブレンはさらに、インプラントに対する組織反応の低減を提供し、そして、センサーを周囲組織および体液から分離するカプセルの形成を防止する。

【0066】

したがって、本発明のさらなる目的は、酵素分子が固定化された電極と、好ましくは、電極システムの外側の体液から酵素分子への分析物の拡散を制御する拡散バリアと、を備え、スペーサーメンブレンが電極システムの外層の少なくとも一部分を形成することを特徴とする、*in vivo*条件下で分析物の濃度を測定するための電極システムであって、スペーサーメンブレンがアクリルおよび／またはメタアクリルモノマーの親水性コポリマーを含み、ポリマーが50モル%より多い親水性モノマーを含む電極システムを提供することである。

20

【0067】

上述されるように、本発明のスペーサーメンブレンは、免疫細胞の応答をトリガーし得るおよびその*in vivo*における性能を制限するまたは妨害するかもしれないタンパク質吸着からセンサーの電極システムを保護するために、制限されたタンパク質結合能力をまさに有する。実施例5および6は、本発明の好ましいスペーサーメンブレンが、フィブリノゲンへの結合をほとんど提供せず、および、単球に対するMAC-1結合モチーフの露出を導くであろうフィブリノゲンのコンフォメーション変化を防ぐことを示している。有利には、スペーサーメンブレンコポリマーの材料は免疫細胞をそれ自身で活性化しない。実施例6によって、本発明のスペーサーメンブレンコポリマーが、埋め込まれたセンサーによる免疫細胞の活性化を減少させ得ることが示され得る。さらに、有利には、スペーサーメンブレンは生体適合性材料であり、特に、体液例えば血液などに適合性である。実施例7は、本発明のスペーサーメンブレンコポリマーが、埋め込まれたセンサーによる溶血および補体活性化を防ぐことができることを示している。したがって、本発明のスペーサーメンブレンは、高い機械的安定性を示すだけでなく、理想的な生体適合特性を有しており、これは、湿潤された際の低い水分取り込み量を考慮すると驚くべきことである。

30

【0068】

電極システムの構造、分析物および酵素分子に特に関する本実施態様の特性は、本明細書中に記載されるようなものである。拡散バリアは、好ましくは、本明細書中に記載されるようなものであるが、しかしながら、それはまた異なる組成を有していてもよく、また、存在していなくてもよい。ある好ましい実施態様において、拡散バリアは好ましくは、本明細書中に記載されるような少なくとも一つの親水性ブロックおよび少なくとも一つの疎水性ブロックを有するブロックコポリマーを含む。

40

【0069】

さらに好ましい実施態様において、拡散バリアは、親水性ポリウレタンを含む。拡散メンブレンとして使用される親水性ポリウレタンは、(ポリ)ジイソシアネート、好ましくは4,4'-メチレンビス(シクロヘキシルイソシアネート)のポリアルコール、好

50

ましくはジオール混合物への重付加によって作製され得る。

【0070】

ジオール混合物の成分は、好ましくは、例えばポリエチレングリコール（PEG）およびポリプロピレングリコール（PPG）などのポリアルキレングリコール、および、例えばエチレングリコールなどの脂肪族ジオールである。好ましくは、親水性ポリウレタンは、45～55モル%、好ましくは50モル%のイソシアネートおよび25～35モル%、好ましくは30モル%のエチレングリコールを含む。そして、親水化の程度が、PPGに対するPEGの比によって調整される。好ましくは、ポリウレタンは、2～3モル%、より好ましくは2.5モル%のPEGおよび17～18モル%、好ましくは17.5モル%のPPGを含む。ポリウレタンの親水性を増大させるために、PEGの割合が、例えば、きわめて親水性なポリウレタンを得るために、4.5～5.5モル%まで、好ましくは5モル%PEGまで増加されてもよい。ポリウレタンの種々の親水性変異体がまた、拡散バリアの特性を最適化するために混合され得る。

10

【0071】

スパーサーメンブレンコポリマーの好ましいアクリルおよびメタアクリルモノマーは本明細書中に記載されるようなものである。

【0072】

親水性モノマーユニットは、好ましくは、親水性の（メタ）アクリル酸エステル、すなわち極性基をもつエステル、すなわちOH、OCH₃またはOC₂H₅基をエステルのアルコール部分内にもつエステル、親水性の（メタ）アクリルアミドであって、アミド（NH₂）またはN-アルキルまたはN、N-ジアルキルアミド基を有し、アルキル基が1～3個の炭素原子および任意には例えばOH、OCH₃またはOC₂H₅基などの親水性基を含む（メタ）アクリルアミド、ならびに、例えばアクリル酸（アクリレート）またはメタクリル酸（メタクリレート）などの荷電性の基、例えばアニオン性基またはカチオン性基などをもつ適切な（メタ）アクリル酸ユニットから選択される。さらに、モノマーユニットの組み合わせも使用され得る。

20

【0073】

親水性ブロックのための好ましいモノマーユニットの具体的な例は以下から選択される：

- 2-ヒドロキシエチルアクリレート、
- 2-ヒドロキシエチルメタクリレート（HEMA）、
- 2-メトキシエチルアクリレート、
- 2-メトキシエチルメタクリレート、
- 2-エトキシエチルアクリレート、
- 2-エトキシエチルメタクリレート、
- 2-または3-ヒドロキシプロピルアクリレート、
- 2-または3-ヒドロキシプロピルメタクリレート（2-または3-HPMA）、
- 2-または3-メトキシプロピルアクリレート、
- 2-または3-メトキシプロピルメタクリレート、
- 2-または3-エトキシプロピルアクリレート、
- 2-または3-エトキシプロピルメタクリレート、
- 1-または2-グリセロールアクリレート、
- 1-または2-グリセロールメタクリレート、
- アクリルアミド、
- メタクリルアミド、
- N-アルキルまたはN、N-ジアルキルアクリルアミドおよび
- N-アルキルまたはN、N-ジアルキルメチルアミドであって、アルキル基は例えばメチル、エチルまたはプロピルなどの1～3個の炭素原子を含む、
- アクリル酸（アクリレート）、
- メタクリル酸（メタクリレート）

30

40

50

およびそれらの組み合わせ。

【0074】

好ましい親水性モノマーは、2-ヒドロキシエチルメタクリレート（HEMA）および／または2-または3-ヒドロキシプロピルメタクリレート（2-または3-HPMA）である。

【0075】

疎水性モノマーユニットは、好ましくは、疎水性のアクリル酸および／またはメタクリル酸ユニット、またはそれらの組み合わせより選択される。好ましくは、疎水性モノマーユニットは、例えば、親水性基を有さない1～3個の炭素原子をもつアルコール部位を有するエステルなどの、疎水性の（メタ）アクリル酸エステルより選択される。疎水性ブロックのためのモノマーユニットの具体的な例は以下から選択される：

メチルアクリレート、
メチルメタクリレート（MMA）、
エチルアクリレート、
エチルメタクリレート（EMA）、
n-またはi-プロピルアクリレート、
n-またはi-プロピルメタクリレート、
n-ブチルアクリレート、
n-ブチルメタクリレート（BUMA）、
ネオペンチルアクリレート、
ネオペンチルメタクリレート
およびそれらの組み合わせ。

【0076】

好ましい実施態様において、疎水性ブロックは、メチルメタクリレート（MMA）およびn-ブチルメタクリレート（BUMA）を含む。

【0077】

外側のスペーサーメンブレンは、少なくとも、酵素分子を含む作用電極の部分、および、任意にはまた他の部分、例えば対電極などを被覆する。存在するのであれば、スペーサーメンブレンはまた、参照電極も被覆する。スペーサーメンブレンは好ましくは、電極システムの埋め込まれた表面全体を被覆する。スペーサーメンブレンは好ましくは、作用電極、任意には対電極および存在する場合には参照電極を、連続層の形状で被覆する。

【0078】

本発明の改善されたスペーサーメンブレンを含む電極システムは、例えば、ポテンシオスタットおよび電極システムの測定シグナルの増幅のための増幅器に連結されることなどによって、センサーの一部分とされてもよい。センサーは好ましくは、酵素的、非流体的（ENF）センサーであり、より好ましくは、電気化学的ENFセンサーである。電極システムの電極は、ポテンシオスタットを担持する基板上に配置されてもよく、また、ポテンシオスタットを担持する回路基板へと接着されていてもよい。好ましくは、センサーはグルコースの測定のためのものである。

【0079】

本発明のさらなる主題は、アクリルおよび／またはメタクリルモノマーの親水性コポリマーの使用に関し、ここで、親水性コポリマーは、酵素的電極のためのスペーサーメンブレンとして50モル%より多い親水性モノマーを含む。親水性コポリマーは、好ましくは上述されるようなものである。好ましくは、スペーサーメンブレンは、それが身体内に挿入された場合または埋め込まれた場合に、酵素的電極に対する異物反応（FRB）を最小限にするために使用される。

【実施例】

【0080】

実施例1 一つの単一のブロックコポリマーからなる拡散層を有する経皮的埋め込みのための、分散された電極を有する酵素的、非流体的（ENF）センサーの透過性

10

20

30

40

50

センサーは、 $250\text{ }\mu\text{m}$ の厚さを有するポリエステル基板上の既成のパラジウムストリップ導体構造上に作製された。作用電極（WE）および対電極（CE）が（図1～2に示されるように）分散されて配置された。

【0081】

CEのフィールドは、カーボンペーストを用いて重ね塗りされ、残りのストリップ導体は絶縁された。WEのフィールドは、架橋化グルコース酸化酵素（酵素）、導電性ポリマーペーストおよび電氣的触媒、ここでは二酸化マンガン（Technipur）の混合物を用いて重ね塗りされた。ストリップ導体の残りのパスは、同様に絶縁された。参照電極（RE）はAg/AgClペーストからなる。電極はセンサー軸部の約1cmを被覆する。

【0082】

WEのフィールドは、HEMAブロックおよびBUMAブロックからなるブロックコポリマーの拡散層によってコーティングされた。層厚は $7\text{ }\mu\text{m}$ である。

【0083】

センサーの4つのバッチが作製され、それぞれに、拡散層として特定のブロックコポリマーが設けられた（以下のリストを参照のこと）。全てのブロックコポリマーは、Polymer Source, Montrealより入手され、そして、以下の表1に挙げられている。

【0084】

【表1】

名前	分子の比／%	モノマーユニット	分子量
コポリマー	BUMA/HEMA	HEMA	コポリマー [kD]
C	73/27	92	47
F	60/40	108	37
D	48/52	162	44
B	62/38	169	61

【0085】

それぞれのブロックコポリマーは、有機溶媒（25%濃度）に溶解され、そして、それらを用いてセンサーがコーティングされた。ベルトドライヤーを用いて（2分、 $30\sim 50^{\circ}\text{C}$ ）乾燥させた後、コーティングされたセンサーが、種々の濃度のグルコース溶液中、*in vitro*で試験された。それぞれのセンサーのバッチとして10個のセンサーが無作為のサンプルとして測定された。*in vitro*での感度の測定として、10mMおよび0mMのグルコース濃度における測定された電流の相違によってシグナルが算出され、そして10mMで除された（実施例4を参照のこと）。

【0086】

全てのセンサーは、Ag/AgClに対する分極電圧350mVで操作され、測定温度は 37°C で一定に保たれた。この測定シリーズで用いられたセンサーは、国際公開第2010/028708号に記載のスペーサーを備えていなかったが、試験されたシグナルレベルに照らしていかなる相違も生じなかった。図5は、4つの異なる拡散層に関する標準偏差を用いたセンサー感度を示す。

【0087】

ブロックコポリマーC、DおよびFに関し、*in vitro*感度と親水性ブロックに対する疎水性ブロックのモル比とのあいだに明白な関連が存在する。ほぼ同一の全鎖長のコポリマーにおいて、感度は、親水性ブロック（HEMA）の量が増大するにつれて向上した。

【0088】

ブロックコポリマーBの拡散層を有するセンサーは、例外である。ポリマーBは、ポリマーFと類似の、親水性の量に対する疎水性の量の相対比を有するにも関わらず、感度およびしたがってグルコースの透過性は低下する。経験的に、ポリマーBの場合、全鎖長（

10

20

30

40

50

コポリマー分子の分子量（総計）に対応する）が非常に大きく、このため層の透過性は低下されるということが出来る。これはまた、重量測定法的に測定された、ブロックコポリマーBの、他のポリマーと比較した水分取り込み量においても見る事が出来るであろう。ポリマーBは、10.6%+1.5%の水分取り込み（ポリマーの乾燥重量に照らした重量パーセント）をもつ。ポリマーCは、15.6%+0.0%であり、ポリマーFは、16.5%+3.1%、および、ポリマーDは27%+1.7%である。

【0089】

実施例2 ENFグルコースセンサーの拡散層の機械的柔軟性

センサーは、国際公開第2010/028708号に記載されるように、しかしながら本発明の拡散層をもつように製造された。ガラス転位温度（Tg）が機械的柔軟性の代替のパラメータであると仮定された。さらに、疎水性ブロックに割り当てられ得る、ガラス転位温度が*in vivo*適用における機械的柔軟性を決定すると仮定された。一つのブロックコポリマーに対し、いくつかのTgが、ブロック数に対応して特定されるかもしれないことに留意するべきである。

10

【0090】

センサーは、実施例1と同じ電極ペーストを用いてコーティングされた。その後、いくつかのセンサーが、MMA-HEMA（Polymer Source, Montrealによって製造された）より選択されるコポリマーを用いてコーティングされた。このポリマー（Eと称される）は、41kDの総分子量を有し、HEMAに対するMMA（疎水性量）のモル比は60%：40%である。DSCを用いて10℃/分の加熱速度で測定された、疎水性ブロックのガラス転位温度は、111℃である。

20

【0091】

なお、他のセンサーには、本発明のブロックコポリマー（Aと称される）の拡散層が設けられた。前記コポリマーAの疎水性ブロックは、MMAおよびBUMAをランダム配列内に等モル量で含む。この場合も、親水性部分に対する疎水性部分のモル比は60%：40%である。分子量は36kDである。疎水性ブロックのTgは、MMAおよびBUMA（約45℃のTg）のランダム配列に起因して73℃まで低下する。

【0092】

拡散層はともに、コポリマーのそれぞれのエーテル溶液（25%）から作製され、そして、実施例1に記載されるように乾燥された。拡散層の厚みは7μmであった。スペーサー層が続いてディップコーティングにより適用され、そして、室温で24時間乾燥された。スペーサー層は、NOF Japanによって製造された、Lipidure（登録商標）CM5206から作製された。

30

【0093】

組織からの外植の後、コポリマーE拡散層を有するセンサーは、拡散層中に散発的なクラックを示す。これは、機械的な負荷の影響としてみなされる。これとは対照的に、コポリマーA拡散層を有するセンサーは、同一の負荷の下、いかなるクラックも表さない。これは明らかにTgの低下に起因するものであり、これは、コポリマーの機械的安定性を向上させる。国際公開第2010/028708号に開示されるような、2つのコポリマーの物理的な混合は、もはや必要ではない。

40

【0094】

実施例3 分散された電極および本発明の拡散層を有するENFグルコースセンサーの最適化された透過挙動

センサーは実施例1に記載されるように、しかしセンサーの軸部の全体上に追加のスペーサー層を備えるように製造された。実施例1および2に記載のコポリマーA、C、DおよびFであるそれぞれの拡散層を有するセンサーが製造された。この目的のため、コポリマーの24%エーテル溶液が生成された。それぞれの溶液が、1セット（N=10）のセンサー上に適用され、そして、バンドドライヤー中で乾燥された。これにより、7μmの厚さを有する拡散層が得られた。

【0095】

50

その後、センサーに実施例 2 で記載されるようなスペーサー層が設けられた。

【0096】

センサーは、センサーの上端部上で測定システムに連結され、これは測定されたデータをデータストアへと移動させる。in vitro 測定が、実施例 1 のように、しかしながら、測定期間が 7 日間で、行われた。測定されたデータから、感度ドリフトが、それぞれのセンサーについて対応する測定期間にわたって算出された。図 6 は、センサーのそれぞれの変形、すなわち、異なる拡散層のセンサー、に関する各グループとしての in vitro ドリフト値の平均値を示す。測定の初期段階（最初の 6 時間、いわゆる測定開始段階）は、算出から除かれた。

【0097】

BUMA の疎水性ブロックを有する全てのコポリマー C、D および F に関し、正のドリフトが存在し、すなわち、感度は時間とともに向上する。これとは対照的に、MMA および BUMA のランダムコポリマーの疎水性ブロックを有するコポリマー A は、非常に低い、わずかに負であるドリフトをもたらす。

【0098】

これらの相違は、追加の実験によって測定された、それぞれの拡散層の長期間の透過応答性によって説明されるかもしれない。WE ベースト内ではあるが、規定の活性化表面は有する、すなわち、酵素層ももたない（その膨張挙動が結果に及ぼす影響を排除する）パラジウムセンサーが、上記のポリマー溶液を用いてコーティングされ、そしてその後、乾燥され、層厚が測定された。続いて、伝導度が、ナトリウムおよび塩素含有緩衝液中で測定された。

【0099】

図 7 は、コポリマー A の導電度が、短期の測定開始段階の後、ほぼ一定に保たれていたことを示している。

【0100】

コポリマー F の場合には、これは、同一の測定条件下でさえも、図 8 に示されるように当てはまらなかった。この場合、コポリマー F の拡散層の、長期のおよび強力な透過応答性が観察され、これは、実質的に層厚には影響を受けなかった。BUMA の疎水性ブロックを有する、コポリマー F の場合（およびコポリマー C および D の場合も（データは示さず））、長期間にわたってさえも、透過性の増加がもたらされる。測定されるときに、拡散層が、分散された酵素層をもつセンサー上に適用されていたならば、これは感度の継続的な上昇を導く。これは、観測された正のセンサードリフトを説明する。

【0101】

同じように、ブロックコポリマー A を有するセンサーは、負のドリフトを示すが、これは、伝導度測定における非常に小さい透過性の変化に起因するものである。しかしながら、測定開始直後から（その後約 1 時間まで）、大きな伝導度の上昇がコポリマー A において観察される。ここでは、非常に速い立ち上がりが観察され、これは約 1 時間後に終結する。この時点において、拡散層は、完全に湿潤され、そして、水分取り込みに起因する構造再構成が終結する。構造変化の程度は、おそらく T_g に依存する。増大された T_g をもつコポリマーが、大気温度の範囲内の T_g をもつコポリマーと比較して、時間的および大

【0102】

加えて、コポリマー A を有するセンサーが、測定の開始時において、コポリマー F の拡散層を有するセンサーと比較して、比較的高い感度を示すことに言及しておくべきである。これは、疎水性および親水性ブロックのあいだの同一の相対比に起因すると予想される。1 ~ 1.5 nA/mM である得られた感度範囲（実施例 1 を参照のこと）は、理想的であると思われる。この感度は、コポリマー A からなる拡散層を有するセンサーにおいては同様に得られる。

【0103】

3 つの物理化学的特性（透過性、機械的安定性および透過応答性）の合計に関して、理

10

20

30

40

50

想的なセンサーは、好ましくは、ランダム型に配置された少なくとも2つの異なる疎水性モノマーユニットを有する疎水性ブロックをもつブロックコポリマー、例えばブロックコポリマーAなどの拡散層を用いて得られ得る。疎水性ブロックが単一のモノマーユニットからのみなる他のブロックコポリマーのいずれも、全ての3つのパラメータにおいてコポリマーAに匹敵し得るような質には到達しない。

【0104】

実施例4 ブロックコポリマーの特性評価

グルコースの連続的測定のための複数のフィールドセンサー（作用電極および対電極のそれぞれ10個のフィールド）が、作製され、そして、*in vitro*で特徴付けられた。

10

【0105】

センサーには、ランダム型に共重合されたメチルメタクリレート（MMA）およびn-ブチルメタクリレート（BUMA）の疎水性ブロックならびに2-ヒドロキシエチルメタクリレート（HEMA）の親水性ブロックを含むブロックコポリマーからなる拡散層が設けられた。これらのポリマー（GおよびHと規定する）は、Polymer Source, Montrealによって製造され、そして、実施例1～3からのポリマーAよりもより透過性であり、そして、これは参照によって本明細書中に組み込まれる。

【0106】

以下の表2において、コポリマーが説明される。

【0107】

20

【表2】

ポリマー	G	H	A
分子量 Mn[kD]	23.5-b-29	21-b-20.5	21-b-15
重量% HEMA	55.2	49.4	41.6
モル% HEMA (化学量論的)	53.5	47.4	40
モル% HEMA (¹ H, ¹³ C NMR による測定)	51	46	32.6
Tg [°C] 疎水性ブロック	65	68	86
HEMA モノマーユニット	223	157	115
MMA モノマーユニット	194	174	174

30

【0108】

それぞれのブロックの分子量Mnが上記の表2において個々に示されており、ポリマーは特定の平均値のまわりに分子鎖長の分散を有することが知られているため、その平均値が示されている。これはまた、表2において導出された量に関しても適用される。

40

【0109】

疎水性ブロックの示されているガラス転位温度は、機械的柔軟性を保証するための好ましい範囲内にある。

【0110】

分析物のための拡散バリアの透過性に関する重要なパラメータは、作用電極のユニット面積（すなわち幾何学的面積）当たりの感度である。感度SEは、リン酸緩衝液（pH 7.4）中、10 mMおよび0 mMグルコース濃度での電流（I）測定により、nA/mMで、分析されたそれぞれのセンサーに関して算出された：

【数 3】

$$SE = [I(10 \text{ mM}) - I(0 \text{ mM})]/10$$

個々の測定値（ $N = 8$ ）から平均感度 SE_m が決定された。得られた感度値は、顕微鏡で測定された、複数のフィールドを有するセンサー上の全ての作用電極スポットの幾何学的な総面積 F で除された。これにより、感度密度 SE_m / F が得られた。

【0111】

in vitro 機能曲線の線形性 Y は、作用電極上のポリマーカバー層の拡散制御機能性を示すものである。20 mM、10 mM および 0 mM のグルコース濃度における電流測定から、% で、以下の式：

10

【数 4】

$$Y^{20\text{mM}} = 50 \cdot [I(20\text{mM}) - I(0\text{mM})] / [I(10\text{mM}) - I(0\text{mM})]$$

にしたがい、分析されたセンサーのそれぞれについて算出された。個々の測定値から、平均線形性値およびその標準偏差が決定された（表 3 参照のこと）。

【0112】

最後に、センサーの拡散バリアの層厚 L が、それぞれのポリマーの光学的測定によって測定された。対応する平均値が、同じポリマーをもつ ≥ 23 個のセンサーのサンプルについて算出された。これらから、カバー層の実効拡散係数 D_{eff} が、以下の式：

20

【数 5】

$$D_{\text{eff}} = SE_m / F \cdot L_m \cdot 5.182 \cdot 10^{-8}$$

にもとづき、 cm^2 / s で算出され得、ここで式中、 SE_m および L_m は感度および層厚それぞれの平均値であり、および、 F は全ての作用電極スポットの総面積である。

【0113】

センサードリフトは、7 日間にわたる *in vitro* 測定のグルコース濃度工程の繰り返しから算出された。実質的に一定の導電度を示している、ポリマー H に関する結果が図 9 に示されている。

【0114】

以下の表 3 は、機能的特性評価の結果を示している。

30

【0115】

【表 3】

ポリマー	G	H
SE_m / F [nA/mM*mm ²]	1.85	1.25
ドリフト [%d]	-1.5±0.2	0.3±0.1
$Y^{20\text{mM}}$ [%]	88.2±0.7	88.6±0.3
層厚 L_m [μm]	11.61	12.69
D_{eff} [cm ² /s]	$1.11305 \cdot 10^{-9}$	$8.22019 \cdot 10^{-10}$

40

【0116】

より親水性のポリマー G（グルコースに対しより透過性である）に関し、拡散係数がまた、代替的な方法、例えばグルコース溶液を含むチャンバーからのグルコースを含まない緩衝液を含むチャンバーへの、ポリマーのフィルムを通じたグルコースの透過などを用いて測定された。この方法により、拡散係数として類似の値が得られた（ $1.17 \times 10^{-9} \text{ cm}^2 / \text{s}$ ）。

【0117】

実施例 5 タンパク質のスペーサー層材料への結合

50

スぺーサー層材料へのタンパク質の結合を評価するために、A d a p t（登録商標）（BioInteractions Ltd, Reading, England）またはE u d r a g i t（登録商標） E 1 0 0（Evonik Industries）がインキュベーションプレート（FluoroNunc Maxisorp, Thermo Scientific）内に満たされた。E u d r a g i t（登録商標） E 1 0 0は、ジメチルアミノエチルメタクリレート、ブチルメタクリレートおよびメチルメタクリレートベースのカチオン性コポリマーである。ポリマーは、終夜40℃で乾燥された。その後、スぺーサー材料が、フィブリノゲン溶液で表面を覆われた。溶液は、ヒト血漿由来の、蛍光色素A l e x a 4 8 8（Invitrogenより購入された）に結合されているフィブリノゲンを含んでいた。4時間のインキュベーションの後、フィブリノゲン溶液は、吸引され、そして、スぺーサー層がホウ酸緩衝液を用いて8回洗浄された。スぺーサーに結合したタンパク質の量が、蛍光読取装置（Synergy4, BioTek Instruments）を使用して励起波長485nmおよび発光波長528nmで、インキュベーションプレート内の蛍光強度を測定することによって分析された。ラベルされたタンパク質の既知の濃度（6.25～500ng）が、蛍光の読取り値をタンパク質の量へと変換するための較正曲線を作製するために使用された。

10

【0118】

期待されるように、フィブリノゲンは、コーティングされていないインキュベーションプレート（ブランク）に、390ngの結合タンパク質という結果で接着した（図10）。E u d r a g i t（登録商標） E 1 0 0でコーティングされたプレートは、60ngである、低減されたタンパク質結合を示した。A d a p t（登録商標）でコーティングされたプレートにおいては、タンパク質結合はほとんど検出されなかった。インキュベーション前の読取り値は、バックグラウンド蛍光によるものであった。これらの結果は明らかに、スぺーサー材料でコーティングされた表面、特にA d a p t（登録商標）でコーティングされた表面がフィブリノゲン接着を良好に防ぐことを示している。

20

【0119】

実施例6 スぺーサー層との接触後の細胞からのサイトカイン遊離

センサーは、実施例2に記載されるように製造された。その後、センサーは、実施例2に記載されるようにスぺーサー層を設けられた。スぺーサー層は、L i p i d u r e（登録商標） C M 5 2 0 6（NOF Corporation, Japan）から作製されるか、または、A d a p t（登録商標）（BioInteractions Ltd, Reading, England）から作製された。

30

【0120】

スぺーサー層を有さないセンサー、L i p i d u r e（登録商標） C M 5 2 0 6からなるスぺーサー層を有するセンサーまたはA d a p t（登録商標）からなるスぺーサー層を有するセンサーが、単球性T H P - 1細胞とインキュベートされ、そして、炎症性マーカーの誘導が分析された。

【0121】

T H P - 1細胞は、センサーの存在下、37℃で24時間培養された。細胞は、その後、遠心分離によって収集された。上澄みがサイトカイン遊離を測定するために使用され、一方、細胞ペレットは、ウシ血清アルブミン（B S A）を1%含むP B S中に再懸濁され、そして、細胞表面タンパク質C D 5 4（I C A M - 1としても知られる、炎症性バイオマーカー）の発現を分析するために使用された。T H P - 1細胞は、蛍光色素フィコエリトリンで標識された抗C D 5 4抗体（BD Bioscience）とともにインキュベートされた。4℃で45分間のインキュベーション後、細胞は、P B S / 1 % B S A中で洗浄され、そして、10000個の細胞の平均蛍光強度（M F I）が、フローサイトメーター（BD FAC SArray, BD Bioscience）を用いて測定された（励起波長532nm、発光波長585nm）。未処理のT H P - 1細胞と比較して、コーティングなしのセンサーとのインキュベーションは、高いM F I読取り値によって示されるように（図11）、増大されたC D 5 4の相対的な発現（6倍の誘導）をもたらした。C M 5 2 5 6またはA d a p t（登録商標）のスぺーサー層によって被覆されたセンサーとの細胞のインキュベーションは、それぞれ45%または41%のC D 5 4発現の減少をもたらした。

40

50

【0122】

上澄み液は、サイトカイン、インターロイキン-8 (IL-8) および「単球走化性タンパク質-1 (monocyte chemotactic protein-1) (MCP-1) の量を、製造者の取り扱い説明書にしたがいビーズを用いた免疫アッセイ (Flex sets, BD Bioscience)、そして、その後のフローサイトメトリー分析 (BD FACSArray, BD Bioscience) を用いて測定するために使用された。データ分析は、F C A P アレイソフトウェア v 1. 0. 1 (Soft flow Hungary Ltd) を用いて行われた。

【0123】

未処理の THP-1 細胞と比較して、コーティングなしのセンサーは、強力な IL-8 (49 対 197 pg/mL) (図 12a) および MCP-1 (6 対 48 pg/mL) (図 12b) の遊離を誘導した。IL-8 および MCP-1 の遊離は、センサーが CM5256 または Adapt (登録商標) のスペーサー層によって被覆されていた場合減少した。Adapt (登録商標) で被覆されたセンサーは、100 pg/mL の IL-8 および 25 pg/mL の MCP-1 の遊離を誘導した。CM5256 で被覆されたセンサーは、125 pg/mL の IL-8 および 18 pg/mL の MCP-1 の分泌をもたらした。

【0124】

まとめると、これらのデータは、スペーサー層が 3 個のよく知られた炎症性バイオマーカー、すなわち CD54、IL-8 および MCP-1 の誘導を減少させることを示している。

【0125】

THP-1 細胞の活性化のためのタンパク質吸着の役割を分析物するために、組織培養プレートが、CM5256、Adapt (登録商標) または Eudragit (登録商標) E100 を用いてコーティングされた。スペーサーは、その後、ヒトフィブリノゲン (Sigma-Aldrich) と共にインキュベートされた。THP-1 細胞は、種々のスペーサー + フィブリノゲン層とインキュベートされた。37°C での 48 時間のインキュベーション後、細胞は遠心分離によって沈殿され、そして、上澄みが IL-8 遊離に関して分析された。対照として、細胞が、スペーサーを含まないが、フィブリノゲンでコーティングされている培養プレート (Polyst.=培養プレート材料) 中で培養された。図 13 に示されるように、これらの細胞は、89 pg/mL の IL-8 を遊離した。CM 5206 + フィブリノゲン上で、または、Adapt (登録商標) + フィブリノゲン上で培養された細胞は、それぞれ、68 または 49 pg/mL を遊離した。これに対し、Eudragit (登録商標) E100 + フィブリノゲン上で培養された細胞は 206 pg/mL の IL-8 を遊離した。特に、フィブリノゲンコーティングなしで Eudragit (登録商標)

E100 上で培養された細胞は、59 pg/mL の IL-8 しか分泌しなかった。ポリマー表面上へのフィブリノゲンの吸着およびタンパク質中のコンフォメーションの変化が、おそらく MAC-1 結合部位を露出させる。MAC-1 レセプターへの結合を介して活性化される THP-1 細胞が、IL-8 などのサイトカインを遊離し、そして、これによって、炎症性応答をトリガーする。これゆえ、Adapt (登録商標) または CM5256 で作製されたスペーサー層は、タンパク質の沈着および構造モチーフの (センサーのような) 表面上での露出を回避し、そしてこれによって、インプラントに対する炎症性反応を最小限にする。

【0126】

実施例 7 スペーサー層でコーティングされたセンサーでの制限された溶血

センサーは実施例 2 に記載されるように製造された。その後、センサーは、実施例 2 に記載されるようにスペーサー層を設けられた。スペーサー層は、Lipidure (登録商標) CM5206 (NOF Corporation, Japan) から作製されるか、または、Adapt (登録商標) (BioInteractions Ltd, Reading, England) から作製された。

【0127】

スペーサー層を有さないセンサー、Lipidure (登録商標) CM5206 からなるスペーサー層を有するセンサーまたは Adapt (登録商標) からなるスペーサー層

10

20

30

40

50

を有するセンサーの溶血の可能性が分析された。このため、総表面積 6 cm^2 であるセンサーが赤血球細胞とインキュベートされ、そして、その後、上澄みへのヘモグロビンの遊離を測定することによって、細胞の溶解が測定された。赤血球が、遠心分離によって新鮮なヒト血液から単離された（クエン酸塩が凝集を避けるために使用された）。それらはその後、リン酸緩衝生理食塩水（PBS）を用いて洗浄され、その後、PBS中に1：40で希釈された。赤血球懸濁液は、回転式プラットフォーム上（ 350 rpm ）で、暗所内 37°C で、24時間センサーとインキュベートされた。その後、細胞は遠心分離によって沈殿され、そして、上澄みのヘモグロビン含有量が、波長 575 nm で上澄みの吸収を測定することによってスペクトルの的に決定された。結果は、%での溶解性指数によって示されており、これは、陽性対照（＝蒸留水中、赤血球の完全な浸透圧溶解）中のヘモグロビンの遊離量で除されたサンプル中のヘモグロビンの遊離量である。結果は、図14に示されている。

10

【0128】

スペーサー層を有さないセンサーは、47.4%という高い溶血指数によって示されるように、顕著な溶血を引き起こした。Lipidure（登録商標）CM5206のスペーサー層を用いたセンサーのコーティングは、14.7%の溶解指数によって示されるように、センサーの溶血可能性を低減した。Adapt（登録商標）のスペーサー層を用いてコーティングされたセンサーは、7.5%の溶解指数をもたらすわずかな溶血を引き起こしたが、これは、負の対照（＝いかなる試験材料も無しにPBS中でインキュベートされた赤血球）またはAdapt（登録商標）のみの範囲内のものである。これらの結果は、溶血を低減させるためのスペーサー層の保護的機能を示していた。

20

【図1】

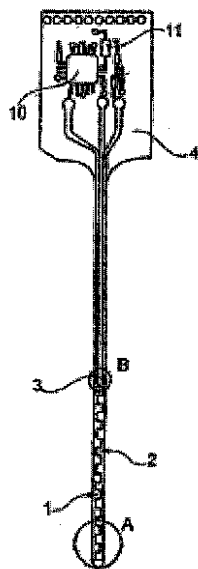


Fig. 1

【図2】

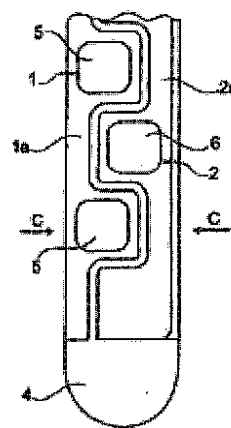


Fig. 2

【図3】

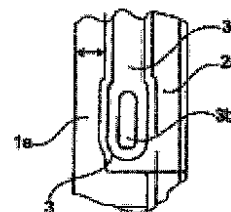
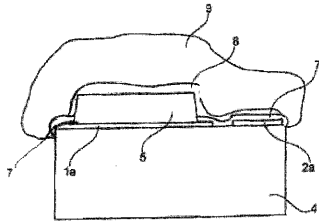


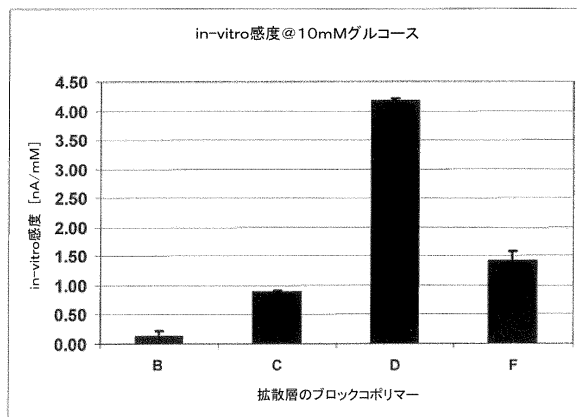
Fig. 3

【図 4】

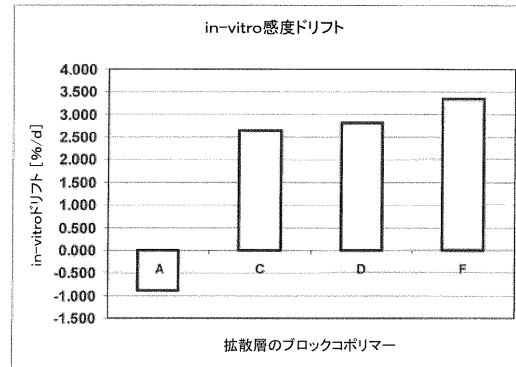
Figure 4



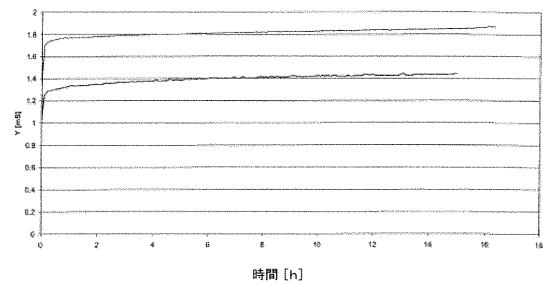
【図 5】



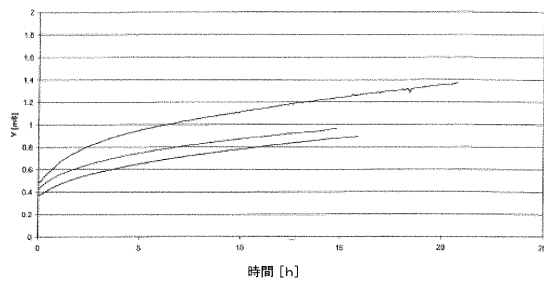
【図 6】



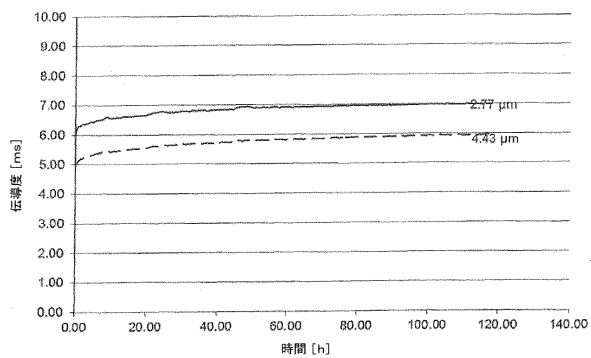
【図 7】



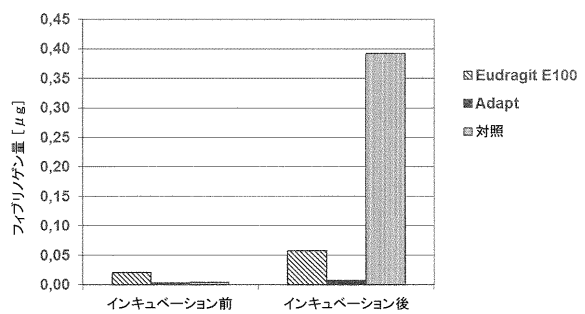
【図 8】



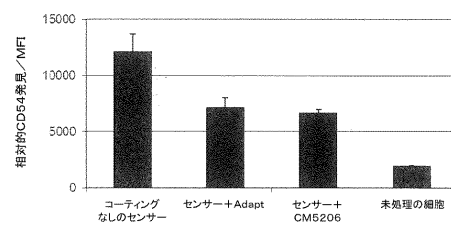
【図 9】



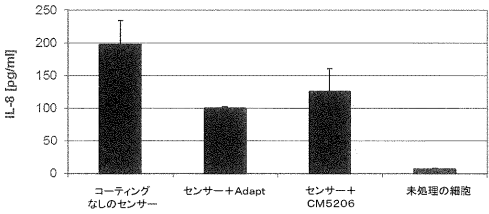
【図 10】



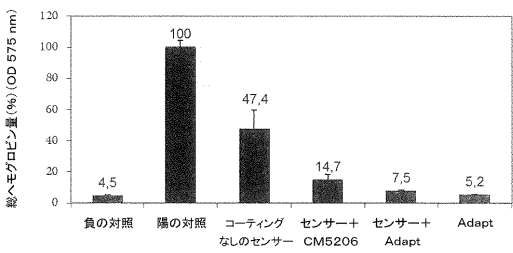
【図 11】



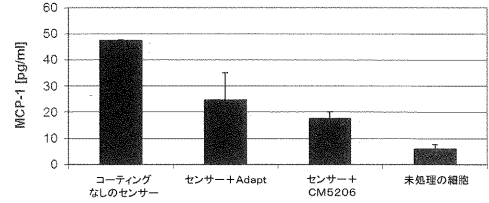
【図 1 2 a】



【図 1 4】

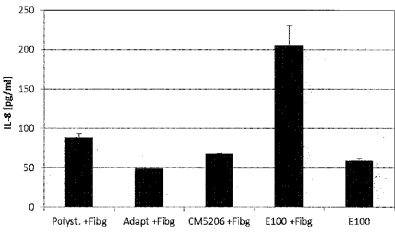


【図 1 2 b】



【図 1 3】

Figure 13



フロントページの続き

- (72)発明者 ケルカー、カールーハイント
ドイツ連邦共和国、6 7 2 6 9 グリュンシュタット、トリフトヴェーク 3 1
- (72)発明者 リーガー、エヴァルト
ドイツ連邦共和国、6 7 2 4 0 ボーベンハイムーロックスハイム、リッターズハイマー ヴェーク 1 0
- (72)発明者 リヒト、アレクサンダー
ドイツ連邦共和国、6 9 4 6 9 ヴァインハイム、ホラーツヴェーク 1 8

審査官 ▲高▼原 悠佑

- (56)参考文献 米国特許出願公開第2 0 1 1 / 0 1 9 6 2 1 6 (US, A 1)
特表2 0 0 6 - 5 1 9 0 4 9 (JP, A)
MANG A ET AL., Biocompatibility of an electrochemical sensor for continuous glucose monitoring in subcutaneous tissue, DIABETES TECHNOLOGY AND THERAPEUTICS, 2 0 0 5年 2月 1日, vol. 7, no. 1, 第163-173頁
ALI OZGUR BOZTAS ET AL., Immobilization and Release of the Redox Mediator Ferrocene Monocarboxylic Acid from within Cross-Linked p(HEMA-co-PEGMA-co-HMMA) Hydrogels, BIOMACROMOLECULES, 2 0 0 9年 8月1 0日, vol. 10, no. 8, 第2135-2143頁
ABRAHAM S ET AL., Molecularly engineered p(HEMA)-based hydrogels for implant biochip biocompatibility, BIOMATERIALS, 2 0 0 5年 8月 1日, vol. 26, no. 23, 第4767-4778頁

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
A 6 1 B 5 / 0 6 - 5 / 2 2
G 0 1 N 2 7 / 3 2 7