(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 118843620 A
(43)申请公布日 2024.10.25

(21)申请号 202380026162.X
(22)申请日 2023.03.01
(30)优先权数据
2022-034824 2022.03.07 JP
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2024.09.06
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/JP2023/007472 2023.03.01
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2023/171473 JA 2023.09.14
(71)申请人 普和希控股公司
地址 日本
(72)发明人 羽田圭吾 高原佳史
(74)专利代理机构 中科专利商标代理有限责任公司 11021
专利代理师 张毅群
(51)Int.Cl.
C07D 279/18(2006.01)
G01N 27/327(2006.01)

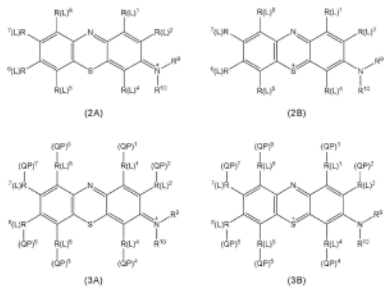
权利要求书4页 说明书41页 附图16页

(54)发明名称

电子受体、以及使用其的试剂层和传感器

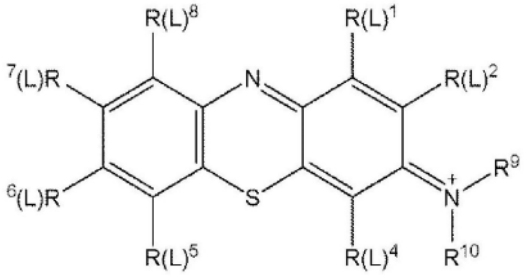
(57)摘要

本发明提供一种氧化还原聚合物或构成其的氧化还原介体,所述氧化还原聚合物用于形成适合用于长期测定(连续监测)的稳定性优异的电化学传感器。由本发明提供的氧化还原介体为通式(2A)或(2B)所示的亲水部导入型吩噻嗪系化合物,由本发明提供的氧化还原聚合物为通式(3A)或(3B)所示的聚合物键合型吩噻嗪系化合物。式中,R^9和R^{10}两者为取代基、或者任一者为取代基且另一者为氢原子,$R(L)^1$、$R(L)^2$和$R(L)^4$~$R(L)^8$为规定的基团或原子,$(QP)^1$、$(QP)^2$和$(QP)^4$~$(QP)^8$分别为:在对应的$R(L)^1$、$R(L)^2$和$R(L)^4$~$R(L)^8$为特定的基团的情况下存在的、来自于高分子量聚合物的高分子结构。

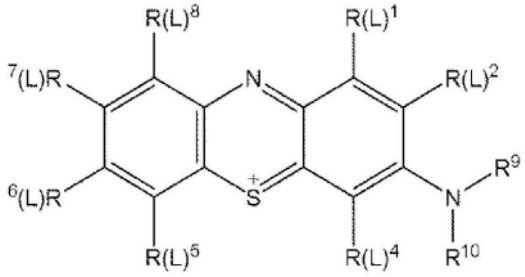


CN 118843620 A

1.一种亲水部导入型吩噻嗪系化合物,其由通式(2A)或通式(2B)表示,



(2A)



(2B)

通式(2A)和通式(2B)中,

R^9和R^{10}两者为取代基、或者任一者为取代基且另一者为氢原子,

$R(L)^1$、$R(L)^2$和$R(L)^4$～$R(L)^8$分别为:[A]任选具有取代基的羟基、任选具有取代基的羧基、任选具有取代基的氨基、任选具有取代基的碳原子数1～6的直链或支链的饱和或不饱和的烃基、任选具有取代基的酰基、或任选具有取代基的苯基;[B]通过在选自所述[A]中的键合性取代基上键合亲水部导入用化合物而形成的基团;或者[C]氢原子或卤素原子,

其中,$R(L)^1$、$R(L)^2$和$R(L)^4$～$R(L)^8$中的至少1个为所述[B]的基团。

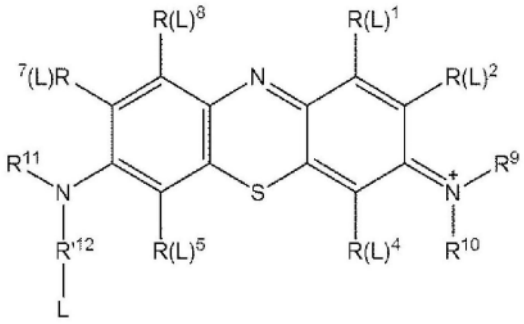
2.根据权利要求1所述的亲水部导入型吩噻嗪系化合物,其中,R^9和R^{10}中的取代基为碳原子数1～6的烷基。

3.根据权利要求1所述的亲水部导入型吩噻嗪系化合物,其中,$R(L)^1$、$R(L)^2$和$R(L)^4$～$R(L)^8$中的至少1个为通过在具有选自羧基或其活性酯体、氨基、巯基、甲酰基、环氧基和马来酰亚胺基中的至少1种反应基团的键合性取代基上键合亲水部导入用化合物而形成的基团。

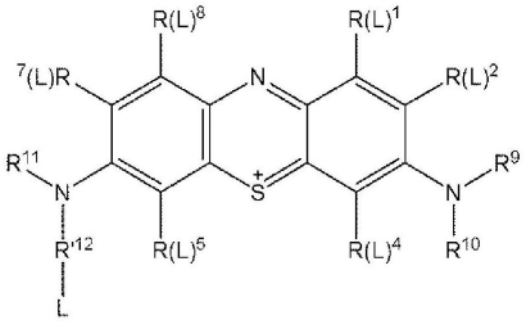
4.根据权利要求1所述的亲水部导入型吩噻嗪系化合物,其中,$R(L)^1$、$R(L)^2$和$R(L)^4$～$R(L)^8$中的至少1个为通过在作为$-NR^{11}R^{12}$所示的具有取代基的氨基的键合性取代基上键合亲水部导入用化合物而形成的基团,式$-NR^{11}R^{12}$中,R^{11}和R^{12}中的任一者为反应性N取代基,另一者为氢原子或非反应性N取代基。

5.根据权利要求1所述的亲水部导入型吩噻嗪系化合物,其中,至少$R(L)^6$是通过在键合性取代基上键合亲水部导入用化合物而形成的基团。

6.根据权利要求1所述的亲水部导入型吩噻嗪系化合物,其由通式(2A-2)或(2B-2)表示,



(2A-2)



(2B-2)

通式(2A-2)和通式(2B-2)中,R^{11}为氢原子或非反应性N取代基,R'^{12}为由反应性N取代基

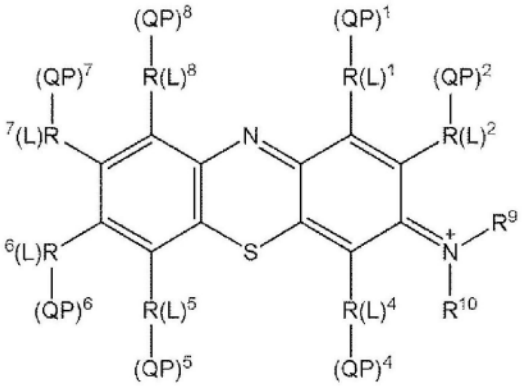
衍生的基团,L为来自于亲水部导入用化合物的亲水部,除此以外的符号与通式(2A)和通式(2B)含义相同。

7.根据权利要求1所述的亲水部导入型吩噻嗪系化合物,其中,来自于亲水部导入用化合物的亲水部包含选自羟基、氨基、羧基、磺基、季铵阳离子和由它们衍生的基团中的至少一种。

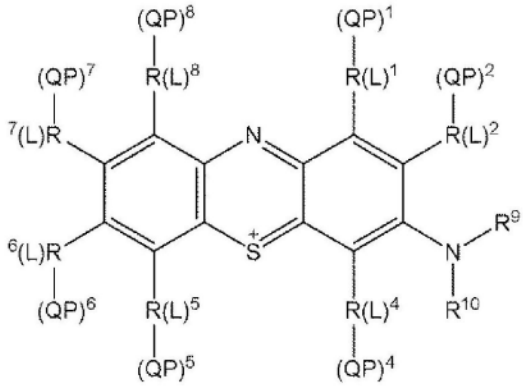
8.根据权利要求1所述的亲水部导入型吩噻嗪系化合物,其中,来自于亲水部导入用化合物的亲水部包含氧亚乙基链。

9.根据权利要求1所述的亲水部导入型吩噻嗪系化合物,其中,来自于亲水部导入用化合物的亲水部具有选自羧基或其活性酯体、氨基、巯基、甲酰基、环氧基和马来酰亚胺基中的至少1种反应基团。

10.一种聚合物键合型吩噻嗪系化合物,其由通式(3A)或通式(3B)表示,



(3A)



(3B)

通式(3A)和通式(3B)中,

R^9和R^{10}两者为取代基、或者任一者为取代基且另一者为氢原子,

$R(L)^1$、$R(L)^2$和$R(L)^4$～$R(L)^8$分别为:[A]任选具有取代基的羟基、任选具有取代基的羧基、任选具有取代基的氨基、任选具有取代基的碳原子数1～6的直链或支链的饱和或不饱和的烃基、任选具有取代基的酰基、或任选具有取代基的苯基;[B]通过在选自所述[A]中的键合性取代基上键合亲水部导入用化合物而形成的基团;[C]氢原子或卤素原子;或者[D]由选自所述[A]中的键合性取代基或所述[B]的基团中的任一者衍生的基团,

$(QP)^1$、$(QP)^2$和$(QP)^4$～$(QP)^8$分别为:在对应的$R(L)^1$、$R(L)^2$和$R(L)^4$～$R(L)^8$为所述[D]的基团时存在的来自于高分子量聚合物的高分子结构,

其中,存在$(QP)^1$、$(QP)^2$和$(QP)^4$～$(QP)^8$中的至少1个。

11.根据权利要求10所述的聚合物键合型吩噻嗪系化合物,其中,R^9和R^{10}中的取代基为碳原子数1～6的烷基。

12.根据权利要求10所述的聚合物键合型吩噻嗪系化合物,其中,$R(L)^1$、$R(L)^2$和$R(L)^4$～$R(L)^8$中的至少1个为由具有选自羧基或其活性酯体、氨基、巯基、甲酰基、环氧基和马来酰亚胺基中的至少1种反应基团的键合性取代基、或通过在该键合性取代基上键合亲水部导入用化合物而形成的基团中的任一者衍生的基团。

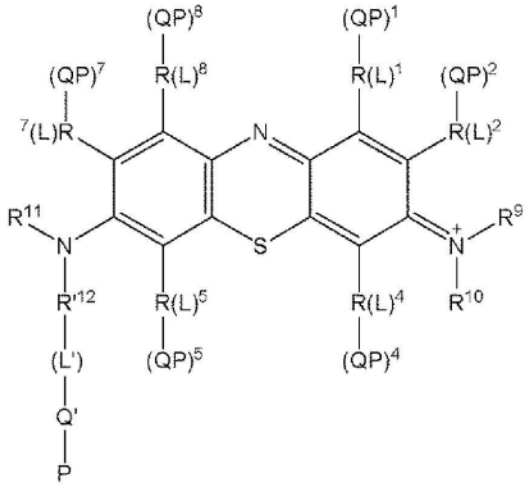
13.根据权利要求10所述的聚合物键合型吩噻嗪系化合物,其中,$R(L)^1$、$R(L)^2$和$R(L)^4$～$R(L)^8$中的至少1个为由作为$-NR^{11}R^{12}$所示的具有取代基的氨基的键合性取代基、或通过在

该键合性取代基上键合亲水部导入用化合物而形成的基团中的任一者衍生的基团,式-$NR^{11}R^{12}$中,R^{11}和R^{12}中的任一者为反应性N取代基,另一者为氢原子或非反应性N取代基。

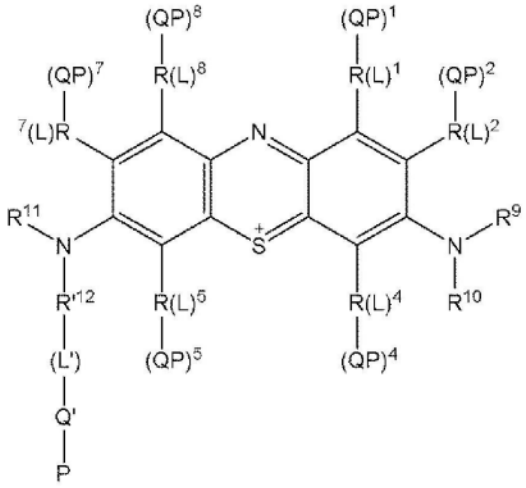
14.根据权利要求10所述的聚合物键合型吩噻嗪系化合物,其中,至少$R(L)^6$为由键合性取代基、或通过在该键合性取代基上键合亲水部导入用化合物而形成的基团中的任一者衍生的基团。

15.根据权利要求10所述的聚合物键合型吩噻嗪系化合物,其中,至少$R(L)^6$为由通过在键合性取代基上键合亲水部导入用化合物而形成的基团衍生的基团。

16.根据权利要求10所述的聚合物键合型吩噻嗪系化合物,其由通式(3A-2)或通式(3B-2)表示,



(3A-2)



(3B-2)

通式(3A-2)和通式(3B-2)中,R^{11}为氢原子或非反应性N取代基,R'^{12}为由反应性N取代基衍生的基团,(L')为任选存在的由亲水部导入用化合物衍生的基团,Q'为由高分子量聚合物的反应基团衍生的基团,P为高分子量聚合物的主链,除此以外的符号与通式(3A)和通式(3B)含义相同。

17.根据权利要求10所述的聚合物键合型吩噻嗪系化合物,其中,来自于亲水部导入用化合物的亲水部包含选自羟基、氨基、羧基、磺基、季铵阳离子和由它们衍生的基团中的至少一种。

18.根据权利要求10所述的聚合物键合型吩噻嗪系化合物,其中,来自于亲水部导入用化合物的亲水部包含氧亚乙基链。

19.根据权利要求10所述的聚合物键合型吩噻嗪系化合物,其中,$R(L)^1$、$R(L)^2$和$R(L)^4$~$R(L)^8$中的至少1个为由通过在键合性取代基上键合具有选自羧基或其活性酯体、氨基、巯基、甲酰基、环氧基和马来酰亚胺基中的至少1种反应基团的亲水部导入用化合物而形成的基团衍生的基团。

20.根据权利要求10所述的聚合物键合型吩噻嗪系化合物,其中,高分子量聚合物为选自氨基酸系聚合物、亚胺系聚合物、乙烯系聚合物和蛋白质中的至少1种。

21.根据权利要求10所述的聚合物键合型吩噻嗪系化合物,其中,高分子量聚合物为阳离子性的高分子量聚合物。

22.一种试剂层,其包含权利要求1~9中任一项所述的亲水部导入型吩噻嗪系化合物、

或权利要求10～21中任一项所述的聚合物键合型吩噻嗪系化合物。

23.根据权利要求22所述的试剂层,其还包含使分析物氧化或脱氢化的氧化还原酶。

24.根据权利要求22所述的试剂层,其中,所述氧化还原酶与所述聚合物键合型吩噻嗪系化合物进行了交联。

25.一种电化学传感器,其为对分析物进行检测或定量的电化学传感器,

所述电化学传感器具有工作电极、对电极和配置在所述工作电极上的权利要求22所述的试剂层。

26.根据权利要求25所述的电化学传感器,其还具有参比电极。

27.根据权利要求25所述的电化学传感器,其还具有至少被覆所述试剂层的保护膜。

电子受体、以及使用其的试剂层和传感器

技术领域

[0001] 本发明涉及电子受体、以及使用其的试剂层和传感器。更详细而言,本发明涉及作为具有吩噻嗪结构的化合物的电子受体(氧化还原介体)、以及包含该电子受体的试剂层、具有该试剂层的传感器。

背景技术

[0002] 以往,已知有使蛋白质作用于试样中的分析物来测定分析物的传感器。作为这样的传感器,可举出:使用酶的电化学传感器,例如,使用葡萄糖氧化还原酶和根据需要的氧化还原介体(介导电子传递的氧化还原物质)、氧化还原聚合物(介由连接体(日文:リンカー)等使氧化还原介体键合而成的聚合物)等制作的葡萄糖传感器。葡萄糖传感器例如用于血糖值的自我检查,以往,通常采取微量的血液作为试样,但近年来,还开发了植入到生物体内而连续地测定血液中或间质中的葡萄糖的植入型的电化学式葡萄糖传感器。另外,葡萄糖传感器也用于测定生物体物质外的试样、例如培养基中的葡萄糖。这种葡萄糖传感器通常在数天~数周这样的长时间内连续或半连续地进行试样中的葡萄糖浓度的测定。

[0003] 以这样的电化学式葡萄糖传感器为代表的连续监测传感器需要进行长时间的测定,因此期望所使用的传感器材料(酶、介体等)的稳定性高。针对这样的迫切期望,作为提高酶自身的稳定性的技术,例如在专利文献1中记载了:与以往使用的葡萄糖氧化酶相比保存稳定性(长期稳定性)优异的、即在体内等经过长时间后的残留酶活性高的、具有特定的氨基酸序列的FAD依赖性葡萄糖脱氢酶突变体;使用其的连续葡萄糖监测器件。另外,作为与氧化还原介体和氧化还原聚合物的稳定性的提高相关的技术,例如在专利文献2中例示了:包含使用时和保存时的稳定性高的过渡金属络合物的氧化还原介体、以及其进行键合而成的聚合物。

[0004] 现有技术文献

[0005] 专利文献

[0006] 专利文献1:日本特开2018-201486号公报

[0007] 专利文献2:美国专利第8444834号说明书

发明内容

[0008] 发明要解决的课题

[0009] 本发明的一个方面的课题在于,提供适合用于长期测定(连续监测)的、稳定性优异的电化学传感器。本发明的另一个方面的课题在于,提供用于形成上述那样的电化学传感器的试剂层的氧化还原聚合物或构成该氧化还原聚合物的氧化还原介体。

[0010] 用于解决课题的手段

[0011] 本发明人等发现,对于在吩噻嗪骨架的3位具有亚胺阳离子的吩噻嗪系化合物而言,即使在该骨架的其他位置(例如6位)键合有亲水部(例如包含聚乙二醇链的结构)的情况下、键合有高分子量聚合物的情况下,电子授受的功能的稳定性也优异,适合作为用于制

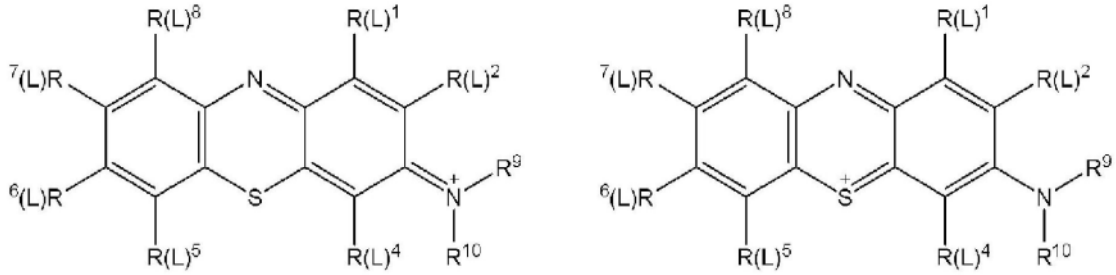
作在生物体内、培养基内这样的湿润环境中的长期测定时使用的电化学传感器的氧化还原介体。

[0012] 即,本发明至少包括下述事项。

[0013] [1]

[0014] 一种亲水部导入型吩噻嗪系化合物,其由通式(2A)或(2B)表示:

[0015] [化学式1]

[0016] 

(2A) (2B)

[0017] 式中,

[0018] R^9和R^{10}两者为取代基、或者任一者为取代基且另一者为氢原子,

[0019] $R(L)^1$、$R(L)^2$和$R(L)^4$~$R(L)^8$分别为:[A]可以具有取代基的羟基、可以具有取代基的羧基、可以具有取代基的氨基、可以具有取代基的碳原子数1~6的直链或支链的饱和或不饱和的烃基、可以具有取代基的酰基、或可以具有取代基的苯基;[B]通过在选自上述[A]中的键合性取代基上键合亲水部导入用化合物而形成的基团;或者[C]氢原子或卤素原子。

[0020] 其中,$R(L)^1$、$R(L)^2$和$R(L)^4$~$R(L)^8$中的至少1个为上述[B]的基团。

[0021] [2]

[0022] 根据项1中记载的亲水部导入型吩噻嗪系化合物,其中,R^9和R^{10}中的取代基为碳原子数1~6的烷基。

[0023] [3]

[0024] 根据项1或2中记载的亲水部导入型吩噻嗪系化合物,其中,$R(L)^1$、$R(L)^2$和$R(L)^4$~$R(L)^8$中的至少1个为通过在具有选自羧基或其活性酯体、氨基、巯基、甲酰基、环氧基和马来酰亚胺基中的至少1种反应基团的键合性取代基上键合亲水部导入用化合物而形成的基团。

[0025] [4]

[0026] 根据项1~3中任一项记载的亲水部导入型吩噻嗪系化合物,其中,$R(L)^1$、$R(L)^2$和$R(L)^4$~$R(L)^8$中的至少1个为通过在作为$-NR^{11}R^{12}$(式中,R^{11}和R^{12}中的任一者为反应性N取代基,另一者为氢原子或非反应性N取代基。)所示的具有取代基的氨基的键合性取代基上键合亲水部导入用化合物而形成的基团。

[0027] [5]

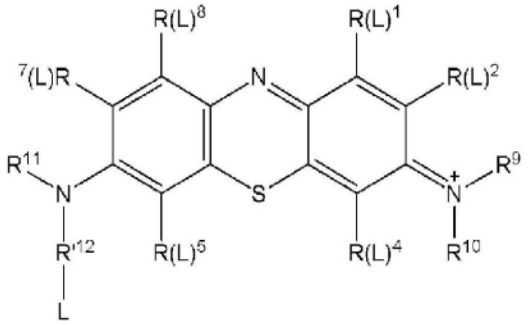
[0028] 根据项1~4中任一项记载的亲水部导入型吩噻嗪系化合物,其中,至少$R(L)^6$是通过在键合性取代基上键合亲水部导入用化合物而形成的基团。

[0029] [6]

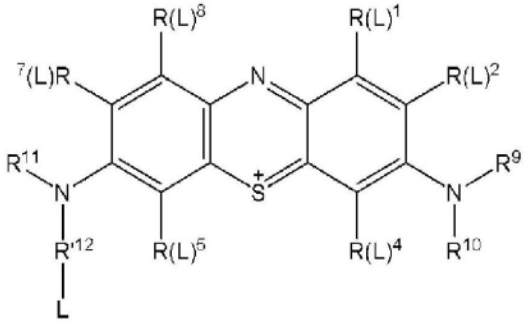
[0030] 根据项1~5中任一项记载的亲水部导入型吩噻嗪系化合物,其由通式(2A-2)或

(2B-2)表示：

[0031] [化学式2]

[0032] 

(2A-2)



(2B-2)

[0033] 式中，R^{11}为氢原子或非反应性N取代基，R'^{12}为由反应性N取代基衍生的基团，L为来自于亲水部导入用化合物的亲水部，除此以外的符号与通式(2A)和(2B)含义相同。

[0034] [7]

[0035] 根据项1～6中任一项记载的亲水部导入型吩噻嗪系化合物，其中，来自于亲水部导入用化合物的亲水部包含选自羟基、氨基、羧基、磺基、季铵阳离子和由它们衍生的基团中的至少一种。

[0036] [8]

[0037] 根据项1～7中任一项记载的亲水部导入型吩噻嗪系化合物，其中，来自于亲水部导入用化合物的亲水部包含氧亚乙基链。

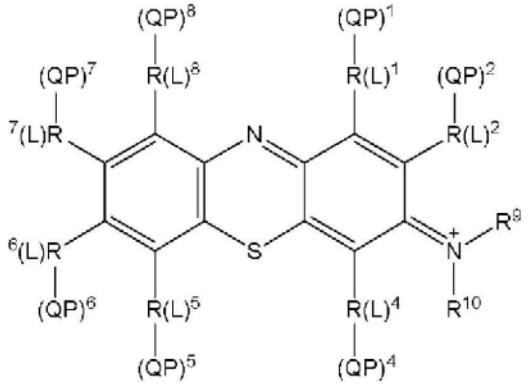
[0038] [9]

[0039] 根据项1～8中任一项记载的亲水部导入型吩噻嗪系化合物，其中，来自于亲水部导入用化合物的亲水部具有选自羧基或其活性酯体、氨基、巯基、甲酰基、环氧基和马来酰亚胺基中的至少1种反应基团。

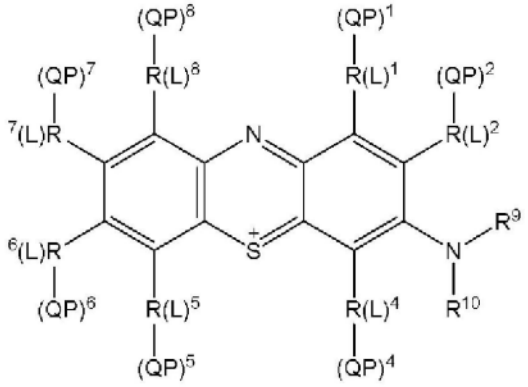
[0040] [10]

[0041] 一种聚合物键合型吩噻嗪系化合物，其由通式(3A)或(3B)表示：

[0042] [化学式3]

[0043] 

(3A)



(3B)

[0044] 式中，

[0045] R^9和R^{10}两者为取代基、或者任一者为取代基且另一者为氢原子，

[0046] $R(L)^1$、$R(L)^2$和$R(L)^4$～$R(L)^8$分别为：[A]可以具有取代基的羟基、可以具有取代基

的羧基、可以具有取代基的氨基、可以具有取代基的碳原子数1～6的直链或支链的饱和或不饱和的烃基、可以具有取代基的酰基、或可以具有取代基的苯基;[B]通过在选自上述[A]中的键合性取代基上键合亲水部导入用化合物而形成的基团;[C]氢原子或卤素原子;或者[D]由选自上述[A]中的键合性取代基或上述[B]的基团中的任一者衍生的基团,

[0047] $(QP)^1$、$(QP)^2$和$(QP)^4$～$(QP)^8$分别为:在对应的$R(L)^1$、$R(L)^2$和$R(L)^4$～$R(L)^8$为上述[D]的基团时存在的来自于高分子量聚合物的高分子结构。

[0048] 其中,存在$(QP)^1$、$(QP)^2$和$(QP)^4$～$(QP)^8$中的至少1个。

[0049] [11]

[0050] 根据项10中记载的聚合物键合型吩噻嗪系化合物,其中,R^9和R^{10}中的取代基为碳原子数1～6的烷基。

[0051] [12]

[0052] 根据项10或11中记载的聚合物键合型吩噻嗪系化合物,其中,$R(L)^1$、$R(L)^2$和$R(L)^4$～$R(L)^8$中的至少1个为由具有选自羧基或其活性酯体、氨基、巯基、甲酰基、环氧基和马来酰亚胺基中的至少1种反应基团的键合性取代基、或通过在该键合性取代基上键合亲水部导入用化合物而形成的基团中的任一者衍生的基团。

[0053] [13]

[0054] 根据项10～12中任一项记载的聚合物键合型吩噻嗪系化合物,其中,$R(L)^1$、$R(L)^2$和$R(L)^4$～$R(L)^8$中的至少1个为由作为$-NR^{11}R^{12}$(式中,R^{11}和R^{12}中的任一者为反应性N取代基,另一者为氢原子或非反应性N取代基。)所示的具有取代基的氨基的键合性取代基、或通过在该键合性取代基上键合亲水部导入用化合物而形成的基团中的任一者衍生的基团。

[0055] [14]

[0056] 根据项10～13中任一项记载的聚合物键合型吩噻嗪系化合物,其中,至少$R(L)^6$为由键合性取代基、或通过在该键合性取代基上键合亲水部导入用化合物而形成的基团中的任一者衍生的基团。

[0057] [15]

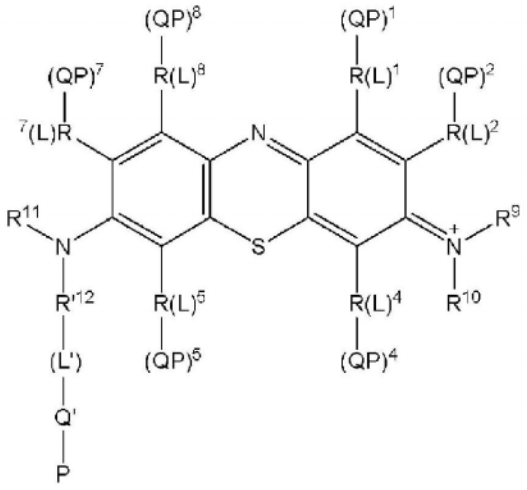
[0058] 根据项10～14中任一项记载的聚合物键合型吩噻嗪系化合物,其中,至少$R(L)^6$为由通过在键合性取代基上键合亲水部导入用化合物而形成的基团衍生的基团。

[0059] [16]

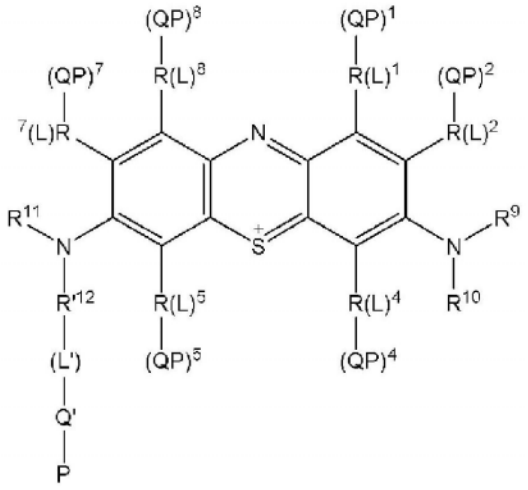
[0060] 根据项10～15中任一项记载的聚合物键合型吩噻嗪系化合物,其由通式(3A-2)或(3B-2)表示:

[0061] [化学式4]

[0062]



(3A-2)



(3B-2)

[0063] 式中,R^{11}为氢原子或非反应性N取代基,R'^{12}为由反应性N取代基衍生的基团,(L')为任选存在的由亲水部导入用化合物衍生的基团,Q'为由高分子量聚合物的反应基团衍生的基团,P为高分子量聚合物的主链,除此以外的符号与通式(3A)和(3B)含义相同。

[0064] [17]

[0065] 根据项10~16中任一项记载的聚合物键合型吩噻嗪系化合物,其中,来自于亲水部导入用化合物的亲水部包含选自羟基、氨基、羧基、磺基、季铵阳离子和由它们衍生的基团中的至少一种。

[0066] [18]

[0067] 根据项10~17中任一项记载的聚合物键合型吩噻嗪系化合物,其中,来自于亲水部导入用化合物的亲水部包含氧亚乙基链。

[0068] [19]

[0069] 根据项10~18中任一项记载的聚合物键合型吩噻嗪系化合物,其中,$R(L)^1$、$R(L)^2$和$R(L)^4$~$R(L)^8$中的至少1个为由通过在键合性取代基上键合具有选自羧基或其活性酯体、氨基、巯基、甲酰基、环氧基和马来酰亚胺基中的至少1种反应基团的亲水部导入用化合物而形成的基团衍生的基团。

[0070] [20]

[0071] 根据项10~19中任一项记载的聚合物键合型吩噻嗪系化合物,其中,高分子量聚合物为选自氨基酸系聚合物、亚胺系聚合物、乙烯系聚合物和蛋白质中的至少1种。

[0072] [21]

[0073] 根据项10~20中任一项记载的聚合物键合型吩噻嗪系化合物,其中,高分子量聚合物为阳离子性的高分子量聚合物。

[0074] [22]

[0075] 一种试剂层,其包含项1~9中任一项记载的亲水部导入型吩噻嗪系化合物、或项10~21中任一项记载的聚合物键合型吩噻嗪系化合物。

[0076] [23]

[0077] 根据项22中记载的试剂层,其还包含使分析物氧化或脱氢化的氧化还原酶。

[0078] [24]

[0079] 根据项22或23中记载的试剂层,其中,上述氧化还原酶与上述聚合物键合型吩噻嗪系化合物进行了交联。

[0080] [25]

[0081] 一种电化学传感器,其为对分析物进行检测或定量的电化学传感器,

[0082] 上述电化学传感器具有工作电极、对电极和配置在上述工作电极上的项22～24中任一项记载的试剂层。

[0083] [26]

[0084] 根据项25中记载的电化学传感器,其还具有参比电极。

[0085] [27]

[0086] 根据项25或26中记载的电化学传感器,其还具有至少被覆上述试剂层的保护膜。

[0087] 发明效果

[0088] 本发明的聚合物键合型吩噻嗪系化合物、亲水部导入型吩噻嗪系化合物的电子授受功能的稳定性、例如生物体内或培养环境中的稳定性等优异。通过将这样的聚合物键合型吩噻嗪系化合物、亲水部导入型吩噻嗪系化合物用作氧化还原聚合物或氧化还原介体,能够提供适合用于长期测定(连续监测)的、耐久性优异的电化学传感器。

附图说明

[0089] 图1是本发明的一个实施方式中的传感器的俯视图。图1的(A)表示传感器整体,图1的(B)放大表示传感器的前端部分。

[0090] 图2是图1的(B)的特定部分的传感器的剖视图。图2的(A)是图1的(B)的AA向观察剖视图。图2的(B)是图1的(B)的BB向观察剖视图。图2的(C)是图1的(B)的CC向观察剖视图。

[0091] 图3是表示本发明的一个实施方式中的传感器的表侧(具有工作电极和参比电极的一侧)的另一个例子的俯视图。

[0092] 图4是图3中的A-A’切断线处的剖视图。

[0093] 图5是图4中的B-B’切断线处的剖视图。

[0094] 图6是图4中的C-C’切断线处的剖视图。

[0095] 图7是本发明的一个实施方式中的传感器的俯视图。图7的(A)表示形成膜(绝缘性抗蚀膜)之前的电极图案,图7的(B)表示形成膜之后的电极图案。

[0096] 图8是参考比较例1-1和1-2的PNT化合物、以及它们的光学试验的吸收光谱和氧化还原反应试验的循环伏安图。

[0097] 图9是参考实施例1-1～1-3的PNT化合物、以及它们的光学试验的吸收光谱和氧化还原反应试验的循环伏安图。

[0098] 图10是参考实施例1-4和1-5的PNT化合物、以及它们的光学试验的吸收光谱和氧化还原反应试验的循环伏安图。

[0099] 图11是实施例2-1的PNT化合物、以及其光学试验的吸收光谱和氧化还原反应试验的循环伏安图。

[0100] 图12是实施例2-2的PNT化合物、以及其光学试验的吸收光谱和氧化还原反应试验的循环伏安图。

[0101] 图13是实施例2-3的PNT化合物、以及其光学试验的吸收光谱和氧化还原反应试验

的循环伏安图。

[0102] 图14是实施例3-1～3-4的聚合物键合型PNT化合物的、PBS中的光学试验的吸收光谱。

[0103] 图15是实施例3-2～3-4的聚合物键合型PNT化合物的、磷酸钠缓冲液(pH6或pH8)中的光学试验的吸收光谱。

[0104] 图16是实施例3-2～3-4的聚合物键合型PNT化合物的、电化学响应性试验的循环伏安图。

[0105] 图17是实施例3-2～3-4的聚合物键合型PNT化合物的、电化学响应性-耐久性试验的循环伏安图。

[0106] 图18是表示实施例3-3和3-4的聚合物键合型PNT化合物的、传感器耐久性试验中的传感器响应性的图。

[0107] 附图标记说明

[0108] 11:传感器(探针)

[0109] 21:基板

[0110] 22:电极

[0111] 22a:工作电极

[0112] 22b:参比电极

[0113] 22c:对电极

[0114] 23:试剂层

[0115] 24:银/氯化银层

[0116] 25:膜

[0117] X1:传感器头部

[0118] X2:传感器向生物体的插入方向

[0119] X3:对电极的未被膜被覆的区域

[0120] X4:传感器头部的未被膜被覆的区域

[0121] X5:未形成试剂层的区域

[0122] X6:未形成试剂层和电极(工作电极)的(被修整的)区域

[0123] 101:传感器

[0124] 111:绝缘性基板

[0125] 112:导电性薄膜

[0126] 112a:工作电极区域

[0127] 112b:参比电极区域

[0128] 112c:对电极区域

[0129] 113:槽

[0130] 114:工作电极

[0131] 115:参比电极

[0132] 116a:绝缘性抗蚀膜(上表面)

[0133] 116b:绝缘性抗蚀膜(下表面)

[0134] 117:对电极

[0135] 118:试剂层

[0136] 119:保护膜

[0137] 121:感测部

[0138] 122:端子部

[0139] 201:传感器

[0140] 202:感测部

[0141] 203:端子部

[0142] 204:凹口部

[0143] 210:基板

[0144] 220:电极

[0145] 221:第1工作电极

[0146] 221a:第1工作电极的感测部中的露出区域

[0147] 221b:第1工作电极的端子部中的露出区域

[0148] 222:第2工作电极

[0149] 222a:第2工作电极的感测部中的露出区域

[0150] 222b:第2工作电极的端子部中的露出区域

[0151] 223:参比电极

[0152] 223a:参比电极的感测部中的露出区域

[0153] 223b:参比电极的端子部中的露出区域

[0154] 224:对电极

[0155] 224a:对电极的感测部中的露出区域

[0156] 224b:对电极的端子部中的露出区域

[0157] 225:槽

[0158] 230:膜(绝缘性抗蚀膜)

具体实施方式

[0159] 以下,进一步对本发明中的吩噻嗪系化合物、亲水部导入型吩噻嗪系化合物、聚合物键合型吩噻嗪系化合物、试剂层、电化学传感器等的实施方式进行详细说明。

[0160] 在本说明书中,下述术语分别具有如下含义。

[0161] •“化合物(N)”(N例如为1A、1B等)…通式(N)所示的化合物。

[0162] •“亚胺阳离子”…在通式(1A)等的吩噻嗪骨架的3位导入的、由$=N^{+}R^{9}R^{10}$表示的取代基。

[0163] •“C_{n-m}”…(取代基等的)碳原子数为n～m。

[0164] •“反应性N取代基”…具有能够形成共价键或非共价键的反应基团的、氨基的氮原子上的取代基,。

[0165] •“非反应性N取代基”…不具有能够形成共价键或非共价键的反应基团的、氨基的氮原子上的取代基。

[0166] •“键合性取代基”…其为化合物所具有的取代基(在本说明书中,特别是吩噻嗪系化合物所具有、吩噻嗪骨架上的取代基),且为通过具有能够与键合对象物(在本说明书

中,特别是亲水部导入用化合物或高分子量聚合物)所具有的反应基团进行反应的基团,从而能够使该化合物与该键合对象物键合的基团。

[0167] • "吩噻嗪系化合物的特定键合性取代基"…其为吩噻嗪系化合物所具有的、在吩噻嗪骨架上的取代基(式(1A)和(1B)中的R^1、R^2、R^4~R^8),且为能够与亲水部导入用化合物或高分子量聚合物键合的基团。

[0168] • "吩噻嗪系化合物(特定键合性取代基)的特定反应基团"…吩噻嗪系化合物所具有的、由特定键合性取代基的一部分或整体构成的、能够与亲水部导入用化合物的第1特定反应基团或高分子量聚合物的特定反应基团进行反应的基团。

[0169] • "亲水部导入用化合物的第1特定反应基团"…亲水部导入用化合物所具有的、能够与吩噻嗪系化合物(特定键合性取代基)的特定反应基团进行反应的基团。

[0170] • "亲水部导入用化合物的第2特定反应基团"…亲水部导入用化合物可以任选具有的、能够与高分子量聚合物的特定反应基团进行反应的基团。亲水部导入用化合物与吩噻嗪系化合物键合,作为亲水部被导入至吩噻嗪系化合物,由此该亲水部导入用化合物的第2特定反应基团成为亲水部的特定反应基团。

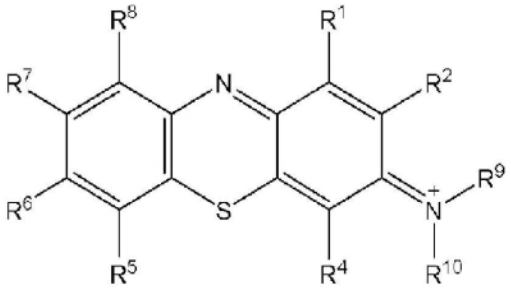
[0171] • "高分子量聚合物的特定反应基团"…高分子量聚合物在侧链(和末端)所具有的、能够与亲水部导入用化合物的(被导入到吩噻嗪系化合物中的亲水部所具有的)第2特定反应基团或吩噻嗪系化合物的特定键合性取代基所具有的特定反应基团进行反应的基团。

[0172] -吩噻嗪系化合物-

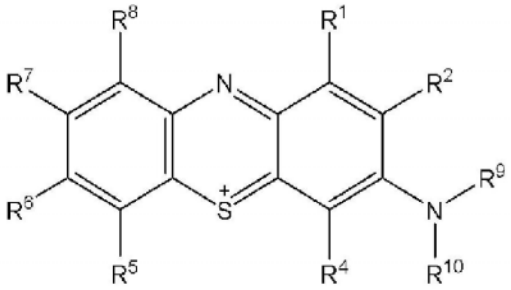
[0173] 本发明中的吩噻嗪系化合物是可以作为"氧化还原介体"使用的物质。"氧化还原介体"是指介导电子传递的氧化还原物质,例如是指负责电子的传递的物质,电子的传递通过利用氧化还原酶进行的分析物的氧化还原反应而产生。作为氧化还原介体,已知铁氰化物、二茂铁等各种化合物,吩噻嗪系化合物的氧化还原电位(vs.Ag/AgCl·饱和KCl)为负(低于0V),不易受到试样中所含的、对于电化学测定而言为夹杂物、例如生物体试样中或培养基试样中所含的不为分析物的抗坏血酸(维生素C)、尿酸等易氧化性化合物的影响,因此可以说是优选的氧化还原介体。

[0174] 本发明中的吩噻嗪系化合物为通式(1A)或(1B)所示的化合物。通式(1A)所示的化合物、即化合物(1A)在吩噻嗪骨架的3位导入有$=N^+R^9R^{10}$所示的取代基(亚胺阳离子)。另外,通式(1B)所示的化合物、即化合物(1B)与化合物(1A)为共振结构的关系。明确了通式(1A)所示的化合物是也可以由通式(1B)表示的化合物,通式(1B)所示的化合物是也可以由通式(1A)表示的化合物。在本说明书中,只要没有特别说明,则有关通式(1A)所示的化合物的记载事项能够用作有关通式(1B)所示的化合物的记载事项,有关通式(1B)所示的化合物的记载事项能够用作有关通式(1A)所示的化合物的记载事项。

[0175] [化学式5]

[0176] 

(1A)



(1B)

[0177] 通式(1A)和(1B)中的各符号的定义如下所述。

[0178] R^9和R^{10}两者为取代基,或者任一者为取代基且另一者为氢原子(R^9和R^{10}两者不同时为氢原子)。

[0179] 作为R^9和R^{10}的“取代基”只要是能够形成本发明的吩噻嗪系化合物在规定的位置具有亚胺阳离子的化合物(1A)、或具有其共振结构的化合物(1B)的取代基就没有特别限定,例如可举出(vi)“可以具有取代基的直链或支链的饱和或不饱和的烃基”。作为该烃基,例如优选碳原子数1~6的(C_{1-6})烃基,特别优选甲基。

[0180] R^1、R^2和R^4~R^8各自独立地表示下述(i)~(viii)中的任一基团或原子:

[0181] (i)氢原子;

[0182] (ii)卤素原子;

[0183] (iii)可以具有取代基的羟基;

[0184] (iv)可以具有取代基的羧基;

[0185] (v)可以具有取代基的氨基;

[0186] (vi)可以具有取代基的饱和或不饱和的烃基(例如C_{1-15}烷基,优选C_{1-6}烷基);

[0187] (vii)可以具有取代基的酰基(例如C_{1-6}酰基、即C_{1-6}烷基-羰基);

[0188] (viii)可以具有取代基的苯基。

[0189] 作为上述(iii)~(viii)的取代基所可以具有的取代基,例如可举出:包含(a)卤素原子、(b)羟基、(c)羧基或其活性酯体(例如N-羟基琥珀酰亚胺酯(NHS))、(d)氨基、(e)直链或支链的饱和或不饱和的烃基(例如C_{1-15}烷基,优选C_{1-6}烷基,更优选C_{1-3}烷基)、(f)酰基(例如C_{1-6}酰基,优选C_{1-3}酰基)、(g)胍基、(h)甲磺酰基、(i)苯基、(j)巯基、(k)甲酰基(醛基)、(l)环氧基、(m)马来酰亚胺基中的至少1个的基团。即,上述(iii)~(viii)的取代基所可以具有的取代基可以是:由上述(a)~(m)中的任一者单独构成的基团,也可以是由选自上述(a)~(m)中的2个或3个以上构成的基团,例如,进一步被(c)羧基或其活性酯体、(d)氨基、(j)巯基、(k)甲酰基、(l)环氧基或(m)马来酰亚胺基取代的(e)直链或支链的饱和或不饱和的烃基这样的基团。本领域技术人员可以从(a)~(m)中选择分别对于上述(iii)~(viii)而言在化学上适当的取代基,或者从(a)~(m)中选择在化学上适当的2个或3个以上的取代基并进行连接,由此来实施本发明。

[0190] 上述(iii)~(viii)各自所可以具有的取代基的数量没有特别限定,例如可以为1个、2个或3个,另外,可以在一个原子(例如烷基的碳原子、氨基的氮原子)上键合有多个取代基。

[0191] R^1、R^2和R^4~R^8可以是具有与特定的化合物或聚合物的键合性的基团,也可以是不

具有这样的键合性的基团。例如,R^1、R^2和R^4～R^8可以是在“亲水部导入型吩噻嗪系化合物”的制作中具有与亲水部导入用化合物的键合性的、用于向吩噻嗪系化合物导入亲水部的取代基。另外,R^1、R^2和R^4～R^8可以是具有与高分子量聚合物的键合性的取代基,在该情况下,能够制作吩噻嗪系化合物与高分子量聚合物不借助上述那样的亲水部而是直接键合的“聚合物键合型吩噻嗪系化合物”。另一方面,R^1、R^2和R^4～R^8也可以是其自身(即使不与亲水部导入用化合物键合)有助于提高吩噻嗪系化合物的亲水性的亲水基团。此外,R^1、R^2和R^4～R^8可以是与作为氧化还原介体的性能相关的基团。

[0192] ＜吩噻嗪系化合物的特定键合性取代基＞

[0193] 在本发明的吩噻嗪系化合物的优选的一个实施方式中,R^1、R^2和R^4～R^8中的任1个以上为具有与亲水部导入用化合物或高分子量聚合物的键合性的取代基(本发明中的吩噻嗪系化合物的“特定键合性取代基”)。在本实施方式中,特别优选至少R^6为特定键合性取代基。除了R^1、R^2和R^4～R^8中为特定键合性取代基的基团以外,例如可以全部为氢原子,也可以为氢以外的不成为特定键合性取代基的原子或取代基。

[0194] 特定键合性取代基可以设为:从作为R^1、R^2和R^4～R^8的具体例而示出的上述(iii)～(viii)中选择的、适于与亲水部导入用化合物或高分子量聚合物的键合的取代基,即具有能够在适当的条件下与亲水部导入用化合物的第1特定反应基团或高分子量聚合物的特定反应基团进行反应的基团的取代基。上述(iii)～(viii)中,实质上无法与亲水部导入用化合物或高分子量聚合物键合的基团、或产业上难以进行键合的基团(例如未取代的苯基)被排除在本发明的特定键合性取代基之外。关于上述(iii)～(viii),可以是各自的基团本身(不具有取代基的状态的基团)成为能够与亲水部导入用化合物的第1特定反应基团或高分子量聚合物的特定反应基团进行反应的基团(本发明中的吩噻嗪系化合物(特定键合性取代基)的“特定反应基团”)的基团,也可以是上述(iii)～(viii)各自的基团所具有的取代基的一部分或整体成为特定反应基团的基团。在上述任一实施方式中,均可以说是吩噻嗪系化合物(特定键合性取代基)“具有”特定反应基团。

[0195] ＜吩噻嗪系化合物(特定键合性取代基)的特定反应基团＞

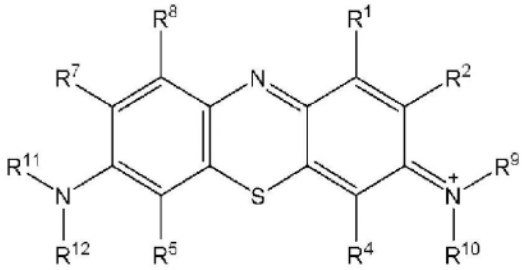
[0196] “吩噻嗪系化合物(特定键合性取代基)的特定反应基团”只要能够与用于导入亲水部的亲水部导入用化合物所具有的第1特定反应基团或高分子量聚合物所具有的特定反应基团进行反应就没有特别限定,可以从公知的各种反应基团中选择。

[0197] 作为吩噻嗪系化合物的特定反应基团,例如优选为“选自羧基或其活性酯体(例如NHS体)、氨基、巯基、甲酰基(醛基)、环氧基和马来酰亚胺基中的至少1种”。优选的是,这样的吩噻嗪系化合物的特定反应基团为特定键合性取代基所具有的反应基团,即上述(iii)～(viii)的基团具有上述(c)、(d)、(j)、(k)、(l)、(m)等取代基作为特定反应基团。另外,吩噻嗪系化合物的特定反应基团可以根据需要键合有保护基,可以在用于使吩噻嗪系化合物与亲水部导入用化合物或高分子量聚合物键合的反应之前进行脱保护。

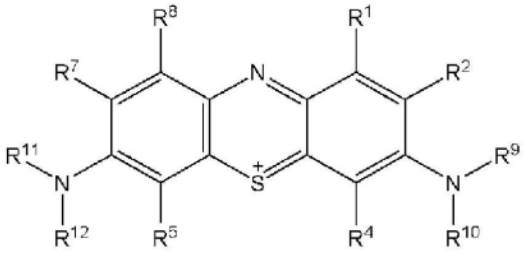
[0198] 在本发明的吩噻嗪系化合物的优选的一个实施方式中,R^1、R^2和R^4～R^8中的任1个以上、特别优选至少R^6为作为特定键合性取代基的、上述(v)“可以具有取代基的氨基”、即式:$-NR^{11}R^{12}$(式中,R^{11}和R^{12}分别表示氢原子或取代基。)所示的基团。在本实施方式中,优选的是,成为特定键合性取代基的$-NR^{11}R^{12}$所示的基团为“具有取代基的氨基”,且R^{11}和R^{12}的任一者或两者、优选任一者为具有特定反应基团的取代基(反应性N取代基,例如被羧基取代

的C_{1-6}烷基:-$(CH_2)_{1-6}$-COOH),另一者为氢原子或不具有特定反应基团的取代基(非反应性N取代基,例如C_{1-6}烷基)。另一方面,也可以是:R^{11}和R^{12}两者均为氢原子,即-$NR^{11}R^{12}$表示未取代的氨基,将该未取代的氨基作为特定键合性取代基(吩噻嗪系化合物的特定反应基团)。作为一个例子,本发明的吩噻嗪系化合物可以由下述通式(1A-1)和(1B-1)表示。

[0199] [化学式6]

[0200] 

(1A-1)



(1B-1)

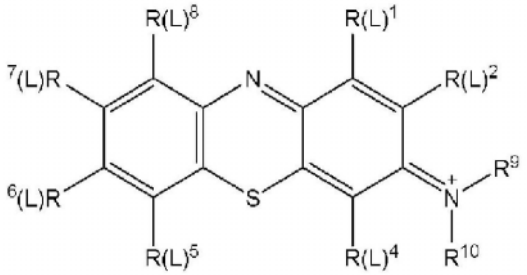
[0201] 通式(1A-1)和(1B-1)中,R^{11}为氢原子或非反应性N取代基,R^{12}为反应性N取代基,除此以外的符号与上述通式(1A)和(1B)含义相同。

[0202] 本发明中的吩噻嗪系化合物(包括亲水部导入型吩噻嗪系化合物和聚合物键合型吩噻嗪系化合物。)可以形成盐。在本发明的吩噻嗪系化合物包含带正电的部分(阳离子)的情况下,能够形成与带负电的离子(阴离子种)的盐,在本发明的吩噻嗪系化合物包含带负电的部分(阴离子)的情况下,能够形成与带正电的离子(阳离子种)的盐。作为阴离子种,例如可举出:卤素离子、含卤素的化合物的离子、氢氧根离子、羧酸根离子、硝酸根离子、亚硝酸根离子、甲酸根离子、乙酸根离子、丙酸根离子、丁酸根离子、碳酸氢根离子、磷酸二氢根离子、硫酸氢根离子、烷基磺酸根离子、硫氢根离子、草酸氢根离子、氰酸根离子和硫氰酸根离子等。作为阳离子种,例如可举出:钠离子、钾离子等碱金属离子、钙离子、镁离子、钡离子等碱土金属离子、铝离子等金属离子、胆碱离子等季铵阳离子、铵离子、包含氨基或取代氨基的化合物的离子、吡啶鎓离子、包含吡啶基或取代吡啶基的化合物的离子等。

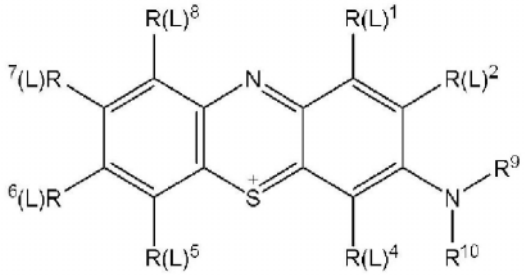
[0203] -亲水部导入型吩噻嗪系化合物-

[0204] 本发明的亲水部导入型吩噻嗪系化合物是在上述本发明中的吩噻嗪系化合物中导入了“亲水部”的化合物,即在通式(1A)或(1B)中的R^1、R^2和R^4~R^8中的任1个以上的部位导入了亲水部(L)的化合物。这样的化合物可以由通式(2A)或(2B)表示。

[0205] [化学式7]

[0206] 

(2A)



(2B)

[0207] 通式(2A)和(2B)中的各符号的定义如下所述。

[0208] R^9和R^{10}两者为取代基、或者任一者为取代基且另一者为氢原子。(与通式(1A)和

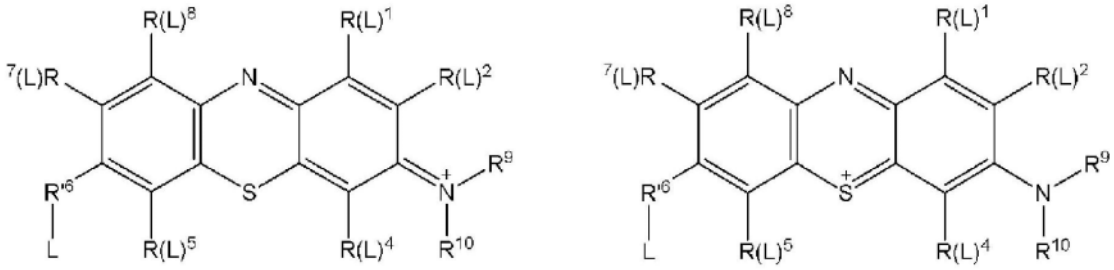
(1B)中的定义含义相同。)

[0209] R(L)^1、R(L)^{2}和R(L)^4～R(L)^{8}分别为:[A]可以具有取代基的羟基、可以具有取代基的羧基、可以具有取代基的氨基、可以具有取代基的碳原子数1～6的直链或支链的饱和或不饱和的烃基、可以具有取代基的酰基、或可以具有取代基的苯基;[B]通过在选自上述[A]中的键合性取代基上键合亲水部导入用化合物而形成的基团;或者[C]氢原子或卤素原子。即,在可以具有取代基的羟基、可以具有取代基的羧基、可以具有取代基的氨基、可以具有取代基的碳原子数1～6的直链或支链的饱和或不饱和的烃基、可以具有取代基的酰基、或者可以具有取代基的苯基上,可以分别进一步键合亲水部导入用化合物(即,可以导入有亲水部),也可以不键合亲水部导入用化合物(即,可以不导入亲水部)。其中,R(L)^1、R(L)^{2}和R(L)^4～R(L)^{8}中的至少1个为上述[B]的基团、即通过在上述[A]的基团上键合亲水部导入用化合物而形成的(即,导入有亲水部)基团。在R(L)^1、R(L)^{2}和R(L)^4～R(L)^{8}中的2个以上为这样的基团的情况下,各自的亲水部可以相同也可以不同。

[0210] 在本发明的亲水部导入型吩噻嗪系化合物的优选的一个实施方式中,至少在R(L)^{6}中导入亲水部,也可以根据需要进一步在R(L)^1、R(L)^2、R(L)^4、R(L)^5、R(L)^{7}和R(L)^{8}中的1个以上中导入亲水部。该实施方式的亲水部导入型吩噻嗪系化合物相当于如下情形:在通式(2A)和(2B)中,至少R(L)^{6}为通过在具有亲水部导入用的特定反应基团的亲水部导入用的特定键合性取代基上,键合亲水部导入用化合物而形成的基团。需要说明的是,关于“特定键合性取代基”和“特定反应基团”的详细情况,如关于本发明中的吩噻嗪系化合物而在本说明书中所记载的那样。作为一个例子,在R^{6}的部位导入有亲水部的发明的亲水部导入型吩噻嗪系化合物可以由下述通式(2A-1)和(2B-1)表示。

[0211] [化学式8]

[0212]



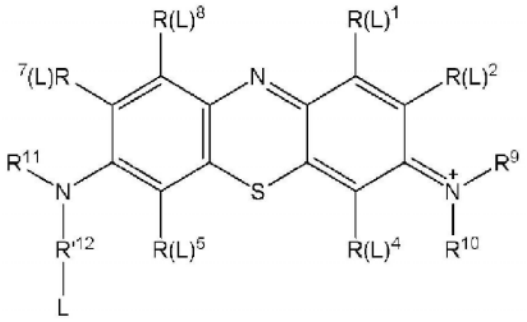
(2A-1) (2B-1)

[0213] 通式(2A-1)和(2B-1)中,R'^{6}表示由特定键合性取代基衍生的基团,L表示亲水部,除此以外的各符号的定义与通式(2A)和(2B)含义相同。

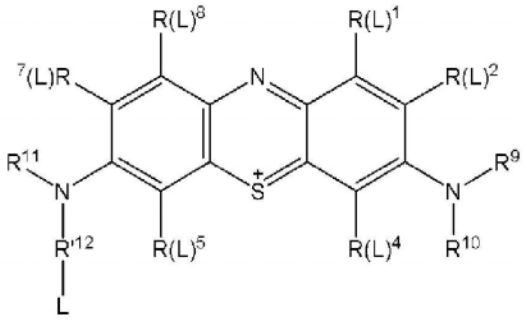
[0214] 在本发明的亲水部导入型吩噻嗪系化合物的优选的一个实施方式中,R(L)^1、R(L)^{2}和R(L)^4～R(L)^{8}中的任1个以上、特别优选至少R(L)^{6}为通过在式:-NR^{11}R^{12}所示的特定键合性取代基上键合亲水部导入用化合物而形成的基团。需要说明的是,关于式:-NR^{11}R^{12}的详细情况,如关于本发明的吩噻嗪系化合物而在本说明书中所记载的那样。作为一个例子,R(L)^{6}为通过在-NR^{11}R^{12}所示的特定键合性取代基上键合亲水部导入用化合物而形成的基团的、本发明的亲水部导入型吩噻嗪系化合物可以由下述通式(2A-2)和(2B-2)表示。

[0215] [化学式9]

[0216]



(2A-2)



(2B-2)

[0217] 通式(2A-2)和(2B-2)中,R^{11}为氢原子或非反应性N取代基,R'^{12}为由反应性N取代基衍生的基团,L为来自于亲水部导入用化合物的亲水部,除此以外的符号与上述通式(2A-1)和(2B-1)含义相同。

[0218] <亲水部>

[0219] 本发明的亲水部导入型吩噻嗪系化合物中的"亲水部"是指用于对吩噻嗪系化合物赋与"亲水性"的部分(化学结构),根据实施方式,也可以成为适合于将高分子量聚合物与吩噻嗪系化合物连接的部分。亲水部至少在其一部分(例如第1末端或其附近)具有:来自于亲水部导入用化合物所具有的第1特定反应基团、且通过与吩噻嗪系化合物(特定键合性取代基)的特定反应基团的反应而形成的键合结构。亲水部可以在其他部位(例如第2末端或其附近)具有亲水部导入用化合物所具有的第2特定反应基团作为能够与高分子量聚合物的特定反应基团进行反应的基团,也可以不具有能够与高分子量聚合物的特定反应基团进行反应的基团。

[0220] 在本发明中,"亲水性"是指:对水的亲和性高,相对于水或其他极性溶剂,例如在合成聚合物键合型吩噻嗪系化合物时用于使亲水部导入型吩噻嗪系化合物与高分子量聚合物进行反应的溶剂、在形成电化学传感器中的规定的层时用于使聚合物键合型吩噻嗪系化合物(氧化还原聚合物)溶解的溶剂等,以能够实现目的的程度溶解或混溶的性质。作为极性溶剂,例如可举出:甲醇、乙醇、1-丙醇、2-丙醇、1-丁醇、2-丁醇、2-甲基-1-丙醇、2-甲基-2-丙醇、甲酸、乙酸、四氢呋喃、丙酮、二氧六环、甲基乙基酮、乙酸乙酯、乙腈、二甲基甲酰胺、二甲基亚砜。

[0221] 本发明中的亲水部没有特别限定,可以从各种亲水部中进行选择。作为化学结构上的尺寸(分子长等)较小的亲水部,例如可举出:羟基、氨基、羧基、磺基、季铵阳离子等被称为所谓的"亲水基团"的官能团自身;由包含这样的亲水基团的分子衍生、且具有亲水性的基团。另一方面,作为化学结构上的尺寸较大的亲水部,例如可举出:被称为所谓的"连接体基团(部)"的结构中的具有亲水性的亲水部(在本说明书中称为"连接体样亲水部")。

[0222] <连接体样亲水部>

[0223] 连接体样亲水部通常是如下这样的结构的部位:除位于两端的反应前的反应基团或反应后的键合结构以外的部分为以碳原子为主体、且可以包含选自氮原子、氧原子和硫原子中的至少1种杂原子的链状的结构,换言之,为中途可以存在醚键、硫醚键、酰胺键等包含杂原子的键的、链状的结构。"链状的结构"可以为直链状,也可以为支链状,从亲水性的观点出发,优选为直链状。另外,从亲水性的观点出发,"链状的结构"优选不包含由环式化合物(芳香族烃环、非芳香族烃环、芳香族杂环、非芳香族杂环等)衍生的环结构,但也可以

在具有所期望的亲水性的范围内包含一个或多个环结构。

[0224] 在本发明的优选的一个实施方式中,连接体样亲水部包含式:-$(OC_2H_4)_q$-所示的氧亚乙基链。式中的q例如表示1～80的整数,优选表示3～36的整数。需要说明的是,该式所示的氧亚乙基链中q大到一定程度的氧亚乙基链通常被称为“聚氧亚乙基(PEG链)”等。

[0225] 在本发明的一个实施方式中,连接体样亲水部包含式:-$(CH_2)_p$-所示的烃链。在本发明的一个实施方式中,连接体样亲水部的主链包含上述式:-$(CH_2)_p$-所示的烃链和上述式:-$(OC_2H_4)_q$-所示的氧亚乙基链这两者。对于表示烃链的式中的p而言,可以考虑连接体样亲水部的亲水性,以取得与表示氧亚乙基链的式中的q之间的平衡的方式适当调节。

[0226] ＜亲水部的特定反应基团(亲水部导入用化合物的第2特定反应基团)＞

[0227] 亲水部的特定反应基团、即亲水部导入用化合物所可以具有的用于与高分子量聚合物键合的反应基团(亲水部导入用化合物的“第2特定反应基团”)只要能够与高分子量聚合物的特定反应基团进行反应就没有特别限定,可以从公知的各种反应基团中选择。作为这样的亲水部的特定反应基团(亲水部导入用化合物的第2特定反应基团),例如优选为“选自羧基或其活性酯体(例如NHS体)、氨基、巯基、甲酰基(醛基)、环氧基和马来酰亚胺基中的至少1种”。另外,聚合物键合用反应基团可以根据需要键合有保护基,可以在用于亲水部导入型吩噻嗪系化合物与高分子量聚合物的键合的反应之前进行脱保护。

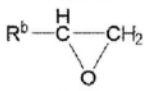
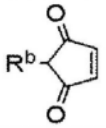
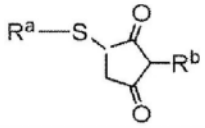
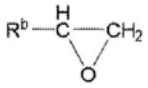
[0228] ＜反应基团整体＞

[0229] 作为本发明中的规定的反应基团、即吩噻嗪系化合物的特定反应基团和与其键合的亲水部导入用化合物的第1特定反应基团或高分子量聚合物的特定反应基团、以及亲水部导入用化合物(亲水部)的第2特定反应基团和与其键合的高分子量聚合物的特定反应基团,可以分别采用公知的各种反应基团,并设为各种组合。本发明中的规定的反应基团彼此可以通过共价键进行键合,也可以通过非共价键(例如静电相互作用)进行键合,例如从键合的稳定性的观点出发,优选通过共价键进行键合。

[0230] 本发明中的规定的反应基团分别优选为选自“由羧基或其活性酯体、氨基、巯基、甲酰基(醛基)、环氧基和马来酰亚胺基组成的组”(在本说明书中称为“优选的反应基团组”。)中的至少1种。将优选的反应基团组中所含的反应基团各自能够反应的基团示于表1。在选择了优选的反应基团组中所含的反应基团作为本发明中的规定的反应基团的一者的情况下,与其反应的对象的基团可以为优选的反应基团组中所含的其他反应基团(表中划了下划线的反应基团),也可以是优选的反应基团组中不包含的反应基团(表中未划下划线的反应基团、或表中不包含的反应基团)。

[0231] [表1]

[0232]

反应基团A	反应基团B	所形成的键等
羧基 R^a-COOH 或其活性酯体	氨基 R^b-NH_2	酰胺键 R^a-CO-NH-R^b
	醇性或酚性羟基 R^b-OH	酯键 R^a-CO-O-R^b
	巯基 R^b-SH	硫酯键 R^a-CO-S-R^b
	卤代烷基 R^b-X	酯键 R^a-CO-O-R^b
氨基 R^a-NH_2	羧基 或其活性酯体 R^b-COOH	酰胺键 R^a-NH-CO-R^b
	酰基叠氮基	酰胺键
	酰卤基	酰胺键
	异氰酸酯基	脲键
	异硫氰酸酯基	硫脲键
	酰亚胺酯	脒键
	环氧基 	酰胺键 R^a-NH-CO-R^b
	卤代烷基	烷基酰胺键
	磺酰卤基	磺酰胺键
巯基 R^a-SH	羧基 或其活性酯体 R^b-COOH	硫酯键 R^a-S-CO-R^b
	马来酰亚胺基 	硫醚键 
	环氧基 	硫醚键
	卤代烷基	硫醚键
	烷基磺酸盐基	硫醚键
	氮丙啶基	硫醚键
甲酰基(醛基) R^a-CHO	烷氧基氨基 R^b-O-NH_2	肟键 R^a-CH=N-O-R^b
	氨基 R^b-NH_2	席夫碱 R^a-CH=N-R^b
	肼基 $R^{b1}R^{b2}$N-NH_2	腙键 R^a-CH=N-N$R^{b1}R^{b2}$

[0233] 在本发明的优选的一个实施方式中,亲水部导入用化合物(亲水部)的“第2特定反应基团”或“吩噻嗪系化合物的特定反应基团”与高分子量聚合物的特定反应基团”中的任一者为表1的“反应基团A”,另一者为“反应基团B”。同样地,在本发明的优选的一个实施方式中,亲水部导入用化合物的“第1特定反应基团”与“吩噻嗪系化合物的特定反应基团”中

的任一者为表1的“反应基团A”,另一者为“反应基团B”。

[0234] 在本发明的更优选的一个实施方式中,亲水部导入用化合物(亲水部)的“第2特定反应基团”或“吩噻嗪系化合物的特定反应基团”与“高分子量聚合物的特定反应基团”中的任一者为氨基,另一者为羧基或其活性酯体。同样地,在本发明的更优选的一个实施方式中,亲水部导入用化合物的“第1特定反应基团”与“吩噻嗪系化合物的特定反应基团”中的任一者为氨基,另一者为羧基或其活性酯体。例如,在使用如下物质,即具有羧酸活性酯体作为特定反应基团的吩噻嗪系化合物;具有氨基作为第1特定反应基团、具有羧酸活性酯体(例如羧酸NHS酯体)作为第2特定反应基团的亲水部导入用化合物;以及具有氨基作为特定反应基团的高分子量聚合物的情况下,首先通过该吩噻嗪系化合物的羧酸活性酯体与该亲水部导入用化合物的氨基的反应,而得到通过第1酰胺键键合的亲水部导入型吩噻嗪系化合物,通过所得到的亲水部导入型吩噻嗪系化合物的羧酸活性酯体与该高分子量聚合物的氨基的反应,而得到通过第2酰胺键键合的聚合物键合型吩噻嗪系化合物。

[0235] <亲水部导入用化合物>

[0236] 本发明中的“亲水部导入用化合物”是为了导入(追加形成)上述那样的“亲水部”而用于与吩噻嗪系化合物所具有的特定键合性取代基键合的化合物。作为亲水部导入用化合物,例如可以使用:在关于亲水部而说明的相当于连接体样亲水部的结构、和其一部分(例如第1末端或其附近)具有用于与吩噻嗪系化合物键合的第1特定反应基团、根据需要可以在其他部分(例如第2末端或其附近)具有用于与高分子量聚合物键合的第2特定反应基团的化合物。另外,还可以将能够形成亲水部的尺寸(分子量)更小的化合物用作亲水部导入用化合物。这种亲水部导入用化合物没有特别限定,可以从公知的各种亲水部导入用化合物中选择。

[0237] <亲水部导入用化合物的第1特定反应基团>

[0238] 亲水部导入用化合物所具有的第1特定反应基团只要能够与吩噻嗪系化合物的特定反应基团进行反应就没有特别限定,可以从公知的各种反应基团中选择。作为这样的亲水部导入用化合物的第1特定反应基团,例如优选为“选自羧基或其活性酯体(例如NHS体)、氨基、巯基、甲酰基(醛基)、环氧基和马来酰亚胺基中的至少1种”。另外,亲水部导入用化合物的第1特定反应基团可以根据需要键合有保护基,可以在用于亲水部导入用化合物与吩噻嗪系化合物的键合的反应之前进行脱保护。需要说明的是,亲水部导入用化合物所可以具有的第2特定反应基团为与亲水部所可以具有的特定反应基团相当的反应基团,其技术事项如上所述。

[0239] <亲水部导入型吩噻嗪系化合物的制造方法>

[0240] 亲水部导入型吩噻嗪系化合物可以通过使具有所期望的化学结构的吩噻嗪系化合物与具有所期望的化学结构的亲水部导入用化合物在适当的条件(温度、时间、辅助剂等)下进行反应而合成。所合成的亲水部导入型吩噻嗪系化合物可以根据需要通过凝胶过滤色谱法、超滤等进行纯化。

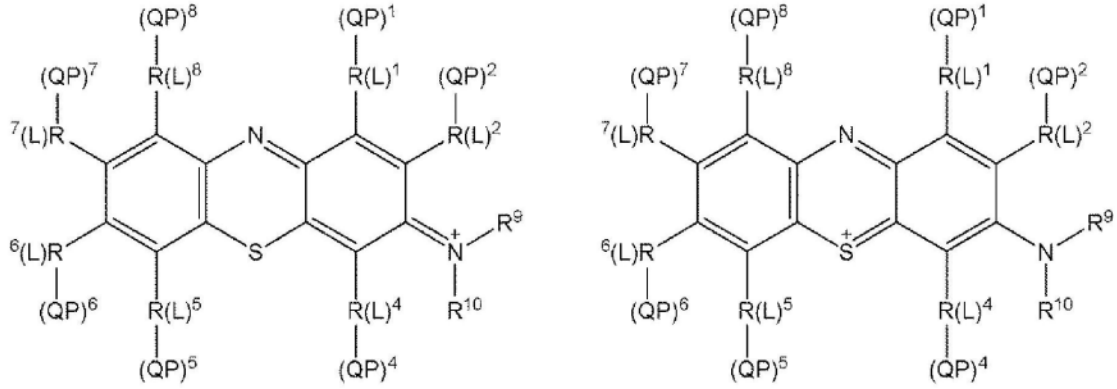
[0241] 亲水部导入型吩噻嗪系化合物可以利用通式(2A)和(2B)中的$R(L)^1$、$R(L)^2$和$R(L)^4$~$R(L)^8$以及R^9和R^{10}各自的结构而制造各种种类的化合物并使用。在本发明中,亲水部导入型吩噻嗪系化合物例如作为用于合成如后所述那样的聚合物键合型吩噻嗪系化合物的原料,而可以单独使用任1种,也可以组合使用2种以上。

[0242] -聚合物键合型吩噻嗪系化合物-

[0243] 本发明的聚合物键合型吩噻嗪系化合物是:具有上述本发明的吩噻嗪系化合物或亲水部导入型吩噻嗪系化合物与高分子量聚合物键合而成的结构、即具有在本发明的吩噻嗪系化合物上借助或不借助亲水部地键合了高分子量聚合物而成的结构的、吩噻嗪系化合物。从相反的角度来看,本发明的聚合物键合型吩噻嗪系化合物是键合有吩噻嗪系化合物或亲水部导入型吩噻嗪系化合物的、能够用作氧化还原聚合物的高分子量聚合物。通过使作为氧化还原介体的吩噻嗪系化合物或亲水部导入型吩噻嗪系化合物与高分子量聚合物键合,能够防止或抑制从保护膜的流出。聚合物键合型吩噻嗪系化合物例如可以如通式(3A)或(3B)那样表示。

[0244] [化学式10]

[0245]



(3A) (3B)

[0246] 通式(3A)和(3B)中的各符号的定义如下所述。

[0247] R^9和R^{10}两者为取代基、或者任一者为取代基且另一者为氢原子。(与通式(1A)和(1B)、和(2A)和(2B)中的定义为含义相同。)

[0248] $R(L)^1$、$R(L)^2$和$R(L)^4$~$R(L)^8$分别为:[A]可以具有取代基的羟基、可以具有取代基的羧基、可以具有取代基的氨基、可以具有取代基的碳原子数1~6的直链或支链的饱和或不饱和的烃基、可以具有取代基的酰基、或可以具有取代基的苯基;[B]通过在选自上述[A]中的键合性取代基上键合亲水部导入用化合物而形成的基团;[C]氢原子或卤素原子;或者[D]由选自上述[A]中的键合性取代基或上述[B]的基团中的任一者衍生的基团。

[0249] $(QP)^1$、$(QP)^2$和$(QP)^4$~$(QP)^8$分别为:在对应的$R(L)^1$、$R(L)^2$和$R(L)^4$~$R(L)^8$为上述[D]的基团时存在的来自于高分子量聚合物的高分子结构。即,由$(QP)^1$、$(QP)^2$和$(QP)^4$~$(QP)^8$表示的来自于高分子量聚合物的高分子结构可以键合于导入有亲水部时的$R(L)^1$、$R(L)^2$和$R(L)^4$~$R(L)^8$,也可以键合于未导入亲水部时的$R(L)^1$、$R(L)^2$和$R(L)^4$~$R(L)^8$、即R^1、R^2和R^4~R^8所示的特定键合性取代基本身。

[0250] 其中,存在$(QP)^1$、$(QP)^2$和$(QP)^4$~$(QP)^8$中的至少1个。在存在$(QP)^1$、$(QP)^2$和$(QP)^4$~$(QP)^8$中的2个以上的情况下,各高分子量聚合物可以相同也可以不同(即,多个高分子量聚合物的分子可以通过亲水部导入型吩噻嗪系化合物而进行交联)。另外,在与$(QP)^1$、$(QP)^2$和$(QP)^4$~$(QP)^8$中的2个以上对应的$R(L)^1$、$R(L)^2$和$R(L)^4$~$R(L)^8$中的2个以上为导入有亲水部的特定键合性取代基的情况下,各亲水部可以相同也可以不同。

[0251] 在本发明的聚合物键合型吩噻嗪系化合物的优选的一个实施方式中,$R(L)^1$、$R(L)^2$

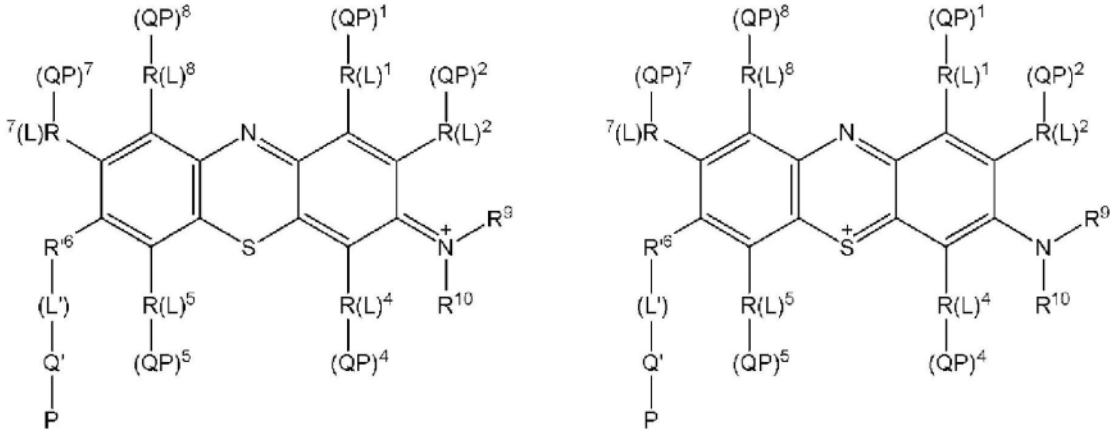
和R(L)^4～R(L)^{8}中的至少1个为:由具有选自羧基或其活性酯体、氨基、巯基、甲酰基、环氧基和马来酰亚胺基中的至少1种特定反应基团的特定键合性取代基、或通过在该特定键合性取代基上键合亲水部导入用化合物而形成的基团中的任一者衍生的基团。

[0252] 在本发明的聚合物键合型吩噻嗪系化合物的优选的一个实施方式中,R(L)^1、R(L)^{2}和R(L)^4～R(L)^{8}中的至少1个为:由通过在特定键合性取代基上键合具有选自羧基或其活性酯体、氨基、巯基、甲酰基、环氧基和马来酰亚胺基中的至少1种特定反应基团的亲水部导入用化合物而形成的基团衍生的基团。

[0253] 在本发明的聚合物键合型吩噻嗪系化合物的优选的一个实施方式中,关于吩噻嗪系化合物的特定键合性取代基,至少在R(L)^6(QP)^{6}中借助或不借助亲水部地与高分子量聚合物键合,也可以根据需要进一步在R(L)^1(QP)^1、R(L)^2(QP)^2、R(L)^4(QP)^4、R(L)^5(QP)^5、R(L)^7(QP)^{7}和R(L)^8(QP)^{8}中的1个以上中借助或不借助亲水部地与高分子量聚合物键合。该实施方式的聚合物键合型吩噻嗪系化合物相当于如下情形:在通式(3A)和(3B)中,至少R(L)^{6}为由特定键合性取代基、或由导入有亲水部的特定键合性取代基衍生的基团中的、任1者衍生的基团。需要说明的是,关于“特定键合性取代基”、“特定反应基团”和“亲水部”的详细情况,如关于本发明的吩噻嗪系化合物和亲水部导入型吩噻嗪系化合物而在本说明书中所记载的那样。作为一个例子,在R(L)^6(QP)^{6}中,在特定键合性取代基上键合有亲水部导入用化合物、且借助通过该键合而导入的亲水部从而键合有高分子量聚合物的本发明的聚合物键合型吩噻嗪系化合物,可以由下述通式(3A-1)和(3B-1)表示。

[0254] [化学式11]

[0255]



(3A-1) (3B-1)

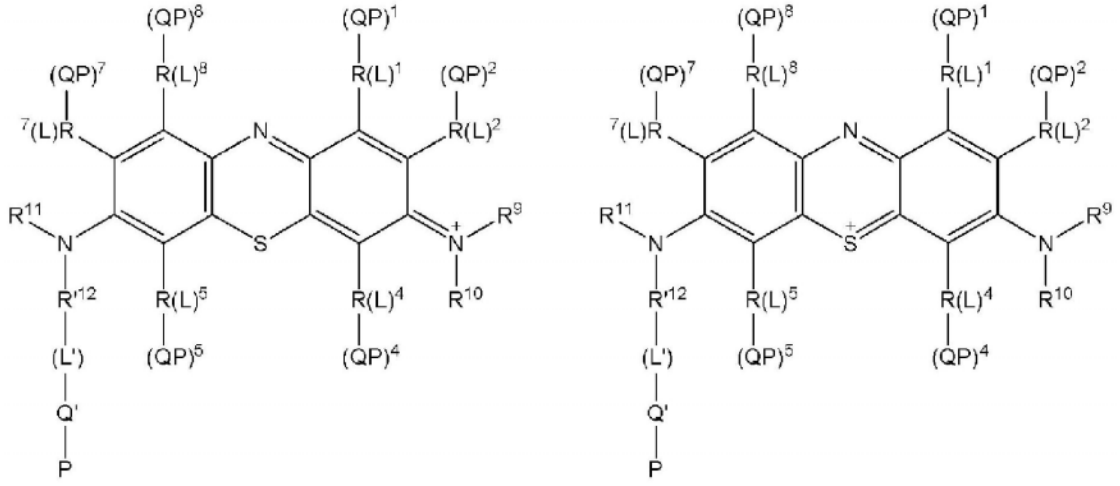
[0256] 通式(3A-1)和(3B-1)中,R'^{6}为由特定键合用取代基(R)衍生的基团,(L')为任选存在的由亲水部导入用化合物(L)衍生的基团,Q'为由高分子量聚合物的反应基团(Q)衍生的基团,P为高分子量聚合物的主链,除此以外的各符号的定义与通式(3A)和(3B)相同。高分子量聚合物的主链(P)和反应基团(Q)、以及具有它们的高分子量聚合物的详细情况如后所述。

[0257] 在本发明的聚合物键合型吩噻嗪系化合物的优选的一个实施方式中,R(L)^1、R(L)^{2}和R(L)^4～R(L)^{8}中的任1个以上、特别优选至少R(L)^{6}为:由具有式:-NR^{11}R^{12}所示的取代基的氨基即特定键合性取代基、或通过在该特定键合性取代基上键合亲水部导入用化合物而形成的基团中的、任1者衍生的基团。需要说明的是,关于式:-NR^{11}R^{12}的详细情况,如关于本发

明的吩噻嗪系化合物而在本说明书中所记载的那样。作为一个例子，$R(L)^6$为可以键合或不键合亲水部导入用化合物(即可以导入或不导入亲水部)的、作为特定键合性取代基的-$NR^{11}R^{12}$所示的基团，在其上借助或不借助亲水部而进一步键合有高分子量聚合物的本发明的聚合物键合型吩噻嗪系化合物可以由下述通式(3A-2)和(3B-2)表示。

[0258] [化学式12]

[0259]



(3A-2) (3B-2)

[0260] 通式(3A-2)和(3B-2)中，R^{11}为氢原子或非反应性N取代基，R'^{12}为由反应性N取代基衍生的基团，除此以外的符号与上述通式(3A-1)和(3B-1)含义相同。

[0261] 需要说明的是，通式(3A-1)和(3B-1)、(3A-2)和(3B-2)等表观上表示为：1分子的(亲水部导入型)吩噻嗪系化合物借助由1个反应基团(Q)衍生的基团(Q')与1个高分子量聚合物的主链(P)键合。然而，本发明的聚合物键合型吩噻嗪系化合物并不如此限定性地解释，应解释为：相对于1个该高分子量聚合物的主链，通常多个(多数)(亲水部导入型)吩噻嗪系化合物借助改高分子量聚合物的多个(多数)侧链(和末端)与其键合。

[0262] 另外，在本说明书中后述那样的、包括使(亲水部导入型)吩噻嗪系化合物与高分子量聚合物进行反应的工序的氧化还原聚合物的制造方法中，能够得到：相对于1分子的高分子量聚合物的(亲水部导入型)吩噻嗪系化合物的键合数具有分布的、高分子量聚合物组合物。关于高分子量聚合物组合物所具有的(亲水部导入型)吩噻嗪系化合物的键合数的分布方式、相对于1分子的高分子量聚合物而键合的(亲水部导入型)吩噻嗪系化合物的数量(的平均)，没有特别限定，可以考虑用途、性能等，并且根据制造氧化还原聚合物时的原料(高分子量聚合物或构成其的单体)、反应条件等适当调整。例如，(1)使作为高分子量聚合物的原料使用的单体1分子中所含的反应基团的数量增减，或(2)根据反应条件来调节单体整体中所含的反应基团中的、实际与(亲水部导入型)吩噻嗪系化合物中所含的反应基团进行反应的基团的比例，由此能够使相对于1分子的高分子量聚合物的(亲水部导入型)吩噻嗪系化合物得键合数(平均值)增减，或使其分布的方式变化，能够制造具有所期望的性状的高分子量氧化还原聚合物(的组合物)。

[0263] 典型地作为氧化还原聚合物使用的、本发明的聚合物键合型吩噻嗪系化合物优选具有亲水性。关于“亲水性”的详细情况，如关于亲水部所上述的那样。在聚合物键合型吩噻嗪系化合物中，优选亲水部、高分子量聚合物、或者这两者对聚合物键合型吩噻嗪系化合物

赋与亲水性。关于本发明的聚合物键合型吩噻嗪系化合物,例如,优选高分子量聚合物借助亲水部(作为一个例子,PEG链或其他连接体样亲水部)与吩噻嗪系化合物键合,更优选该高分子量聚合物自身也具有亲水性。

[0264] ＜高分子聚合物＞

[0265] 高分子量聚合物是具有一定水准以上的分子量(重均分子量)的聚合物,只要是具有与作为氧化还原介体的(亲水部导入型)吩噻嗪系化合物键合而能够担载其的结构、即能够与亲水部导入型吩噻嗪系化合物的亲水部所具有的特定反应基团或吩噻嗪系化合物的特定键合性取代基所具有的特定反应基团进行反应的反应基团(本发明中的高分子量聚合物的“特定反应基团”)、且能够在工作电极上形成试剂层的聚合物即可。高分子量聚合物的种类(主链和侧链的结构等)没有特别限定,可以单独使用任1种,也可以组合使用2种以上。

[0266] 是指高分子量聚合物的分子量(重均分子量)具有通常为10000以上、优选为50000以上、更优选为100000以上的重均分子量的聚合物。高分子量聚合物的重均分子量的上限没有特别限定,通常小于10000000,优选小于1000000。

[0267] 高分子量聚合物的重均分子量、分子量分布可以根据高分子量聚合物的种类通过公知的手段进行测定,例如可以使用凝胶渗透色谱(GPC)、如果高分子量聚合物为蛋白质则可以使用SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)法等。另外,在购买市售的高分子量聚合物来使用的情况下,可以将其目录等中(例如作为“Mw”、“M.W.”)所示的数值视为重均分子量。

[0268] 高分子量聚合物的主链通常是:以碳原子为主体、且可以包含选自氮原子、氧原子和硫原子中的至少1种杂原子的链状的结构,换言之,是中途可以存在醚键、硫醚键、酰胺键等包含杂原子的键的链状的结构。另外,从能够在1分子的高分子聚合物上担载多个(多数)(亲水部导入型)吩噻嗪系化合物的观点出发,高分子量聚合物在侧链上具有用于与(亲水部导入型)吩噻嗪系化合物键合的特定反应基团是适宜的,此外主链的一个或两个末端也可以具有特定反应基团。作为具有这样的主链和特定反应基团(侧链和/或末端)的高分子量聚合物,公知有各种高分子量聚合物,另外,可以通过使用适当的单体来合成。高分子量聚合物可以为均聚物(homopolymer)、共聚物(copolymer)、以及它们键合和/或混合而成的聚合物中的任一种,另外,可以为无规聚合物或嵌段聚合物中的任一种。

[0269] ＜高分子量聚合物的特定反应基团＞

[0270] 关于本发明中的高分子量聚合物所具有的特定反应基团,在与亲水部导入型吩噻嗪系化合物键合的情况下(即借助亲水部与吩噻嗪系化合物键合的情况下),只要能够与该亲水部的特定反应基团进行反应即可,在不借助亲水部地与吩噻嗪系化合物键合的情况下,只要能够与吩噻嗪系化合物自身所具有的特定反应基团进行反应即可。这样的反应基团没有特别限定,可以从公知的各种反应基团中选择。作为高分子量聚合物的特定反应基团,例如优选为“选自羧基或其活性酯体(例如NHS体)、氨基、巯基、甲酰基(醛基)、巯基和马来酰亚胺基中的至少1种”。另外,高分子量聚合物的特定反应基团可以根据需要键合有保护基,也可以在用于使高分子量聚合物与(亲水部导入型)吩噻嗪系化合物键合的反应之前进行脱保护。

[0271] 高分子量聚合物的特定反应基团可以是高分子量聚合物的合成中使用的单体原本具有的基团,也可以是之后导入的基团、例如通过在用于合成高分子量聚合物的单体原本具有的反应基团上进一步导入反应性取代基而加成得到的基团。需要说明的是,后者那

样的实施方式中的“反应性取代基”与如下基团相同,该基团为:关于吩噻嗪系化合物而上述的、(iii)～(viii)的取代基所可以具有的包含(a)～(m)中的至少1个的基团。在上述任一实施方式中,均可以说高分子量聚合物“具有”特定反应基团。

[0272] 作为高分子量聚合物的具体例,可举出:氨基酸系聚合物、亚胺系聚合物、乙烯系聚合物等在侧链(和末端)具有特定反应基团的高分子量聚合物。另外,可以说是以氨基酸为单体的聚合物(其中,作为概念,与人工合成的氨基酸系聚合物相区别)的、具有天然的氨基酸序列或经改变的(置换、缺失、添加等)氨基酸序列的蛋白质、多肽也包括在高分子量聚合物中。具有适当的反应基团或导入了适当的反应基团的多糖类系聚合物也包括在高分子量聚合物中。

[0273] 作为乙烯系聚合物,可举出:由选自包含能够进行自由基聚合的烯属碳-碳双键、例如乙烯基(CH_2=CH-)、烯丙基(CH_2=CH-CH_2-)、丙烯酰基(CH_2=CH-C(O)-)、甲基丙烯酰基(CH_2=C(CH_3)-C(O)-)等的单体中的1种或2种以上的单体合成的、均聚物和共聚物以及它们的修饰物(例如,通过皂化将来自于乙酸乙烯酯的单元进行乙烯醇化而得到的物质、进行赋予亲水性那样的处理而得到的物质)。作为包含烯属碳-碳双键的单体,例如可举出:乙烯、丙烯、丁二烯、异丁烯、四氟乙烯、乙烯醇、乙酸乙烯酯、氯乙烯、偏二氯乙烯、苯乙烯、甲基苯乙烯、烯丙基胺、二烯丙基胺、二烯丙基二甲基氯化铵、丙烯酸、甲基丙烯酸、甲基丙烯酸酯(丙烯酸甲酯)、甲基甲基丙烯酸酯(甲基丙烯酸甲酯)、丁基丙烯酸酯(丙烯酸丁酯)、丁基甲基丙烯酸酯(甲基丙烯酸丁酯)、甲基丙烯酸羟基乙酯、丙烯腈等。作为乙烯系聚合物,例如可举出:聚烯丙基胺盐酸盐、烯丙基胺盐酸盐-二烯丙基胺盐酸盐共聚物、烯丙基胺-二烯丙基二甲基氯化铵共聚物等。另外,作为优选的乙烯系聚合物,还可举出:通常作为生物适应性聚合物而已知的、甲基丙烯酸甲酯与甲基丙烯酸羟基乙酯的共聚物、甲基丙烯酸丁酯与甲基丙烯酸羟基乙酯的共聚物、聚(2-甲基丙烯酰氧基乙基磷酸胆碱-共-甲基丙烯酸正丁酯)等(甲基)丙烯酸系聚合物、聚对苯二甲酸乙二醇酯等聚酯系聚合物。在侧链(和末端)具有季铵阳离子、氨基等的(甲基)丙烯酸系聚合物也可以作为优选的乙烯系聚合物而列举。

[0274] 作为亚胺系聚合物,例如可举出聚(亚乙基亚胺)。聚(亚乙基亚胺)在侧链具有-$(CH_2)_2$-NH_2、-$(CH_2)_2$-NH-$(CH_2)_2$-NH_2、-$(CH_2)_2$-N($(CH_2)_2$-NH_2)$_2$等结构,该结构中的氨基:-NH_2成为该高分子量聚合物的特定反应基团,可以与包含与其对应的适当的特定反应基团(例如羧基)的(亲水部导入型)吩噻嗪系化合物键合。

[0275] 作为氨基酸系聚合物,例如可举出:聚(L-赖氨酸)、聚(L-精氨酸)、聚(L-鸟氨酸)、聚(L-谷氨酸)。聚(L-赖氨酸)在侧链具有-$(CH_2)_4$-NH_2的结构。聚(L-精氨酸)在侧链具有-$(CH_2)_2$-NH-C(=NH)-NH_2的结构。聚(L-谷氨酸)在侧链具有-COOH的结构。这些氨基酸系聚合物的侧链所含的氨基:-NH_2(或胍基:-NH-C(=NH)-NH_2)、羧基:-COOH等成为该高分子量聚合物的特定反应基团,可以与具有对应的适当的特定反应基团(例如羧基或氨基)的(亲水部导入型)吩噻嗪系化合物键合。需要说明的是,氨基酸系聚合物例如可以像聚(L-精氨酸盐酸盐)、聚(L-谷氨酸钠)那样形成盐。

[0276] 作为多糖类系聚合物,例如可举出壳聚糖、羧甲基纤维素等纤维素衍生物。壳聚糖是通过将几丁质水解而得到的多糖类,在侧链(糖结构中)具有氨基。羧甲基纤维素例如是通过对纤维素进行碱处理后与单卤乙酸进行反应而得到的纤维素衍生物,在侧链具有羧甲基。这些多糖类系聚合物的侧链所含的氨基、羧基等成为该高分子量聚合物的特定反应基

团,可以与具有对应的适当的特定反应基团(例如羧基或氨基)的(亲水部导入型)吩噻嗪系化合物键合。

[0277] 作为蛋白质,例如可举出:在本发明中作为氧化还原酶使用的葡萄糖脱氢酶(GDH)、葡萄糖氧化酶等酶、作为封闭剂而公知惯用的牛血清白蛋白(BSA)等。这些蛋白质含的氨基酸残基中,例如赖氨酸、精氨酸和组氨酸在侧链中包含氨基(或胍基),天门冬氨酸和谷氨酸在侧链包含羧基,半胱氨酸在侧链包含巯基(硫基)。因此,包含这样的氨基酸残基的蛋白质可以与包含对应的适当的特定反应基团(例如羧基或氨基)的(亲水部导入型)吩噻嗪系化合物键合。

[0278] 在本发明的聚合物键合型吩噻嗪系化合物的优选的一个实施方式中,高分子量聚合物为“阳离子性聚合物”。“阳离子性聚合物”是上述那样的高分子量聚合物中,作为聚合物整体的净电荷具有正电荷的聚合物的总称。通常,在侧链具有带正电的官能团的高分子量聚合物,即使用在不参与主链的形成的部位具有带正电的官能团的单体而合成的高分子量聚合物成为阳离子性聚合物。作为带正电的官能团,例如可举出氨基、季铵阳离子,优选具有化学稳定性的季铵阳离子。例如,作为阳离子性聚合物,可举出:作为实施例的聚合物A、B和C公开的、包含来自于甲基丙烯酸2-氨基乙酯、(乙烯基苄基)三甲基氯化铵、甲基丙烯酰氧乙基三甲基氯化铵等的结构单元的均聚物或共聚物、聚(二烯丙基二甲基氯化铵)、聚(烯丙基胺盐酸盐)、烯丙基胺盐酸盐-二烯丙基胺盐酸盐共聚物、烯丙基胺-二烯丙基二甲基氯化铵共聚物、聚(亚乙基亚胺)等。另外,作为阳离子性聚合物,还可举出:在侧链具有氨基(或胍基)的、聚(L-赖氨酸)、聚(L-精氨酸)等氨基酸系聚合物、壳聚糖等多糖类系聚合物。

[0279] <聚合物键合型吩噻嗪系化合物的制造方法>

[0280] 本发明的聚合物键合型吩噻嗪系化合物可以通过使具有所期望的化学结构的(亲水部导入型)吩噻嗪系化合物与具有所期望的化学结构的高分子量聚合物,特别是考虑吩噻嗪系化合物的特定反应基团或亲水部导入型吩噻嗪系化合物的亲水部的特定反应基团与高分子量聚合物的特定反应基团的反应,在适当的条件(温度、时间、辅助剂等)下进行反应来合成。合成的聚合物键合型吩噻嗪系化合物可以根据需要通过凝胶过滤色谱、超滤、透析等进行纯化,除去低分子化合物。

[0281] 关于聚合物键合型吩噻嗪系化合物,可以利用通式(3A-1)和(3B-1)中的$R(L)^1(QP)^1$、$R(L)^2(QP)^2$、$R(L)^4(QP)^4$~$R(L)^8(QP)^8$以及R^9和R^{10}各自的结构来制造各种种类的化合物并使用。在本发明中,聚合物键合型吩噻嗪系化合物例如作为用于制造后述那样的电化学传感器的、试剂层中所含的氧化还原聚合物,可以单独使用任1种,也可以组合使用2种以上。

[0282] -试剂层-

[0283] 本发明的试剂层是包含本发明的亲水部导入型吩噻嗪系化合物或聚合物键合型吩噻嗪系化合物(以下总称为“本发明的吩噻嗪系化合物等”。)的层。该试剂层典型地在本发明的电化学传感器中配置于工作电极上。吩噻嗪系化合物(包括亲水部导入型吩噻嗪系化合物、构成聚合物键合型吩噻嗪系化合物的状态的化合物。)作为氧化还原介体发挥功能,聚合物键合型吩噻嗪系化合物作为氧化还原聚合物发挥功能。本发明的吩噻嗪系化合物等的详细情况(具体的实施方式、优选的实施方式、通式等)如本说明书中所述。试剂层可

以单独包含任1种吩噻嗪系化合物等,也可以将2种以上的吩噻嗪系化合物等组合(例如,以2种以上的吩噻嗪系化合物等的混合物的形式、或者以将包含各吩噻嗪系化合物等的层层叠的状态)并包含。

[0284] 试剂层可以根据需要包含与分析物对应的"氧化还原酶"。电化学传感器典型地采取在试剂层中包含氧化还原酶的电化学传感器(生物传感器)的形态,但并不限定于此,也可以采取在试剂层中不包含氧化还原酶的生物传感器以外的电化学传感器、或者电化学传感器以外的传感器(例如光学传感器)的形态。根据电化学传感器等的用途,可以选择试剂层是否包含氧化还原酶,另外根据分析物的种类,可以选择包含何种种类的氧化还原酶。

[0285] 试剂层可以根据需要进一步包含其他成分。作为其他成分,例如可举出碳粒子等导电性粒子、缓冲液成分等。

[0286] "氧化还原酶"是指能够将电化学传感器等作为对象的分析物氧化或脱氢化的酶。作为氧化还原酶,例如可举出:氧化酶系的酶(葡萄糖氧化酶、乳酸氧化酶、丙酮酸氧化酶、胆固醇氧化酶、氨基酸氧化酶、谷氨酸氧化酶、果糖基氨基酸氧化酶、醇氧化酶、抗坏血酸氧化酶、果糖基肽氧化酶、胆红素氧化酶、醛氧化酶等)和脱氢酶系的酶(葡萄糖脱氢酶、乳酸脱氢酶、丙酮酸脱氢酶、氨基酸脱氢酶、谷氨酸脱氢酶、3-羟基丁酸脱氢酶、醇脱氢酶、醛脱氢酶)。氧化还原酶可以单独使用任一种,也可以根据需要组合使用两种以上。

[0287] 氧化还原酶可以与本发明的聚合物键合型吩噻嗪系化合物交联。例如,通过使交联剂(例如:戊二醛)与作为蛋白质的氧化还原酶所具有的反应基团(例如:氨基)、和构成聚合物键合型吩噻嗪系化合物的高分子量聚合物(作为未与(亲水部导入型)吩噻嗪系化合物反应的(亲水部键合用)反应基团、或作为与(亲水部导入型)吩噻嗪系化合物的反应用的不同种类的反应基团)所具有的反应基团(例如:氨基)这两者进行反应,从而能够借助交联剂使氧化还原酶与聚合物键合型吩噻嗪系化合物键合。通过键合氧化还原酶,从而聚合物键合型吩噻嗪系化合物和酶成为分子量更大的复合体,能够进一步抑制吩噻嗪系化合物(氧化还原介体)和酶向保护膜外流出。另外,通过使用交联剂,有时氧化还原酶彼此交联。在不与聚合物键合型吩噻嗪系化合物交联的情况下,氧化还原酶只要以与聚合物键合型吩噻嗪系化合物混合的状态包含在试剂层中即可。

[0288] 试剂层可以通过制备包含用于形成试剂层的原料的试剂液后涂布于基板上并使其干燥而形成。试剂液至少包含本发明的吩噻嗪系化合物等,可以根据需要包含氧化还原酶、交联剂、其他成分(例如导电性炭黑),可以通过将这些原料混合,根据需要进行分散处理(例如,在添加氧化还原酶之前进行的、导电性炭黑等的超声波处理)来制备。涂布试剂液的基板典型地为电化学传感器的工作电极,例如,在绝缘性基板的两面具备使用碳或导电性金属材料(金、银、铂、钯等)通过丝网印刷、溅射法、蒸镀法、离子镀等而形成的导电性薄膜的工作电极。在该导电性薄膜的表面涂布试剂液并使其干燥,由此得到在导电性薄膜的上表面形成有试剂层的工作电极。通过调节试剂液的组成、涂布面的面积和涂布量,能够形成所期望的厚度的试剂层。

[0289] -电化学传感器-

[0290] 本发明的对分析物进行检测或定量的电化学传感器具有工作电极、对电极和配置于工作电极上的如上所述的本发明的试剂层,根据需要还具有至少被覆试剂层的保护膜。

[0291] "保护膜"是用于防止或抑制试剂层中所含的物质(作为氧化还原介体的(亲水部

导入型)吩噻嗪系化合物、氧化还原酶等)向保护膜外的环境中(生物体内、培养基中等)漏出的膜状的构件。被覆试剂层的保护膜为了使保护膜外的环境中存在的分析物能够与试剂层接触,在保护膜内具有能够透过的孔是适当的。这样的保护膜例如优选在电化学传感器用于持续的测定的情况下形成,在电化学传感器用于单次的测定的情况下也可以不形成。

[0292] 形成有试剂层的工作电极(具备该工作电极的探针)插入到生物体内来使用,或者浸渍于培养基中使用,因此被覆其表面的保护膜具有蛋白质、细胞不吸附或难以吸附的生物相容性,通常优选通过具有这样的性质的生物相容性聚合物形成。作为生物相容性聚合物,例如可举出:甲基丙烯酸甲酯与甲基丙烯酸羟基乙酯的共聚物、甲基丙烯酸丁酯与甲基丙烯酸羟基乙酯的共聚物、聚(2-甲基丙烯酰氧基乙基磷酸胆碱-共-甲基丙烯酸正丁酯)等。需要说明的是,为了形成保护膜,也可以利用关于聚合物键合型吩噻嗪系化合物而上述过的、作为高分子量聚合物的具体例提及的生物相容性聚合物。

[0293] 保护膜可以通过如下方式形成:制备包含用于形成保护膜的原料的溶液(保护膜溶液),将想要形成保护膜的区域、例如工作电极的至少形成有试剂层的区域浸渍,提起并使其干燥,根据需要将这样的工序反复进行多次,由此形成保护膜。

[0294] 本发明的电化学传感器可以根据需要进一步包含参比电极。即,本发明的电化学传感器可以设为由工作电极和对电极构成的二电极式,也可以设为由工作电极、对电极和参比电极构成的三电极式。

[0295] 在本发明的一个实施方式中,电化学传感器可以制作为植入型的电化学传感器,例如,用于连续或半连续地、例如在数天~数周内测定血液中或间质液中的葡萄糖浓度的自体血糖测定用的CGM(Continuous Glucose Monitoring:连续血糖监测)的生物传感器。另一方面,在本发明的一个实施方式中,电化学传感器也可以制作为非植入型的电化学传感器、例如,用于连续或半连续地测定培养基中的葡萄糖等的浓度的生物传感器。

[0296] 以下,参照附图对本发明的电化学传感器为植入型的情况下的实施方式进行说明。然而,附图和以下的记载是例示性的,本发明的技术的范围并不限定于由此公开的实施方式,应理解为在能够解决本发明的课题的范围内、并且在起到本发明的作用效果的范围内,包括进行了各种改变的实施方式。

[0297] 在以下的记载中,有时将位于图1的(A)和(B)、图3和图7的纸面近前方向、图2的(A)~(C)和图4~图6的纸面上方向的面称为“上表面”,将位于图1的(A)和(B)、图3和图7的纸面进深方向、图2的(A)~(C)和图4~图6的纸面下方向的面称为“下表面”,将位于图1的(A)和(B)、图2的(A)~(C)、图5~图7的纸面左右任一方向、以及图4的纸面近前侧或进深侧任一方向的面称为“侧面”。另外,有时将图1的(A)的纸面的上下方向、即与表示传感器向生物体的插入方向的箭头X2平行的方向的尺寸、以及图3和图7的纸面的上下方向的尺寸称为“长度”,将图1的(A)的纸面的左右方向、即与箭头X2垂直的方向的尺寸、以及图3和图7的纸面的上下方向的尺寸称为“宽度”。

[0298] 图1是本发明的一个实施方式中的传感器11的俯视图。图1的(A)表示传感器11的整体。在图1的(B)中,将图1的(A)所示的传感器11的前端部分(感测部分)放大表示。传感器11例如适合于构建用于血糖值的自我检查而佩戴于生物体来使用的植入型生物传感器的系统的情况,该情况下的传感器11可以作为从主体(未图示)突出的突出部分(探针)而插入到生物体内。另外,传感器11例如也可以在构建用于测定培养基中的分析物的浓度的系统

的情况下使用。

[0299] 图1的(A)所示的传感器11的区域X1(头部)收容于主体(未图示),传感器11的前端部分(感测部分)从主体突出。箭头X2表示例如将传感器11向生物体插入的情况下的插入方向。关于感测部分的尺寸,长度例如为20～3mm,优选为10～3mm,宽度例如为1～50μm,优选为500～50μm。

[0300] 在图1中,传感器11具有基板21、电极22、试剂层23、银/氯化银层(有时也称为参比层。)24和膜25。电极22均匀地形成在基板21上,包含工作电极22a、参比电极22b和对电极22c。工作电极22a和参比电极22b通过槽A1在物理上且电气上分离,参比电极22b和对电极22c通过槽A2在物理上且电气上分离。试剂层23形成在工作电极22a上。银/氯化银层24形成在参比电极22b上。膜25除了电极22的一部分(头部的区域X1中的区域X4的部分、对电极22c的区域X3的部分等)以及试剂层23的部分以外(由于具备使它们露出的开口),被覆传感器11的上表面。需要说明的是,电极22露出的区域X4与主体11的电路连接。

[0301] 需要说明的是,如图1的(B)的区域X5所示,优选在传感器11的前端(从前端到规定的距离)不形成试剂层23。换言之,试剂层23优选与传感器11隔开距离地形成。这是因为,通过像这样形成,从而在传感器11插入到生物体内时,能够抑制试剂层23从传感器11剥离(卷缩)。

[0302] 图2的(A)是图1的(B)的AA向观察剖视图。在传感器11的形成有试剂层23的部分依次层叠有基板21、电极22(工作电极22a)和试剂层23。在11a和11b的部分中,电极22(工作电极22a)、试剂层23和膜25未层叠(被修整),基板21露出。

[0303] 图2的(B)是图1的(B)的BB向观察剖视图。在相对于槽A1处于右侧的形成有银/氯化银层24的部分,层叠有基板21、电极22(参比电极22b)、银/氯化银层24和膜25。在相对于槽A1处于左侧的与参比电极22b物理上和电气上分离的部分,层叠有基板21、电极22(工作电极22a)和膜25。银/氯化银层24的侧面(图2的(B)的右侧侧面)未配置膜25而露出。在本实施方式中,银/氯化银层24的上表面被膜25被覆,但也可以不被膜25被覆而露出。

[0304] 图2的(C)是图1的(B)的CC向观察剖视图。在相对于槽A2处于右侧的部分,层叠有基板21和电极22(对电极22c)。对电极22c的上表面未被膜25被覆而露出。在被槽A1和槽A2夹着的部分,层叠有基板21、电极22(参比电极22b)和膜25。在槽A1的左侧的部分层叠有基板21、电极22(工作电极22a)和膜25。

[0305] 基板21典型地是片状的合成树脂。基板21的材料只要是具有柔软性、易加工性和耐热性中的至少一个以上的特征的塑料材料(合成树脂)那样的树脂材料就没有特别限定。作为这样的基板21的树脂材料的代表例,可举出聚对苯二甲酸乙二醇酯(PET),除此以外,还可举出聚乙烯、聚丙烯和聚萘二甲酸乙二醇酯等通用塑料。另外,在需要高耐热性的情况下,优选聚酰亚胺。

[0306] 电极22是形成在基板21上的薄膜(薄层)。电极22的材料只要是具有导电性和稳定性(例如,耐氧化性或耐盐性)的金属或碳材料就没有特别限定。作为这样的电极22的材料的代表例,可举出金,除此以外,还可举出铂、钯、碳等。需要说明的是,当在传感器11的上表面和下表面的一者形成工作电极22a(试剂层23)、在另一者形成对电极22c的情况下,也可以使用相互不同的电极材料。

[0307] 工作电极22a被赋予:对于将通过基于氧化还原酶的分析物(例如葡萄糖)的反应

而被还原的介体进行氧化而言,为充分的电位(以参比电极22b为基准的电位)。通过监测在工作电极22a与对电极22c之间流动的电流来测定葡萄糖浓度。试剂层23形成于传感器11的前端部分的工作电极22a的上表面。

[0308] 银/氯化银层24根据需要形成于传感器11的前端部分的参比电极22b的上表面。在本实施方式中,为了实现更高精度的测定,示出了包含工作电极22a、参比电极22b和对电极23c的3电极构成的例子,但也可以不包含参比电极22b,而设为包含工作电极22a和对电极23c的2电极构成(例如,目前市售的SMBG中,这样的2电极构成是主流)。如本实施方式所示,参比电极除了可以设为形成有银/氯化银(Ag/AgCl)层24的银/氯化银电极以外,还可以设为氢电极、甘汞电极等形成有包含汞的层的电极。

[0309] 膜25是在形成于基板21上的电极22(工作电极22a、参比电极22b和对电极22c)的规定部分以及银/氯化银层24上形成(层叠)的、具有绝缘性的片状的构件。膜25的厚度通常为1μm以上且150μm以下,优选为3μm以上且50μm以下,更优选为5μm以上且30μm以下。膜25在与位于传感器11的前端的试剂层23对应的部分、以及与对电极22c的一部分对应的部分具有开口,该部分的试剂层23和对电极22c露出。

[0310] 膜25例如可以设为在与基板21相同的树脂材料的片材上贴附有粘合片(例如丙烯酸系、橡胶系或热熔系)的膜。与上述基板21相同的树脂材料的片材也可以是与基板21不同的树脂材料的片材。也可以将粘合片单体用作膜25。也可以将热或光增塑性抗蚀膜、或由抗蚀墨液形成的层用作膜25。

[0311] 用于形成试剂层23的试剂液可以从位于膜25的对应的部分的开口滴下到电极22(工作电极22a)的表面来进行涂布。从这样的工序的作业性等观点出发,优选试剂液相对于膜25的表面的接触角(α)比试剂液相对于膜25的开口部、即露出的工作电极22a的表面的接触角(β)高,其差(α-β)越大越优选。例如,优选α为90°以上且β为50°以下。需要说明的是,此处所说的“接触角”是通过“θ/2法”测定的“静态接触角”。即使形成膜25的材料自身和/或形成露出的工作电极22a的材料自身不满足上述那样的接触角的条件,通过适当的表面处理,例如进行针对膜25的拒水处理和针对工作电极22a的亲水处理中的至少一者,从而也能够满足上述那样的接触角的条件。

[0312] 虽然在图1的(A)和(B)中未图示,但传感器11的至少包含试剂层23的部分也可以被保护膜被覆。即,也可以在图2的(B)的试剂层23的上表面形成(层叠)保护膜。关于试剂层,后面参照对其进行图示的图4～图6进行叙述。

[0313] 传感器11的制造方法没有特别限定,可以适当选择使用能够制造在规定的部位具有上述那样的构成的传感器11的方法。例如,传感器11可以通过进行下述的工序(i)～(viii)来制造。

[0314] (i)在基板21的上表面形成(层叠)电极22的工序

[0315] (ii)形成将电极22物理且电气分离为工作电极22a、参比电极22b和对电极22c这3个区域的、槽A1和A2的工序

[0316] (iii)在电极22(参比电极22b)的上表面形成银/氯化银层24的工序

[0317] (iv)在电极22和银/氯化银层24的上表面形成(层叠)膜25的工序

[0318] (v)在电极22(工作电极22a)的上表面形成试剂层23的工序

[0319] (vi)除去试剂层23和电极22的一部分(区域X6)的工序

[0320] (vii)从基板21切出传感器11的工序

[0321] (viii)形成保护膜的工序

[0322] 关于上述工序(i),电极22的形成(层叠)方法可以考虑电极22的材料与基板21的材料的组合等而适当选择、调整。例如,在基板21的材料为PET等合成树脂、电极22的材料为金属的情况下,可以通过蒸镀(包括溅射。)在基板21的表面形成包含该金属材料的电极22,但除此以外,也可以使用印刷、镀敷、旋涂等。在基板21的材料为PET等合成树脂、电极22的材料为碳的情况下,例如,可以通过在基板21的表面印刷碳糊来形成由碳构成的电极22。需要说明的是,该工序中的基板21无需预先具有传感器11的形状,为了能够通过之后进行的工序(vii)切出传感器11,可以使用具有比传感器11大的尺寸的基板21。

[0323] 关于上述工序(ii),作为形成槽A1和A2的手段,例如可以使用激光修整。

[0324] 关于上述工序(iii),银/氯化银层24的形成方法可以考虑银/氯化银层24的材料与电极22的材料的组合等而适当选择调整。例如,使用银/氯化银糊(墨液),在以金属或碳为材料的电极22的上表面通过丝网印刷法、喷墨法等进行印刷或涂布后,进行干燥,由此能够在电极22的上表面形成银/氯化银层24。另外,也可以在电极22的上表面印刷、涂布、镀覆银(Ag)等之后,对其表面进行氯化处理,由此形成银/氯化银层24。

[0325] 关于上述工序(iv),膜25的形成(层叠)方法可以考虑膜25的材料与电极22和银/氯化银层24的材料的组合等而适当选择调整。例如,在由树脂片材和粘合片的层叠体构成、或由粘合片单体构成的膜25上,预先形成与试剂层23的尺寸对应的(至少比试剂层23的尺寸大的)开口。将这样的膜25以其开口包围电极22(工作电极22a)的形成试剂层23的部分的方式配置于电极22的上表面,并通过粘合片固定。另一方面,也可以通过使用抗蚀膜或抗蚀墨液将上述那样的规定的位置和尺寸的部分除去,从而形成(层叠)具有规定的开口的膜25。

[0326] 需要说明的是,在电极22中的对电极22c的一部分(区域X3)的上表面未形成膜25,对电极22c露出。因此,例如,也可以在如上述那样暂时也包括对电极22c的上表面地形成膜之后,通过切割等在膜25上形成切口形状的开口。

[0327] 在上述工序(v)中,例如,使用具有规定的开口的膜25和预先制备的试剂液,将该试剂液滴加到通过上述工序(iv)形成(层叠)的膜25的开口的部分,由此能够施加至工作电极22a的至少一部分。然后,通过使该施加的试剂液干燥,从而在工作电极22a的上表面形成试剂层23。

[0328] 需要说明的是,膜25的开口例如可以具有形成比传感器11(图11(B)所示的前端部分)的宽度大的宽度的试剂层的尺寸和形状。在该情况下,由所施加的试剂液形成的比传感器11的宽度大的试剂层通过以下的工序(vi)被整形为具有规定的宽度和形状。

[0329] 关于上述工序(vi)中的试剂层23和电极22的除去(修整),在传感器11(前端部分)的宽度方向的端部,遍及传感器11的长度方向(例如向生物体的插入方向)的规定的长度进行。通过这样的工序(vi)中的修整,在一定程度的面积形成试剂层后,选择适当的部分(优选均匀的部分),能够形成在传感器间一致的规定的面积的试剂层,并且能够在接下来的工序(vii)中,不切割所形成的试剂层地将传感器11沿着外形从基板21切出。试剂层23和电极22的除去方法可以考虑试剂层23的材料(试剂液的组成)和电极22的材料等而适当选择调整。例如,试剂层23和电极22可以通过激光修整来除去。

[0330] 关于上述工序(vii),从基板21切出(切割)传感器11的方法可以考虑基板21的材料、所切出的传感器的形状等而适当选择并调整。例如,在基板21的材料为树脂的情况下,可以使用通常的切割技术。

[0331] 需要说明的是,切割位置包括通过工序(vi)修整的部分,例如,可以将基于激光修整的凹部的底部分的中央线附近作为切割位置。换言之,在稍微远离修整后的试剂层23和工作电极22a的位置进行切割。

[0332] 上述工序(viii)除了可以参照关于本发明的电化学传感器而记载的保护膜的形成方法以外,还可以考虑保护膜的材料即保护膜溶液的组成和要被覆的部分的材料(主要是试剂层23的材料即试剂液的组成)的组合、要被覆的部分的形状、面积等而适当选择、调整。例如,通过在保护膜溶液中浸渍工作电极22a(至少形成有试剂层23的部分),提起并干燥,从而能够用保护膜被覆该部分。

[0333] 图3是表示本发明的其他实施方式中的传感器101的俯视图。传感器101由感测部(插入到生物体内或浸渍于培养基中的前端部分)121、以及用于与主体(未图示)的内部电路电连接的端子部122构成。

[0334] 图4表示图3的A-A'切断线处的传感器101的剖视图。在绝缘性基板111的两面具备导电性薄膜112。绝缘性基板111的一个面(表侧)的导电性薄膜112通过激光描绘而形成到达绝缘性基板111的表面的深度的槽113,进行电绝缘,由此分离为工作电极区域112a和参比电极区域112b。

[0335] 绝缘性基板111的上表面被绝缘性抗蚀膜116a被覆,所述绝缘性抗蚀膜116a具有用于在参比电极区域112b的规定的位置处形成参比电极115的开口,并且绝缘性基板111的下表面被绝缘性抗蚀膜116b被覆。另一方面,从感测部分112的端部到离开一定距离的部分为止,上表面、下表面均未被绝缘性抗蚀膜116a、116b被覆,其表侧的区域112a成为工作电极114,里侧的区域112c成为对电极117。试剂层118形成于工作电极114上。

[0336] 图5表示图4中的B-B'切断线处的剖视图,图6表示图4中的C-C'切断线处的剖视图。如图5所示,在B-B'切断线处,从上表面朝向下表面依次(图中的箭头方向)形成有保护膜119、试剂层118、工作电极114、绝缘性基板111、对电极117和保护膜119。另外,如图6所示,在C-C'切断线处,从上表面朝向下表面依次(图中的箭头方向)形成有保护膜119、参比电极115(绝缘性抗蚀膜116a)、工作电极区域112a、绝缘性基板111、对电极区域112c、绝缘性抗蚀膜116b和保护膜119。需要说明的是,图6所示的工作电极区域112a和对电极区域112c在其上表面侧具备绝缘性抗蚀膜116a、116b,因此不作为工作电极和对电极发挥功能。

[0337] 图7是表示本发明的其他实施方式中的传感器201的俯视图。传感器201包含:具备用于对分析物进行电化学测定的构成的感测部202;具备用于与主体(未图示)的内部电路电连接的构成的端子部203;以及设置于端子部的附近的凹口部204。传感器201例如是在构建培养基中的分析物测定用的系统的情况下所适宜的实施方式,感测部202具有也可以浸渍于液量少的培养基中的结构,凹口部204具有适于将传感器201设置于培养容器的结构。图7的(A)表示形成膜(绝缘性抗蚀膜)220之前的电极图案,图7的(B)表示形成膜220之后的电极图案。

[0338] 如图7的(A)所示,传感器201在基板210上形成有电极220,电极220通过槽225在物理上且电气上被分离为第1工作电极221、第2工作电极222、参比电极223和对电极224。如图

7的(B)所示,通过用膜220被覆,从而第1工作电极221具有感测部202中的露出区域221a和端子部203中的露出区域221b。同样地,第2工作电极222、参比电极223和对电极224也分别具有感测部202中的露出区域222a、223a和224a、以及端子部203中的露出区域222b、223b和224b。在感测部202中,第1工作电极的露出区域221a和第2工作电极的露出区域222a以面积最大化的方式被横向排列地配置,并且还配置参比电极的露出区域223a和对电极的露出区域224a。在第1工作电极的露出区域221a和第2工作电极的露出区域222a,能够形成用于分别测定不同的分析物的不同种类的试剂层(未图示)。第1工作电极、第2工作电极、参比电极和对电极各自的端子部203中的露出区域221b、222b、223b和224b例如可以通过电极垫(未图示)与主体(未图示)电连接。

[0339] [实施例]

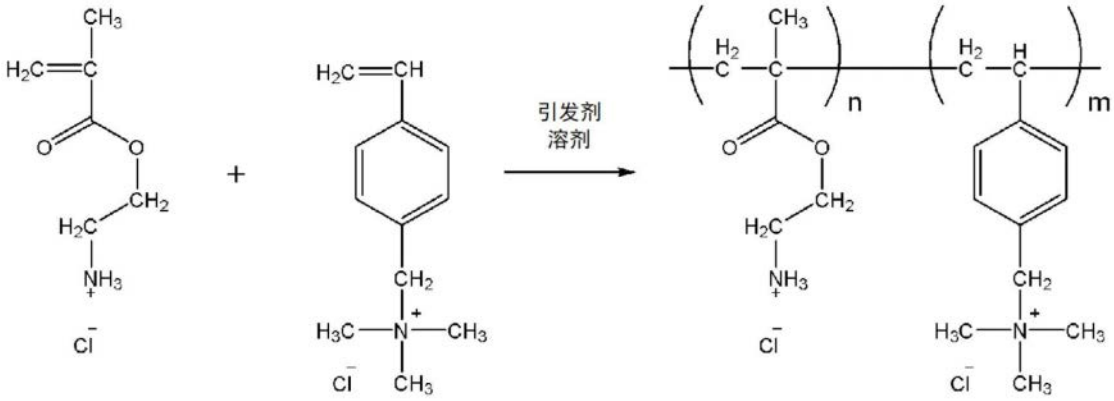
[0340] 以下,通过实施例和比较例更具体地说明本发明的实施方式。然而,本发明不应被本实施例所公开的实施方式限定性地解释,应被解释为包括与本实施例所公开的实施方式同样地发挥本发明的作用效果的其他实施方式。

[0341] 在以下的实施例和比较例中,作为吩噻嗪系化合物,使用了3-(4'-羧基苯基)亚氨基-3H-吩噻嗪(Glanren公司制)、硫堇(富士胶片和光纯药株式会社制)、AZURE(日文:アズール)A(富士胶片和光纯药株式会社制)、AZURE B(富士胶片和光纯药株式会社制)、AZURE C(MP Biomedicals公司制或富士胶片和光纯药株式会社制)、亚甲基蓝(MP Biomedicals公司制)和甲苯胺蓝(东京化成工业株式会社制)。这些吩噻嗪系化合物统称为"PNT化合物"。

[0342] 以下的实施例和比较例中使用的聚合物A、聚合物B和聚合物C分别是按照下述步骤得到的聚合物。

[0343] [聚合物A的合成]

[0344] [化学式13]

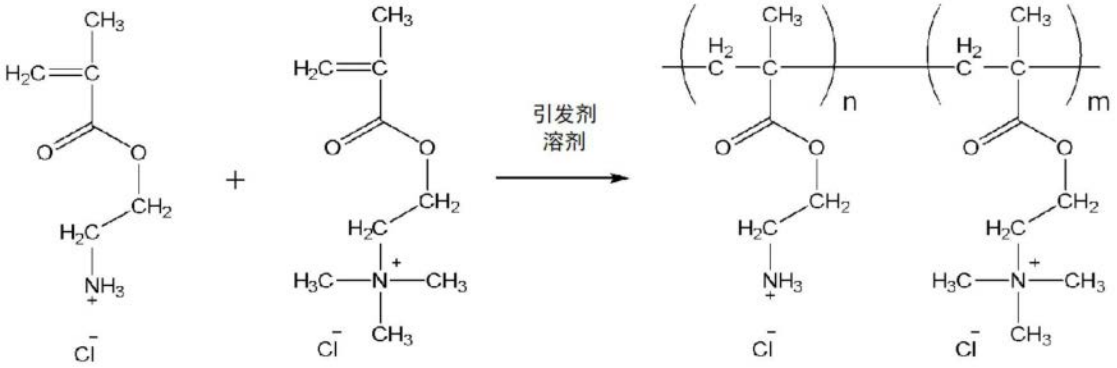
[0345] 

[0346] 首先,准备甲基丙烯酸2-氨基乙酯盐酸盐和(乙烯基苄基)三甲基氯化铵。然后,向4口烧瓶中投入甲基丙烯酸2-氨基乙酯盐酸盐7.36mmol、(乙烯基苄基)三甲基氯化铵7.36mmol、2,2'-偶氮双(2-甲基丙脒)二盐酸盐(以下称为"V-50"。)0.07mmol、离子交换水11.11g。接着,将搅拌片、温度计、减压/Ar气体管线设置于4口烧瓶。一边在室温下搅拌,一边使用减压/Ar气体管线重复10次4口烧瓶内的减压和Ar气体的供给,对烧瓶内的试样进行脱气。在脱气处理之后将4口烧瓶密闭,在反应温度60℃进行聚合反应24小时(根据需要适当调整反应时间。)。聚合的进行和结束通过利用1H-NMR测量单体的消失来确认。反应结束后,将反应液放入到透析膜(MWCO:3500)中,透析3天。这时,1天更换2次液体。透析结束后,

将所得到的反应物冷冻干燥,得到了聚合物A。聚合物A相当于根据1H-NMR的结果算出摩尔比的结果为n:m＝48.5:51.5的聚合物。

[0347] [聚合物B的合成]

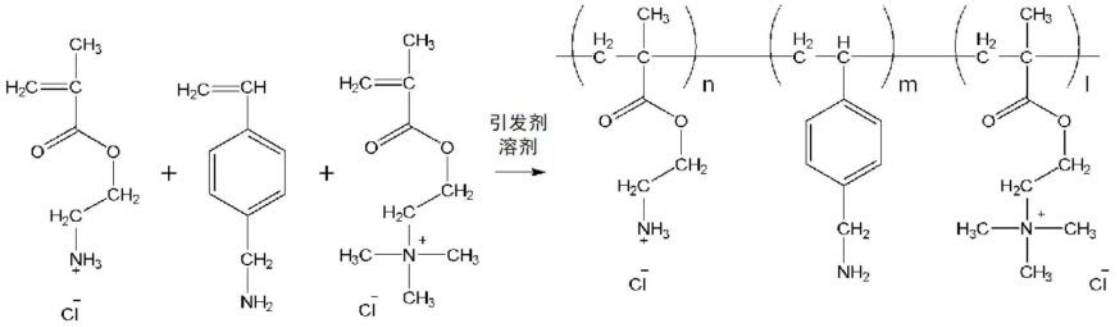
[0348] [化学式14]

[0349] 

[0350] 首先,准备甲基丙烯酸2-氨基乙酯盐酸盐和甲基丙烯酰氧乙基三甲基氯化铵。然后,在4口烧瓶中投入甲基丙烯酸2-氨基乙酯盐酸盐1.14mmol、甲基丙烯酰氧乙基三甲基氯化铵10.22mmol、0.06mmol的V-50、离子交换水8.71g。之后实施与聚合物A的情况相同的处理,得到了聚合物B。聚合物B相当于根据1H-NMR的结果算出摩尔比的结果为n:m＝13.3:86.7的聚合物。

[0351] [聚合物C的合成]

[0352] [化学式15]

[0353] 

[0354] 首先,准备甲基丙烯酸2-氨基乙酯盐酸盐、(4-乙烯基苯基)甲胺和甲基丙烯酰氧乙基三甲基氯化铵。然后,在4口烧瓶中投入甲基丙烯酸2-氨基乙酯盐酸盐0.97mmol、(4-乙烯基苯基)甲胺0.97mmol、甲基丙烯酰氧乙基三甲基氯化铵11.97mmol、0.08mmol的V-50、乙醇10.49g。之后实施与聚合物A的情况相同的处理,得到了聚合物C。聚合物C相当于根据1H-NMR的结果算出摩尔比的结果为n:m:l＝21.2:8.1:70.7的聚合物。另外,利用凝胶渗透色谱(GPC)进行了测定,结果该聚合物的数均分子量Mn为37774,重均分子量Mw为214367。

[0355] [参考实施例1-1～1-5和参考比较例1-1～1-2]

[0356] 作为PNT化合物,使用3-(4'-羧基苯基)亚氨基-3H-吩噻嗪(参考比较例1-1)、硫堇(参考比较例1-2)、AZURE A(参考实施例1-1)、AZURE B(参考实施例1-2)、AZURE C(参考实施例1-3)、亚甲基蓝(参考实施例1-4)和甲苯胺蓝(参考实施例1-5),按照下述的步骤,进行光学试验和氧化还原反应试验。

[0357] ＜光学试验＞

[0358] 将各PNT化合物用100mM磷酸钠缓冲液(pH7.4)在0.01～0.2mM的范围内以成为合

适的浓度的方式制备水溶液,使用VIOLAMO紫外线透射型Disposable Cell Semimicro Type和Agilent8453紫外可见分光光度系统测定吸收光谱。测定后,将各PNT化合物的水溶液在40℃环境下保存,然后随时取出进行测定,确认经时变化直至第14天或第15天。

[0359] ＜氧化还原反应试验＞

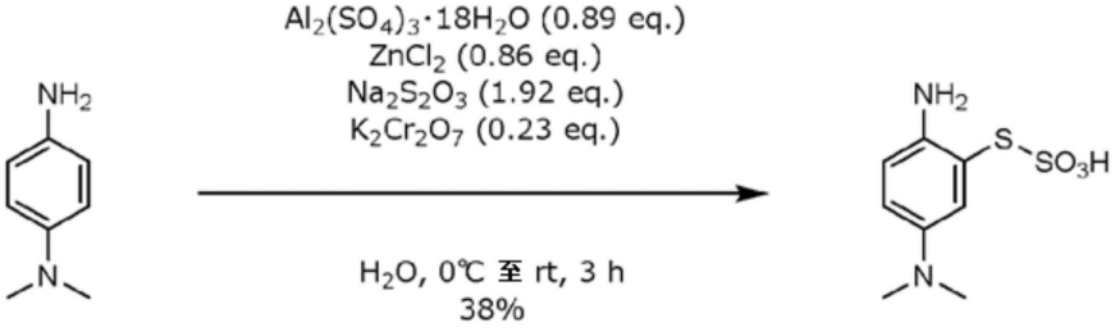
[0360] 通过循环伏安法进行氧化还原反应的测定。测定中,使用用100mM磷酸钠缓冲液(pH7.4)制备成0.1mM的各PNT水溶液,工作电极使用玻璃状碳电极,对电极使用铂丝,参比电极使用Ag/AgCl电极(饱和KCl),利用恒电位仪进行。扫描速度设定为0.1V/Sec.。各种电极和恒电位仪使用BAS公司制的产品作为电化学中通常使用的电极和恒电位仪。测定后,将各PNT化合物的水溶液在40℃环境下保存,然后随时取出进行测定,确认经时变化直至规定的天数。

[0361] 将上述试验的结果示于图8、图9和图10。根据经时测定的吸收光谱和循环伏安图明确了:在吩噻嗪骨架的3位具有亚胺阳离子的PNT化合物(参考实施例1-1～1-5)与在相同位置具有亚氨基的PNT化合物(参考比较例1-1)、具有氨基的PNT化合物(参考比较例1-2)相比,具有高的保存稳定性。

[0362] [实施例2-1]与特定键合性取代基键合的、具有来自于亲水部导入用化合物的亲水部(-N(CH_3)(CH_2)$_3$-CO-NH-PEG3-(CH_2)2-COOH)的PNT化合物(PNT-66)

[0363] (1)磺酸片段的合成

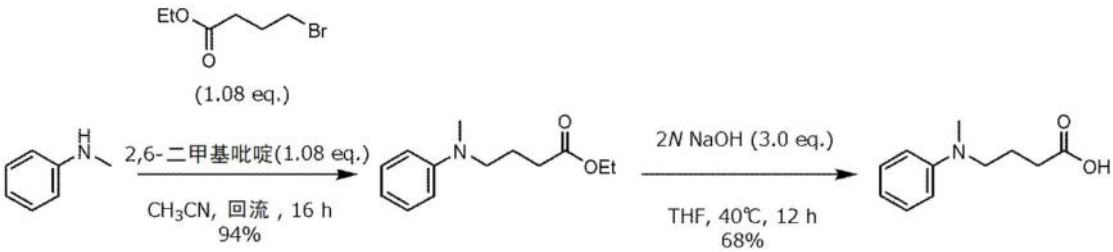
[0364] [化学式16]

[0365] 

[0366] 通过上述反应合成磺酸片段。

[0367] (2)磺酸片段的合成

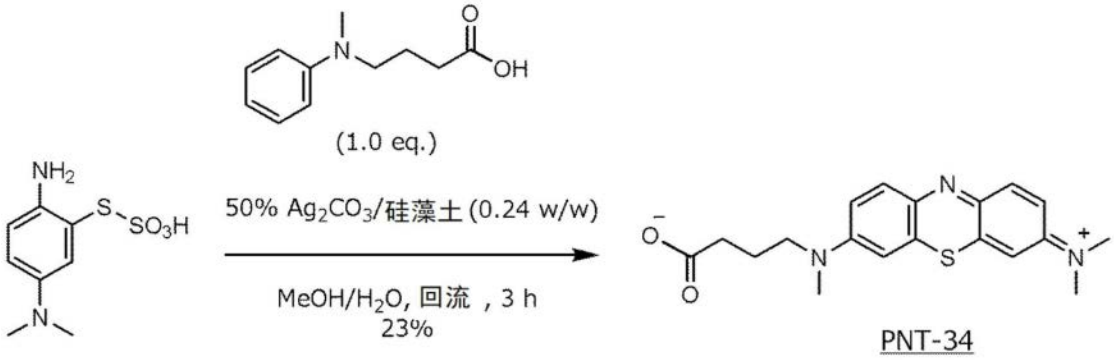
[0368] [化学式17]

[0369] 

[0370] 通过上述反应合成羧酸片段。

[0371] (3)PNT-34的合成

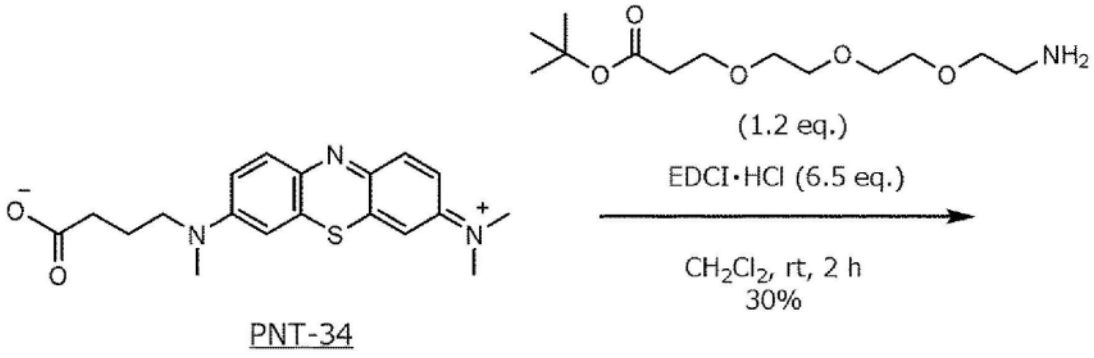
[0372] [化学式18]

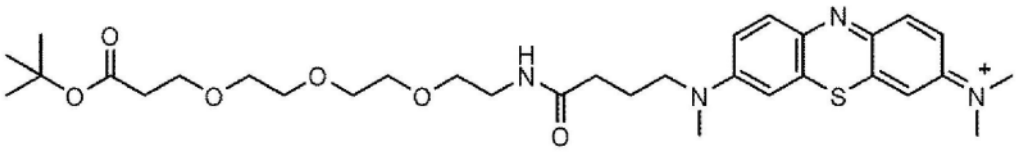
[0373] 

[0374] 使如上述那样合成的磺酸片段和羧酸片段悬浮于MeOH/H_2O,在内温47℃附近用15分钟分批添加50％Ag_2CO_3/硅藻土。添加后,在内温68℃附近搅拌2.5小时。放冷至室温后,进行硅藻土过滤,将滤液浓缩。将残渣用硅胶柱色谱纯化多次,由此得到了PNT-34。

[0375] (4)缩合物(PNT-65)的合成

[0376] [化学式19]

[0377] 

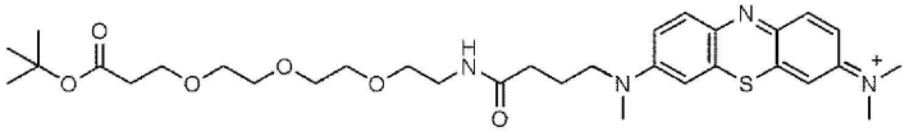


PNT-65

[0378] 使PNT-34溶解于二氯甲烷,制备溶液(1)。使氨基-PEG3-叔丁酯和1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐(EDCI·HCl)悬浮于二氯甲烷,制备悬浮液(2)。将悬浮液(2)添加到溶液(1)中并在室温下搅拌2小时。将反应液用硅胶柱色谱纯化2次,由此得到了缩合物(PNT-65)。

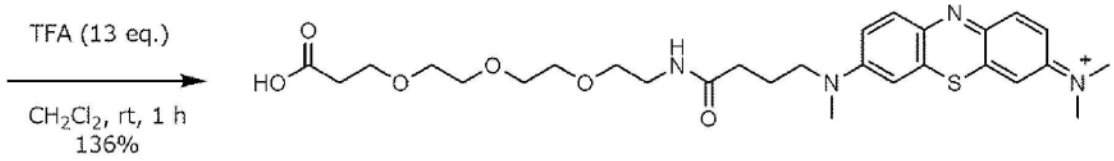
[0379] (5)脱保护体(PNT-66)的合成

[0380] [化学式20]



PNT-65

[0381]



PNT-66

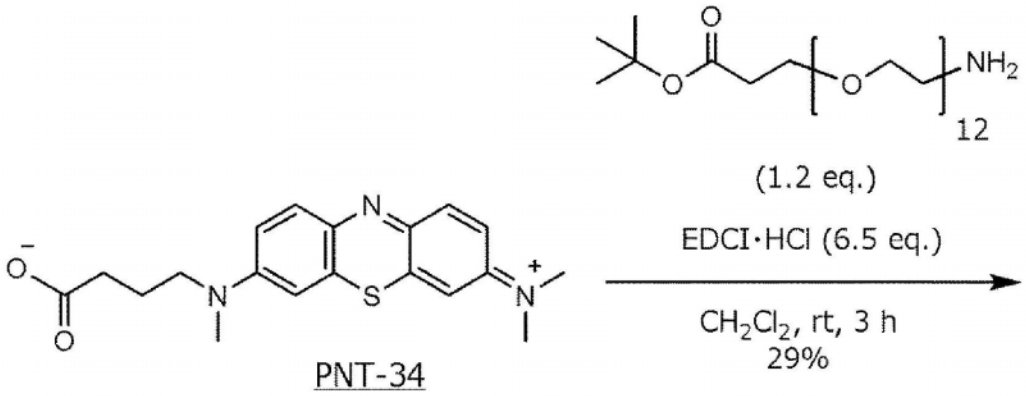
[0382] 使缩合物(PNT-65)溶解于二氯甲烷,添加TFA后,在室温下搅拌1小时。将反应液浓缩后,用甲苯共沸数次,由此得到了脱保护体(PNT-66)。

[0383] [实施例2-2]与特定键合性取代基键合的、具有来自于亲水部导入用化合物的亲水部(-N(CH_3)(CH_2)$_3$-CO-NH-PEG12-(CH_2)$_2$-COOH)的PNT化合物(PNT-69)

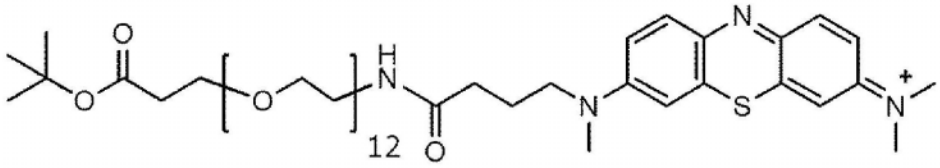
[0384] (1)缩合物(PNT-68)的合成

[0385] [化学式21]

[0386]



PNT-34

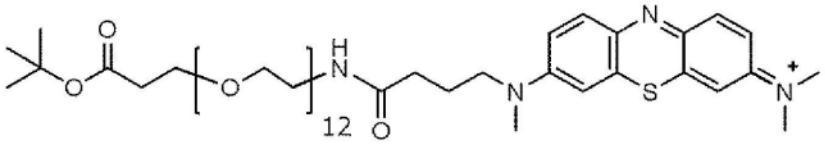


PNT-68

[0387] 在Ar气氛下,使PNT-34(参照实施例2-1)溶解于二氯甲烷,添加氨基-PEG12-叔丁酯和EDCI·HCl后,在室温下搅拌3小时。将反应液浓缩后,用硅胶柱色谱纯化3次,由此得到了缩合物(PNT-68)。

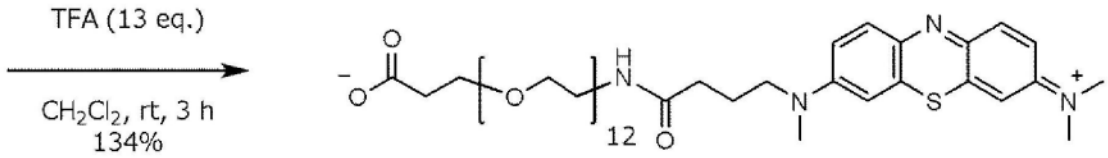
[0388] (2)脱保护体(PNT-69)的合成

[0389] [化学式22]



PNT-68

[0390]



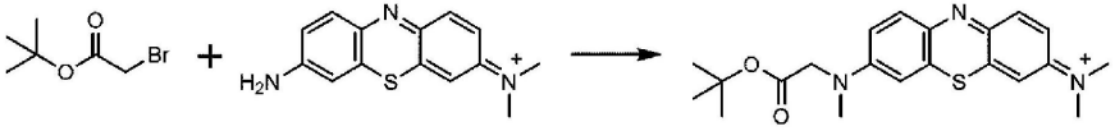
PNT-69

[0391] 使(1)中得到的缩合物(PNT-68)溶解于二氯甲烷,添加TFA后,在室温下搅拌3小时。将反应液浓缩后,用甲苯共沸数次,由此得到了脱保护体(PNT-69)。

[0392] [实施例2-3]具有与特定键合性取代基键合的、来自于亲水部导入用化合物的亲水部(-N(CH_3)CH_2-CO-NH-PEG12-CH_2-COOH)的PNT化合物(PNT-63)

[0393] (1)工序1:基于烷基化反应的吩噻嗪系化合物的合成

[0394] [化学式23]

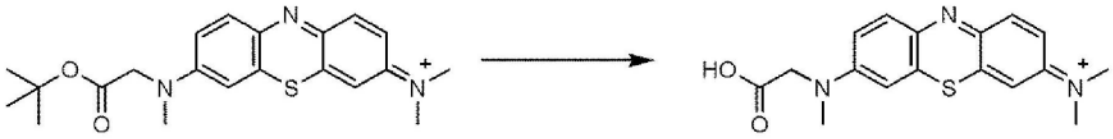
[0395] 

PNT-54

[0396] 使100mg(343.57μmol)的AZURE A溶解(悬浮)于2mL的DMF中,加入溴乙酸叔丁酯355mg(1710.9μmol),接着加入碳酸钾(K_2CO_3)226mg(1635μmol),在室温下搅拌3小时。加入碘代甲烷244mg(1718μmol),在室温下搅拌2小时。过滤除去不溶物后,利用硅胶柱(甲醇/氯仿,分阶(日文:ステップワイズ)),接着利用ODS柱(0.1%TFA/甲醇,线性梯度)生成,得到了40mg的PNT-54。

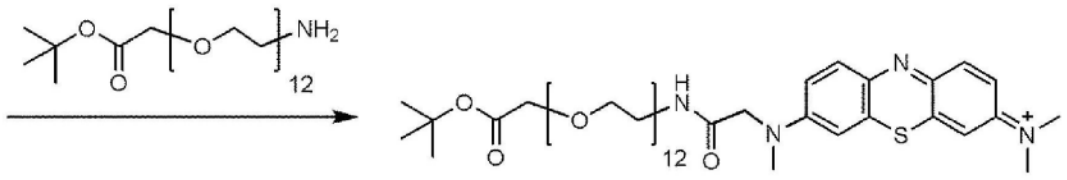
[0397] (2)工序2:亲水部导入用取代基的脱保护和基于酰胺化反应的亲水部的导入

[0398] [化学式24]



PNT-54 PNT-55

[0399]

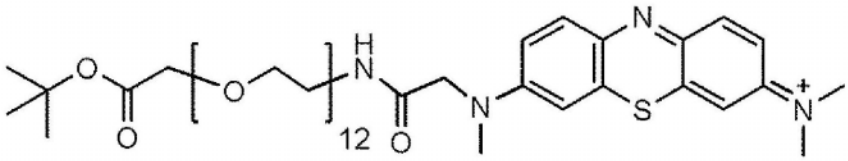


PNT-62

[0400] 向53mg的PNT-54中加入1mL的TFA,在室温下搅拌1小时。在减压下除去TFA后,一次性加入溶解有NH_2-PEG13-COOtBu40.5mg(96.4μmol)和WSC 123mg(642.6μmol)的DMF溶液。在室温下搅拌1小时后,进行减压浓缩而除去DMF,利用ODS柱进行纯化,接着利用HPLC柱进行(0.1%TFA/水,乙腈线性梯度)纯化,得到了17.7mg的PNT-62。

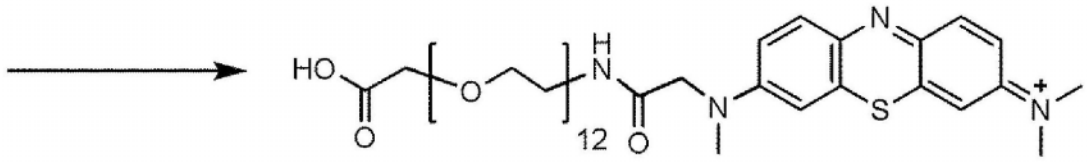
[0401] (3)工序3:亲水部的脱保护

[0402] [化学式25]



PNT-62

[0403]



PNT-63

[0404] 在室温下,在21mg的PNT-62中加入1mL的TFA,搅拌1小时。在减压下除去TFA,直接进行减压干燥,得到了20mg的作为目标物的PNT-63。

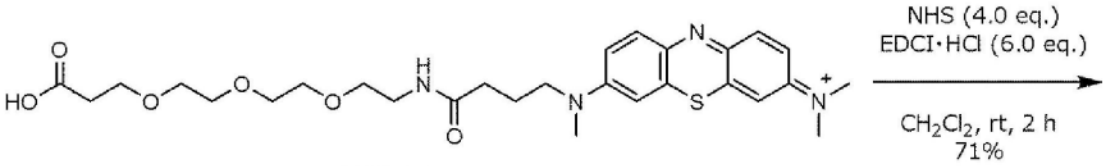
[0405] <光学试验和氧化还原反应试验>

[0406] 对于实施例2-1～2-3各自的脱保护体,除了使用pH7.4的磷酸钠缓冲液以外,还使用pH6.2和pH8.0的磷酸钠缓冲液进行试验,除此以外,与上述参考实施例和参考比较例中的步骤同样地进行光学试验和氧化还原反应试验。将结果示于图11、图12和图13。根据经时测定的吸收光谱和循环伏安图明确了:在吩噻嗪骨架的3位具有亚胺阳离子,并且在吩噻嗪骨架的其他部位(6位)导入有亲水部(PEG链)的PNT化合物也具有高的保存稳定性。

[0407] [实施例3-1]与聚(L-赖氨酸)键合的PNT-66的制作

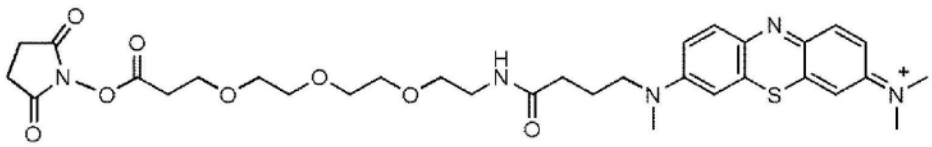
[0408] (1)PNT-66NHS体(PNT-67)的合成

[0409] [化学式26]



PNT-66

[0410]



PNT-67

[0411] 使脱保护体(PNT-66)溶解于二氯甲烷,添加N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)和EDCI·HCl

后,在室温下,搅拌2小时。将反应液用硅胶柱色谱纯化2次,由此得到了PEG链(PEG3)的末端的羧基被活化(NHS酯化)的PNT-66NHS体(PNT-67)。

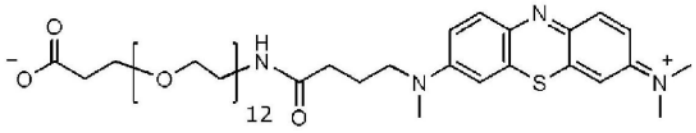
[0412] (2)与聚(L-赖氨酸)的键合

[0413] 将(1)中得到的PNT-66NHS体(PNT-67)以成为15mg/mL的方式用MiliQ水溶解(液(1))。作为高分子量聚合物,将聚(L-赖氨酸)盐酸盐(ALAMANDA POLYMERS PLKC800)以成为10mg/mL的方式用MiliQ水溶解(液(2))。接下来,将WSC(DOJINDO WOO1)以成为20mg/mL的方式用MiliQ水溶解(液(3))。将液(1)43.7μL、液(2)51.3μL、液(3)479.3μL和另行制备的250mM的2-吗啉代乙磺酸(MES)缓冲液(pH6.0)96μL混合,用MiliQ水调整至合计体积成为1200μL。然后,在室温下一边搅拌一边反应约20小时。然后,使用离心式超滤过滤器(Amicon Ultra-4 50k;MERCK MILLIPORE)进行多次超滤,回收除去了低分子的液体。

[0414] [实施例3-2]与聚合物A键合的PNT-69的制作

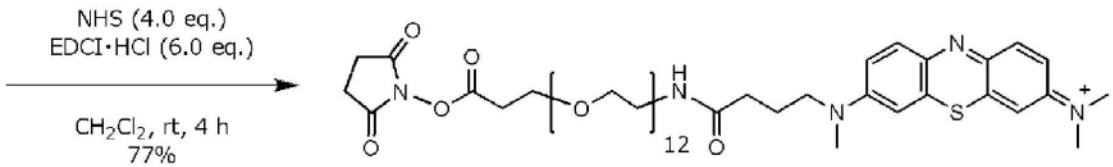
[0415] (1)PNT-69NHS体(PNT-70)的合成

[0416] [化学式27]



PNT-69

[0417]



PNT-70

[0418] 使脱保护体(PNT-69)溶解于二氯甲烷,添加N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)和EDCI·HCl后,在室温下搅拌4小时。将反应液用硅胶柱色谱纯化,由此得到了PEG链(PEG12)的末端的羧基被活化(NHS酯化)的PNT-69NHS体(PNT-70)。

[0419] (2)与聚合物A的键合

[0420] 将PNT-69NHS体(PNT-70)以成为21.05mg/mL的方式用MiliQ水溶解(液(1))。作为高分子量聚合物,将聚合物A以成为15mg/mL的方式用MiliQ水溶解(液(2))。接下来,将WSC(DOJINDO WOO1)以成为20mg/mL的方式用MiliQ水溶解(液(3))。将液(1)50μL、液(2)104.1μL、液(3)479.3μL和另行制备的250mM的2-吗啉代乙磺酸(MES)缓冲液(pH6.0)96μL混合,用MiliQ水调整至合计体积成为1200μL。然后,在室温下一边搅拌一边反应约20小时。然后,使用离心式超滤过滤器(Amicon Ultra-4 50k;MERCK MILLIPORE)进行多次超滤,回收除去了低分子的液体。

[0421] [实施例3-3]与聚合物B键合的PNT-69的制作

[0422] 将PNT-69NHS体(PNT-70)以成为21.05mg/mL的方式用MiliQ水溶解(液(1))。作为高分子量聚合物,将聚合物B以成为15mg/mL的方式用MiliQ水溶解(液(2))。接下来,将WSC(DOJINDO WOO1)以成为20mg/mL的方式用MiliQ水溶解(液(3))。将液(1)50μL、液(2)405.2μ

L、液(3)479.3μL和另行制备的250mM的2-吗啉代乙磺酸(MES)缓冲液(pH6.0)96μL混合,用MiliQ水调整至合计体积成为1200μL。然后,在室温下一边搅拌一边反应约20小时。然后,使用离心式超滤过滤器(Amicon Ultra-4 50k;MERCK MILLIPORE)进行多次超滤,回收除去了低分子的液体。

[0423] [实施例3-4]与聚合物C键合的PNT-69的制作

[0424] 将PNT-69NHS体(PNT-70)以成为21.05mg/mL的方式用MiliQ水溶解(液(1))。作为高分子量聚合物,将聚合物C以成为15mg/mL的方式用MiliQ水溶解(液(2))。接下来,将WSC(DOJINDO W001)以成为20mg/mL的方式用MiliQ水溶解(液(3))。将液(1)40μL、液(2)140.3μL、液(3)383.4μL和另行制备的250mM的2-吗啉代乙磺酸(MES)缓冲液(pH6.0)96μL混合,用MiliQ水调整至合计体积成为1200μL。然后,在室温下一边搅拌一边反应约20小时。然后,使用离心式超滤过滤器(Amicon Ultra-4 50k;MERCK MILLIPORE)进行多次超滤,回收除去了低分子的液体。

[0425] ＜光学试验＞

[0426] 对于实施例3-1～3-4各自的与高分子量聚合物键合的PNT-66或PNT-69(聚合物键合型PNT),将回收的聚合物键合型PNT的溶液用磷酸缓冲生理盐水(PBS)(Takara Bio PBS Tablets T9181)调整至规定的浓度,向微孔板中投入150μL,使用酶标仪测定吸收光谱。另外,在测定后,在37℃下保存,在第7天、第14天取出,再次进行测定。在此,微孔板使用Greiner Bio-One公司制的UV-Star(注册商标)96Well F-Boden。另外,酶标仪使用Tecan公司制的infinite(注册商标)M200 Pro。

[0427] 将结果示于图14。根据测定结果,即使在37℃保存后第14天,光谱形状也没有显著的变化,因此显示出各种聚合物键合后的PNT具有高保存稳定性。

[0428] 另外,对于实施例3-2～3-4中制作的各聚合物键合型PNT(与高分子量聚合物A、B或C键合的PNT-69),除了使用pH6或pH8的磷酸钠缓冲液(由磷酸氢二钠和磷酸二氢钠制备)来代替磷酸缓冲生理盐水(PBS)以外,与上述同样地操作,对吸收光谱进行测定。将结果示于图15。这3种聚合物键合型PNT即使在pH6或pH8的磷酸钠缓冲液中,也与在PBS中同样地,即使在37℃保存后第14天,光谱形状也没有显著变化,显示出具有高保存稳定性。

[0429] ＜电化学响应性试验＞

[0430] (1)聚合物键合型PNT的试剂的制备

[0431] 将实施例3-2～3-4中制作的各聚合物键合型PNT和碳分散液的各试剂以成为表2所示的组成的方式混合,使其反应约1小时,制备试剂。碳分散液通过以下方式制备:将科琴黑EC300J(Lion Specialty Chemicals株式会社)以碳浓度成为16mg/mL的方式混合到5mg/mL的羟丙基纤维素(NISSO HPCL)溶液中,用超声波均化器处理3分钟以上,由此制备。另外,在分散液的制备后和试剂的制备时的使用前,用超声波浴处理约10分钟。关于各聚合物键合型PNT的浓度,将各溶液稀释25倍,向微孔板中投入100μL,用酶标仪测定吸收光谱,由此确认储备溶液的浓度,基于该值进行调整。

[0432] [表2]

[0433]

试剂名	终浓度	
碳分散液	5	mg/mL
各聚合物键合型PNT	2	608nm的吸光度

[0434] (2)传感器的制作

[0435] 在绝缘基板上通过溅射制作的金电极上涂布上述(1)中制备的试剂0.4μL,干燥约15分钟。再次涂布0.4μL的试剂后,通过过夜使其干燥,得到了具备包含聚合物键合型PNT的试剂层的电极(聚合物键合型PNT被覆电极)。

[0436] (3)评价

[0437] 将上述(2)中制作的聚合物键合型PNT被覆电极作为工作电极,以对电极使用金电极、参比电极使用Ag/AgCl电极(饱和KCl)(BAS公司制)的三电极式,使用BAS公司制的恒电位仪在PBS中进行循环伏安法。扫描速度以10mV/s进行,并且还进行各扫描速度下的氧化、还原峰电流值的测定。

[0438] 将结果示于图16。根据所得到的循环伏安图,观察到氧化还原电流,由此可知PNT在聚合物键合后也具有作为介体的功能。另外,氧化峰电流值(Ipa)、还原峰电流值(Ipc)与扫描速度成比例,因此启示聚合物键合后的PNT吸附在电极上。

[0439] <电化学响应性·耐久性试验>

[0440] (1)聚合物键合型PNT的试剂的制备

[0441] 与上述“电化学响应性试验”时同样地操作,制备聚合物键合型PNT的试剂。

[0442] (2)传感器的制作

[0443] 与上述“电化学响应性试验”时同样地操作,制作传感器。

[0444] (3)保护膜用聚合物溶液的制备

[0445] 将以下所示的各试剂以成为以下的终浓度的方式混合,制备保护膜用聚合物溶液。

[0446] ·聚(甲基丙烯酸叔丁酯-b-4-乙烯基吡啶)(Polymer Source公司制,以下称为“tBuMA4VP”)终浓度7.11%(wt/v)

[0447] ·三丙二醇甲醚甲基丙烯酸酯-苯乙烯-4-乙烯基吡啶的无规共聚物(NARD公司制,以下称为“TGMAS4VP”)终浓度0.89%(wt/v)

[0448] ·聚(乙二醇)二缩水甘油醚(Sigma-Aldrich公司制,以下称为“PEGDGE”)终浓度0.98%(wt/v)

[0449] ·HEPES缓冲液(pH8.0)终浓度5mM

[0450] 需要说明的是,tBuMA4VP、TGMAS4VP和PEGDGE溶解于乙醇来使用。关于tBuMA4VP的数均分子量Mn,聚(甲基丙烯酸叔丁酯)为87000,聚(4-乙烯基吡啶)为74000。tBuMA4VP的Mw/Mn为1.16。关于TGMAS4VP,三丙二醇甲醚甲基丙烯酸酯:苯乙烯:4-乙烯基吡啶=6.6:20.3:73.0,数均分子量Mn为60704,重均分子量Mw为120095,Mw/Mn为1.98。PEGDGE的数均分子量Mn为~1000。HEPES缓冲液使用2-[4-(2-羟乙基)-1-哌嗪基]乙磺酸(同仁化学公司制)来制备。

[0451] (4)保护膜用聚合物溶液的被膜

[0452] 将上述(2)中制作的电极(聚合物键合型PNT被覆电极)浸渍于保护膜用聚合物溶液中,提起,使其干燥,将该操作重复多次,在各电极上形成保护膜。

[0453] (5)评价

[0454] 将上述(4)中制作的电极作为工作电极,以对电极使用金电极、参比电极使用Ag/AgCl电极(饱和KCl)(BAS公司制)的三电极式,使用BAS公司制的恒电位仪在PBS、RPMI培养

基中进行循环伏安法。扫描速度以10mV/s进行。另外,在测定中,将通过循环伏安法循环多次而得到者作为最终的循环伏安图。测定后将电极保存在37℃的各溶液(与测定溶液同样)中。在保存后第1、4、7、19天进行同样的测定。需要说明的是,RPMI培养基使用如下液体:在用RPMI-1640Medium(Sigma-Aldrich公司制R1383)制作的溶液中加入作为缓冲液成分的MES(2-Morpholinoethanesulfonic acid monohydrate:2-吗啉乙磺酸一水合物)(同仁化学公司制)、MOPS(3-Morpholinopropanesulfonic acid:3-吗啉丙磺酸)(同仁化学公司制),使各终浓度为25mM,且调整为pH7.4,由此得到的液体。

[0455] 将结果示于图17。在37℃保存后第19天,在PBS中和RPMI培养基中均未观察到大的氧化还原峰减少。由此可知,没有引起聚合物键合型PNT的显著的失活和从电极上的流出。

[0456] <传感器评价试验>

[0457] (1)试剂液的制备

[0458] 将以下所示的各试剂以成为以下的终浓度的方式混合,使其反应约1小时,制备试剂液。需要说明的是,碳分散液在使用前用超声波浴处理约10分钟,然后使用。

[0459] • 磷酸钠缓冲液(pH6.5)终浓度5mM

[0460] • 碳分散液终浓度5mg/mL

[0461] • 各聚合物键合型PNT终浓度2(608nm的吸光度)

[0462] • FAD依赖性葡萄糖脱氢酶(GDH GLD1:BBI International公司制)终浓度2000U/mL

[0463] • 戊二醛25%溶液(富士胶片和光纯药株式会社制)终浓度0.01%(wt/v)

[0464] 需要说明的是,磷酸钠缓冲液用磷酸氢二钠(富士胶片和光纯药株式会社制)和磷酸二氢钠(富士胶片和光纯药株式会社制)制备。碳分散液通过如下方式得到:将科琴黑(EC300J:Lion Specialty Chemicals株式会社制)以碳浓度成为16mg/mL的方式混合到5mg/mL的羟丙基纤维素(NISSO HPCL日本曹达株式会社制)溶液中,用超声波均化器处理3分钟以上。关于各聚合物键合型PNT的浓度,将各聚合物键合型PNT的溶液稀释25倍,向微孔板中投入100μL,用酶标仪测定吸收光谱,由此确认溶液中的各PNT的浓度,基于该值进行调整。

[0465] (2)保护膜用聚合物溶液的制备

[0466] 与上述的"电化学响应性•耐久性试验"时同样地制作传感器。

[0467] (3)传感器用电极的制作

[0468] 通过溅射在绝缘基板上形成金电极。将含有各聚合物键合型PNT的试剂液0.4μL涂布在各自的金电极上,干燥约15分钟。重复该操作共计3次,通过过夜使其干燥。由此,在各金电极上形成试剂层。将形成有试剂层的各金电极浸渍于保护膜用聚合物溶液中,提起,使其干燥,将该操作重复多次,在各金电极上形成保护膜。通过以上的工序,得到了具备含有各聚合物键合型PNT的试剂层和被覆试剂层的保护膜的传感器用电极。

[0469] (4)传感器评价

[0470] 将通过上述(3)制作的传感器用电极作为工作电极,组合作为对电极的金电极和作为参比电极的Ag/AgCl电极(饱和KCl)(BAS公司制),制作3电极式的电极部。然后,使用恒电位仪(BAS公司制),通过电流法测定约37℃、PBS或RPMI培养基中的电流的时间变化。具体而言,从测定开始1000秒后每500秒添加葡萄糖,使得理论值为50mg/dL、150mg/dL、300mg/

dL、500mg/dL,持续测定电流响应值。测定后将电极保存在37℃的PBS或RPMI培养基中。另外,在保存后第2天、第3天进行同样的测定。需要说明的是,葡萄糖浓度50mg/dL、150mg/dL、300mg/dL时的电流值为:添加作为测定对象的葡萄糖后,由下一次即将添加葡萄糖之前的5秒前、10秒前、15秒前、20秒前和25秒前的5个点的测定值算出的平均值。另外,最终浓度的电流值是以葡萄糖浓度成为500mg/dL的方式添加葡萄糖溶液后,根据480秒后、485秒后、490秒后、495秒后和500秒后的5个点的测定值算出的平均值。需要说明的是,各葡萄糖浓度下的电流值是实施了减去葡萄糖浓度0mg/dL时的电流值的本底修正处理后的电流值。

[0471] 将结果示于图18。在PBS中、RPMI培养基中均观测到葡萄糖浓度依赖性的电流响应值的上升。由此可知,聚合物键合型PNT具有与酶的反应性,作为葡萄糖传感器发挥功能。另外,在保存第3天也未观测到显著的电流值的降低,可以理解聚合物键合型PNT与酶的反应性得以维持。

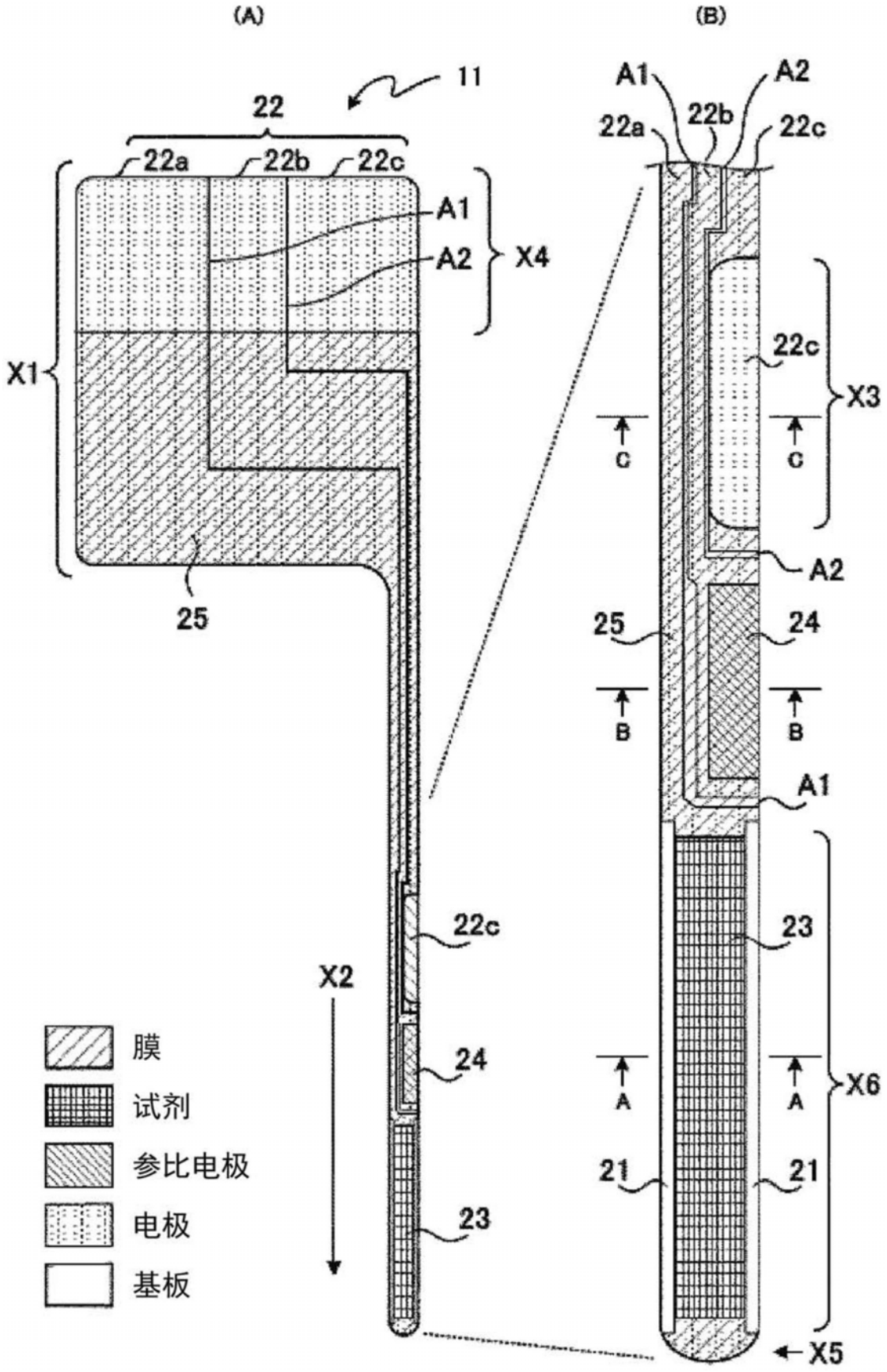

(A)
(B)
11
22
22a
22b
22c
A1
A2
X4
X1
25
X2
膜
试剂
参比电极
电极
基板
X3
C
B
A
X6
X5
21
23
24

图1

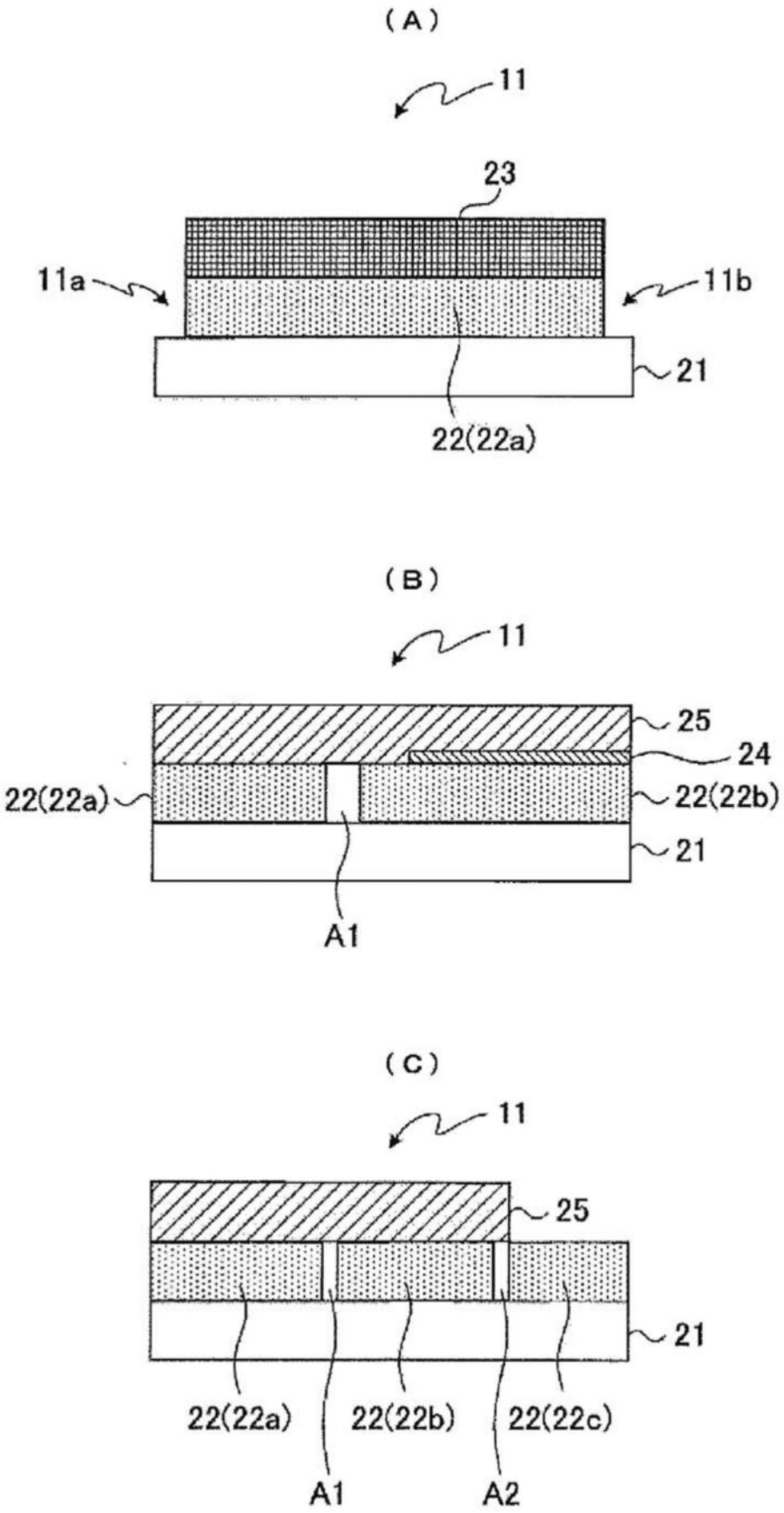

(A)
11
23
11a
11b
21
22(22a)
(B)
11
25
24
22(22a)
22(22b)
21
A1
(C)
11
25
21
22(22a)
22(22b)
22(22c)
A1
A2

图2

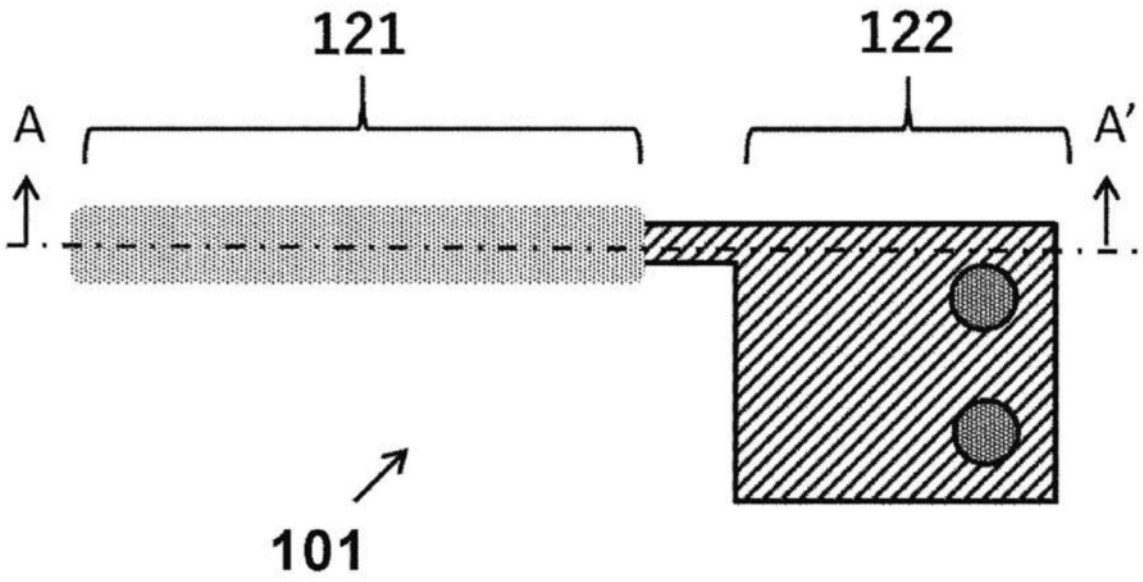

121
122
A
A'
101

图3

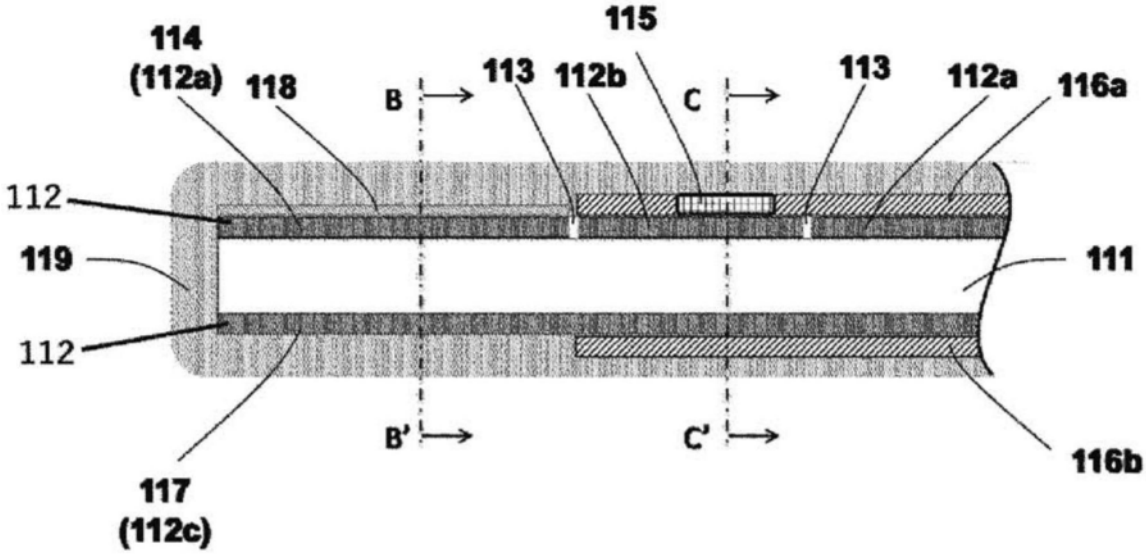

114
(112a)
118
B
113
112b
115
C
113
112a
116a
112
119
111
112
B'
C'
117
(112c)
116b

图4

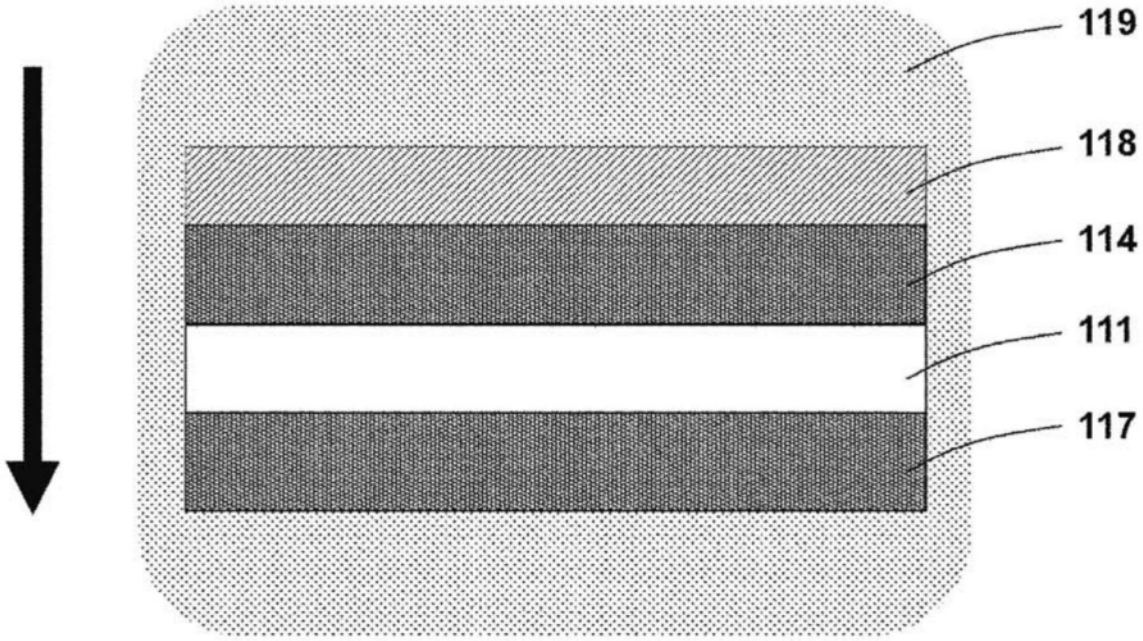


图5

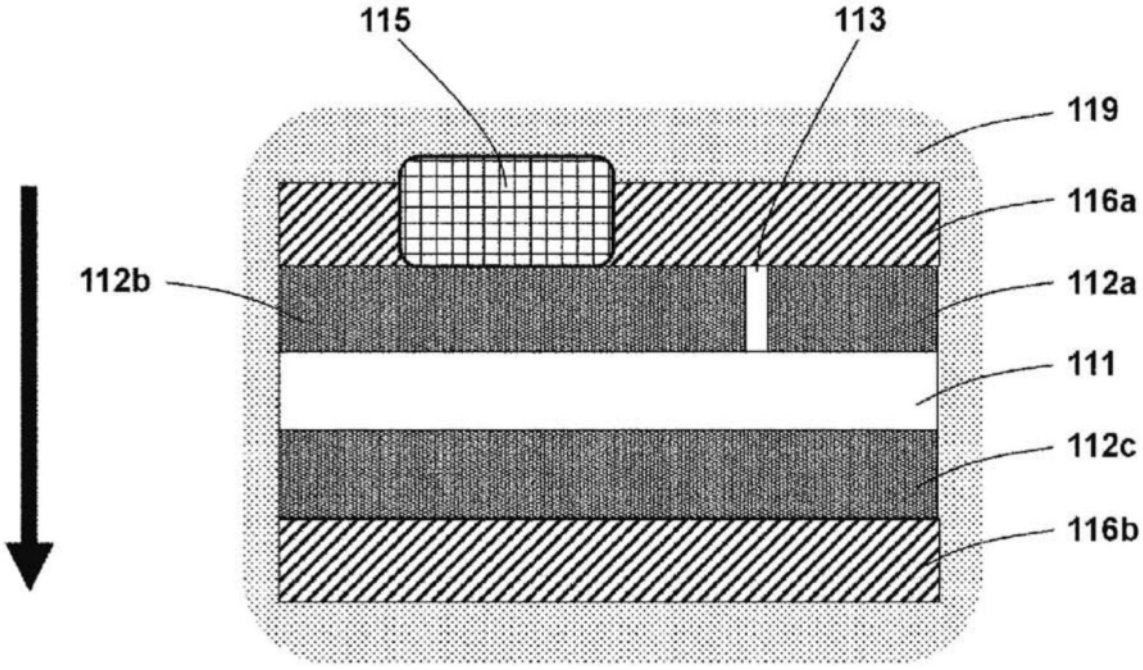


图6

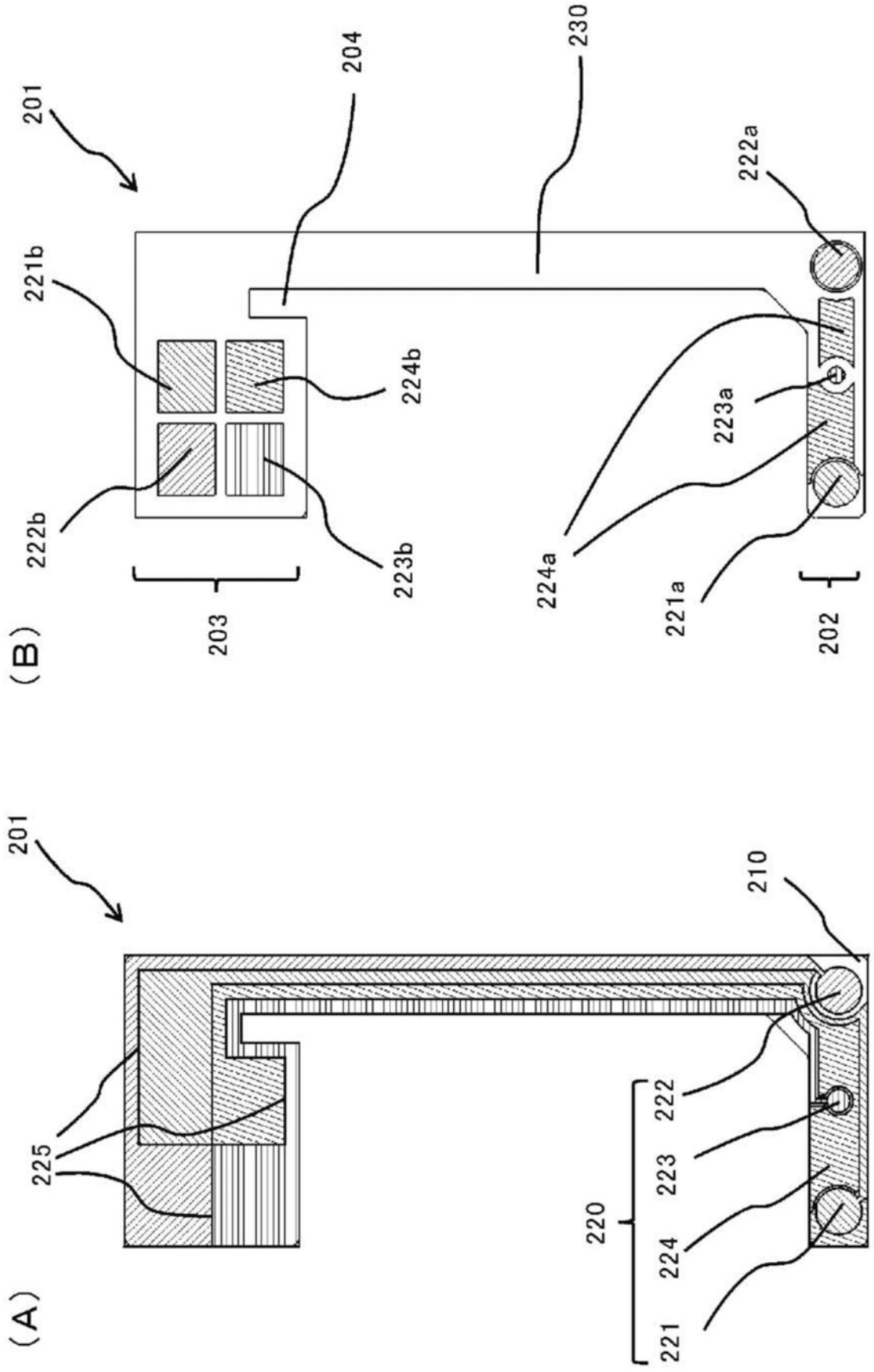

(B)
201
204
230
222a
221b
224b
223a
222b
223b
224a
221a
203
202
(A)
201
210
225
222
223
220
224
221

图7

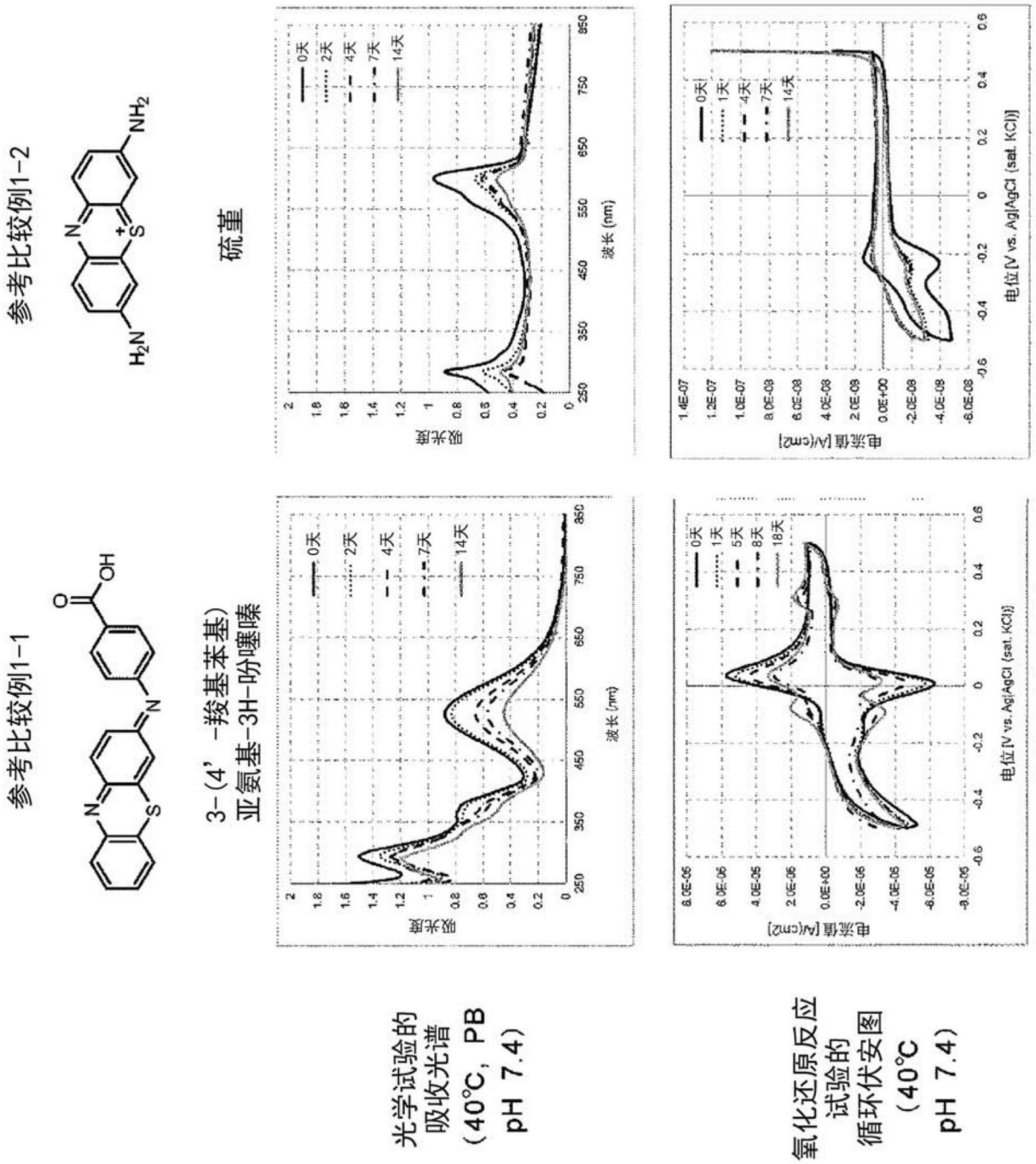

参考比较例1-1
参考比较例1-2
硫堇
3-(4'-羧基苯基)
亚氨基-3H-吩噻嗪
光学试验的
吸收光谱
(40℃, PB
pH 7.4)
氧化还原反应
试验的
循环伏安图
(40℃
pH 7.4)
0天
2天
4天
7天
14天
1天
5天
8天
18天
波长 (nm)
电位 [V vs. Ag/AgCl (sat. KCl)]

图8

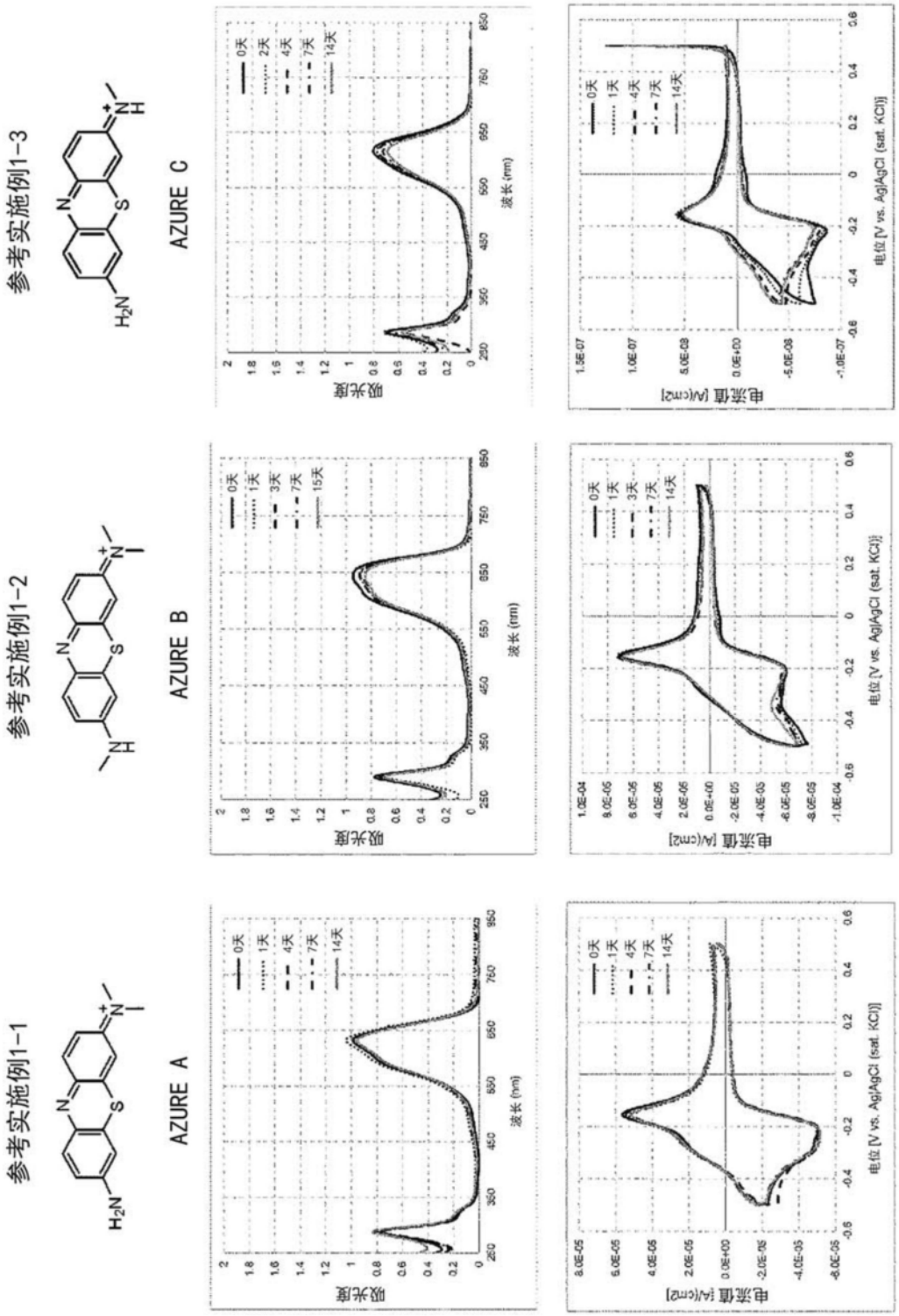

参考实施例1-1
AZURE A
参考实施例1-2
AZURE B
参考实施例1-3
AZURE C
吸光度
波长 (nm)
0天
1天
2天
3天
4天
7天
14天
15天
电流值 [A/(cm2)]
电位 [V vs. Ag/AgCl (sat. KCl)]
光学试验的吸收光谱（40°C，PB pH 7.4）
氧化还原反应试验的循环伏安图（40°C pH 7.4）

图9

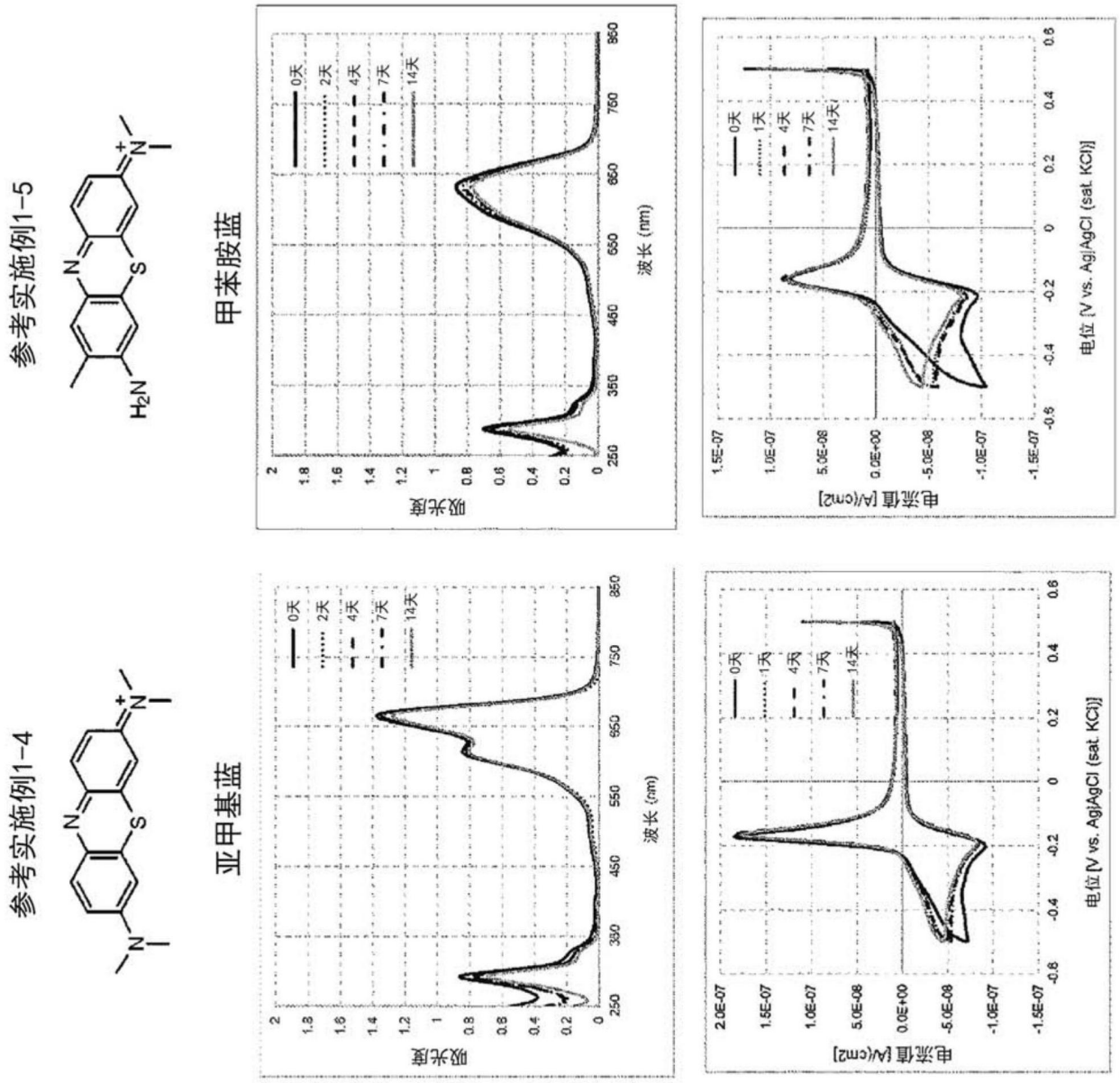

参考实施例1-5
甲苯胺蓝
参考实施例1-4
亚甲基蓝
0天
2天
4天
7天
14天
吸光值
波长 (nm)
电流值 [A/cm2]
电位 [V vs. Ag/AgCl (sat. KCl)]
光学试验的
吸收光谱
（40℃，PB
pH 7.4）
氧化还原
反应试验的
循环伏安图
（40℃
pH 7.4）

图10

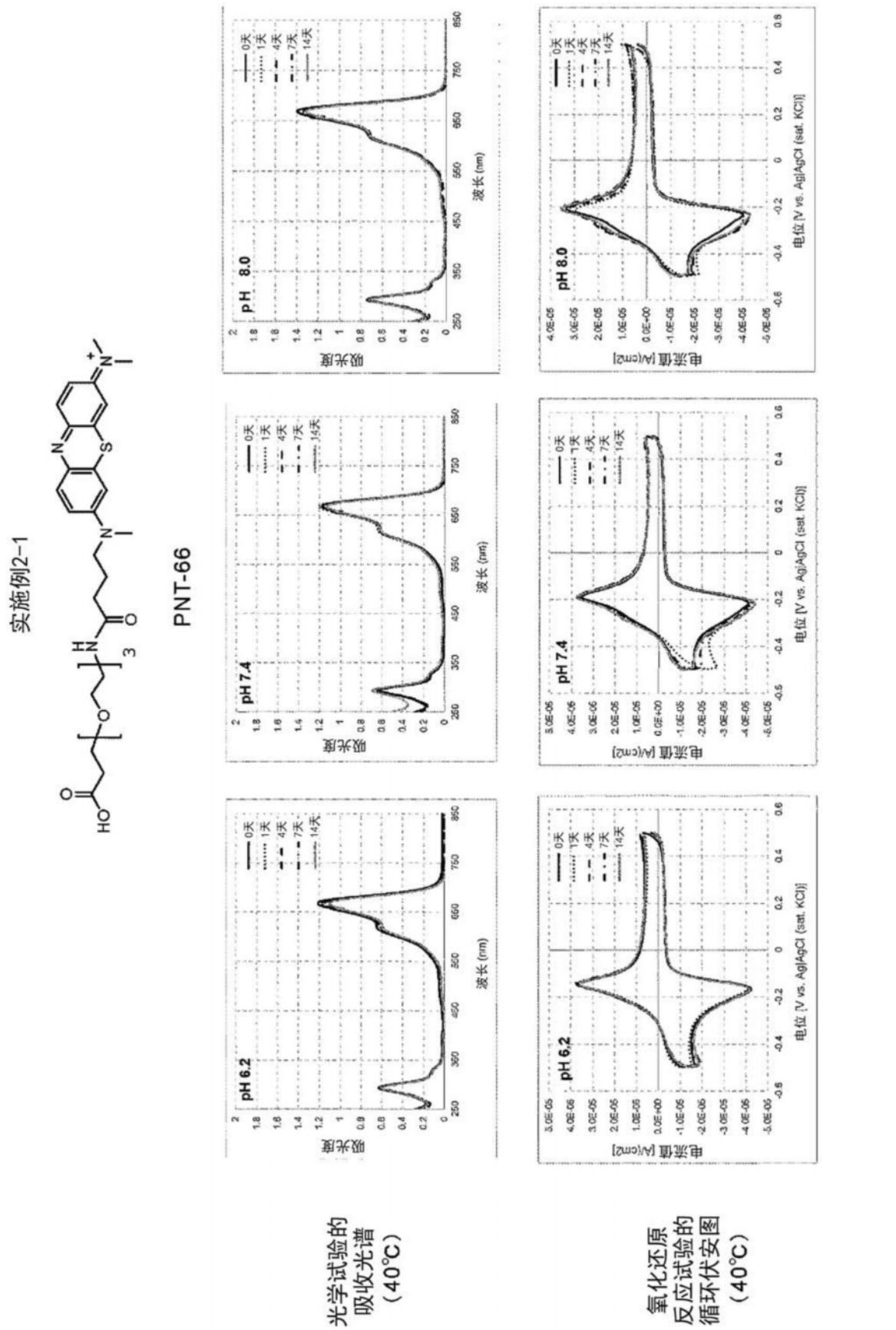

实施例2-1
PNT-66
光学试验的
吸收光谱
（40℃）
氧化还原
反应试验的
循环伏安图
（40℃）
pH 6.2
pH 7.4
pH 8.0
0天
1天
4天
7天
14天
吸光度
波长 (nm)
电流值 [A/cm2]
电位 [V vs. Ag/AgCl (sat. KCl)]

图11

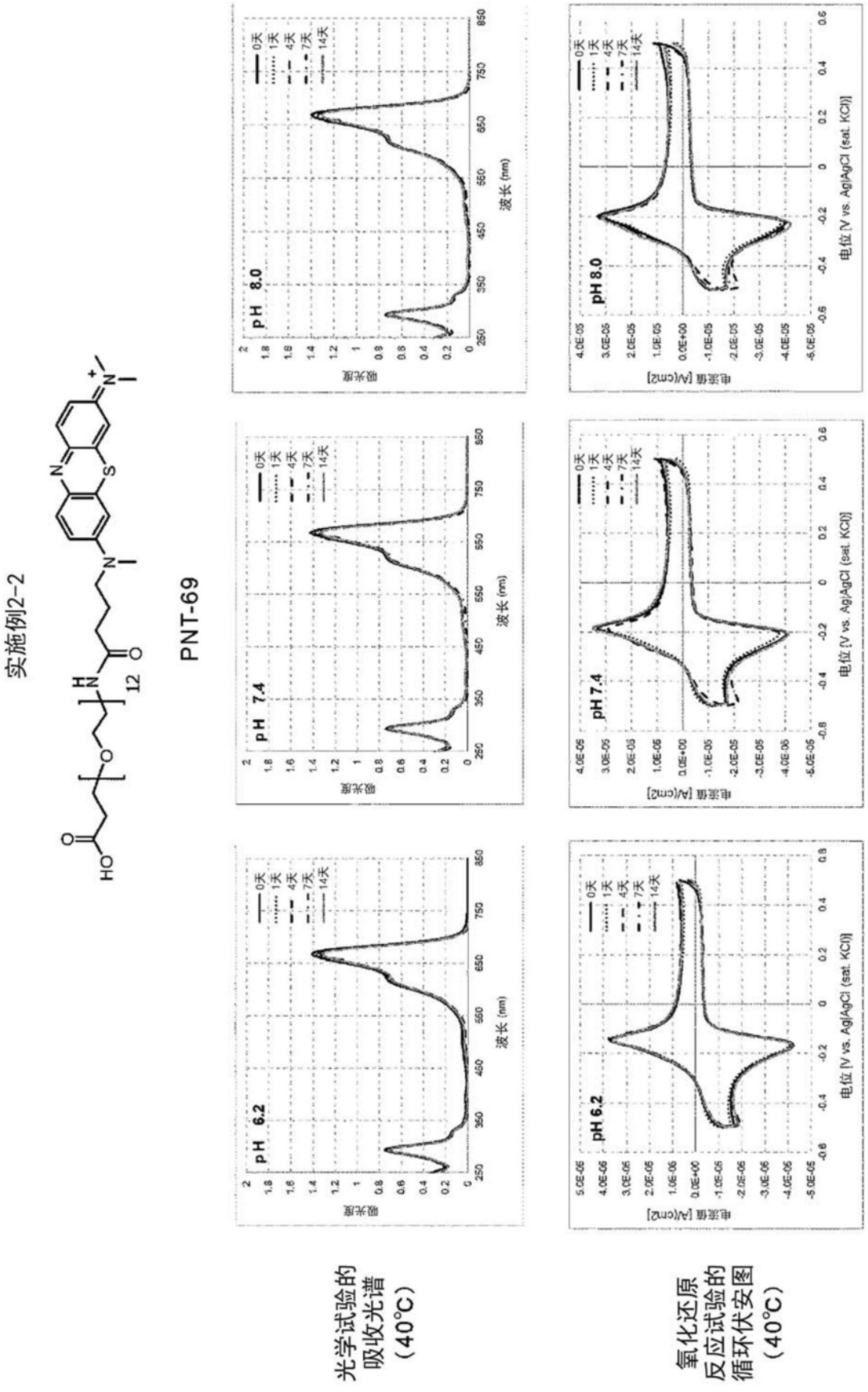

实施例2-2
PNT-69
光学试验的吸收光谱（40℃）
氧化还原反应试验的循环伏安图（40℃）
pH 6.2
pH 7.4
pH 8.0
0天
1天
4天
7天
14天
吸光度
波长 (nm)
电流值 [A/(cm2)]
电位 [V vs. Ag/AgCl (sat. KCl)]

图12

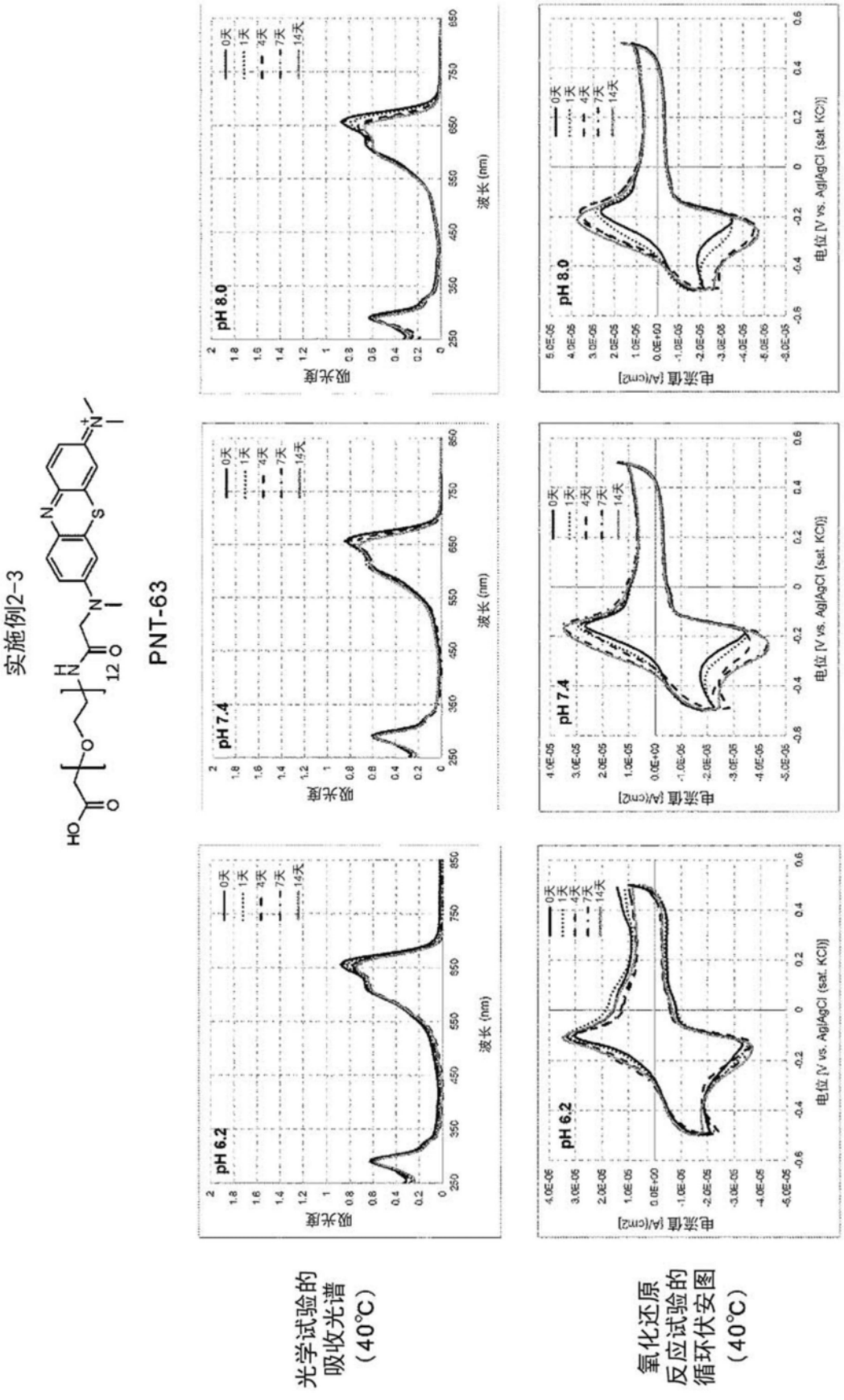

实施例2-3
PNT-63
光学试验的
吸收光谱
（40℃）
氧化还原
反应试验的
循环伏安图
（40℃）
pH 6.2
pH 7.4
pH 8.0
0天
1天
4天
7天
14天
吸光度
波长 (nm)
电流值 [A/cm2]
电位 [V vs. Ag/AgCl (sat. KCl)]

图13

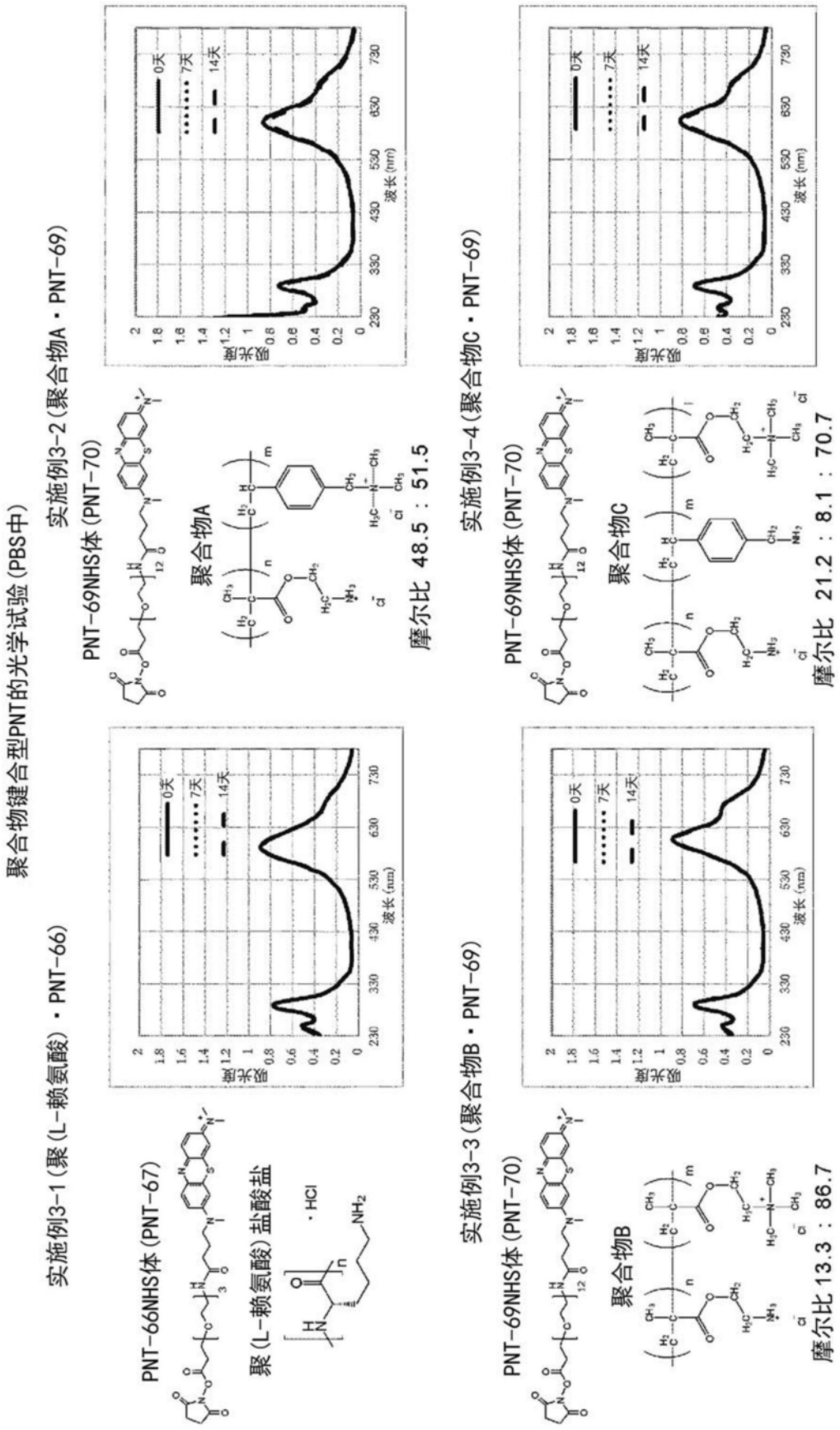

聚合物键合型PNT的光学试验(PBS中)
实施例3-1(聚(L-赖氨酸)・PNT-66)
PNT-66NHS体(PNT-67)
聚(L-赖氨酸)盐酸盐
・HCl
摩尔比 13.3 : 86.7
实施例3-2(聚合物A・PNT-69)
PNT-69NHS体(PNT-70)
聚合物A
摩尔比 48.5 : 51.5
实施例3-3(聚合物B・PNT-69)
PNT-69NHS体(PNT-70)
聚合物B
摩尔比 13.3 : 86.7
实施例3-4(聚合物C・PNT-69)
PNT-69NHS体(PNT-70)
聚合物C
摩尔比 21.2 : 8.1 : 70.7
0天
7天
14天
吸光度
波长(nm)

图14

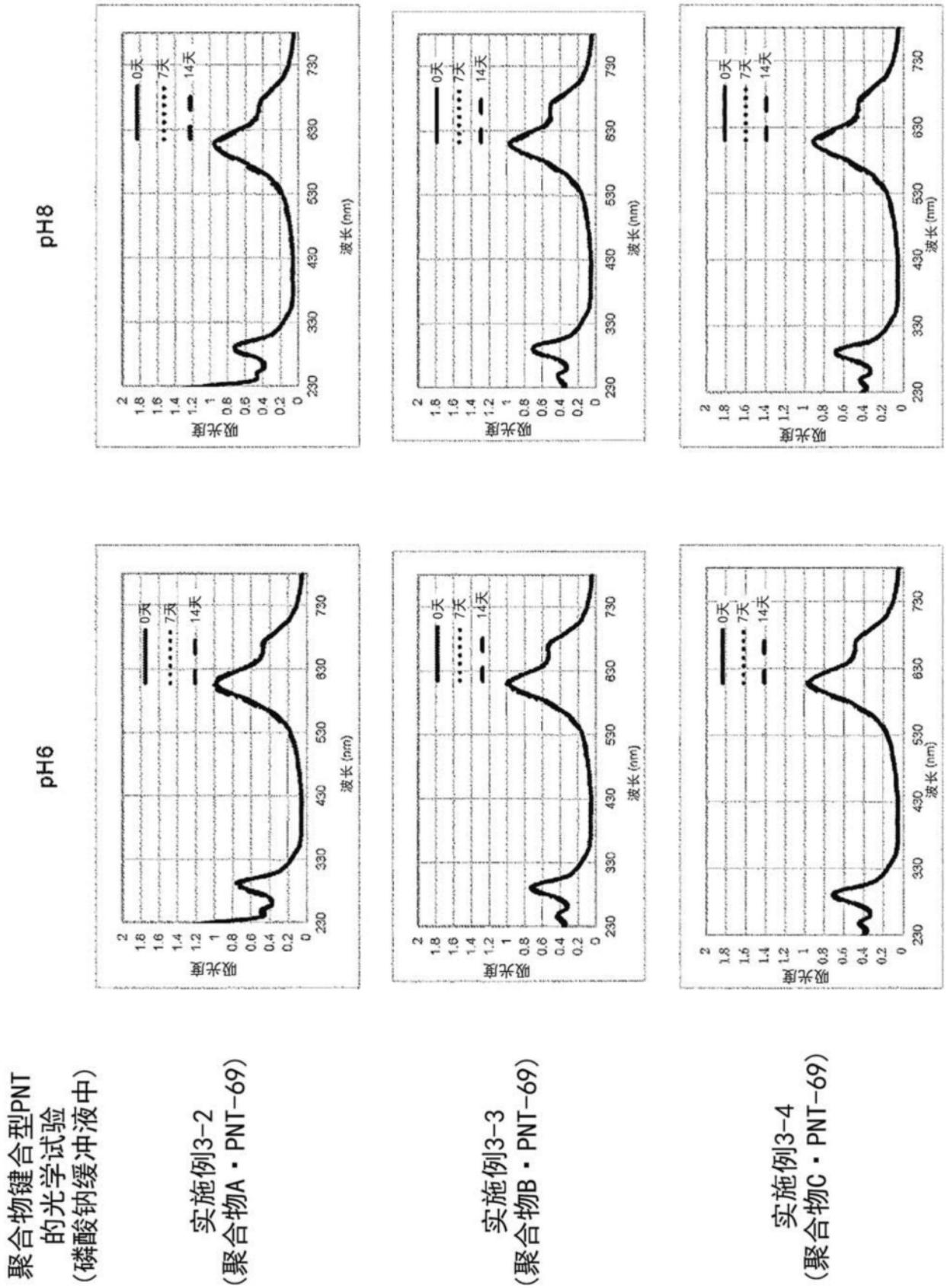

聚合物键合型PNT
的光学试验
(磷酸钠缓冲液中)
pH6
pH8
实施例3-2
(聚合物A・PNT-69)
实施例3-3
(聚合物B・PNT-69)
实施例3-4
(聚合物C・PNT-69)
0天
7天
14天
波长(nm)
强度

图15

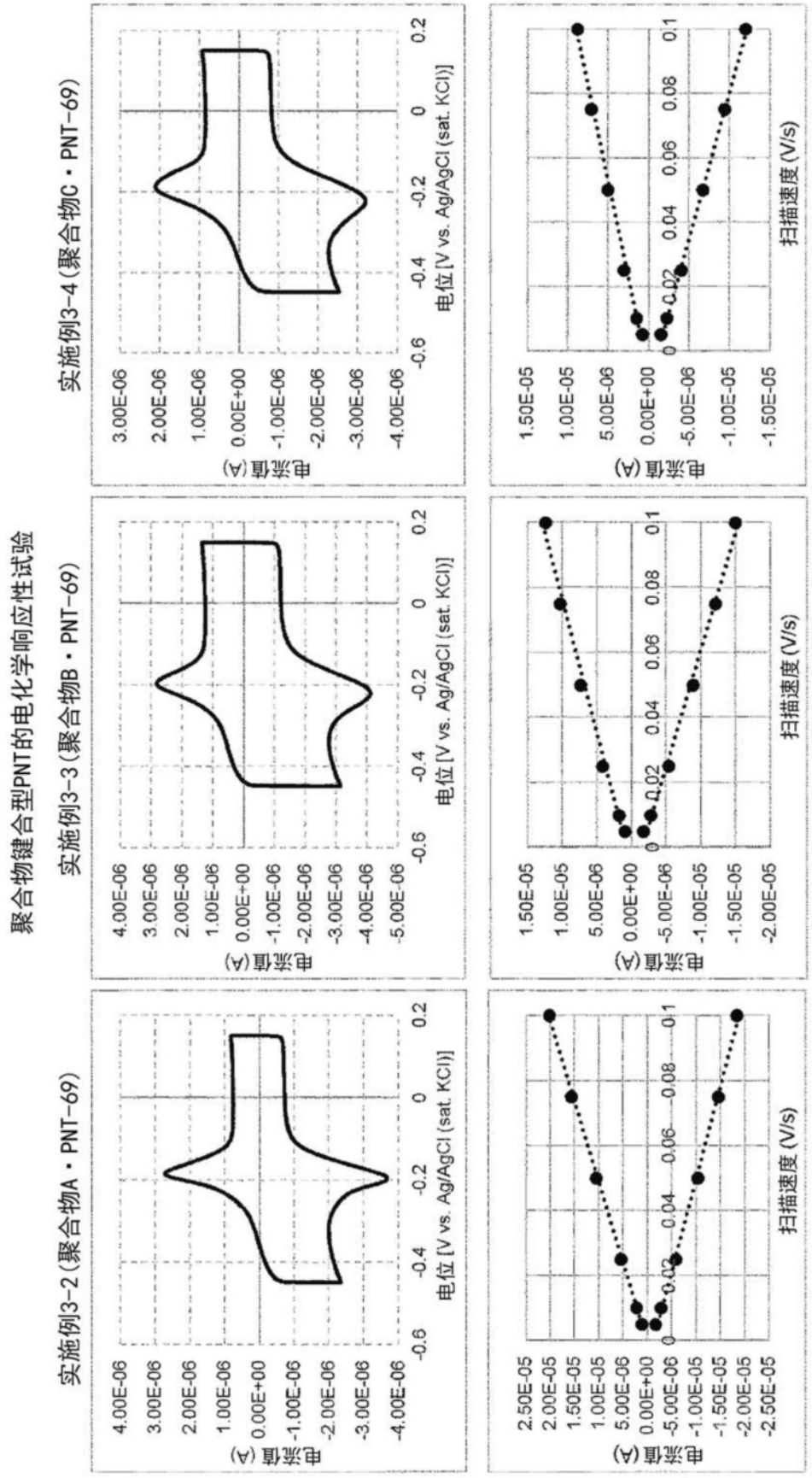

聚合物键合型PNT的电化学响应性试验
实施例3-2(聚合物A・PNT-69)
实施例3-3(聚合物B・PNT-69)
实施例3-4(聚合物C・PNT-69)
电流值(A)
电位[V vs. Ag/AgCl (sat. KCl)]
扫描速度(V/s)

图16

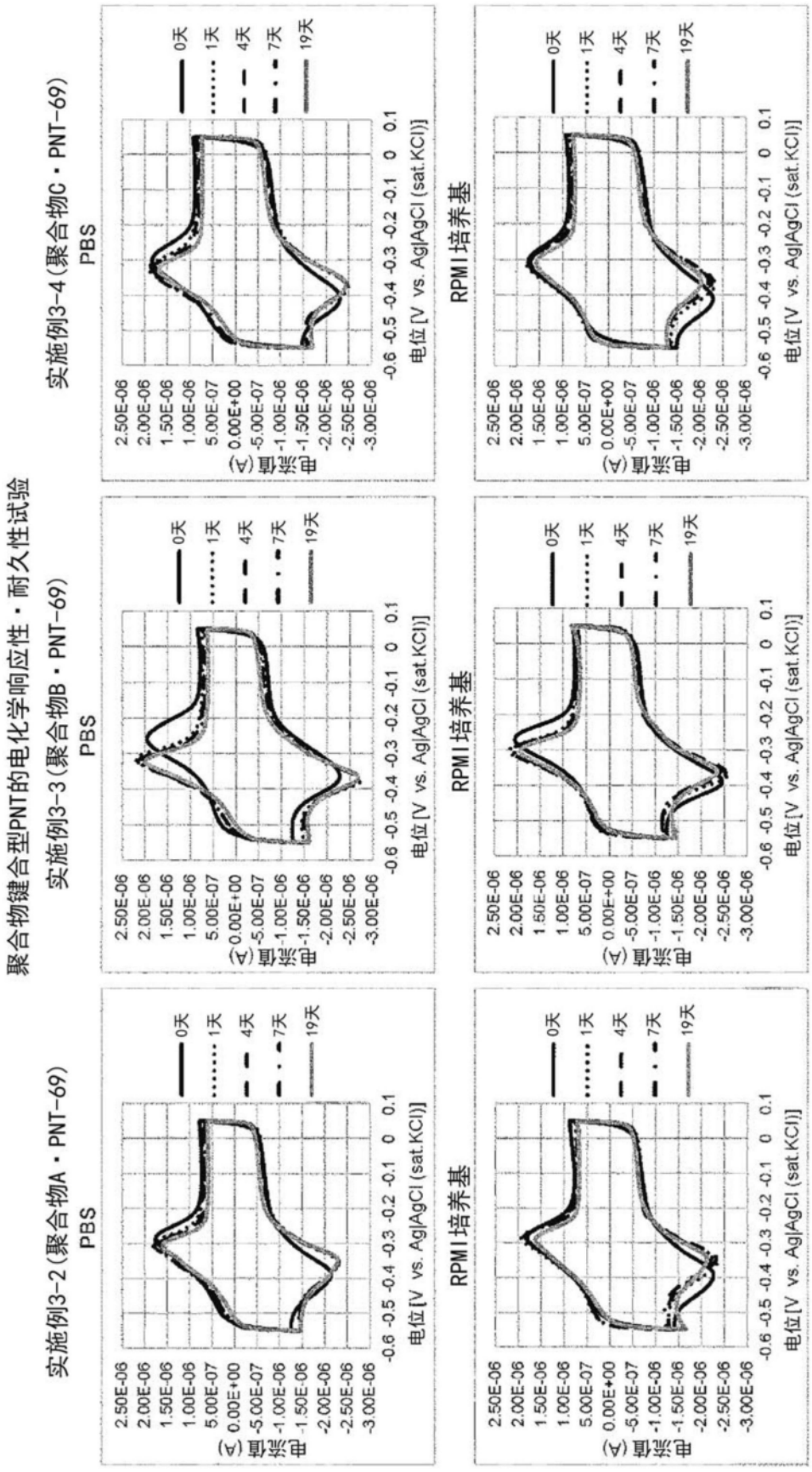

聚合物键合型PNT的电化学响应性・耐久性试验
实施例3-2（聚合物A・PNT-69）
实施例3-3（聚合物B・PNT-69）
实施例3-4（聚合物C・PNT-69）
PBS
RPMI培养基
0天
1天
4天
7天
19天
电流值（A）
电位[V vs. Ag|AgCl (sat.KCl)]

图17

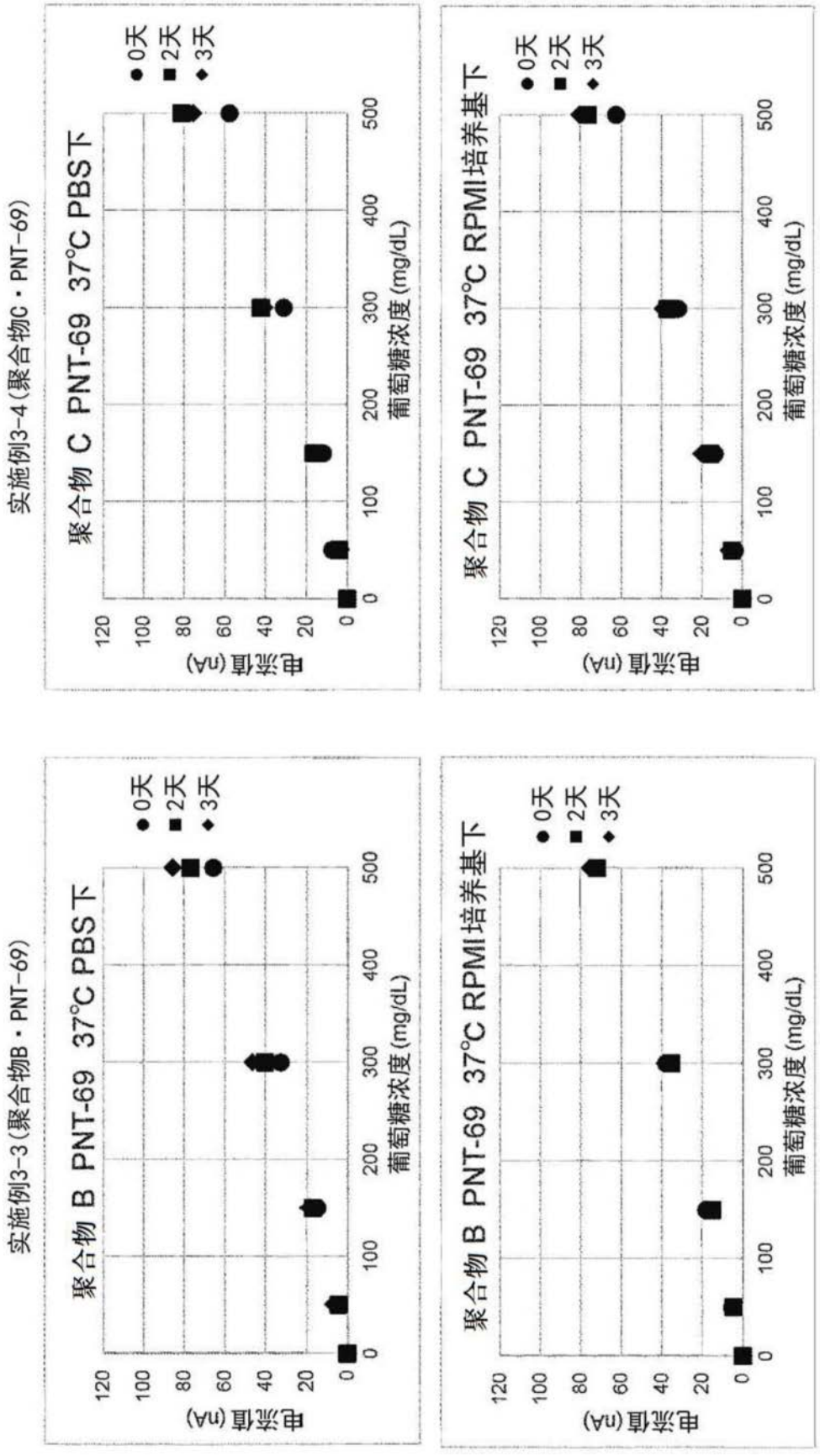

实施例3-3(聚合物B・PNT-69)
聚合物 B PNT-69 37°C PBS下
聚合物 B PNT-69 37°C RPMI培养基下
实施例3-4(聚合物C・PNT-69)
聚合物 C PNT-69 37°C PBS下
聚合物 C PNT-69 37°C RPMI培养基下
● 0天
■ 2天
◆ 3天
血浆值(3天)
葡萄糖浓度(mg/dL)
0
20
40
60
80
100
120
0
100
200
300
400
500

图18