

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-506069

(P2004-506069A)

(43) 公表日 平成16年2月26日(2004.2.26)

(51) Int.Cl.⁷

C08F 220/34

C08F 230/06

C08G 85/00

F I

C08F 220/34

C08F 230/06

C08G 85/00

テーマコード (参考)

4 J O 3 1

4 J 1 0 0

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 105 頁)

(21) 出願番号 特願2002-518226 (P2002-518226)
 (86) (22) 出願日 平成13年8月3日 (2001.8.3)
 (85) 翻訳文提出日 平成15年1月29日 (2003.1.29)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2001/024294
 (87) 国際公開番号 W02002/012251
 (87) 国際公開日 平成14年2月14日 (2002.2.14)
 (31) 優先権主張番号 09/632, 624
 (32) 優先日 平成12年8月4日 (2000.8.4)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 501078166
 センサーズ・フォー・メデセン・アンド・
 サイエンス・インコーポレーテッド
 アメリカ合衆国メリーランド州20874
 , ジャーマンタウン, ミドルブルック・ロ
 ード 12321, スイート 210
 (74) 代理人 100089705
 弁理士 社本 一夫
 (74) 代理人 100076691
 弁理士 増井 忠式
 (74) 代理人 100075270
 弁理士 小林 泰
 (74) 代理人 100080137
 弁理士 千葉 昭男

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 水性環境中での検体検出

(57) 【要約】

本発明は、媒質（例えば液体）中で検体の存在または濃度を検出するための指示分子に関する。より詳細には、本発明は、水性環境中で使用できるよう比較的疎水性の指示成分モノマー及び親水性モノマーを含有するコポリマー高分子に関する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

水性環境中で検体の存在又は濃度を検出できるよう、

a) 該検体の存在又は濃度を検出するため水性環境中において使用するには単独では水への溶解性が充分でない 1 以上の指示成分モノマー；及び

b) 1 以上の親水性モノマー；

のコポリマーを含む、水性環境中で検体の存在又は濃度を検出するための指示高分子。

【請求項 2】

光の変化により検出可能である請求項 1 の指示高分子。

【請求項 3】

指示成分モノマーが N-（o-ボロノベンジル）アミノメチルアントラセン誘導体を含む請求項 1 の指示高分子。

10

【請求項 4】

指示成分モノマーが：

9-[[N-メタクリロイルアミノプロピル-N-（o-ボロノベンジル）アミノ]メチル]アントラセン；

9-[N-[2-（5, 5-ジメチルボリナン-2-イル）ベンジル]-N-[3-（メタクリルアミド）プロピルアミノ]メチル]-10-[N-[2-（5, 5-ジメチルボリナン-2-イル）ベンジル]-N-[2-（2-ヒドロキシエトキシ）エチルアミノ]メチル]アントラセン；

20

9-[N-（2-ボロノベンジル）-N-[3-（メタクリルアミド）プロピルアミノ]メチル]-10-[N-（2-ボロノベンジル）-N-[2-（2-ヒドロキシエトキシ）エチルアミノ]メチル]アントラセン；

9, 10-ビス[N-[2-（5, 5-ジメチルボリナン-2-イル）ベンジル]-N-[3-（メタクリルアミド）プロピルアミノ]メチル]アントラセン；

9, 10-ビス[N-（2-ボロノベンジル）-N-[3-（メタクリルアミド）プロピルアミノ]メチル]アントラセン；

9-[N-[2-（5, 5-ジメチルボリナン-2-イル）ベンジル]-N-[2-（2-メタクロイルオキシエトキシ）エチルアミノ]メチル]-10-[N-[2-（5, 5-ジメチルボリナン-2-イル）ベンジル]-N-[2-（2-ヒドロキシエトキシ）エチルアミノ]メチル]アントラセン；

30

9-[N-（2-ボロノベンジル）-N-[2-（2-メタクロイルオキシエトキシ）エチルアミノ]メチル]-10-[N-（2-ボロノベンジル）-N-[2-（2-ヒドロキシエトキシ）エチルアミノ]メチル]アントラセン；

9, 10-ビス[N-[2-（5, 5-ジメチルボリナン-2-イル）ベンジル]-N-[2-（2-メタクロイルオキシエトキシ）エチルアミノ]メチル]アントラセン；

9, 10-ビス[N-（2-ボロノベンジル）-N-[2-（2-メタクロイルオキシエトキシ）エチルアミノ]メチル]アントラセン；

N-[3-（メタクリルアミド）プロピル]-3, 4-ジヒドロキシ-9, 10-ジオキソ-2-アントラセンスルホンアミド；

40

α , α' -ビス[N-[2-（5, 5-ジメチルボリナン-2-イル）ベンジル]-N-[3-（メタクリルアミド）プロピルアミノ]-1, 4-キシレン；

及びそれらの塩又は誘導体；

からなる群より選択される請求項 3 の指示高分子。

【請求項 5】

親水性モノマーが[3-（メタクリロイルアミノ）プロピル]トリメチルアンモニウムクロリドを含む請求項 3 の指示高分子。

【請求項 6】

指示成分モノマーがランタノイドキレート及び多環芳香族炭化水素からなる群より選択される請求項 1 の指示高分子。

50

【請求項 7】

親水性モノマー：指示成分モノマーのモル比が約 2 : 1 から約 1 0 0 0 : 1 である請求項 1 の指示高分子。

【請求項 8】

親水性モノマー：指示成分モノマーの比が約 5 : 1 から約 5 0 : 1 である請求項 7 の指示高分子。

【請求項 9】

親水性モノマー：指示成分モノマーの比が約 5 : 1 である請求項 8 の指示高分子。

【請求項 10】

検出される検体が、ビスナルジオール； α -ヒドロキシ酸； β -ケト酸；酸素；二酸化炭素；亜鉛、カリウム、水素、又は炭酸イオン；毒素；無機物；及びホルモン；からなる群より選択される請求項 1 の指示高分子。 10

【請求項 11】

検出される検体が糖類を含むビスナルジオールである請求項 10 の指示高分子。

【請求項 12】

糖類がグルコースである請求項 11 の指示高分子。

【請求項 13】

i) 親水性モノマー：指示成分モノマーのモル比が約 2 : 1 から約 1 5 : 1 であり；
 i i) 指示成分モノマーが N-(α -ボロノベンジル) アミノメチルアントラセン誘導体を含み； 20
 i i i) 親水性モノマーが [3-(メタクリロイルアミノ) プロピル] トリメチルアンモニウムクロリドを含み；
 i v) 高分子がエキシマー効果を示す；
 請求項 1 の指示高分子。

【請求項 14】

生成する高分子が水性環境中で検体の存在又は濃度を検出できるよう、
 a) 該検体の存在又は濃度を検出するため水性環境中において使用するには単独では水への溶解性が充分でない 1 以上の指示成分モノマー；及び
 b) 1 以上の親水性モノマー；
 を重合させることを含む、水性環境中で検体の存在又は濃度を検出するための指示高分子の製造方法。 30

【請求項 15】

高分子が光の変化により検出可能である請求項 14 の方法。

【請求項 16】

指示成分モノマーが N-(α -ボロノベンジル) アミノメチルアントラセン誘導体を含む請求項 14 の方法。

【請求項 17】

指示成分モノマーが、
 9-[[N-メタクリロイルアミノプロピル-N-(α -ボロノベンジル) アミノ] メチル] アントラセン； 40
 9-[N-[2-(5, 5-ジメチルボリナン-2-イル) ベンジル]-N-[3-(メタクリルアミド) プロピルアミノ] メチル]-10-[N-[2-(5, 5-ジメチルボリナン-2-イル) ベンジル]-N-[2-(2-ヒドロキシエトキシ) エチルアミノ] メチル] アントラセン；
 9-[N-(2-ボロノベンジル)-N-[3-(メタクリルアミド) プロピルアミノ] メチル]-10-[N-(2-ボロノベンジル)-N-[2-(2-ヒドロキシエトキシ) エチルアミノ] メチル] アントラセン；
 9, 10-ビス [N-[2-(5, 5-ジメチルボリナン-2-イル) ベンジル]-N-[3-(メタクリルアミド) プロピルアミノ] メチル] アントラセン；
 9, 10-ビス [N-(2-ボロノベンジル)-N-[3-(メタクリルアミド) プロピル 50

ルアミノ] メチル] アントラセン；

9- [N- [2- (5, 5-ジメチルポリナフ-2-イル) ベンジル] -N- [2- (2-メタクロイルオキシエトキシ) エチルアミノ] メチル] -10- [N- [2- (5, 5-ジメチルポリナフ-2-イル) ベンジル] -N- [2- (2-ヒドロキシエトキシ) エチルアミノ] メチル] アントラセン；

9- [N- (2-ボロノベンジル) -N- [2- (2-メタクロイルオキシエトキシ) エチルアミノ] メチル] -10- [N- (2-ボロノベンジル) -N- [2- (2-ヒドロキシエトキシ) エチルアミノ] メチル] アントラセン；

9, 10-ビス [N- [2- (5, 5-ジメチルポリナフ-2-イル) ベンジル] -N- [2- (2-メタクロイルオキシエトキシ) エチルアミノ] メチル] アントラセン；

9, 10-ビス [N- (2-ボロノベンジル) -N- [2- (2-メタクロイルオキシエトキシ) エチルアミノ] メチル] アントラセン；

N- [3- (メタクリルアミド) プロピル] -3, 4-ジヒドロキシー-9, 10-ジオキソ-2-アントラセンスルホンアミド；

α , α' -ビス [N- [2- (5, 5-ジメチルポリナフ-2-イル) ベンジル] -N- [3- (メタクリルアミド) プロピルアミノ] -1, 4-キシレン；

及びそれらの塩又は誘導体；

からなる群より選択される請求項16の方法。

【請求項18】

親水性モノマーが [3- (メタクリロイルアミノ) プロピル] トリメチルアンモニウムクロリドを含む請求項14の方法。

【請求項19】

指示成分モノマーがランタノイドキレート及び多環芳香族炭化水素からなる群より選択される請求項14の方法。

【請求項20】

親水性モノマー：指示成分モノマーのモル比が約2：1から約1000：1である請求項14の方法。

【請求項21】

親水性モノマー：指示成分モノマーの比が約5：1から約50：1である請求項20の方法。

【請求項22】

親水性モノマー：指示成分モノマーの比が約5：1である請求項21の方法。

【請求項23】

検出される検体が、ビシナルジオール； α -ヒドロキシ酸； β -ケト酸；酸素；二酸化炭素；亜鉛、カリウム、水素、又は炭酸イオン；毒素；無機物；及びホルモン；からなる群より選択される請求項14の方法。

【請求項24】

検出される検体が糖類を含むビシナルジオールである請求項23の方法。

【請求項25】

糖類がグルコースである請求項24の方法。

【請求項26】

i) 親水性モノマー：指示成分モノマーのモル比が約2：1から約15：1であり；

ii) 指示成分モノマーがN- (o-ボロノベンジル) アミノメチルアントラセン誘導体を含み；

iii) 親水性モノマーが [3- (メタクリロイルアミノ) プロピル] トリメチルアンモニウムクロリドを含み；

iv) 高分子がエキシマー効果を示す；

請求項14の方法。

【請求項27】

a) i) 検体の存在又は濃度を検出するため水性環境中において使用するには単独で

10

20

30

40

50

は水への溶解性が充分でない 1 以上の指示成分モノマー；及び

i i) 1 以上の親水性モノマー；

のコポリマーを含む指示高分子に試料を露出する工程であって、

該指示高分子が水性環境中での該検体の存在又は濃度を検出可能であり；

該指示高分子が、該検体に露出される場合に濃度に依存した方式で変化する検出可能な特性を有する；上記の露出工程と、

b) 該検出可能な特性における任意の変化を測定し、それにより該試料中の該検体の存在又は濃度を決定する工程と、

を含む、水性環境を有する試料中での検体の存在又は濃度の検出方法。

【請求項 28】

10

該検出可能な特性における変化が光の変化である請求項 27 の方法。

【請求項 29】

指示成分モノマーが N-（o-ボロノベンジル）アミノメチルアントラセン誘導体を含む請求項 27 の方法。

【請求項 30】

指示成分モノマーが：

9-[[N-メタクリロイルアミノプロピル-N-（o-ボロノベンジル）アミノ]]メチル]アントラセン；

9-[N-[2-（5, 5-ジメチルポリナナン-2-イル）ベンジル]-N-[3-（メタクリルアミド）プロピルアミノ]メチル]-10-[N-[2-（5, 5-ジメチルポリナナン-2-イル）ベンジル]-N-[2-（2-ヒドロキシエトキシ）エチルアミノ]メチル]アントラセン；

20

9-[N-（2-ボロノベンジル）-N-[3-（メタクリルアミド）プロピルアミノ]メチル]-10-[N-（2-ボロノベンジル）-N-[2-（2-ヒドロキシエトキシ）エチルアミノ]メチル]アントラセン；

9, 10-ビス[N-[2-（5, 5-ジメチルポリナナン-2-イル）ベンジル]-N-[3-（メタクリルアミド）プロピルアミノ]メチル]アントラセン；

9, 10-ビス[N-（2-ボロノベンジル）-N-[3-（メタクリルアミド）プロピルアミノ]メチル]アントラセン；

9-[N-[2-（5, 5-ジメチルポリナナン-2-イル）ベンジル]-N-[2-（2-メタクロイルオキシエトキシ）エチルアミノ]メチル]-10-[N-[2-（5, 5-ジメチルポリナナン-2-イル）ベンジル]-N-[2-（2-ヒドロキシエトキシ）エチルアミノ]メチル]アントラセン；

30

9-[N-（2-ボロノベンジル）-N-[2-（2-メタクロイルオキシエトキシ）エチルアミノ]メチル]-10-[N-（2-ボロノベンジル）-N-[2-（2-ヒドロキシエトキシ）エチルアミノ]メチル]アントラセン；

9, 10-ビス[N-[2-（5, 5-ジメチルポリナナン-2-イル）ベンジル]-N-[2-（2-メタクロイルオキシエトキシ）エチルアミノ]メチル]アントラセン；

9, 10-ビス[N-（2-ボロノベンジル）-N-[2-（2-メタクロイルオキシエトキシ）エチルアミノ]メチル]アントラセン；

40

N-[3-（メタクリルアミド）プロピル]-3, 4-ジヒドロキシ-9, 10-ジオキソ-2-アントラセンスルホンアミド；

α , α' -ビス[N-[2-（5, 5-ジメチルポリナナン-2-イル）ベンジル]-N-[3-（メタクリルアミド）プロピルアミノ]-1, 4-キシレン；

及びそれらの塩又は誘導体；

からなる群より選択される請求項 29 の方法。

【請求項 31】

親水性モノマーが[3-（メタクリロイルアミノ）プロピル]トリメチルアンモニウムクロリドを含む請求項 27 の方法。

【請求項 32】

50

指示成分モノマーがランタノイドキレート及び多環芳香族炭化水素からなる群より選択される請求項 27 の方法。

【請求項 33】

親水性モノマー：指示成分モノマーのモル比が約 2 : 1 から約 1000 : 1 である請求項 27 の方法。

【請求項 34】

親水性モノマー：指示成分モノマーの比が約 5 : 1 から約 50 : 1 である請求項 33 の方法。

【請求項 35】

親水性モノマー：指示成分モノマーの比が約 5 : 1 である請求項 34 の方法。 10

【請求項 36】

検出される検体が、糖類；酸素；二酸化炭素；亜鉛、カリウム、水素、又は炭酸イオン；からなる群より選択される請求項 27 の方法。

【請求項 37】

検出される検体が糖類である請求項 36 の方法。

【請求項 38】

糖類がグルコースである請求項 37 の方法。

【請求項 39】

i) 親水性モノマー：指示成分モノマーのモル比が約 2 : 1 から約 15 : 1 であり；
 i i) 指示成分モノマーが N-（オーボロノベンジル）アミノメチルアントラセン誘導 20
 体を含み；
 i i i) 親水性モノマーが [3-（メタクリロイルアミノ）プロピル] トリメチルアン
 モニウムクロリドを含み；
 i v) 高分子がエキシマー効果を示す；
 請求項 27 の方法。

【請求項 40】

該高分子が指示剤及びリファレンスの両者として作用する請求項 39 の方法。

【請求項 41】

高分子がエキシマー効果を示すよう、
 a) 互いに適切に配向させた場合にエキシマー効果を示すことができる 1 以上のエキシ 30
 マー形成モノマー；及び
 b) 1 以上の他のモノマー；
 のコポリマーを含む高分子。

【請求項 42】

検体の存在または濃度を検出できる請求項 41 の高分子。

【請求項 43】

水性環境中で検体の存在又は濃度を検出できるよう、
 a) 1 以上のエキシマー形成モノマーが、該検体の存在又は濃度を検出するため水性環境 40
 中において使用するには単独では水への溶解性が充分でなく；
 b) 他のモノマーが親水性モノマーである；
 請求項 42 の高分子。

【請求項 44】

エキシマー効果が検体の存在又は濃度の変化に応答して実質的に変化することのない請求項 42 の高分子。

【請求項 45】

i) 他のモノマー：エキシマー形成モノマーのモル比が約 2 : 1 から約 15 : 1 であり；
 i i) 該エキシマー形成モノマーが N-（オーボロノベンジル）アミノメチルアントラ 50
 セン誘導体を含み；
 i i i) 該他のモノマーが [3-（メタクリロイルアミノ）プロピル] トリメチルアン

モニウムクロリドを含む；

請求項 44 の高分子。

【請求項 46】

エキシマー形成モノマーがランタノイドキレート及び多環芳香族炭化水素からなる群より選択される請求項 41 の高分子。

【請求項 47】

エキシマー形成モノマーが：

9-[[N-メタクリロイルアミノプロピル-N-(o-ボロノベンジル)アミノ]メチル]アントラセン；

9-[N-[2-(5,5-ジメチルボリナン-2-イル)ベンジル]-N-[3-(メ
タクリルアミド)プロピルアミノ]メチル]-10-[N-[2-(5,5-ジメチルボ
リナン-2-イル)ベンジル]-N-[2-(2-ヒドロキシエトキシ)エチルアミノ]
メチル]アントラセン；

9-[N-(2-ボロノベンジル)-N-[3-(メタクリルアミド)プロピルアミノ]
メチル]-10-[N-(2-ボロノベンジル)-N-[2-(2-ヒドロキシエトキシ)
エチルアミノ]メチル]アントラセン；

9,10-ビス[N-[2-(5,5-ジメチルボリナン-2-イル)ベンジル]-N-
[3-(メタクリルアミド)プロピルアミノ]メチル]アントラセン；

9,10-ビス[N-(2-ボロノベンジル)-N-[3-(メタクリルアミド)プロピ
ルアミノ]メチル]アントラセン；

9-[N-[2-(5,5-ジメチルボリナン-2-イル)ベンジル]-N-[2-(2-
メタクロイルオキシエトキシ)エチルアミノ]メチル]-10-[N-[2-(5,5-
ジメチルボリナン-2-イル)ベンジル]-N-[2-(2-ヒドロキシエトキシ)エ
チルアミノ]メチル]アントラセン；

9-[N-(2-ボロノベンジル)-N-[2-(2-メタクロイルオキシエトキシ)エ
チルアミノ]メチル]-10-[N-(2-ボロノベンジル)-N-[2-(2-ヒドロ
キシエトキシ)エチルアミノ]メチル]アントラセン；

9,10-ビス[N-[2-(5,5-ジメチルボリナン-2-イル)ベンジル]-N-
[2-(2-メタクロイルオキシエトキシ)エチルアミノ]メチル]アントラセン；

9,10-ビス[N-(2-ボロノベンジル)-N-[2-(2-メタクロイルオキシエ
トキシ)エチルアミノ]メチル]アントラセン；

N-[3-(メタクリルアミド)プロピル]-3,4-ジヒドロキシ-9,10-ジオキ
ソ-2-アントラセンスルホンアミド；

α , α' -ビス[N-[2-(5,5-ジメチルボリナン-2-イル)ベンジル]-N-
[3-(メタクリルアミド)プロピルアミノ]-1,4-キシレン；

及びそれらの塩又は誘導体；

からなる群より選択される請求項 45 の高分子。

【請求項 48】

生成する高分子がエキシマー効果を示すよう、

a) 互いに適切に配向させた場合にエキシマー効果を示すことができる 1 以上のエキシ
マー形成モノマー；及び

b) 1 以上の他のモノマー；

を共重合させることを含む、エキシマー効果を示すことができる高分子の製造方法。

【請求項 49】

高分子が検体の存在又は濃度を検出することができる請求項 48 の方法。

【請求項 50】

指示高分子が水性環境中での検体の存在又は濃度を検出できるよう、

a) 該エキシマー形成モノマーが、該検体の存在又は濃度を検出するため水性環境中にお
いて使用するには単独では水への溶解性が充分でなく；

b) 該他のモノマーが親水性モノマーである；

請求項 49 の方法。

【請求項 51】

エキシマー効果が該検体の存在又は濃度の変化に応答して実質的に変化することのない請求項 49 の方法。

【請求項 52】

i) 他のモノマー：エキシマー形成モノマーのモル比が約 2 : 1 から約 15 : 1 であり；

i i) エキシマー形成モノマーが N- (o-ボロノベンジル) アミノメチルアントラセン誘導体を含み；

i i i) 他のモノマーが [3- (メタクリロイルアミノ) プロピル] トリメチルアンモニウムクロリドを含む； 10

請求項 51 の方法。

【請求項 53】

エキシマー形成モノマーがランタノイドキレート及び多環芳香族炭化水素からなる群から選択される請求項 48 の方法。

【請求項 54】

エキシマー形成モノマーが：

9- [[N-メタクリロイルアミノプロピル-N- (o-ボロノベンジル) アミノ]] メチル] アントラセン；

9- [N- [2- (5, 5-ジメチルボリナン-2-イル) ベンジル] -N- [3- (メ 20
タクリルアミド) プロピルアミノ] メチル] -10- [N- [2- (5, 5-ジメチルボ
リナン-2-イル) ベンジル] -N- [2- (2-ヒドロキシエトキシ) エチルアミノ]
メチル] アントラセン；

9- [N- (2-ボロノベンジル) -N- [3- (メタクリルアミド) プロピルアミノ]
メチル] -10- [N- (2-ボロノベンジル) -N- [2- (2-ヒドロキシエトキシ)
エチルアミノ] メチル] アントラセン；

9, 10-ビス [N- [2- (5, 5-ジメチルボリナン-2-イル) ベンジル] -N-
[3- (メタクリルアミド) プロピルアミノ] メチル] アントラセン；

9, 10-ビス [N- (2-ボロノベンジル) -N- [3- (メタクリルアミド) プロピ 30
ルアミノ] メチル] アントラセン；

9- [N- [2- (5, 5-ジメチルボリナン-2-イル) ベンジル] -N- [2- (2-
メタクロイルオキシエトキシ) エチルアミノ] メチル] -10- [N- [2- (5, 5-
ジメチルボリナン-2-イル) ベンジル] -N- [2- (2-ヒドロキシエトキシ) エ
チルアミノ] メチル] アントラセン；

9- [N- (2-ボロノベンジル) -N- [2- (2-メタクロイルオキシエトキシ) エ
チルアミノ] メチル] -10- [N- (2-ボロノベンジル) -N- [2- (2-ヒドロ
キシエトキシ) エチルアミノ] メチル] アントラセン；

9, 10-ビス [N- [2- (5, 5-ジメチルボリナン-2-イル) ベンジル] -N-
[2- (2-メタクロイルオキシエトキシ) エチルアミノ] メチル] アントラセン；

9, 10-ビス [N- (2-ボロノベンジル) -N- [2- (2-メタクロイルオキシエ 40
トキシ) エチルアミノ] メチル] アントラセン；

N- [3- (メタクリルアミド) プロピル] -3, 4-ジヒドロキシ-9, 10-ジオキ
ソ-2-アントラセンスルホンアミド；

α , α' -ビス [N- [2- (5, 5-ジメチルボリナン-2-イル) ベンジル] -N-
[3- (メタクリルアミド) プロピルアミノ] -1, 4-キシレン；

及びそれらの塩又は誘導体；からなる群より選択される請求項 52 の方法。

【請求項 55】

a) i) 互いに適切に配向させた場合にエキシマー効果を示すことができ、検体の存在
または濃度を検出することもできる、1 以上の指示成分モノマー；及び

i i) 1 以上の他のモノマー；

のコポリマーを含む指示高分子に試料を露出する工程であって；

該指示高分子が該エキシマー効果を示し；該指示高分子が、該検体に露出される場合に濃度に依存した方式で変化する検出可能な特性を有する；上記の露出工程と、

b) 該検出可能な特性における任意の変化を測定し、それにより該試料中における該検体の存在または濃度を決定する工程と、

を含む、試料中の検体の存在または濃度の検出方法。

【請求項 56】

エキシマー効果が該検体の存在又は濃度の変化に応答して実質的に変化することのない請求項 55 の方法。

【請求項 57】

i) 他のモノマー：指示成分モノマーのモル比が約 2 : 1 から約 15 : 1 であり；

i i) 指示成分モノマーが N - (o - ボロノベンジル) アミノメチルアントラセン誘導体を含む；

i i i) 他のモノマーが [3 - (メタクリロイルアミノ) プロピル] トリメチルアンモニウムクロリドを含む；

請求項 56 の方法。

【請求項 58】

指示成分モノマーがランタノイドキレート及び多環芳香族炭化水素からなる群より選択される請求項 55 の高分子。

【請求項 59】

指示成分モノマーが、

9 - [[N - メタクリロイルアミノプロピル - N - (o - ボロノベンジル) アミノ] - メチル] アントラセン；

9 - [N - (2 - ボロノベンジル) - N - [3 - (メタクリルアミド) プロピルアミノ] メチル] - 10 - [N - [2 - (5, 5 - ジメチルボリナン - 2 - イル) ベンジル] - N - [2 - (2 - ヒドロキシエトキシ) エチルアミノ] メチル] アントラセン；

9 - [N - (2 - ボロノベンジル) - N - [2 - (2 - メタクロイルオキシエトキシ) エチルアミノ] メチル] - 10 - [N - (2 - ボロノベンジル) - N - [2 - (2 - ヒドロキシエトキシ) エチルアミノ] メチル] アントラセン；

9, 10 - ビス [N - (2 - ボロノベンジル) - N - [2 - (2 - メタクロイルオキシエトキシ) エチルアミノ] メチル] アントラセン；

及びそれらの塩又は誘導体；

からなる群より選択される請求項 57 の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2000 年 8 月 4 日出願の出願シリアル No. 09 / 632, 624 の一部継続出願である。

【0002】

連邦政府の補助による研究または開発に関する陳述

適用されない。

本発明の背景

1. 本発明の分野

本発明は、媒質（例えば液体）中の検体の存在または濃度を検出するための指示分子と、該検出を行うための方法とに関する。より詳細には、本発明は、水性環境中で使用できるよう、比較的疎水性である指示成分モノマーと親水性モノマーとを含有するコポリマー高分子に関する。

2. 関連技術の記載

媒質中の検体の存在または濃度を検出するための指示分子が知られている。残念ながら、該指示剤の多くは水に不溶性であるか、やや難溶性 (sparingly soluble)

10

20

30

40

50

e)である。例えば米国特許第5,503,770号(Jamesら)は、糖類(グルコースが含まれる)と結合して強度の高い蛍光を発する蛍光性ホウ酸含有化合物を記載している。この蛍光化合物は、フルオロフォア、少なくとも一つのフェニルホウ酸部位、及び少なくとも一つのアミン提供(amine-providing)窒素原子を含む分子構造を有し、窒素原子がホウ酸と分子内相互作用するようにフェニルホウ酸部位に隣接して配置される。そのような相互作用によって、該化合物が糖類と結合して蛍光を発する。T. James, et al., J. Am. Chem. Soc. 117 (35): 8982-87 (1995)も参照のこと。しかし、米国特許第5,503,770号の実施例2中に記載された化合物(式(6)を有する)は実質的に水に不溶であり、実用上の問題として液体の環境中で作用するためには有機溶媒(例えばメタノール)の存在を必要とする。 10

【0003】

水性環境中での用途、例えばin vivoでの用途を扱う場合、十分な水溶性の欠如は深刻な問題である。この様に、不溶性又はやや難溶性の指示剤を水性環境中で使用するために適合させることについて、依然として要望が大きい。

【0004】

本発明の概要

一つの側面では、本発明は水性環境中で検体の存在または濃度を検出するための指示高分子(indicator macromolecule)に向けられており；水性環境中で該検体の存在または濃度を検出できるよう、該高分子が； 20

a) 該検体の存在又は濃度を検出するため水性環境中において使用するには単独では水への溶解性が充分でない1以上の指示成分モノマー(indicator component monomer)；及び

b) 1以上の親水性モノマー；

のコポリマーを含む。

【0005】

別の側面では、本発明は水性環境中で検体の存在または濃度を検出するための指示高分子の製造方法に向けられており；生成する高分子が水性環境中で該検体の存在または濃度を検出できるよう、該方法は

a) 該検体の存在又は濃度を検出するため水性環境中において使用するには単独では水への溶解性が充分でない1以上の指示成分モノマー；及び 30

b) 1以上の親水性モノマー；

を共重合する工程を含む。

【0006】

別の側面では、本発明は水性環境を有する試料中の検体の存在または濃度の検出方法に向けられており；該方法は

a) i) 該検体の存在又は濃度を検出するため水性環境中において使用するには単独では水への溶解性が充分でない1以上の指示成分モノマー；及び

ii) 1以上の親水性モノマー；

のコポリマーを含む指示高分子に試料を露出する工程であって；生成する高分子が水性環境中で該検体の存在または濃度を検出可能であり；該指示高分子が、該検体に露出される場合に濃度に依存する方式で変化する検出可能な特性を有する；上記の露出工程と 40

b) 該検出可能な特性における任意の変化を測定し、それにより該試料中の該検体の存在又は濃度を決定する工程とを含む。

【0007】

別の側面では、本発明はエキシマー効果を示すことのできる高分子を提供し；生成する高分子が該エキシマー効果を示すよう、

a) 互いに適切に配向させた場合にエキシマー効果を示すことができる1以上のエキシマー形成モノマー；及び

b) 1以上の他のモノマー；

のコポリマーを含む。

【0008】

さらに別の側面では、本発明はエキシマー効果を示すことのできる高分子の製造方法を提供し；この方法は、生成する高分子が該エキシマー効果を示すよう、

a) 互いに適切に配向させた場合にエキシマー効果を示すことができる分子構成 (m o l e c u l a r c o n s t i t u e n t) である1以上の指示成分モノマー；及び

b) 1以上の他のモノマー；

を共重合する工程を含む。

【0009】

さらに別の側面では、本発明は試料中の検体の存在または濃度の検出方法を提供し、該方 10
法は

a) i) 互いに適切に配向させた場合にエキシマー効果を示すことができ、検体の存在または濃度を検出することもできる、1以上のエキシマー形成モノマー；及び

i i) 1以上の他のモノマー；

のコポリマーを含む指示高分子に試料を露出する工程であって；生成する高分子が該エキシマー効果を示し、該指示高分子が、該検体に露出される場合に濃度に依存した方式で変化 15
する検出可能な特性を有する；上記の露出工程と、

b) 該検出可能な特性における任意の変化を測定し、それにより該試料中における該検体の存在または濃度を決定する工程とを含む。

【0010】

本発明の詳細な説明

一つの側面では、本発明は、水性環境中においてそれ自身では不溶性又はやや難溶性である指示成分を、水性環境中で使用する方法を提供する。生成する指示高分子が全体として十分に親水性であり、該指示成分モノマーの疎水的な寄与を上回るよう、該指示剤は充分に親水性である1以上のモノマーと実際には共重合される。

【0011】

適切な指示成分には水に不溶性又はやや難溶性である指示分子が含まれ、その検体の水溶性は、やや難溶性かそれより高い。適切な検体にはグルコース、フルクトース、及びその他のビシナルジオール； α -ヒドロキシ酸； β -ケト酸；酸素；二酸化炭素；様々なイオン（例えば亜鉛、カリウム、水素（pH測定））；炭酸塩；毒素；無機物；ホルモン、等 30
)が含まれる。本発明の高分子に組み込まれ指示剤として機能する場合、ここで用いられる指示成分モノマーの範囲には、2以上の個々のモノマーの混合物が含まれる（それらの少なくとも一つは、水性環境中で適切に機能するには充分に可溶ではない）ことが理解される。

【0012】

そのような指示成分の多くが知られている。例えば、米国特許第5,503,770号に記載される化合物はグルコースといった糖類の検出に有用であるが、水にやや難溶から不溶である。その他の種類の指示剤には、ここに参照して組み込まれる1999年3月11日に出願された同時継続中の米国特許出願シリアルNo. 09/265,979（1999年9月16日にPCT国際出願 WO99/46600として公開）に開示されたラン 40
タノイドキレート；多環芳香族炭化水素及びその誘導体；2001年1月5日に出願された同時継続出願シリアルNo. 09/754,217、及び2001年2月21日に出願された出願シリアルNo. 60/269,887（この両者は、グルコースと、干渉性の α -ヒドロキシ酸または β -ケトン等とを識別できる2つの認識要素を有する指示剤を記載する）に開示された指示剤等；が含まれる。

【0013】

一般に本発明の指示成分は、高分子が測定すべき検体に露出される場合に濃度に依存した方式で変化 35
する検出可能な特性を有する。多くのそのような特性が知られており、本発明で使用する。例えば、指示剤 (i n d i c a t o r) には発光（蛍光若しくはリン光）または化学発光部位、吸収型部位等が含まれてもよい。指示剤にはエネルギードナー部位 50

及びエネルギーアクセプター部位が含まれてもよく、各々は高分子が検体と接触する場合に検出可能な変化が生じるよう置かれている。指示剤にフルオロフォア及びクエンチャーが含まれ、検体が存在しない場合にはフルオロフォアがクエンチャーによりクエンチされるよう構成できる。その状況では、検体が存在すると指示剤が立体配置変化を起こし、蛍光発光できるようにクエンチャーがフルオロフォアから十分遠くへ移動する。それとは逆に、検体が存在しない場合にはフルオロフォアとクエンチャーが充分離れ、フルオロフォアが蛍光を発するように、それらを配置することもできる；検体と相互作用する場合には、フルオロフォア及びクエンチャーはクエンチングを起こすのに充分近接した場所に移動する。立体配置変化の概念は、“検体の検出”という名称であり同時係属中の出願シリアル No. 09/754, 219 により詳細に記載されており、ここに参照して取り込む。

10

【0014】

その他の検出可能な部位には、光誘起電子移動または誘導効果による検体との相互作用によって発光が影響される部位が含まれる。これらには、参照してここに取り込まれる 1999 年 3 月 11 日に出願され同時係属の米国出願シリアル No. 09/267, 979 に開示されたランタノイドキレート；多環芳香族炭化水素及びそれらの誘導體；クマリン；BODIPY（登録商標）（Molecular Probes, Eugene, OR）；ダンシル；カテコール；等が含まれる。別の種類の部位には、指示化合物が検体と相互作用する場合に吸収スペクトルが変化する部位が含まれ、アリザリンレッド等が含まれる。別の種類の部位には、近接効果により蛍光が変調される部位（例えば、ダンシル／ダブシルといったエネルギードナー／アクセプターペア）等が含まれる。

20

【0015】

好ましくは、検出可能な特性は検出可能な光またはスペクトルの変化であり、例えば：吸収特性（例えば吸光率及び／またはスペクトルシフト）、蛍光減衰時間（時間領域または周波数領域測定により決定される）、蛍光強度、蛍光異方性または偏光性における変化；発光スペクトルのスペクトルシフト；時間分解異方性減衰（時間領域または周波数領域測定により決定される）における変化；等である。

【0016】

生成する指示高分子が水性環境中で機能できるよう、適切な親水性モノマーは、疎水性指示成分モノマーの和を上回るため充分親水性でなければならない。幅広い親水性モノマーが本発明の使用に適しているということは、直ちに明らかとなる。例えば、適切な親水性モノマーにはメタクリルアミド、メタクルレート、メタクリル酸、ジメチルアクリルアミド、TMAMA、ビニル、多糖類、ポリアミド、ポリアミノ酸、親水性シランまたはシロキサン等、並びに 2 以上の異なるモノマーの混合物が含まれる。

30

【0017】

所定の用途に適切な親水性モノマーは、多くの要因（意図する作動温度、塩分濃度、pH、その他の溶質の存在及び性質、イオン強度などが含まれる）に応じて変化する。機能性構成要素（例えば、スルホナート、4 級アミン、カルボキシルといったイオン；水酸基、スルフヒドリル基、アミン、カルボニル、アミド等といった極性部位；ハロゲン等）を追加して、指示高分子の親水性の程度を増加させることができるということは直ちに明らかとなる。

40

【0018】

親水性モノマー：指示成分モノマーのモル比は、所期の特定の用途に依存して広く変えることが理解される。親水性モノマー：指示成分モノマーの好ましい比は約 2：1 から約 1000：1、好ましくは約 5：1 から約 50：1 の範囲にある。

【0019】

一般に、本発明の指示高分子は、少なくとも一つの指示成分モノマーを少なくとも一つの親水性モノマーと単に共重合することにより合成できる。最適の重合条件（時間、温度、触媒など）は、具体的な反応体及び最終生成物の用途によって変化し、当業者により容易に確定される。

【0020】

50

本発明の指示高分子は、望まれる何れの程度の水溶性をも有しうる。例えば、以下の実施例 1 及び 2 の指示高分子は非常に水溶性が高く、水性液に容易に溶解する。その一方、例えば親水性モノマー HEMA（ヒドロキシエチル メタクリレート）またはその他の一般的なヒドロゲル構成成分を含有する指示高分子は、親水性ではあるが不溶性となりうる。

【0021】

望まれる場合には、可溶性指示高分子を直接溶液で用いることができる。その一方、望まれる用途で必要とされる場合には、指示高分子をガラス、プラスチック、ポリマー材料等といった不溶性表面またはマトリックスの上または内部に固定化しうる（例えば、機械的な捕捉（*entrapment*）、共有結合的またはイオン結合的な付着、またはその他の手段により）。指示高分子が、例えば別のポリマー中に捕捉される場合、好ましくは、捕捉する物質が検体を十分に透過させ、検体と高分子中の指示成分との間で適切な相互作用が起きるようにすべきである。

10

【0022】

本発明の指示高分子は広く使用され、エネルギー、医薬、及び農業分野での指示剤としての使用が含まれる。例えば、該指示高分子を血液、組織、及び尿中のグルコースを通常以下のレベル（*sub-level*）または通常以上のレベル（*supra-level*）で検出するための指示分子として使用でき、糖尿病及び副腎不全といった疾病の診断またはモニタリングについて有用な情報を提供する。ヒト治療用途についての医学／薬学的なグルコース生成には、モニタリング及び制御が必要とされる。

【0023】

本発明の農業での使用には、大豆及び他の農産物中のグルコースといった検体濃度の検出が含まれる。ワイン用ブドウといった高価値作物について重要な収穫の決定では、グルコースを慎重に監視しなければならない。グルコースは発酵法で最も高価な炭素源及び原料であるため、最適な反応器供給速度を制御するためのグルコースのモニタリングは高濃度アルコール（*power alcohol*）製造において重要である。反応器の混合及びグルコース濃度の制御は、国際的に大量のグルコース及び発酵性糖を消費するソフトドリンク及び発酵飲料の生産の間の品質管理にも重要である。

20

【0024】

指示高分子が蛍光性指示剤の置換構成成分を取り込む場合、本発明の高分子を利用できる様々な検出法も当該技術分野で知られている。例えば、本発明の高分子を蛍光センシングデバイスで使用することができ（例えば、米国特許第 5, 517, 313 号）、または、ポリマー材料若しくはその他の基質（例えば、視覚検査のための試験紙）に結合させることもできる。例えば、後者の手法により、リトマス試験紙片による pH 測定に類似した方式でグルコース測定を行うことができる。ここに記載する高分子は、標準的なベンチトップ分析機器（例えば島津、日立、Jasco、Beckman、その他により作成される分光蛍光光度計または臨床分析器）として使用することもできる。これらの分子は、Ocean Optics（Dunedin, Florida）またはOriental Opticsにより作成される光ファイバー系（*fiber optic-based*）センサー及び分析蛍光光度計（*analytical fluorometer*）と共に使用して、検体に特有の化学的／光学的信号伝達を提供することもできる。

30

40

【0025】

米国特許第 5, 517, 313 号の開示をここに参照して取り込むが、この特許明細書は蛍光センシングデバイスを記載しており、このデバイスでは本発明の高分子を液体媒質中の検体（例えばグルコースまたはその他のシスジオール化合物）の存在または濃度の決定に使用できる。センシングデバイスは、蛍光指示分子含有マトリックス（以下“蛍光マトリックス”）の積層アレイ；ハイパスフィルタ；及び、光検出器を備える。このデバイスでは、光源からの入射光により指示分子が蛍光を発するよう、光源、好ましくは発光ダイオード（“LED”）が、少なくとも部分的に指示材料内に、または指示マトリックスが配置された導波路に、設置される。ハイパスフィルタにより発光が光検出器に達し、その上、光源からの散乱入射光を透過する。

50

【0026】

米国特許第5, 517, 313号に記載のデバイスに使用される指示分子の蛍光は、検体（例えばグルコースまたはその他のシスジオール化合物）が局所的に存在することにより変調、例えば減衰または増強される。

【0027】

米国特許第5, 517, 313号に記載のセンサーでは、指示分子を含有する材料が検体を透過させることができる。従って、検体が周囲の試験媒質から該材料へ拡散でき、それにより指示分子による蛍光発光に影響を与える。光源、指示分子含有材料、ハイパスフィルタ、及び光検出器は、指示分子による蛍光発光の少なくとも一部が光検出器に衝突して周囲の媒質中の検体（例えばグルコース）濃度を示す電気信号を生成するように構成される。 10

【0028】

本発明の指示高分子を使用する他の可能な実施態様に従い、米国特許第5, 910, 661号、5, 917, 605号、及び5, 894, 351号にもセンシングデバイスが記載されており、全てを参照してここに取り込む。

【0029】

本発明の高分子を、例えば *in vivo* で検体（例えば血液または器官のグルコースレベル）を連続的にモニターする埋め込み型デバイスに用いることもできる。適切なデバイスが、例えば同時係属中である1999年8月26日に出願の米国特許出願シリアルNo. 09/383, 148号、並びに米国特許第5, 833, 603号、第6, 002, 954号、及び第6, 011, 984号に記載されており、全て参照してここに取り込む。 20

【0030】

本発明の高分子は独自の利点を有する。例えば、試料の吸光度は吸収体の濃度と試料経路長との両者に直接比例する。従って吸光度に基づく評価では、所定のレベルの吸光度について、吸光度濃度を大きく増加させると試料経路長を大きく減少できることは明らかである。その望ましい濃度増加を、親水性モノマー：指示成分モノマー比を減少させることにより実現できる。実際に、本発明によって、ずっと多くの吸収体成分を限られた空間に局在化させた濃度が得られ、それによって、単位厚み当たりの吸光度を増加させる。従って、吸光度に基づく評価を行う場合に、本発明によりずっと小さな装置を用いることができる。光に基づく何れの評価についても（蛍光に基づく評価が含まれる）、指示成分の局所濃度を大きく高めることができるため、幾つかの利点が生じる。例えば、指示成分の局所濃度を高くすることにより、指示高分子層の厚みを薄くすることができ、それによって検体の存在または濃度に対する高分子の応答時間を大きく低減できる。さらに、結果として励起光をより弱くすることになり、望ましいことに、器官系または生理的な溶液中で作用する場合に自己蛍光の発生を低減できる。例えば蛍光系の高分子によって作用する場合、吸収されない励起光が、器官または生理的な溶液中に存在する例えばNADH、トリプトファン、チロシン等と相互作用して、それらの部位から望ましくない干渉性の蛍光発光が起きる。それに加え、吸収系の高分子を器官または生理的な溶液中で使用する場合には、周囲の器官または液体中の成分（例えばビリルビン）に応じて変動しうる光源の放射量を低減することが望ましい。従って、高い吸光度を有する指示成分を高い局所濃度にするこ 30 40

【0031】

本発明のさらなる側面としては、一定の高分子がエキシマー効果を示すことが見出された。背景としては、（フルオロフォアに共通するような）芳香族の構造を有する2つの平面状分子を π 電子軌道のローブが重なりあうことのできる点に集めると、重なりによって由来する共鳴の結果としてエネルギー的に好ましく安定なハイブリッド（カプレット）構造が生じる種では、共鳴条件が起きる。これら二つの平面分子が、それらの間で電子雲が重なるサンドウィッチのパンのような共平面状の配置をとる。蛍光平面種では、分離した種と比べて特徴的な低エネルギーシフトした発光が起り、その波長は親種よりも充分低いエネルギーに当たる。そのような共鳴に有利な配置を形成できる分子はエキシマーとして知られ 50

ている。ここで使われる通り、エキシマー効果とは、結果として起き特徴的である長波長シフトしたエキシマーからの発光を指す。

【0032】

典型的なエキシマー形成多環芳香族炭化水素の例としては、アントラセン及びピレンが挙げられる。他に多くのものがある。一つの例はアントラセン誘導体（ホウ酸エステル（ボロナート）が含まれる）であり、本願の実施例1及び2で使用される指示成分である。アントラセンは溶液中でエキシマーを形成することが知られているが、エキシマーの性質を観測するのに充分高レベルに分子を濃縮できなければならない。実施例1及び2のアントラセン誘導体の場合、その分子は水に不溶でありメタノールといった溶媒に充分溶解せず、エキシマーの性質を観測できない。本実施例では、アントラセン誘導体の相対濃度を、コポリマー中で親水モノマーに対し500：1から400：1、200：1、100：1、50：1、25：1、15：1、そして5：1まで増加させた。その全てがアントラセンに特徴的である417nmの青色発光を有するが、5：1の比では、突然、緑の発光が現れる。この緑の発光がエキシマーハイブリッドのものであり、この発光は約100nm以上（～515－570nm、緑）低エネルギーシフト（長波長シフト）した。平面種間の距離は、3D空間での可溶濃度ではなくポリマー骨格に沿った配列によって制御されているため、溶液全体における濃度を高くする必要はない。

10

【0033】

驚くべきことに、エキシマー発光領域は検体濃度の変化には応答しないが、分析される系のその他の点全て（例えば、励起強度、温度、及びpH）に応答する。その結果、本指示高分子は指示剤及び内部リファレンスの両者として作用しうる。例えば理想的なリファレンスのスキームでは、指示波長（つまり、検体に影響される波長）での発光強度を、エキシマー波長での発光強度により、選択バンドパスフィルタを用いて光学的に割り算する。得られた値により、蛍光発光特性に影響する干渉因子（例えば酸素による蛍光のクエンチング、pHのドリフト及び誤差、LED強度に影響する力率及びドリフト、周囲温度の変動等といった因子）を修正する。

20

【0034】

エキシマー効果を示す本発明の高分子が、水性及び非水性の環境の両者で有用であることは、容易に理解される。従って、これらの高分子、そして指示成分（エキシマー形成モノマー及びその他のモノマー）は、目的の用途に応じて親水性から疎水性に変化できる。

30

【0035】

また、本発明のエキシマー高分子を検体の存在又は濃度の検出に使用する場合、その高分子を直接溶液で用いることもでき、上記の通り固定化することもできる。

【0036】

本発明の高分子は、当業者が過度の実験をすることなく、既知の反応機構及び試薬（下記の一般的な方法に合致する反応メカニズムが含まれる）を用いて実施することができる。

【0037】

実施例1

a) 9-[(メタクリロイルアミノプロピルアミノ)メチル]アントラセンの製造

(A) 1段

N-(3-アミノプロピル)メタクリルアミド塩酸塩 (Polysciences, #21200) (11.82 g, 0.066 モル, 3.0 当量) 及び痕跡量の阻害剤 DBMP (2, 6-ジ-tert-ブチル-4-メチルフェノール) (10 mg) のクロロホルム (250 mL) 懸濁液を氷水浴中で攪拌し、そこにジイソプロピルエチルアミン (25 mL, 18.55 g, 0.144 モル, 6.5 当量) を20分で滴下した。この混合物を室温に温め、再び氷水浴で冷却した。9-クロロメチルアントラセン (5.0 g, 0.022 モル) の透明なクロロホルム溶液 (100 mL) を1時間にわたり滴下した。25℃で1時間、50℃で12時間、そして70℃で2時間反応させた。

40

【0038】

混合物を水で洗浄し (60 mLで4回)、水層を塩化メチレンで抽出した。有機層を混

50

ぜ合わせ、 Na_2SO_4 で乾燥し、分離し、溶媒を減圧下 40°C で除去した。粗物質を、メタノールの塩化メチレン溶液 (2–5%) を用いシリカゲルでクロマトグラフィーにかけ、 2.44 g (33.4%) の固体生成物を得た。TLC (シリカゲル) : R_f 0.39 ($\text{MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2 = 1/9$) , 単独スポット。

(B) 2 段

N-(3-アミノプロピル) メタクリルアミド (788 mg , 4.41 mmol , 10 当量) 塩酸塩及び痕跡量の阻害剤 MEHQ (メチルエーテルヒドロキノン) (2 mg) を水 (30 mL) 及びテトラヒドロフラン (30 mL) の混合物に溶解させた透明溶液を氷水浴で攪拌した。 $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ 緩衝液 (66 mL , 0.2 M , $\text{pH } 10$) を 1 時間で加え、9-クロロメチルアントラセン (100 mg , 0.441 mmol) のクロロホルム (100 mL) 溶液を 3 時間で加えた。 25°C で 7 時間、そして 55°C で 12 時間反応させた。

【0039】

有機層を分離し、水で洗浄し (50 mL で 4 回)、水層を塩化メチレンで抽出した。有機層を混ぜ合わせ、 Na_2SO_4 で乾燥し、分離し、溶媒を減圧下 45°C で除去した。粗物質 (270 mg) を、メタノールの塩化メチレン溶液 (10–20%) を用いシリカゲルでクロマトグラフィーにかけ、 28.7 mg (19.6%) の固体生成物を得た。TLC (シリカゲル) : R_f 0.77 ($\text{MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2 = 3/7$) , 単独スポット。

b) 9-[[N-メタクリロイルアミノプロピル-N-(o-ボロノベンジル) アミノ] メチル] アントラセンの製造

上記の工程 a) で得られた生成物 (2.440 g , 0.00734 mol) 及び痕跡量の阻害剤 DBMP (10 mg) のクロロホルム (200 mL) 溶液を氷水浴で攪拌し、DIEA (ジイソプロピルエチルアミン) (2.846 g , 3.84 mL , 0.022 mol , 3.0 等量) を 10 分間で少しずつ加え、そして 2, 2-ジメチルプロパン-1, 3-ジイル [o-(プロモメチル) フェニル] ボロナート (2.492 g , 0.00881 mol , 1.2 等量) のクロロホルム (15 mL) 溶液を 30 分間で加えた。反応を室温で 20 時間行った。

【0040】

混合物を水で洗浄し、分離し、水層を塩化メチレンで抽出した。有機層を混ぜ合わせ、 Na_2SO_4 で乾燥し、分離し、溶媒を減圧下 25°C で除去した。半固体 (4.75 mg) を、メタノールの塩化メチレン溶液 (2–5%) を用いシリカゲルでクロマトグラフィーにかけ、薄い黄色の結晶性固体で融点 $72-73^\circ\text{C}$ の生成物 2.50 g (76.3%) を得た TLC (シリカゲル) : R_f 0.36 ($\text{MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2 = 1/9$) 。 CH_2Cl_2 , CHCl_3 , THF, CH_3OH , 及び $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ に可溶である。 H_2O 及びエーテルへの溶解度は限られている。

c) MAPTAC 及び 9-[[N-メタクリロイルアミノプロピル-N-(o-ボロノベンジル) アミノ] メチル] アントラセンの水に可溶なコポリマー溶液の製造

(50:1) 溶液:

該モノマー (42.3 mg , 0.0908 mmol) のエタノール (100%, 1.5 mL) 溶液に、MAPTAC [3-(メタクリロイルアミノ) プロピル] トリメチルアンモニウムクロリド (2.0 mL , 1.0 g , 4.54 mmol , 50 等量) 及びラジカル開始剤としての AIBN (アゾビスイソブチルニトリル) のエタノール溶液 (0.183 M , 0.2 mL) を加え、透明溶液を得た。窒素で満たし、加熱して 1 時間で 70°C とし、 70°C で 80 分保持し、粘性の液体を得た。

【0041】

得られた液体を水 (26 mL) で処理し、マイクロフィルター ($0.45\text{ }\mu\text{m}$) で濾過し、透明な溶液とした。酢酸セルロースメンブラン (MWCO 3500) で水 5 L を 4 回用いて透析した後、ポリエチレングリコール (MW 20 K) を用いて濃縮し透明な溶液 (34.54 g) とした。濃度: 1.0 g の溶液中に 24.0 mg の固形分、総固体

829 g、収率 79.5 %。

【0042】

類似した方法を適用して、親水性モノマー：指示剤のモル比が500：1，400：1，200：1，100：1，50：1，25：1，15：1，及び5：1であるコポリマー溶液を製造した。

50：1及び25：1コポリマーのグルコースによる変調

様々な濃度のグルコース溶液による50：1及び25：1の指示高分子の蛍光変調を下の表1及び2に示す。表1は、4つの異なるグルコース濃度について、本実施例の25：1の指示高分子を2つの異なる濃度（15 mg/ml及び25 mg/ml）で用いた結果を示す。表2は、4つの異なるグルコース濃度について、本実施例の50：1の指示高分子を2つの異なる濃度（10 mg/ml及び20 mg/ml）で用いた結果を示す。両方の表で、 I/I_0 はグルコースに露出する前後での420 nmの発光強度比である。

【0043】

【表1】

表1

グルコース濃度 (mM)	指示高分子(25:1) 15mg/mlでの I/I_0	指示高分子(25:1) 25mg/mlでの I/I_0
0	1.00	1.00
50	1.44	1.50
100	1.75	1.90
200	2.13	2.33

【0044】

【表2】

表2

グルコース濃度 (mM)	指示高分子(50:1) 10mg/mlでの I/I_0	指示高分子(50:1) 20mg/mlでの I/I_0
0	1.00	1.00
50	1.40	1.48
100	1.70	1.79
200	2.04	2.22

【0045】

実施例2

この実施例は、実施例1で調製した5：1の指示高分子について存在する、驚くべきそして有用なエキシマー効果を示す。

【0046】

図1は、5：1指示高分子を3つのグルコース濃度（0 mM，30 mM，及び60 mM）に露出した場合において、365 nmの光で励起後の発光スペクトルを示す。図1の影を付けた領域には、実施例1の非エキシマー25：1指示高分子の発光も示す。エキシ

マー発光領域は、等吸収点というよりはむしろ“等吸収領域”を示す。図1から、エキシマー発光領域（0 mM, 30 mM, 及び60 mMグルコースの曲線が重なる領域）が（等吸収点のように）グルコース濃度の変化に応答しないことがわかる。エキシマー発光領域は、アントラセン誘導体の変調で応答するピーク波長から約100 nm長波長シフトして始まる。グルコースを除けば、エキシマーはこの系の他の全ての点（例えば、励起強度、温度、及びpH）に応答する。従って理想的なリファレンススキームでは、415 nmでの振幅又は信号値を、515 nm又はエキシマー発光領域内にある別の波長での振幅又は信号値によりコンピュータ上で割り算し、得られた値をpHのドリフト及び誤差、LED強度に影響する力率及びドリフト、周囲温度の変動等について修正する。これを以下に示す。

10

励起強度、温度、及びpHの修正の実証

5：1指示高分子のグルコース変調を、3つの異なるグルコース溶液（0 mM, 100 mM, 及び200 mM）で測定した。光源及び発光について3つの異なる分光光度計スリットの構成により（1.5が狭い方、3が広い方）、グルコース溶液の各々について発光スペクトルを測定した。データを表3に示す。この表では、420 nmの発光強度：550 nmの発光強度比は、スリット構成には比較的依存していない。

【0047】

【表3】

表3

20

スリット構成	I420/I550 0 mM グルコース	I420/I550 100 mM グルコース	I420/I550 200 mM グルコース
1.5/1.5	3.92	6.18	7.36
1.5/3	3.93	6.12	7.25
3/3	4.00	6.27	7.28

【0048】

30

5：1エキシマー指示高分子の温度安定性を測定した。5：1エキシマー指示高分子の1 mg/ml溶液を200 mMのグルコース（pH 7.5）に露出した場合、420 nm：550 nmの発光の比は室温で7.57、約60℃で7.53であった。

【0049】

5：1指示高分子のpH安定性も測定した。3つの異なるpHレベル（6.5, 7.0及び7.5）において、5：1エキシマー指示高分子の1 mg/ml溶液を200 mMのグルコースに露出した場合、420 nm：550 nmの発光の比を測定し（励起光370 nm、スリット1.5, 3）、表4に示す。発光スペクトル全体は図2に示す。試験した範囲を通じて、変化は統計上問題とはならなかった。

【0050】

40

【表4】

表4

I420/I550 pH 6.5	I420/I550 pH 7.0	I420/I550 pH 7.5
4.28 ± 0.18	4.60 ± 0.37	4.29 ± 0.19

【0051】

エキシマー複合体の安定性（恐らくπ電子雲による）は非エキシマーアントラセン誘導体の安定性を上回ると考えられ、そして、ボロナートの認識機能は非エキシマーの特性を変

50

動させて良好な指示剤とするが、より安定なエキシマー複合体に変動を加えることはできず、そのためエキシマーが非常に良好なリファレンス指示剤とすると考えられる。リファレンス分子は、リードチャンネル指示剤 (read channel indicator) と構造的に変わっていない。ポリマーマトリックスも同じでよく、本実施例では実は同じ高分子である。認識要素は開放されており変形されていないが (open and intact)、認識要素とフルオロフォア中心との間での誘起エネルギーの影響は抑制された。

【0052】

指示剤及びリファレンス分子間で物理的及び／又は化学的環境を分ける必要をなくすることができるため、前記事項は非常に重要である。

実施例 3

適切なランタノイドキレート指示成分モノマーの合成を図 3 に示す。化合物 (1) 及び (2) は Macrocyclics, Richardson, TX から市販で入手可能である (化合物 (2) は $p\text{-NH}_2\text{-Bz-DOTA}$ として知られている)。最終生成物 (9) を 1 以上の他のモノマーと共重合して、指示高分子を形成できる。

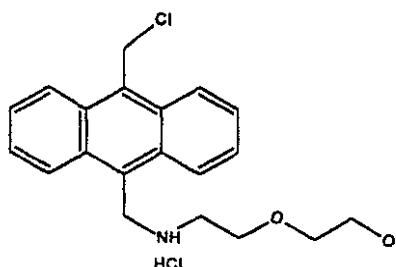
【0053】

実施例 4

ビスーボロネートアントラセンの単一メタクリルアミドモノマー

【0054】

【化 1】



【0055】

A. 9-クロロメチル-10-[[2-(2-(2-ヒドロキシエトキシ)エチルアミノ]-メチル]アントラセン塩酸塩 30

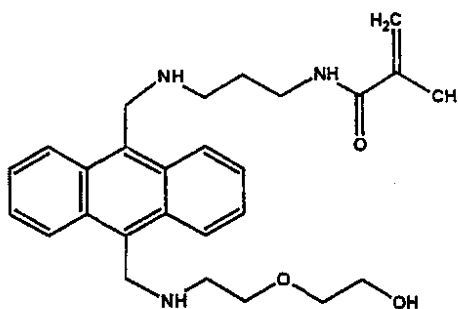
9, 10-ビス(クロロメチル)アントラセン (5.18 g, 18.8 mmol, 3.99 当量) の NMP (200 mL) 溶液に、2-(2-アミノエトキシ)エタノール (0.495 g, 0.475 mL, 4.71 mmol) を加えた。混合物を暗所に 17 時間攪拌した。この際、真空下 50 °C で反応混合物を ~50 mL に濃縮した。残留物をシリカゲルクロマトグラフィー (重力グレードのシリカゲル 150 g、0-10% $\text{CH}_3\text{OH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$) で精製し、0.425 g (24%) の黄色/橙色の固体を得た。

TLC: Merck シリカゲル 60 プレート, $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH} = 70/30$ で R_f 0.72, UV (254/366) で観測、ニンヒドリン検出。 40

HPLC: HP 1100 HPLC クロマトグラフ, Vydac 201TP 10 x 250 mm のカラム, 注入 0.100 mL, 2 mL/分, 370 nm で検出, A = 水 (0.1% HFBA) and B = MeCN (0.1% HFBA), グラジエント 10% B 2 分間, 10-80% B 18 分間, 80-100% B 2 分間, 100% B 2 分間, 保持時間 16.1 分。

【0056】

【化 2】



10

【0057】

B. 9-[[[2-(2-(2-ヒドロキシエトキシ)エチルアミノ)メチル]-10-[[3-メタクリルアミド]プロピルアミノ]メチル]アントラセン

N-(3-アミノプロピル)メタクリルアミド塩酸塩 (3.08 g, 17.2 mmol, 4.2 当量), DIEA (5.19 g, 7.00 mL, 40.1 mmol, 9.8 当量)、及び BHT ~ 3 mg の CHCl_3 (125 mL) 懸濁液に、9-クロロメチル-10-[[[2-(2-(2-ヒドロキシエトキシ)エチルアミノ)メチル]アントラセン塩酸塩 (1.56 g, 4.10 mmol) の CHCl_3 (25 mL) 溶液を、23°C で加えた。続いて混合物を暗所で 92 時間攪拌した。この際、反応混合物を濾過し、40 mL の NaHCO_3 (飽和水溶液) で 2 回洗浄した。有機抽出物を無水 Na_2SO_4 で乾燥し、濾過し、濃縮して、粘りけのある橙色の固体を得て、その固体をアルミナクロマトグラフィー (活性化中性アルミナ 50 g, 0-5% $\text{CH}_3\text{OH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$) で精製し、橙色の固体 0.364 g (20%) を得た。

20

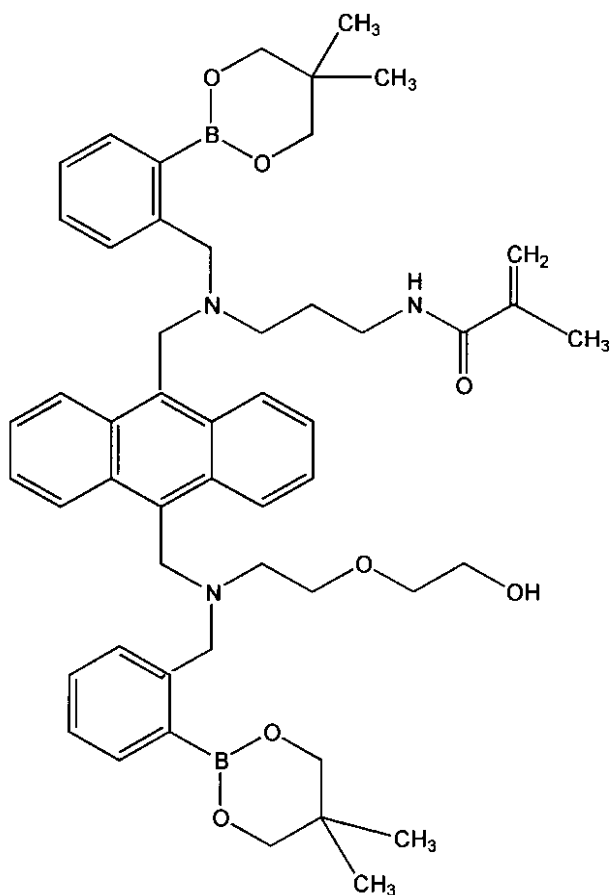
TLC: Merck シリカゲル 60 プレート, $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH} = 70/30$ で R_f 0.16, UV (254/366) で観測、ニンヒドリン検出。

HPLC: HP 1100 HPLC クロマトグラフ, Vydac 201TP 10 x 250 mm のカラム, 注入 0.100 mL, 2 mL/分, 370 nm で検出, A = 水 (0.1% HFBA) and B = MeCN (0.1% HFBA), グラジエント 10% B 2 分間, 10-80% B 18 分間, 80-100% B 2 分間, 100% B 2 分間, 保持時間 16.85 分。

30

【0058】

【化 3】



10

20

30

40

50

【0059】

C. 9-[N-[2-(5,5-ジメチルボルリナン-2-イル)ベンジル]-N-[3-(メタクリルアミド)プロピルアミノ]メチル]-10-[N-[2-(5,5-ジメチルボルリナン-2-イル)ベンジル]-N-[2-(2-ヒドロキシエトキシ)-エチルアミノ]メチル]アントラセン(単一メタクリルアミドモノマー)

9-[[2-(2-ヒドロキシエトキシ)エチルアミノ]メチル]-10-[[3-メタクリルアミド]プロピルアミノ]メチル]アントラセン(0.343 g, 0.763 mmol), DIEA(0.965 g, 1.30 mL, 9.8 当量)、及び(2-ブロモメチルフェニル)ホウ酸ネオペンチルエステル(1.09 g, 3.85 mmol, 5.0 当量)のCHCl₃(20 mL)溶液を、暗所にて25時間23℃で撹拌した。この際、反応混合物を初めロータリーエバポレーターで濃縮し、次いで真空ポンプを用いてDIEAを除去した。残留物をアルミナカラムクロマトグラフィー(活性化中性アルミナ40 g, 0-10% CH₃OH/CH₂Cl₂)で精製し、黄橙の固体0.299 g(46%)を得た。この生成物を1以上のその他のモノマーと共重合し、指示高分子を形成できる。ホウ酸エステル基は使用の前に脱保護しなければならない。

FAB MS: C₅₂H₆₅B₂N₃O₇ についての計算値 [M]⁺ 854; 観測値 [M+1]⁺ 855.

TLC: Merck 塩基性アルミナプレート, CH₂Cl₂/CH₃OH=95/5 でRf 0.35, UV(254/366)で観測。

HPLC: HP 1100 HPLCクロマトグラフ, Vydac 201TP 10 x 250 mmのカラム, 注入0.100 mL, 2 mL/分, 370 nmで検出, A=水(0.1% HFBA) and B=MeCN(0.1% HFBA), グラジエント10% B 2分間, 10-80% B 18分間, 80-100% B 2分間, 100% B 2分間, 保持時間19.7分。

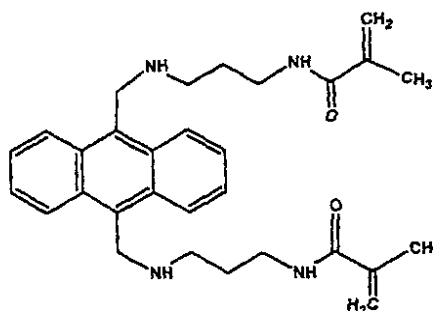
【0060】

実施例 5

ビス-ボロナート-アントラセンの二重メタクリルアミドモノマー

【0061】

【化4】



10

【0062】

A. 9, 10-ビス[3-(メタクリルアミド)プロピルアミノ]メチルーアントラセン

9, 10-ビス(クロロメチル)アントラセン(1.5 g, 5.45 mmol)、DIEA(28.17 g, 38.00 mL, 218 mmol, 40 等量.)、N-(3-アミノプロピル)メタクリルアミド塩酸塩(9.76 g, 54.5 mmol, 10.0 等量.)、及びBHT~5 mgをCHCl₃(200 mL)に23℃で懸濁させた液を、暗所にて40℃で4日間攪拌した。この際、温度を45℃に上げ、混合物をさらに3日間攪拌した。その際、沈殿物が生じた。その混合物を濾過し、固体生成物を最小量のCH₂Cl₂に溶解させた。黄色の結晶性固体、つまり目的生成物の塩酸塩が一晩で形成した(3.15 g, 定量)。

20

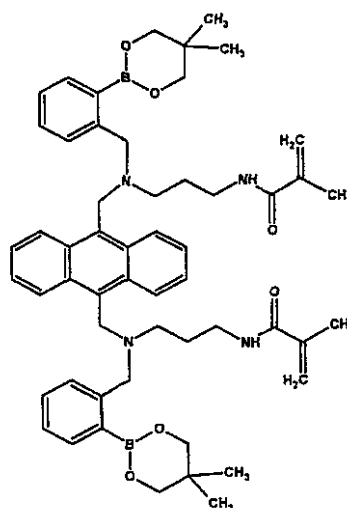
TLC: Merck 塩基性アルミナプレート, CH₂Cl₂/CH₃OH=90/10でRf 0.31, UV(254/366)で観測。

HPLC: HP 1100 HPLCクロマトグラフ, Waters 5 x 100 mm NovaPak HR C18のカラム, 注入0.100 mL, 0.75 mL/分, 360 nmで検出, A=水(0.1% HFBA) and B=MeCN(0.1% HFBA), グラジエント10% B 2分間, 10-80% B 18分間, 80-100% B 2分間, 100% B 2分間, 保持時間15.0分。

30

【0063】

【化5】



40

【0064】

50

B. 9, 10-ビス [N- [2- (5, 5-ジメチルボリナン-2-イル) ベンジル] -N- [3- (メタクリルアミド) プロピルアミノ] メチルアントラセン

9, 10-ビス [3- (メタクリルアミド) プロピルアミノ] メチルアントラセン (0.650 g, 1.34 mmol, アミンフリー)、DIEA (0.612 g, 0.825 mL, 4.74 mmol, 3.55 等量)、(2-ブロモメチルフェニル) ほう酸ネオペンチルエステル (1.34 g, 4.74 mmol, 3.55 等量)、及び BHT (阻害剤として 5 mg) の CHCl_3 (20 mL) 溶液を暗所にて 23 °C で 5 日間攪拌した。この際、反応混合物を真空下で濃縮し、残留物をアルミナカラムクロマトグラフィー (活性化中性アルミナ 200 g, 0-2% $\text{CH}_3\text{OH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$) で精製し、非常に粘度の高い黄色の油 0.465 g (39%) を得た。

TL C: Merck 塩基性アルミナプレート, $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}=90/10$ で R_f 0.59, UV (254/366) で観測。

HPLC: HP 1100 HPLC クロマトグラフ, Waters 5 x 100 mm Nova Pak HR C18 のカラム, 注入 0.050 mL, 0.075 mL/分, 360 nm で検出, A = 水 (0.1% HFBA) and B = MeCN (0.1% HFBA), グラジエント 10% B 2 分間, 10-80% B 18 分間, 80-100% B 2 分間, 100% B 2 分間, 保持時間 16.9 分。

C. グルコース指示剤を有する N, N-ジメチルアクリルアミドヒドロゲルの調製:

N, N-ジメチルアクリルアミド (40 重量%) 及び N, N'-メチレンビスアクリルアミド (0.8 重量%) のエチレングリコール溶液を調製した。9, 10-ビス [N-2- (5, 5-ジメチルボリナン-2-イル) ベンジル] -N- [3- (メタクリルアミド) プロピルアミノ] メチルアントラセン (17.8 mg, 2×10^{-5} モル) 及び 40 μL の過硫酸アンモニウム水溶液 (5 重量%) を、1 mL のエチレングリコールモノマー溶液と混ぜ合わせた。生じた溶液を、窒素パージしたグローブボックス中に設置した。重合を促進するため、そのモノマー処方物に N, N, N', N'-テトラメチルエチレンジアミンの水溶液 (0.040 mL, 5 重量%) を加えた。生成した処方物を、顕微鏡スライド及び 100 ミクロンのステンレス鋼スぺーサから構成されたモールドに注いだ。窒素雰囲気中で 8 時間保持した後、モールドをリン酸緩衝生理食塩水 (PBS, pH = 7.4) 中に入れ、顕微鏡スライドを分離し、ヒドロゲルを取り出した。1 mM のラウリル硫酸ナトリウム及び 1 mM の EDTA ナトリウム塩を含有する PBS 100 mL を毎日取り替えて 3 日間ヒドロゲルを洗浄し、続いて DMF/PBS (容積比 10/90、100 mL で 3 回) で洗浄し、最後に PBS (pH = 7.4、100 mL で 3 回) で洗浄した。生成したヒドロゲルポリマーを、0.2 重量% のアジ化ナトリウム及び 1 mM の EDTA ナトリウム塩を含有する PBS (10 mM PBS, pH = 7.4) 中に保存した。

D. グルコース、ラクテート、及びアセトアセテートによる蛍光変調

本実施例で調製された指示高分子 (二つの認識要素を含有する) のグルコース、ラクテート、及びアセトアセテートによる蛍光変調を測定した。図 4 は、0.2% の NaN_3 及び 1 mM の EDTA ナトリウム塩を含有し、様々な量の L-乳酸ナトリウム、リチウムアセトアセテート、又は α -D-グルコースを含有する PBS (10 mM, pH = 7.4) 中での本実施例のヒドロゲルの規格化した蛍光発光 ($I/I_0 @ 427 \text{ nm}$) を示す。データは島津 RF-5301 分光蛍光光度計を用い、励起光 365 nm (スリット = 3 nm); 発光 427 nm (スリット = 3 nm) とし、低感度で、37 °C において、温度制御されたサンプルホルダーを使用して記録した。測定前に、目的溶液 3 mL を含有するキュベットを 15 分間 37 °C で恒温にした。各々のヒドロゲル試料は独立の試料 4 つについて測定した。エラーバーは各々の測定点について標準偏差を 4 倍したものである。グルコース認識分子を含有するヒドロゲルは、前述の通り調製した。ヒドロゲルをスライドガラスにのせ、入射光に対し 45 °C で PMMA キュベット内でポリエステルメッシュで被覆した。0.2% NaN_3 及び 1 mM EDTA を含有する 10 mM の PBS (pH = 7.4) に: 1, 5, 10 及び 20 mM の L-乳酸ナトリウム [Aldrich]; 5, 10 及び 20 mM のリチウムアセトアセテート [Aldrich]; 並びに、1

10

20

30

40

50

、2、4、5、10、及び20 mMの α -D-グルコースを溶解させた液を調製した。グルコースの存在によってコポリマーの蛍光は影響を受けたが、ラクテート、アセトアセテートの存在によっては影響されなかった。

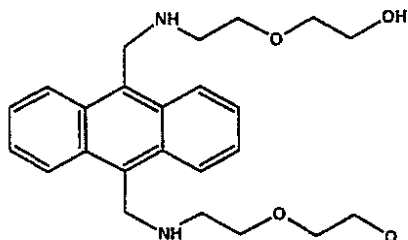
【0065】

実施例 6

ビス-ポロナート-アントラセンの単一及び二重メタクリレートモノマー

【0066】

【化6】



10

【0067】

A. 9, 10-ビス[[2-(2-ヒドロキシエトキシ)エチルアミノ]メチル]-アントラセン

2-(2-アミノエトキシエタノール) (31.4 g, 30.0 mL, 299 mmol, 20.9 等量) の CHCl_3 (40 mL) 溶液に、9, 10-ビス(クロロメチル)アントラセン (3.94 g, 14.3 mmol) を 23°C で加えた。その溶液を暗所で67時間攪拌した。その際、100 mLの CH_2Cl_2 を加え、 NaHCO_3 (飽和水溶液) 50 mLで1回、100 mLで2回洗浄した。有機抽出分を無水 Na_2SO_4 で乾燥し、濾過し、濃縮して、黄色の粉末4.67 g (79%) を得た。生成物 (RP-HPLCで $\sim 85\%$) を同様に処理した。

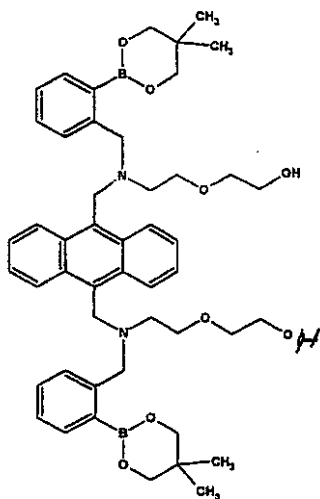
20

HPLC条件: HP 1100 HPLCクロマトグラフ, Vydac 201TP 10 x 250 mmのカラム, 注入0.100 mL, 2 mL/分, 370 nmで検出, A = 水 (0.1% HFBA) and B = MeCN (0.1% HFBA), グラジエント10% B 2分間, 10-80% B 18分間, 80-100% B 2分間, 100% B 2分間, 保持時間15.6分。

30

【0068】

【化7】



40

【0069】

B. 9, 10-ビス[N-[2-(5,5-ジメチルボリナン-2-イル)ベンジル]-N-[2-(2-ヒドロキシエトキシ)エチルアミノ]メチル]アントラセン

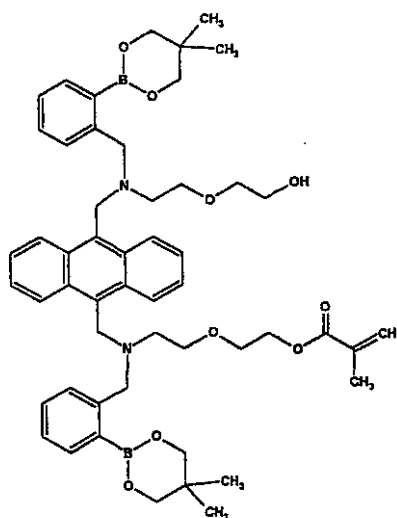
50

9, 10-ビス[[2-(2-ヒドロキシエトキシ)エチルアミノ]メチル]-アントラセン(4.02 g, 9.75 mmol)、DIEA(12.6 g, 17.0 mL, 97.5 mmol, 10.0 等量)、及び(2-ブロモメチルフェニル)ホウ酸ネオペンチルエステル(13.7 g, 48 mmol, 4.9 等量)のCHCl₃(125 mL)溶液を、暗所で46時間23℃で撹拌した。この際、反応混合物を初めロータリーエバポレーターで濃縮し、次いで真空ポンプを用いてDIEAを除去した。残留物をアルミナカラムクロマトグラフィー(活性化中性アルミナ150 g, 0-3% CH₃OH/CH₂Cl₂)で精製し、静置すると固化する粘性の油5.67 g(70%)を得た。生成物(RP-HPLCで~85%)を同様に処理した。TLC: Merck 塩基性アルミナプレート, CH₂Cl₂/CH₃OH=95/5でRf 0.33, UV(254/366)で観測。

HPLC条件: HP 1100 HPLCクロマトグラフ, Vydac 201TP 10 x 250 mmのカラム, 注入0.100 mL, 2 mL/分, 370 nmで検出, A=水(0.1% HFBA) and B=MeCN(0.1% HFBA), グラジエント10% B 2分間, 10-80% B 18分間, 80-100% B 2分間, 100% B 2分間, 保持時間18.8分。

【0070】

【化8】



20

30

【0071】

C. 9-[N-[2-(5,5-ジメチルポリナン-2-イル)ベンジル]-N-[2-(2-メタクロイルオキシエトキシ)エチルアミノ]メチル]-10-[N-[2-(5,5-ジメチルポリナン-2-イル)ベンジル]-N-[2-(2-ヒドロキシエトキシ)-エチルアミノ]メチル]アントラセン (単一メタクリレートモノマー)

9, 10-ビス[N-[2-(5,5-ジメチルポリナン-2-イル)ベンジル]-N-[2-(2-ヒドロキシエトキシ)エチルアミノ]メチル]アントラセン(0.298 g, 0.359 mmol)、メタクリル酸(0.304 g, 0.300 mL, 3.53 mmol, 9.84 等量)、DCC(0.965 g, 4.68 mmol, 13.0 等量)、及びN,N-ジメチルアミノピリジン(0.020 g, 0.16 mmol, 0.46 等量)のCH₂Cl₂(15 mL)溶液を暗所にて4時間23℃で撹拌した。この際、反応混合物を濾過し、ロータリーエバポレーターで濃縮した。残留物をアルミナカラムクロマトグラフィー(活性化中性アルミナ50 g, 0-4% CH₃OH/CH₂Cl₂)で精製し、黄色の固体0.150 g(47%)を得た。

FAB MS: C₅₂H₆₆B₂N₂O₉ についての計算値 [M]⁺ 885; 観測値 [M+1]⁺ 886.

TLC: Merck 塩基性アルミナプレート, CH₂Cl₂/CH₃OH=95/5

50

でRf 0.45, UV (254/366)で観測。

HPLC: HP 1100 HPLCクロマトグラフ, Vydac 201TP 10 x 250 mmのカラム, 注入0.100 mL, 2 mL/分, 370 nmで検出, A = 水 (0.1% HFBA) and B = MeCN (0.1% HFBA), グラジエント10% B 2分間, 10-80% B 18分間, 80-100% B 2分間, 100% B 2分間, 保持時間21分。

D. 9-[N-[2-(5,5-ジメチルポリナニ-2-イル)ベンジル]-N-[2-(2-メタクロイルオキシエトキシ)エチルアミノ]メチル]-10-[N-[2-(5,5-ジメチルポリナニ-2-イル)ベンジル]-N-[2-(2-ヒドロキシエトキシ)エチルアミノ]メチル]-アントラセン及びTMAMAの水溶性コポリマー (モル比 1:50)

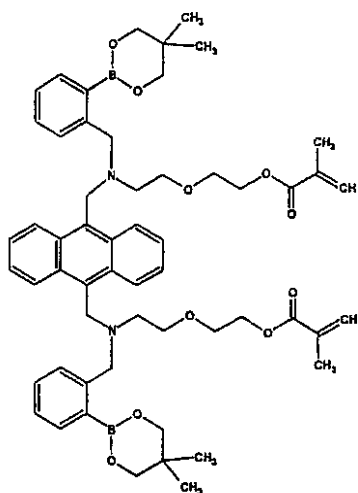
[2-(メタクリルオキシ)エチル]トリメチルアンモニウムクロリド (TMAMA, 70重量%水溶液, 0.344 gモノマー, 1.66 mmol, 50等量)を水0.600 mLに溶解させた液に、9-[N-[2-(5,5-ジメチルポリナニ-2-イル)ベンジル]-N-[2-(2-メタクロイルオキシエトキシ)エチルアミノ]メチル]-10-[N-[2-(5,5-ジメチルポリナニ-2-イル)ベンジル]-N-[2-(2-ヒドロキシエトキシ)エチルアミノ]メチル]アントラセン (0.029 g, 0.033 mmol)のMeOH (3.00 mL)溶液を加えた。この混合物に、4,4'-アゾビス(4-シアノ吉草酸) (0.0075 g, 0.027 mmol, 総モノマーの1.6 mol %)を加えた。この溶液を0.45 µmのメンブランフ
ィルターで濾過し、窒素ガスでパージし、続いて暗所にて16時間55℃で加熱した。その際、その粘性の溶液を25℃に冷却し、真空下で濃縮した。残留物を20 mLの水で希釈し、0.2 µmのメンブランフ
ィルターで濾過した。ポリマー溶液を酢酸セルロールメンブラン (MWCO 3500)で4 Lの水を2回用いて透析した。透析から、38.5 mLのポリマー溶液が得られた。この溶液の一部を乾燥させ、濃度は、溶液1.0 mL当たりポリマー0.0075 gを示した。ポリマーの総収量は0.289 g (77%)であった。

E. グルコース、ラクテート、及びアセトアセテートによる蛍光変調

本実施例の工程Dで調製されたコポリマー (2つの認識要素を含有する)のグルコース、ラクテート、及びアセテートによる蛍光変調を測定した。図5は、a) 0-20 mM グルコース; b) 0-20 mM ラクテート; c) 0-20 mM アセトアセテートを含有するPBS中にアントラセン-ビスボロナート-TMAMA (モル比1:50)を溶解させた液 (1.5 mg/mL)の規格化された蛍光発光 ($I/I_0 @ 427 \text{ nm}$)を示す。スペクトルは島津RF-5301分光蛍光光度計を用い、励起光 365 nm; 励起光スリット 1.5 nm; 発光スリット 1.5 nm; 周囲温度; で記録した。コポリマーの蛍光はグルコースの存在により影響を受けたが、ラクテート、アセトアセテートの存在には影響を受けなかった。

【0072】

【化9】



10

【0073】

F. 9, 10-ビス[N-[2-(5, 5-ジメチルポリナフテン-2-イル)ベンジル]-N-[2-(2-メタクロイルオキシエトキシ)エチルアミノ]メチル]アントラセン
(二重メタクリレートモノマー)

9, 10-ビス[N-[2-(5, 5-ジメチルポリナフテン-2-イル)ベンジル]-N-[2-(2-ヒドロキシエトキシ)エチルアミノ]メチル]アントラセン (0.100 g, 0.120 mmol)、メタクリル酸 (0.112 g, 0.110 mL, 1.30 mmol, 10.8 等量)、DCC (0.316 g, 1.53 mmol, 12.8 等量)、及びN, N-ジメチルアミノピリジン (0.014 g, 0.11 mmol, 0.92 等量)のCH₂Cl₂ (5 mL)溶液を、0℃で1時間、続いて23℃で22時間攪拌した。この際、反応混合物を濾過し、ロータリーエバポレーターで濃縮した。残留物をアルミナカラムクロマトグラフィー (活性化中性アルミナ30 g, 0-2% CH₃OH/CH₂Cl₂)で精製し、黄色の固体0.030 g (26%)を得た。この生成物を1以上の他のモノマーと共重合し指示高分子を形成できる。ホウ酸エステル基は使用前に脱保護すべきである。

20

FAB MS: C₅₆H₇₀B₂N₂O₁₀ についての計算値 [M]⁺ 953; 観測値 [M+1]⁺ 951 (弱い分子イオンピーク)。

30

TLC: Merck 塩基性アルミナプレート, CH₂Cl₂/CH₃OH=95/5でRf 0.67, UV (254/366)で観測。

HPLC: HP 1100 HPLCクロマトグラフ, Waters 5 x 100 mm NovaPak HR C18のカラム, 注入0.100 mL, 0.75 mL/分, 注入ループ2 mL, 370 nmで検出, A=水 (0.1% HFBA) and B=MeCN (0.1% HFBA), グラジエント10% B 2分間, 10-80% B 18分間, 80-100% B 2分間, 100% B 2分間, 保持時間19.6分。

G. グルコース指示剤を有するHEMA/SP/E/MAAヒドロゲルの調製

40

ヒドロキシエチルメタクリレート (HEMA, 0.078 mL, 0.084 g, 0.64 mmol)、メタクリル酸 (MAA, 0.030 mL, 0.030 g, 0.35 mmol)、ポリエチレングリコール ジメタクリレート 1000 (PEGDMA, 0.5 mg/mL水溶液, 0.048 mL)、及びN, N-ジメチル-N-メタクリルオキシエチル-N-(3-スルホプロピル)-アンモニウム-ベタイン (SP/E, 0.462 g, 1.65 mmol)のエチレングリコール (0.900 mL)溶液を調製した。そのエチレングリコールモノマー溶液に、9, 10-ビス[N-[2-(5, 5-ジメチルポリナフテン-2-イル)ベンジル]-N-[2-(2-メタクロイルオキシエトキシ)エチルアミノ]メチル]アントラセン (0.0096 g, 0.010 mmol)及び過硫酸アンモニウムの5重量%水溶液0.020 mLを混ぜ合わせた。この

50

溶液を窒素パージしたグローブボックスに設置した。重合を促進するため、そのモノマー処方物にN, N, N', N'-テトラメチルエチレンジアミンの水溶液(0.040 mL, 5重量%)を加えた。生成した処方物を、顕微鏡スライド及び100ミクロンのステンレス鋼スペーサから構成されたモールドに注いだ。窒素雰囲気中で8時間保持した後、モールドをリン酸緩衝生理食塩水(PBS, pH=7.4)中に置き、顕微鏡スライドを分離し、ヒドロゲルを取り出した。1mMのラウリル硫酸ナトリウムを含有するPBS 100 mLを毎日取り替えて3日間ヒドロゲルを洗浄し、続いてMeOH/PBSで洗浄した(体積比20/80, 100 mLで3回)。生成したヒドロゲルポリマーを、0.2重量%のアジ化ナトリウム及び1mMのEDTAナトリウム塩を含有するPBS(pH=7.4)中に保存した。

10

H. グルコースによる蛍光変調

本実施例で調製した二重メタクリレート指示化合物のグルコースによる蛍光変調を測定した。図6は、0-20mMの α -D-グルコースを含有するPBS(pH=7.4, 0.2%のNaN₃及び1mMのEDTAを含有する)中での、本発明による二重メタクリレート-グルコース認識分子を含有するHEMA/SPÉヒドロゲル(厚み100 μ m、前述の通り調製)の相対蛍光発光(427nmでのI)を示す。ヒドロゲルをスライドガラスに載せ、入射光に対し45℃でPMMAキュベット中で黒のポリエステルメッシュ(Seifar America, Depew, NY)により被覆した。すべての測定は、島津RF-5301分光蛍光光度計を用い、励起光 365nm(スリット=1.5nm)；発光 427nm(スリット=1.5nm)とし、高感度で、温度制御されたサンプルホルダーを用いて行った。目的のグルコース溶液(0, 1, 2, 4, 5, 10, 20mM グルコース) 3 mLを含有するキュベットを、測定前に30分間37℃で恒温にした。蛍光生データをフィッティングするため、単一指数関数を用いた。

20

【0074】

実施例7

N-[3-(メタクリルアミド)プロピル]-3,4-ジヒドロキシー-9,10-ジオキソ-2-アントラセンシルホアミド(アリザリンレッドSモノマー)及び α , α' -ビス[N-[2-(5,5-ジメチルポリナフテン-2-イル)ベンジル]-N-[3-(メタクリルアミド)プロピルアミノ]-1,4-キシレン(ビスホウ酸モノマー)を含有するアクリルアミドゲルにグルコース又はラクテートが与える影響

30

A. 3,4-ジヒドロキシー-9,10-ジオキソ-2-アントラセンシルホニルクロリド:

3,4-ジヒドロキシー-9,10-ジオキソ-2-アントラセンシルホン酸ナトリウム塩(1.4g, 3.9mmol)を30mLのクロロスルホン酸と混合し、90℃に5時間加熱し、その後、その溶液を0℃に冷却して100gの水に注いだ。水が溶けた後、溶液をCH₂Cl₂で抽出し(100mLで3回)、塩化メチレン抽出物を混ぜ合わせ、Na₂SO₄で乾燥し、蒸発させ、0.87gの固体を生成した(収率66%)。

B. N-[3-(メタクリルアミド)プロピル]-3,4-ジヒドロキシー-9,10-ジオキソ-2-アントラセンシルホアミド:

3,4-ジヒドロキシー-9,10-ジオキソ-2-アントラセンシルホニルクロリド(96mg, 0.28mmol)及びN-(3-アミノプロピル)メタクリルアミド塩酸塩(108mg, 0.6mmol)を20mLのCH₂Cl₂と混ぜ合わせた。この懸濁液にEt₃N(303mg, 3mmol)を加えた。混合物を24時間室温で攪拌し、濾過し、溶液を蒸発させた。生じた固体を、CH₂Cl₂/MeOH(90/10)を溶離液としSiO₂(10g)のカラムクロマトグラフィーにかけた。赤い固体の生成物が得られた(80mg, 収率64%)。

40

FAB MS: C₂₁H₂₀N₂O₇S についての計算値 M⁺ 445; 観測値 M⁺ 445.

HPLC: HP 1100 HPLCクロマトグラフ, Waters 5x100mm NovaPak HR C18のカラム, 注入0.100mL, 0.75mL/分

50

、注入ループ 2 mL, 370 nmで検出, A = 水 (0.1% HFBA) and B = MeCN (0.1% HFBA), グラジエント 10% B 2分間, 10-80% B 18分間, 80-100% B 2分間, 100% B 2分間, 保持時間 17.67分。

C. α, α' -ビス[3-(メタクリルアミド)プロピルアミノ]-1,4-キシレン N-(3-アミノプロピル)メタクリルアミド塩酸塩 (3.00 g, 16.8 mmol, 2.21 等量)、DIEA (6.5 g, 8.8 mL, 50 mmol, 6.6 等量)、テレフタルジカルボキサルデヒド (1.02 g, 7.60 mmol)、及び Na_2SO_4 (10.7 g, 75.3 mmol, 9.91 等量)の無水メタノール (75 mL) 溶液を暗所にて 18時間 25℃で攪拌した。この際、さらに Na_2SO_4 (10.7 g, 75.3 mmol, 9.91 等量)を加え、さらに 6時間攪拌を続けた。この際、液を濾過し、濾液に NaBH_4 (1.73 g, 45.7 mmol, 6.01 等量)を少しずつ加え、続いて 25℃で 21時間攪拌した。懸濁液をセライトで濾過し、濾液を濃縮した。残留物を 100 mLの CH_2Cl_2 に溶解し、 NaHCO_3 飽和水溶液 25 mLで一回洗浄した。有機抽出物を無水 Na_2SO_4 で乾燥し、濾過し濃縮して、粘性の油を得た。生成物を同様に処理した。

HPLC: HP 1100 HPLCクロマトグラフ, Vydac 201TP 10 x 250 mmのカラム, 注入 0.100 mL, 2.00 mL/分, 260 nmで検出, A = 水 (0.1% HFBA) and B = MeCN (0.1% HFBA), グラジエント 10% B 2分間, 10-80% B 18分間, 80-100% B 2分間, 100% B 2分間, 保持時間 15.8分。

D. α, α' -ビス[N-[2-(5,5-ジメチルボリナン-2-イル)ベンジル]-N-[3-(メタクリルアミド)プロピルアミノ]-1,4-キシレン] α, α' -ビス[3-(メタクリルアミド)プロピルアミノ]-1,4-キシレン (2.94 g, 7.61 mmol)、DIEA (2.97 g, 4.00 mL, 23.0 mmol, 3.02 等量)、(2-ブロモメチルフェニル)ホウ酸ネオペンチルエステル (6.50 g, 23.0 mmol, 3.02 等量)、及び BHT (阻害剤として 5 mg)の CH_2Cl_2 (75 mL) 溶液を、暗所にて 25℃で 28時間攪拌した。この際、混合物を NaHCO_3 飽和水溶液 25 mLで1回洗浄した。有機抽出分を無水 Na_2SO_4 で乾燥し、濾過し、濃縮した。残留物に 200 mLのエーテルを加え、その懸濁液を 18時間攪拌した。懸濁液を濾過し、残留物を CH_2Cl_2 に溶解し、濾過し、濾液を濃縮した。固体残留物に 150 mLのエーテルを加え、懸濁液を 18時間攪拌した。この際、懸濁液を濾過して、ふわふわしたピンク色の粉末 1.98 g (33%)を生成し、その粉末の PBS (pH 7.4) 中での最大溶解度は 1 mmolであった。

FAB MS: $\text{C}_{46}\text{H}_{64}\text{B}_2\text{N}_4\text{O}_6$ についての計算値 $[\text{M}]^+ 790$; 観測値 $[\text{M} + 1]^+ 791$ 。

HPLC: HP 1100 HPLCクロマトグラフ, Waters 5 x 100 mm NovaPak HR C18のカラム, 注入 0.050 mL, 0.75 mL/分, 280 nmで検出, A = 水 (0.1% HFBA) and B = MeCN (0.1% HFBA), グラジエント 10% B 2分間, 10-80% B 18分間, 80-100% B 2分間, 100% B 2分間, 保持時間 13.4分。

E. N-[3-(メタクリルアミド)プロピル]-3,4-ジヒドロキシー-9,10-ジオキソ-2-アントラセンスルホンアミド (アリザリンレッド S モノマー) 及び α, α' -ビス[N-[2-(5,5-ジメチルボリナン-2-イル)ベンジル]-N-[3-(メタクリルアミド)プロピルアミノ]-1,4-キシレンを含有するアクリルアミドゲルの調製

30重量%のアクリルアミドと 0.8重量%の N, N'-メチレンビスアクリルアミドを含有するエチレングリコール溶液を調製した。N-[3-(メタクリルアミド)プロピル]-3,4-ジヒドロキシー-9,10-ジオキソ-2-アントラセンスルホンアミド (1

10

20

30

40

50

5 mg, 3.38×10^{-6} モル) 及び α, α' -ビス [N- [2- (5, 5-ジメチルポリナフテン-2-イル) ベンジル] -N- [3- (メタクリルアミド) プロピルアミノ] -1, 4-キシレン (28 mg, 3.54×10^{-5} モル) を、800 μ L のエチレングリコールモノマー溶液及び40 μ L の5重量%過硫酸アンモニウム溶液と混ぜ合わせた。この処方物を、顕微鏡スライドガラス及び100 μ m のステンレス鋼スペーサーで構成されたモールドとともに、窒素パージしたグローブボックス内に設置した。重合を促進するためN, N, N', N'-テトラメチルエチレンジアミンの水溶液 (40 μ L, 5重量%) を加え、最終処方物をガラスモールドに注いだ。モールドを窒素下に16時間残し、その後PBS (pH=7.4) に浸してスライドガラスを分離し、薄膜の形状でヒドロゲルポリマーを得た。生成したヒドロゲル薄膜を、1 mM のラウリル硫酸ナトリウムを含有するリン酸緩衝生理食塩水 100 mL を毎日取り替えて3日間洗浄し、続いてMeOH/PBSで洗浄した (容積比20/80、100 mL で3回)。ヒドロゲルポリマーを0.2重量%のアジ化ナトリウム及び1 mM のEDTAナトリウム塩を含有するPBS (10 mM PBS, pH=7.4) 中に保存した。

10

F. グルコース及びラクテートによる吸光度変調

グルコース及びラクテートによる、本実施例で調製された指示ヒドロゲル (二つの認識要素を含有する) の吸光度の変調を測定した。実施例5で記載したのと同じ方法で、アクリルアミドゲルをPMAセルに載せた。目的量のグルコース又は乳酸ナトリウムを含有するリン酸緩衝生理食塩水 (PBS, pH=7.4) を水浴で37°Cに加熱し、ゲルを含有するPMAセル内に入れ、その後、PMAセルを37°Cで15分間恒温にした。各々のグルコース及びラクテート濃度について吸光度測定を3回行った。各々の測定で、650 nmでの吸光度をブランクとして用い、A (650 nm) をA (450 nm) 及びA (530 nm) のすべての値から差し引いた。

20

【0075】

図7は、グルコース有り及び無しの場合について、4 mM のアリザリンレッドSモノマー (アリザリンレッド：アクリルアミドのモル比1：1000) 及び44 mM のビスホウ酸モノマーを含有するアクリルアミドゲル (30%) の吸光度スペクトルを示す。図8は、グルコースが、4 mM のアリザリンレッドSモノマー及び44 mM のビスホウ酸モノマーを含有するアクリルアミドゲル (30%) の吸光度に与える影響を示す。図9は、乳酸ナトリウムが、4 mM のアリザリンレッドSモノマー及び44 mM のビスホウ酸モノマー (ホウ酸モノマー：アクリルアミドのモル比1：95) を含有するアクリルアミドゲル (30%) の吸光度スペクトルに与える影響を示す。指示剤の吸光度はグルコースの存在によって影響を受けるが、ラクテートの存在によっては実質的に影響を受けない。

30

【図面の簡単な説明】

【図1】図1は、実施例2記載の本発明の幾つかの指示高分子の発光スペクトルを示す。

【図2】図2は、実施例2記載の本発明の幾つかの指示高分子の発光スペクトルを示す。

【図3】図3は、実施例3で述べた指示成分モノマーの合成を示す。

【図4】図4は、実施例5記載の指示剤の規格化した蛍光発光 (I/I_0 @ 427 nm) を示す。

【図5】図5は、実施例6記載の指示剤の規格化した蛍光発光 (I/I_0 @ 428 nm) を示す。

40

【図6】図6は、実施例6記載の指示剤の規格化した蛍光発光 (I/I_0 @ 427 nm) を示す。

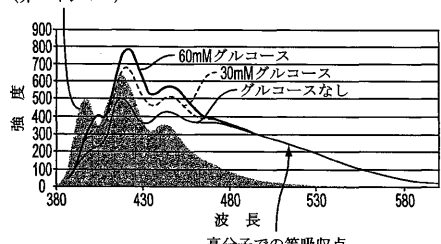
【図7】図7は、実施例7記載の指示剤の吸収スペクトルを示す。

【図8】図8は、図7記載の指示剤の吸光度の比 (450 nm/530 nm) を示す。

【図9】図9は、図7記載の指示剤の吸光度の比 (450 nm/530 nm) を示す。

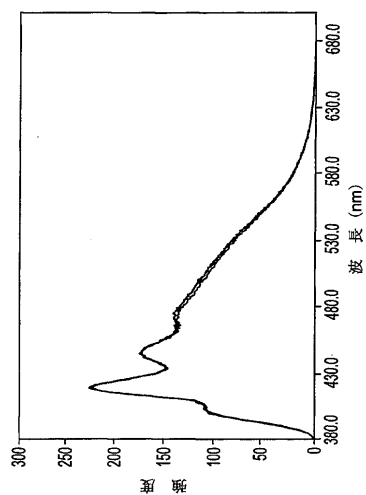
【 図 1 】

25:1 (比較のため示す)
(非エキシマー)

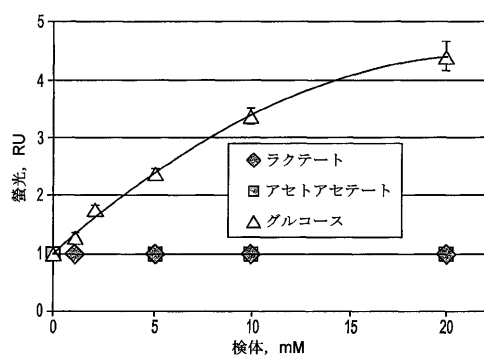


高分子での等吸収点
(分子内リファレンスとして使用することができる)

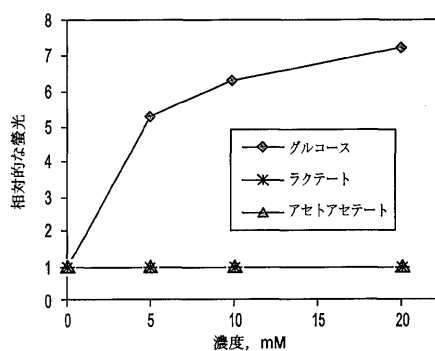
【図 2】



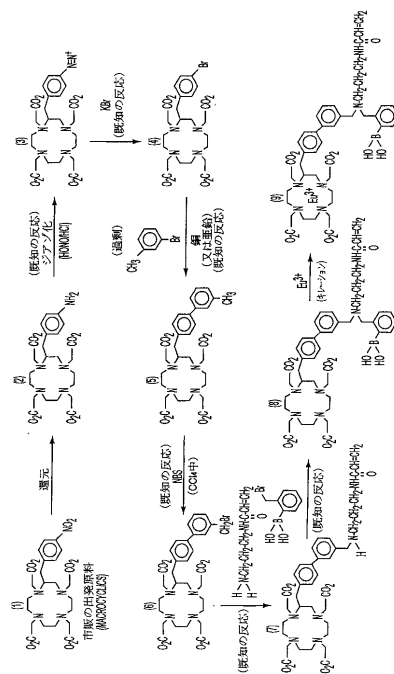
【图 4】



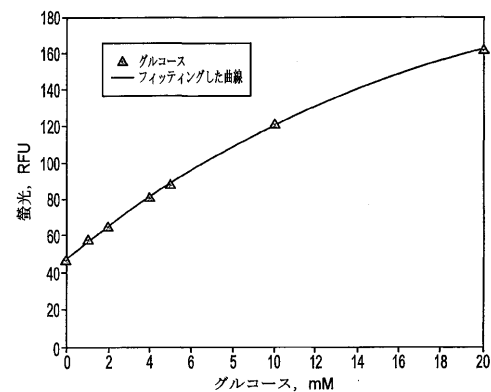
【 図 5 】



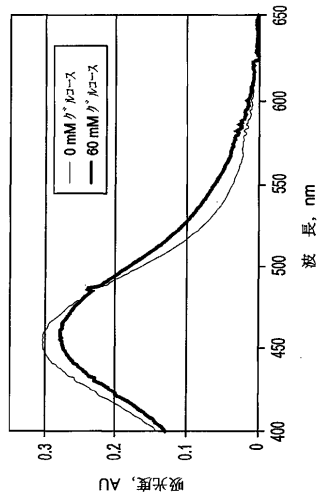
【图 3】



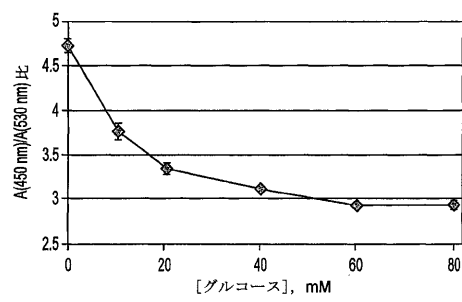
【图 6】



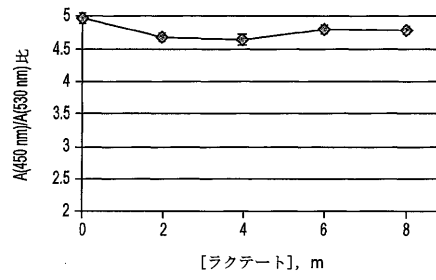
【図 7】



【図 8】



【図 9】



【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
14 February 2002 (14.02.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/12251 A1

- (51) International Patent Classification: C07F 5/02, 5/04, G01N 33/66
- (21) International Application Number: PCT/US01/24294
- (22) International Filing Date: 3 August 2001 (03.08.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 09/632,624 4 August 2000 (04.08.2000) US
- (71) Applicant: SENSORS FOR MEDICINE AND SCIENCE, INC. [US/US], 12321 Middlebrook Road, Germantown, MD 20874 (US).
- (72) Inventor: COLVIN, Arthur, E., Jr.; 4155 Baltimore National Pike, Mt. Airy, MD 21771 (US).
- (74) Agents: KARTA, Glenn, E. et al.; Rothwell, Figg, Ernst & Manbeck, P.C., Suite 701-E, 555 13th Street, N.W., Washington, DC 20004 (US).
- (81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published:
— with international search report
— before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 02/12251 A1

(54) Title: DETECTION OF ANALYTES IN AQUEOUS ENVIRONMENTS

(57) Abstract: The invention relates to indicator molecules for detecting the presence or concentration of an analyte in a medium, such as a liquid, and to methods for achieving such detection. More particularly, the invention relates to copolymer macromolecules containing relatively hydrophobic indicator component monomers, and hydrophilic monomers, such that the macromolecule is capable of use in an aqueous environment.

WO 02/12251

PCT/US01/24294

TITLE OF THE INVENTION
DETECTION OF ANALYTES IN AQUEOUS ENVIRONMENTS

CROSS-REFERENCE TO RELATED APPLICATIONS

5 This application is a continuation-in-part of
application Serial No. 09/632,624, filed August 4, 2000.

STATEMENT REGARDING FEDERALLY SPONSORED
RESEARCH OR DEVELOPMENT

Not applicable.

BACKGROUND OF THE INVENTION

10

1. Field of the Invention

This invention relates to indicator molecules for
detecting the presence or concentration of an analyte in
a medium, such as a liquid, and to methods for achieving
15 such detection. More particularly, the invention relates
to copolymer macromolecules containing relatively
hydrophobic indicator component monomers, and hydrophilic
monomers, such that the macromolecule is capable of use
in an aqueous environment.

20 2. Description of the Related Art

Indicator molecules for detecting the presence or
concentration of an analyte in a medium are known.
Unfortunately, many of such indicators are insoluble or
sparingly soluble in water. For example, U.S. Patent
25 5,503,770 (James, *et al.*) describes a fluorescent boronic
acid-containing compound that emits fluorescence of a
high intensity upon binding to saccharides, including
glucose. The fluorescent compound has a molecular
structure comprising a fluorophore, at least one
30 phenylboronic acid moiety and at least one amine-

WO 02/12251

PCT/US01/24294

providing nitrogen atom where the nitrogen atom is disposed in the vicinity of the phenylboronic acid moiety so as to interact intramolecularly with the boronic acid. Such interaction thereby causes the compound to emit
5 fluorescence upon saccharide binding. See also T. James, et al., *J. Am. Chem. Soc.* 117(35):8982-87 (1995). However, the compound described in example 2 of U.S. Patent 5,503,770 (having formula (6)) is substantially insoluble in water, and as a practical matter requires
10 the presence of an organic solvent such as methanol in order to work in a liquid environment.

Lack of sufficient aqueous solubility is a severe problem when dealing with applications in an aqueous environment, for example, *in vivo* applications. Thus,
15 there remains a great need for adapting insoluble or sparingly soluble indicators for use in aqueous environments.

BRIEF SUMMARY OF THE INVENTION

In one aspect, the present invention is directed to
20 an indicator macromolecule for detecting the presence or concentration of an analyte in an aqueous environment, said macromolecule comprising a copolymer of:

- a) one or more indicator component monomers which individually are not sufficiently water
25 soluble to permit their use in an aqueous environment for detecting the presence or concentration of said analyte; and
 - b) one or more hydrophilic monomers;
- such that the macromolecule is capable of detecting the
30 presence or concentration of said analyte in an aqueous environment.

WO 02/12251

PCT/US01/24294

In another aspect, the present invention is directed to a method for the production of an indicator macromolecule for detecting the presence or concentration of an analyte in an aqueous environment, said method comprising copolymerizing:

- 5 a) one or more indicator component monomers which individually are not sufficiently water soluble to permit their use in an aqueous environment for detecting the presence or concentration of said analyte; and
- 10 b) one or more hydrophilic monomers; such that the resulting macromolecule is capable of detecting the presence or concentration of said analyte in an aqueous environment.

In another aspect, the present invention is directed to a method for detecting the presence or concentration of an analyte in a sample having an aqueous environment, said method comprising:

- 15 a) exposing the sample to an indicator macromolecule, said macromolecule comprising a copolymer of:
- 20 i) one or more indicator component monomers which individually are not sufficiently water soluble to permit their use in an aqueous environment for
- 25 detecting the presence or concentration of said analyte; and
- ii) one or more hydrophilic monomers; such that the resulting macromolecule is capable of detecting the presence or concentration of said analyte
- 30 in an aqueous environment, and wherein the indicator macromolecule has a detectable quality that changes in a concentration-dependent manner when said macromolecule is exposed to said analyte; and

WO 02/12251

PCT/US01/24294

b) measuring any change in said detectable quality to thereby determine the presence or concentration of said analyte in said sample.

In another aspect, the present invention provides a
5 macromolecule which is capable of exhibiting an excimer effect, which comprises a copolymer of:

a) one or more excimer forming monomers, the
molecular constituents of which are capable of exhibiting
an excimer effect when suitably oriented with respect to
10 each other; and

b) one or more other monomers;
such that the resulting macromolecule exhibits said
excimer effect.

In yet another aspect, the present invention provides
15 a method for producing a macromolecule which is capable of exhibiting an excimer effect, which method comprises copolymerizing:

a) one or more excimer forming monomers, the
molecular constituents of which are capable of exhibiting
20 an excimer effect when suitably oriented with respect to each other; and

b) one or more other monomers;
such that the resulting macromolecule exhibits said
excimer effect.

In yet another aspect, the present invention provides
25 a method for detecting the presence or concentration of an analyte in a sample, said method comprising:

a) exposing the sample to an indicator
macromolecule, said macromolecule comprising a copolymer
30 of:

i) one or more indicator component
monomers, the molecules of which are
capable of exhibiting an excimer effect

WO 02/12251

PCT/US01/24294

when suitably oriented with respect to each other, and which are also capable of detecting the presence or concentration of an analyte; and

- 5 ii) one or more other monomers;
- such that the resulting macromolecule exhibits said excimer effect, and wherein the indicator macromolecule has a detectable quality that changes in a concentration-dependent manner when said macromolecule is exposed to
- 10 said analyte; and
- b) measuring any change in said detectable quality to thereby determine the presence or concentration of said analyte in said sample.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

15 Figures 1-2 illustrate the emission spectra of several indicator macromolecules of the present invention as described in Example 2.

 Figure 3 depicts the synthesis of an indicator component monomer referred to in Example 3.

20 Figure 4 illustrates the normalized fluorescence emission (I/I_0 @ 427 nm) of an indicator as described in Example 5.

 Figure 5 illustrates the normalized fluorescence emission (I/I_0 @ 428 nm) of an indicator as described in

25 Example 6.

 Figure 6 illustrates the normalized fluorescence emission (I/I_0 @ 427 nm) of an indicator as described in

 Example 6.

30 Figure 7 illustrates the absorbance spectra of an indicator as described in Example 7.

WO 02/12251

PCT/US01/24294

Figures 8-9 illustrate the ratio of the absorbance (450 nm/530 nm) of an indicator as described in Example 7.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

5 In one aspect, the present invention provides a way to utilize, in an aqueous environment, indicator components which by themselves are insoluble or sparingly soluble in an aqueous environment. Such indicators are, in effect, copolymerized with one or more monomers which are sufficiently hydrophilic such that the resulting
10 indicator macromolecule is sufficiently hydrophilic overall so as to overcome the hydrophobic contribution of the indicator component monomers.

Suitable indicator components include indicator
15 molecules which are insoluble or sparingly soluble in water, and whose analyte is at least sparingly soluble in water. Suitable analytes include glucose, fructose and other vicinal diols; α -hydroxy acids; β -keto acids; oxygen; carbon dioxide; various ions such as zinc, potassium, hydrogen (pH measurement), carbonate, toxins,
20 minerals, hormones, etc. It will be appreciated that within the scope of indicator component monomer as used herein are included mixtures of two or more individual monomers (at least one of which is not sufficiently
25 soluble to function adequately in an aqueous environment) which, when incorporated into the macromolecules of the present invention, function as an indicator.

Many such indicator components are known. For example, the compounds depicted in U.S. Patent 5,503,770
30 are useful for detecting saccharides such as glucose, but are sparingly soluble to insoluble in water. Other classes of indicators include the lanthanide chelates

WO 02/12251

PCT/US01/24294

disclosed in copending U.S. Application Serial No. 09/265,979 filed March 11, 1999 (and published as PCT International Application WO 99/46600 on September 16, 1999), incorporated herein by reference; polyaromatic hydrocarbons and their derivatives; the indicators disclosed in co-pending application Serial No. 09/754,217 filed January 5, 2001 and application Serial No. 60/269,887 filed February 21, 2001, both of which describe indicators having two recognition elements capable of discriminating between glucose and interfering α -hydroxy acids or β -diketones, etc.

The indicator components of the present invention will generally have a detectable quality that changes in a concentration-dependent manner when the macromolecule is exposed to the analyte to be measured. Many such qualities are known and may be used in the present invention. For example, the indicator may include a luminescent (fluorescent or phosphorescent) or chemiluminescent moiety, an absorbance based moiety, etc.

The indicator may include an energy donor moiety and an energy acceptor moiety, each spaced such that there is a detectable change when the macromolecule interacts with the analyte. The indicator may include a fluorophore and a quencher, configured such that the fluorophore is quenched by the quencher when the analyte is absent. In that situation, when the analyte is present, the indicator undergoes a configurational change which causes the quencher to move sufficiently distant from the fluorophore so that fluorescence is emitted. Conversely, the fluorophore and quencher may be configured such that in the absence of analyte, they are sufficiently separated and the fluorophore emits fluorescence; upon interaction with the analyte, the fluorophore and

WO 02/12251

PCT/US01/24294

quencher are moved in sufficient proximity to cause quenching. The configurational change concept is described in more detail in co-pending application Serial No. 09/754,219, filed January 5, 2001, entitled "Detection of Analytes", incorporated herein by reference.

Other detectable moieties include those whose fluorescence is affected by analyte interaction via photoinduced electron transfer or inductive effects. These include the lanthanide chelates disclosed in copending U.S. Application Serial No. 09/265,979 filed March 11, 1999 (and published as PCT International Application WO 99/46600 on September 16, 1999), incorporated herein by reference; polyaromatic hydrocarbons and their derivatives; coumarins; BODIPY® (Molecular Probes, Eugene, OR); dansyl; catechols; etc. Another class of moieties include those whose absorbance spectrum changes upon interaction of the indicator compound with the analyte, including Alizarin Red, etc.

Another class of moieties include those whose fluorescence is modulated by proximity effects, e.g., energy donor/acceptor pairs such as dansyl/dabsyl, etc.

Preferably, the detectable quality is a detectable optical or spectral change, such as changes in absorptive characteristics (e.g., absorptivity and/or spectral shift), in fluorescent decay time (determined by time domain or frequency domain measurement), fluorescent intensity, fluorescent anisotropy or polarization; a spectral shift of the emission spectrum; a change in time-resolved anisotropy decay (determined by time domain or frequency domain measurement), etc.

Suitable hydrophilic monomers should be sufficiently hydrophilic so as to overcome the sum of the hydrophobic

WO 02/12251

PCT/US01/24294

indicator component monomers, such that the resultant indicator macromolecule is capable of functioning in an aqueous environment. It will be readily apparent that a wide variety of hydrophilic monomers are suitable for use in the present invention. For example, suitable hydrophilic monomers include methacrylamides, methacrylates, methacrylic acid, dimethylacrylamide, TMAMA, vinyls, polysaccharides, polyamides, polyamino acids, hydrophilic silanes or siloxanes, etc., as well as mixtures of two or more different monomers.

Suitable hydrophilic monomers for a given application will vary according to a number of factors, including intended temperature of operation, salinity, pH, presence and identity of other solutes, ionic strength, etc. It would be readily apparent that the degree of hydrophilicity of the indicator macromolecule can be increased by adding additional functional constituents such as ions (e.g., sulfonate, quaternary amine, carboxyl, etc.), polar moieties (e.g., hydroxyl, sulfhydryl, amines, carbonyl, amides, etc.), halogens, etc.

It will be appreciated that the molar ratio of hydrophilic monomer to indicator component monomer may vary widely depending on the specific application desired. Preferred ratios of hydrophilic monomer:indicator component monomer range from about 2:1 to about 1000:1, more preferably from about 5:1 to about 50:1.

The indicator macromolecules of the present invention may generally be synthesized by simply copolymerizing at least one indicator component monomer with at least one hydrophilic monomer. Optimum polymerization conditions (time, temperature, catalyst, etc.) will vary according

WO 02/12251

PCT/US01/24294

to the specific reactants and the application of the final product, and can easily be established by one of ordinary skill.

It will be appreciated that the indicator

5 macromolecules of the present invention may have any desired extent of water solubility. For example, the indicator macromolecule of Examples 1 and 2 below is very soluble, readily dissolving in aqueous solution. On the other hand, indicator macromolecules containing, for
10 example, the hydrophilic monomer HEMA (hydroxyethyl methacrylate) or other common hydrogel constituents, can be non-soluble yet hydrophilic.

The soluble indicator macromolecules may be used directly in solution if so desired. On the other hand,
15 if the desired application so requires, the indicator macromolecule may be immobilized (such as by mechanical entrapment, covalent or ionic attachment or other means) onto or within an insoluble surface or matrix such as glass, plastic, polymeric materials, etc. When the
20 indicator macromolecule is entrapped within, for example, another polymer, the entrapping material preferably should be sufficiently permeable to the analyte to allow suitable interaction between the analyte and the indicator components in the macromolecule.

25 Many uses exist for the indicator macromolecules of the present invention, including uses as indicators in the fields of energy, medicine and agriculture. For example, the indicator macromolecules can be used as indicator molecules for detecting sub-levels or supra-
30 levels of glucose in blood, tissues, urine, etc., thus providing valuable information for diagnosing or monitoring such diseases as diabetes and adrenal insufficiency. Medical/pharmaceutical production of

WO 02/12251

PCT/US01/24294

glucose for human therapeutic application requires monitoring and control.

Uses for the present invention in agriculture include detecting levels of an analyte such as glucose in soybeans and other agricultural products. Glucose must be carefully monitored in critical harvest decisions for such high value products as wine grapes. As glucose is the most expensive carbon source and feedstock in fermentation processes, glucose monitoring for optimum reactor feed rate control is important in power alcohol production. Reactor mixing and control of glucose concentration also is critical to quality control during production of soft drinks and fermented beverages, which consumes the largest amounts of glucose and fermentable sugars internationally.

When the indicator macromolecules incorporate fluorescent indicator substituents, various detection techniques also are known in the art that can make use of the macromolecules of the present invention. For example, the macromolecules of the invention can be used in fluorescent sensing devices (e.g., U.S. Patent No. 5,517,313) or can be bound to polymeric materials or other substrates such as test paper for visual inspection. This latter technique would permit, for example, glucose measurement in a manner analogous to determining pH with a strip of litmus paper. The macromolecules described herein may also be utilized as simple reagents with standard benchtop analytical instrumentation such as spectrofluorometers or clinical analyzers as made by Shimadzu, Hitachi, Jasco, Beckman and others. These molecules would also provide analyte specific chemical/optical signal transduction for fiber

WO 02/12251

PCT/US01/24294

optic-based sensors and analytical fluorometers as made by Ocean Optics (Dunedin, Florida), or Oriel Optics.

U.S. Patent 5,517,313, the disclosure of which is incorporated herein by reference, describes a

5 fluorescence sensing device in which the macromolecules of the present invention can be used to determine the presence or concentration of an analyte such as glucose or other cis-diol compound in a liquid medium. The sensing device comprises a layered array of a fluorescent
10 indicator molecule-containing matrix (hereafter "fluorescent matrix"), a high-pass filter and a photodetector. In this device, a light source, preferably a light-emitting diode ("LED"), is located at least partially within the indicator material, or in a
15 waveguide upon which the indicator matrix is disposed, such that incident light from the light source causes the indicator molecules to fluoresce. The high-pass filter allows emitted light to reach the photodetector, while filtering out scattered incident light from the light
20 source.

The fluorescence of the indicator molecules employed in the device described in U.S. Patent 5,517,313 is modulated, *e.g.*, attenuated or enhanced, by the local
25 presence of an analyte such as glucose or other cis-diol compound.

In the sensor described in U.S. Patent 5,517,313, the material which contains the indicator molecule is permeable to the analyte. Thus, the analyte can diffuse into the material from the surrounding test medium,
30 thereby affecting the fluorescence emitted by the indicator molecules. The light source, indicator molecule-containing material, high-pass filter and photodetector are configured such that at least a portion

WO 02/12251

PCT/US01/24294

of the fluorescence emitted by the indicator molecules impacts the photodetector, generating an electrical signal which is indicative of the concentration of the analyte (e.g., glucose) in the surrounding medium.

5 In accordance with other possible embodiments for using the indicator macromolecules of the present invention, sensing devices also are described in U.S. Patent Nos. 5,910,661, 5,917,605 and 5,894,351, all incorporated herein by reference.

10 The macromolecules of the present invention can also be used in an implantable device, for example to continuously monitor an analyte *in vivo* (such as blood or tissue glucose levels). Suitable devices are described in, for example, co-pending U.S. Patent Application
15 Serial No. 09/383,148 filed August 26, 1999, as well as U.S. Patent Nos. 5,833,603, 6,002,954 and 6,011,984, all incorporated herein by reference.

The macromolecules of the present invention have unique advantages. For example, absorbance of a sample
20 is directly proportional to both the concentration of the absorber and the sample path length. Thus, in an absorbance-based assay, it is apparent that for a given level of absorbance, the sample path length may be greatly reduced if the absorber concentration is greatly
25 increased. That desirable increase in concentration may be accomplished by decreasing the ratio of the hydrophilic monomer:indicator component monomer. In effect, the present invention allows the localized concentration of much more absorber component into a
30 limited space, thereby increasing the absorbance per unit thickness. Thus the present invention additionally allows use of much smaller equipment when performing absorbance-based assays. It will also be apparent that

WO 02/12251

PCT/US01/24294

for any optically-based assay, including fluorescence based assays, the ability to greatly increase the local concentration of the indicator component offers several advantages. For example, a higher local concentration of the indicator component can permit the utilization of thinner layers of indicator macromolecule, which in turn can greatly reduce the response time of the macromolecule to the presence or concentration of the analyte. Further, it can result in a higher extinction of excitation light, which can desirably reduce the incidence of autofluorescence when working in tissue systems or physiological solutions. For example, when working with a fluorescence based macromolecule, non-absorbed excitation light can interact with, e.g., NADH, tryptophan, tyrosine, etc. which may be present in tissue or physiological solutions resulting in undesirable interfering fluorescent emission from those moieties. Having a high local concentration of indicator component with high absorption can reduce that undesired interfering emission. Additionally, when utilizing an absorbance-based macromolecule in tissue or physiological solutions, it is desirable to reduce the amount of the source radiation that is reflected in potentially varying amounts by components in surrounding tissue or fluid, such as bilirubin, e.g. Therefore, having a high local concentration of indicator component with high absorption can reduce that undesired effect.

As a further aspect of the present invention, it has been discovered that certain macromolecules exhibit an excimer effect. By way of background, when two planar molecules with aromatic structure (such as is common with fluorophores) are concentrated to a point where their pi electron orbital lobes may overlap, a resonance condition

WO 02/12251

PCT/US01/24294

can then occur for some species where the resonance from overlap results in a hybrid (couplet) structure which is energy favorable and stable. These two planar molecules become oriented in a coplanar configuration like two
5 slices of bread on a sandwich with their electron clouds overlapping between them. For fluorescent planar species, a characteristic downfield emission occurs relative to the uncoupled species at wavelength of substantially lower energy than the parent species.
10 Molecules able to form such favorable resonant configurations are known as excimers. As used herein, an excimer effect refers to the resulting characteristic longer wavelength emission from excimers.

Some examples of typical excimer-forming polyaromatic hydrocarbons include anthracene and pyrene. There are many others. An example is the anthracene derivative (boronate included), the indicator component used in
15 Examples 1 and 2 of the present application. Although anthracene is known to form excimers in solution, one must be able to concentrate the molecule to sufficiently high levels to observe any excimer character. In the case of the anthracene derivative of Examples 1 and 2, the molecule is insoluble in water and insufficiently
20 soluble in a solvent such as methanol to observe excimer characteristics. In the present examples, the relative concentration of the anthracene derivative monomer was increased in proportion to the hydrophilic monomer in the copolymer from 500:1, 400:1, 200:1, 100:1, 50:1, 25:1,
25 15:1 and then 5:1. All have the characteristic blue emission at 417 nm of the anthracene derivative except at 5:1 ratio, a green emission suddenly appears. This green emission is that of an excimer hybrid and the emission
30 has been shifted downfield by approximately 100+

WO 02/12251

PCT/US01/24294

nanometers (~515-570 nm, green). The concentration of the overall solution does not need to be high since the distance between planar species is being controlled by placement along the polymer backbone rather than soluble concentration in 3-D space.

Surprisingly, it has been found that the excimer emission region is not responsive to changes in analyte concentration, but is responsive to all other aspects of the system analyzed, such as excitation intensity, temperature, and pH. As a result, the present indicator macromolecules may serve as both an indicator and an internal reference. For example, an ideal referencing scheme is one where the emission intensity at an indicator wavelength (i.e., the wavelength influenced by the analyte) is divided optically using select bandpass filters, by the emission intensity at the excimer wavelength. The resultant value corrects for interfering factors which affect fluorescent emission properties, such as fluorescent quenching by, e.g., oxygen, drift and error in pH, power factors and drift affecting LED intensity, ambient temperature excursions, etc.

It will be readily appreciated that the macromolecules of the present invention which exhibit an excimer effect will be useful in both aqueous and non-aqueous environments. Consequently, those macromolecules, as well as the component monomers (excimer-forming and other monomer), may range from hydrophilic to hydrophobic, depending upon the desired application.

Also, when the excimer macromolecules of the present invention are used to detect the presence or concentration of an analyte, the macromolecule may be

WO 02/12251

PCT/US01/24294

used directly in solution, or may be immobilized as described above.

The macromolecules of the present invention can be prepared by persons skilled in the art without an undue amount of experimentation using readily known reaction mechanisms and reagents, including reaction mechanisms which are consistent with the general procedures described below.

Example 1

10 a) Preparation of 9-[(methacryloylamino)propylamino]methylanthracene

(A) One-Phase

To a suspension of N-(3-aminopropyl) methacrylamide hydrochloride (Polysciences, #21200) (11.82 g, 0.066 mole, 3.0 eq) and a trace of inhibitor DEMP (2,6-di-*t*-butyl-4-methylphenol) (10 mg) in chloroform (250 mL) stirring in an ice-water bath, diisopropylethylamine (25 mL, 18.55 g, 0.144 mole, 6.5 eq) was added dropwise in 20 minutes. The mixture was allowed to warm up to room temperature and cooled again in ice-water bath. A clear solution of 9-chloromethylanthracene (5.0 g, 0.022 mole) in chloroform (100 mL) was added dropwise over 1 hour. It was run at 25°C for 1 hour, 50°C for 12 hours and then 70°C for 2 hours.

The mixture was washed with water (60 mL x 4), and the aqueous layer was extracted with methylene chloride. The organic layers were combined, dried over Na₂SO₄, separated, and the solvent was removed under reduced pressure at 40°C. The crude material was then chromatographed on silica gel with 2-5% methanol in methylene chloride to give 2.44 g (33.4%) of product as a

WO 02/12251

PCT/US01/24294

solid. TLC (silica gel): R_f 0.39 (MeOH/CH₂Cl₂ = 1/9), a single spot.

(B) Two-Phase

To a clear solution of N-(3-aminopropyl)

5 methacrylamide hydrochloride (788 mg, 4.41 mmole, 10 eq) and a trace of inhibitor MEHQ (methylether hydroquinone) (2 mg) in a mixture of water (30 mL) and tetrahydrofuran (30 mL) stirring in an ice-water bath. A Na₂CO₃/NaHCO₃ buffer (66 mL, 0.2 M, pH 10) was added in 1 hour and a
10 solution of 9-chloromethylantracene (100 mg, 0.441 mmole) in chloroform (100 mL) was added in 3 hours. It was run at 25°C for 7 hours and then 55°C for 12 hours.

The organic layer was separated, washed with water (50 mL x 4), and the aqueous layers were extracted with
15 methylene chloride. The organic layers were combined, dried over Na₂SO₄, separated, and the solvent was removed with reduced pressure at 45°C. The crude material (270 mg) was then chromatographed on silica gel with 10-20% methanol in methylene chloride to give 28.7 mg (19.6% of
20 product as a solid TLC (silica gel): R_f 0.77 (MeOH/CH₂Cl₂ = 3/7), a single spot.

b) Preparation of 9-[[N-methacryloylaminopropyl-N-(o-boronobenzyl)amino]methyl]anthracene

To a solution of the product obtained in step a)
25 above (2.440 g, 0.00734 mole) and a trace of inhibitor DBMP (10 mg) in chloroform (200 mL) stirring in an ice-water bath, DIEA (diisopropylethylamine) (2.846 g, 3.84 mL, 0.022 mole, 3.0 eq) was added by portions in 10 minutes, and then a solution of 2,2-dimethylpropane-1,3-
30 diyl[o-(bromomethyl)phenyl]boronate (2.492 g, 0.00881 mole, 1.2 eq) in chloroform (15 mL) was added in 30

WO 02/12251

PCT/US01/24294

minutes. The reaction was run at room temperature for 20 hours.

The mixture was washed with water, separated and the aqueous layers were extracted with methylene chloride.

- 5 The organic layers were combined, dried over Na_2SO_4 , separated and the solvent was removed with reduced pressure at 25°C. The semi-solid (4.75 g) was then chromatographed on silica gel with 2-5% methanol in methylene chloride to give 2.50 g (76.3%) of product as a
- 10 lightly yellow crystalline solid, mp 72-73°C, TLC (silica gel): R_f 0.36 (MeOH/ CH_2Cl_2 = 1/9). It is soluble in CH_2Cl_2 , CHCl_3 , THF, CH_3OH , and $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$. Limited solubility in H_2O and ether.

15 c) Preparation of water-soluble-copolymeric solutions of MAPTAC and 9-[[N-methacryloylamino]propyl-N-(o-boronobenzyl)amino]methylanthracene

- (50:1) solution: To a solution of the monomer (42.3 mg, 0.0908 mmole) in ethanol (100%, 1.5 mL), MAPTAC [3-(methacryloylamino)propyl]trimethylammonium chloride (2.0
- 20 mL, 1.0 g, 4.54 mmole, 50 eq) and an AIBN (azobisisobutyl nitrile) ethanolic solution (0.183 M, 0.2 mL) as radical initiator were added, a clear solution was obtained. It was saturated with nitrogen and then heated to 70°C in 1 hour, and kept at 70°C for 80 minutes, and a viscous
- 25 liquid was obtained.

- The liquid obtained was treated with water (26 mL) and filtered through a microfilter (0.45 μm) to give a clear solution. After dialysis through a cellulose acetate membrane (MWCO 3500) with water 5 L x 4), it was
- 30 concentrated with polyethylene glycol (MW 20 K) to a clear solution (34.54 g). Concentration: 24.0 mg solid in 1.0 g solution, total solid 829 mg, yield 79.5%.

WO 02/12251

PCT/US01/24294

Similar procedures were applied to prepare copolymeric solutions of 500:1, 400:1, 200:1, 100:1, 50:1, 25:1, 15:1, and 5:1 molar ratios of hydrophilic monomer:indicator.

5 Glucose Modulation of 50:1 and 25:1 Co-polymers

The modulation of the fluorescence of the 50:1 and 25:1 indicator macromolecules by glucose solutions having various concentrations is shown below in Tables 1 and 2. Table 1 shows the results using two different concentrations (15 mg/ml and 25 mg/ml) of the 25:1 indicator macromolecule of this example with four different glucose concentrations. Table 2 shows the results using two different concentrations (10 mg/ml and 20 mg/ml) of the 50:1 indicator macromolecule of this example with four different glucose concentrations. In both Tables, I/I₀ is the ratio of the emitted intensities at 420 nm after and before exposure to glucose (365 nm excitation).

Table 1

20	Glucose concentration (mM)	I/I ₀ for 15 mg/ml indicator macromolecule (25:1)	I/I ₀ for 25 mg/ml indicator macromolecule (25:1)
	0	1.00	1.00
	50	1.44	1.50
25	100	1.75	1.90
	200	2.13	2.33

WO 02/12251

PCT/US01/24294

Table 2

	Glucose concentration (mM)	I/I ₀ for 10 mg/ml indicator macromolecule (50:1)	I/I ₀ for 20 mg/ml indicator macromolecule (50:1)
5	0	1.00	1.00
	50	1.40	1.48
	100	1.70	1.79
	200	2.04	2.22

Example 2

10 This example demonstrates a surprising and useful excimer effect present in connection with the 5:1 indicator macromolecule prepared in Example 1.

Figure 1 depicts the emission spectra of the 5:1 indicator macromolecule when exposed to three

15 concentrations of glucose (0 mM, 30 mM and 60 mM) after excitement by light at 365 nm. Also shown in the shaded region of Figure 1 is the emission of the non-excimer 25:1 indicator macromolecule from Example 1. The excimer emission region shows an "isosbestic region" rather than

20 an isosbestic point. It can be seen from Figure 1 that the excimer emission region (the region where the 0 mM, 30 mM and 60 mM glucose lines overlap) is not responsive to changes in glucose concentration (just like an isosbestic point). The excimer emission region begins

25 approximately 100 nm downfield from the peak responsive wavelength of the anthracene derivative modulation. Except for glucose, the excimer is responsive to all other aspects of the system, such as excitation intensity, temperature, and pH. Therefore, an ideal

30 referencing scheme is one where the amplitude or signal value at 415 nm is divided electronically by the amplitude or signal value at 515 nm or another wavelength

WO 02/12251

PCT/US01/24294

or range of wavelengths within the excimer emission region, and the resultant value will be corrected for drift and error in pH, power factors and drift affecting LED intensity, ambient temperature excursions, etc. That is demonstrated below.

Demonstration of Excitation Intensity, Temperature and pH Correction

The glucose modulation of the 5:1 indicator macromolecule was measured with three different glucose solutions (0 mM, 100 mM and 200 mM). The emission spectra were determined for each of the glucose solutions at three different spectrophotometer slit configurations for source and emitted light (1.5 being narrower and 3 being wider). The data are shown in Table 3. In the Table, the ratio of the emission intensity at 420 nm to the emission intensity at 550 nm is relatively independent of slit configuration.

Table 3

Slit Configuration	I420/I550 0 mM glucose	I420/I550 100 mM glucose	I420/I550 200 mM glucose
1.5/1.5	3.92	6.18	7.36
1.5/3	3.93	6.12	7.25
3/3	4.00	6.27	7.28

The temperature stability of the 5:1 excimer indicator macromolecule was determined. The ratio of the emissions at 420 nm and 550 nm for a 1 mg/ml solution of the 5:1 excimer indicator macromolecule exposed to 200 mM glucose (pH 7.5) was 7.57 at room temperature and 7.53 at approximately 60°C.

WO 02/12251

PCT/US01/24294

The pH stability of the 5:1 excimer indicator macromolecule was also determined. The ratio of the emissions at 420 nm and 550 nm for a 1 mg/ml solution of the 5:1 excimer indicator macromolecule at three different pH levels (6.5, 7.0 and 7.5) were determined (excitation light at 370 nm, slits 1.5,3), and are shown in Table 4. The full emission spectra are shown in Figure 2. The variation over the range tested was statistically insignificant.

Table 4

I420/I550 pH 6.5	I420/I550 pH 7.0	I420/I550 pH 7.5
4.28 ± 0.18	4.60 ± 0.37	4.29 ± 0.19

It is believed that the stability of the excimer complex (presumably through the pi cloud) exceeds that of the non-excimer anthracene derivative, and, that the boronate recognition feature, which is able to perturb the properties of the non-excimer, and thus make a good indicator, is not able to perturb the more stable excimer complex and thus the excimer makes a very good reference indicator. The reference molecule is structurally unaltered from the read channel indicator. The polymer matrix may be the same, and in this example is in fact the same macromolecule. The recognition element is open and intact, but the inductive energy influence between recognition element and fluorophore center has been muted.

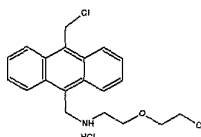
The foregoing is quite significant, because it can eliminate the need for separate physical and/or chemical environments between indicator and reference molecules.

Example 3

WO 02/12251

PCT/US01/24294

The synthesis of a suitable lanthanide chelate indicator component monomer is depicted in Figure 3. Compounds (1) and (2) are commercially available from Macrocylics, Richardson, TX (compound (2) is known as p-
 5 NH₂-Bz-DOTA). The end product (9) may be co-polymerized with one or more other monomers to form an indicator macromolecule.

Example 4**Single-methacrylamide monomer of bis-boronate-anthracene**

10

A. 9-chloromethyl-10-[[2-(2-hydroxyethoxy)ethylamino]-methyl]anthracene hydrochloride salt.

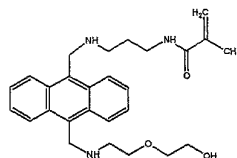
To a suspension of 9,10-bis(chloromethyl)anthracene (5.18 g, 18.8 mmole, 3.99 equiv.) in 200 mL of NMP was
 15 added 2-(2-aminoethoxy)ethanol (0.495 g, 0.475 mL, 4.71 mmole). The mixture was stirred in the dark for 17 hours. At this time, the reaction mixture was concentrated to ~ 50 mL under vacuum at 50°C. The residue was purified by silica gel chromatography (150 g
 20 gravity grade silica gel, 0-10% CH₃OH/CH₂Cl₂) to yield 0.425 g (24%) of a yellow/orange solid.

TLC: Merck silica gel 60 plates, R_f 0.72 with 70/30 CH₂Cl₂/CH₃OH, see with UV (254/366), ninhydrin stain.

WO 02/12251

PCT/US01/24294

HPLC: HP 1100 HPLC chromatograph, Vydac 201TP 10 x 250 mm column, 0.100 mL injection, 2 mL/min, 370 nm detection, A = water (0.1% HFBA) and B = MeCN (0.1% HFBA), gradient 10% B 2 min, 10-80% B over 18 min, 80-100% B over 2 min, 100% B 2 min, retention time 16.1 min.



B. 9-[[2-(2-hydroxyethoxy)ethylamino]methyl]-10-[[3-methacrylamido)propylamino]methyl]anthracene.

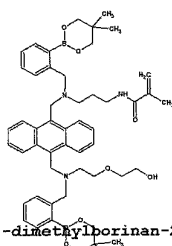
To a suspension of N-(3-aminopropyl)methacrylamide hydrochloride salt (3.08 g, 17.2 mmole, 4.2 equiv.), DIEA (5.19 g, 7.00 mL, 40.1 mmole, 9.8 equiv.) and ~ 3 mg of BHT in 125 mL CHCl₃ at 23°C was added dropwise a solution of 9-chloromethyl-10-[[2-(2-hydroxyethoxy)ethylamino]methyl]anthracene hydrochloride salt (1.56 g, 4.10 mmole) in 25 mL of CHCl₃. The mixture was subsequently stirred in the dark for 92 hours. At this time, the reaction mixture was filtered and washed with 2 x 40 mL of NaHCO₃ (saturated aqueous solution). The organic extract was dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and concentrated to yield a sticky orange solid which was purified by alumina chromatography (50 g activated neutral alumina, 0-5% CH₃OH/CH₂Cl₂) to yield 0.364 g (20%) of an orange solid.

WO 02/12251

PCT/US01/24294

TLC: Merck silica gel 60 plates, Rf 0.16 with 70/30 CH₂Cl₂/CH₃OH, see with UV (254/366), ninhydrin stain.

HPLC: HP 1100 HPLC chromatograph, Vydac 201TP 10 x 250 mm column, 0.100 mL injection, 2 mL/min, 370 nm detection, A = water (0.1% HFBA) and B = MeCN (0.1% HFBA), gradient 10% B 2 min, 10-80% B over 18 min, 80-100% B over 2 min, 100% B 2 min, retention time 16.85 min.



C. 9-[N-[2-(5,5-dimethylborinan-2-yl)benzyl]-N-[3-(methacrylamido)propylamino]methyl]-10-[N-[2-(5,5-dimethylborinan-2-yl)benzyl]-N-[2-(2-hydroxyethoxy)ethylamino]methyl]anthracene. (Single-methacrylamide monomer).

A solution of 9-[[2-(2-hydroxyethoxy)ethylamino]methyl]-10-[[3-(methacrylamido)propylamino]methyl]-anthracene (0.343 g, 0.763 mmole), DIEA (0.965 g, 1.30 mL, 9.8 equiv.) and (2-bromomethylphenyl)boronic acid neopentyl ester (1.09 g, 3.85 mmole, 5.0 equiv.) in 20 mL CHCl₃ at 23°C was stirred in the dark for 25 hours. At this time, the reaction mixture was concentrated initially by rotary evaporation, then using a vacuum pump to remove DIEA. The residue was purified by alumina

WO 02/12251

PCT/US01/24294

column chromatography (40 g activated neutral alumina, 0-10% CH₃OH/CH₂Cl₂) to yield 0.299 g (46%) of a yellow orange solid. This product may be copolymerized with one or more other monomers to form an indicator

5 macromolecule. The boronate groups should be deprotected prior to use.

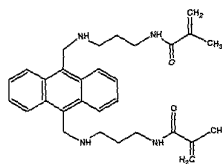
FAB MS: Calc'd for C₂₁H₆₅B₂N₃O₇ [M]⁺ 854; Found [M + 1]⁺ 855.

TLC: Merck basic alumina plates, Rf 0.35 with 95/5 CH₂Cl₂/CH₃OH, see with UV (254/366).

10 **HPLC:** HP 1100 HPLC chromatograph, Vydac 201TP 10 x 250 mm column, 0.100 mL injection, 2 mL/min, 370 nm detection, A = water (0.1% HFBA) and B = MeCN (0.1% HFBA), gradient 10% B 2 min, 10-80% B over 18 min, 80-100% B over 2 min, 100% B 2 min, retention time 19.7 min.

15 **Example 5**

Dual-methacrylamide monomer of bis-boronate-anthracene



WO 02/12251

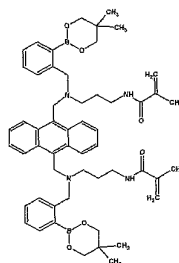
PCT/US01/24294

A. 9,10-bis[3-(methacrylamido)propylamino]methyl-anthracene.

A suspension of 9,10-bis(chloromethyl)anthracene (1.5 g, 5.45 mmole), DIEA (28.17 g, 38.00 mL, 218 mmole, 40 equiv.), N-(3-aminopropyl)methacrylamide hydrochloride salt (9.76 g, 54.5 mmole, 10.0 equiv.), and ~ 5 mg of BHT in 200 mL CHCl_3 at 23°C was stirred in the dark for 4 days at 40°C. At this time, the temperature was increased to 45°C and the mixture was stirred for 3 days longer. At this time, a precipitate had formed. The mixture was filtered, and the solid product dissolved in the minimum amount of CH_2Cl_2 . A yellow crystalline solid, the bis hydrochloride salt of the desired product, formed overnight (3.15 g, quantitative).

TLC: Merck basic alumina plates, Rf 0.31 with 90/10 $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$, see with UV (254/366).

HPLC: HP 1100 HPLC chromatograph, Waters 5 x 100 mm NovaPak HR C18 column, 0.100 mL injection, 0.75 mL/min, 360 nm detection, A = water (0.1% HFBA) and B = MeCN (0.1% HFBA), gradient 10% B 2 min, 10-80% B over 18 min, 80-100% B over 2 min, 100% B 2 min, retention time 15.0 min.



WO 02/12251

PCT/US01/24294

B. 9,10-bis[N-[2-(5,5-dimethylborinan-2-yl)benzyl]-N-[3-(methacrylamido)propylamino]methylantracene.

A solution of 9,10-bis[3-(methacrylamido)-propylamino]methylantracene (0.650 g, 1.34 mmole of the free amine), DIEA (0.612 g, 0.825 mL, 4.74mmole, 3.55 equiv.), (2-bromomethylphenyl)boronic acid neopentyl ester (1.34 g, 4.74 mmole, 3.55 equiv.) and BHT (5 mg as inhibitor) in 20 mL CHCl₃ at 23°C was stirred in the dark for 5 days. At this time, the reaction mixture was concentrated *in vacuo* and the residue was purified by alumina chromatography (200 g activated neutral alumina, 0-2% CH₃OH/CH₂Cl₂) to yield 0.465 g (39%) of a very viscous yellow oil.

TLC: Merck basic alumina plates, Rf 0.59 with 90/10 CH₂Cl₂/CH₃OH, see with UV (254/366).

HPLC: HP 1100 HPLC chromatograph, Waters 5 x 100 mm NovaPak HR C18 column, 0.050 mL injection, 0.75 mL/min, 360 nm detection, A = water (0.1% HFBA) and B = MeCN (0.1% HFBA), gradient 10% B 2 min, 10-80% B over 18 min, 80-100% B over 2 min, 100% B 2 min, retention time 16.9 min.

C. Preparation of N,N-dimethylacrylamide hydrogel with glucose indicator:

A solution of N,N-dimethylacrylamide (40% wt.) and N,N'-methylenebisacrylamide (0.8% wt.) in ethylene glycol was prepared. 9,10-bis[N-[2-(5,5-dimethylborinan-2-yl)-benzyl]-N-[3-(methacrylamido)propylamino]methylantracene (17.8 mg, 2x10⁻⁵ mole) and 40 µL of aqueous ammonium persulfate (5% wt) were combined with 1 mL of ethylene glycol monomer solution. The resulting solution was

WO 02/12251

PCT/US01/24294

placed in a glove box purged with nitrogen. An aqueous solution of N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine (80 μ L, 5% wt.) was added to the monomer formulation to accelerate polymerization. The resulting formulation was poured in a mold constructed from microscope slides and 100 micron stainless steel spacer. After being kept for 8 hours in nitrogen atmosphere the mold was placed in phosphate buffered saline (PBS) (10 mM PBS, pH=7.4), the microscope slides were separated, and the hydrogel was removed. The hydrogel was washed with 100 mL of PBS containing 1 mM lauryl sulfate sodium salt and 1 mM EDTA sodium salt for 3 days, the solution being changed every day, followed by washing with DMF/PBS (10/90 by vol., 3 x 100 mL), and finally with PBS (pH=7.4, 3 x 100 mL). The resulting hydrogel polymer was stored in PBS (10 mM PBS, pH=7.4) containing 0.2% wt. sodium azide and 1 mM EDTA sodium salt.

D. Modulation of Fluorescence With Glucose, Lactate and Acetoacetate

The modulation of the fluorescence of the indicator macromolecule (which contains two recognition elements) prepared in this example by glucose, lactate and acetoacetate was determined. Figure 4 shows the normalized fluorescence emission (I/I_0 @ 427 nm) of the hydrogel of this example in 10 mM PBS, pH 7.4 containing 0.2% NaN_3 and 1 mM EDTA containing various amounts of sodium-L-lactate, lithium acetoacetate or α -D-glucose. Data were recorded using a Shimadzu RF-5301 spectrofluorometer with excitation @365 nm (slit = 3 nm) and emission at 427 nm (slit = 3 nm) at low sensitivity at 37°C using a temperature controlled sample holder. The cuvettes containing 3 mL of the desired solution were

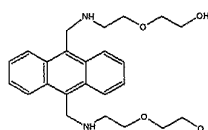
WO 02/12251

PCT/US01/24294

equilibrated at 37°C for 15 minutes before measurement. Each hydrogel sample was measured in four independent samples. Error bars are standard deviation with quadruplicate values for each data point. The hydrogels containing a glucose recognition molecule were prepared as previously described. The hydrogels were mounted on glass slides and covered with polyester mesh in PMMA cuvettes at 45° to the incident light. Solutions of 1, 5, 10 and 20 mM sodium L-lactate [Aldrich], 5, 10 and 20 mM lithium acetoacetate [Aldrich], and 1, 2, 4, 5, 10, and 20 mM α-D-glucose were prepared in 10 mM PBS, pH 7.4 containing 0.2% NaN₃ and 1 mM EDTA. The fluorescence of the copolymer was affected by the presence of glucose, but not by the presence of lactate or acetoacetate.

Example 6

Single- and dual-methacrylate monomers of bis-boronate-anthracene



A. 9,10-bis[[2-(2-hydroxyethoxy)ethylamino]methyl]anthracene.

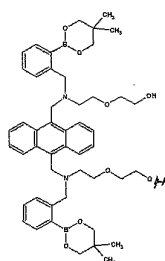
To a solution of 2-(2-aminoethoxy)ethanol (31.4 g, 30.0 mL, 299 mmole, 20.9 equiv.) in 40 mL CHCl₃ at 23°C was added 9,10-bis(chloromethyl)anthracene (3.94 g, 14.3 mmole). The solution was stirred in the dark for 67 hours. At this time, 100 mL CH₂Cl₂ were added and the

WO 02/12251

PCT/US01/24294

solution was washed with 1 x 50 mL and 2 x 100 mL portions of NaHCO₃ (saturated aqueous solution). The organic extract was dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and concentrated to yield 4.67 g (79%) of a yellow powder. Product (~85 % pure by RP-HPLC) was carried on as is.

HPLC conditions: HP 1100 HPLC chromatograph, Vydac 201TP 10 x 250 mm column, 0.100 mL injection, 2 mL/min, 370 nm detection, A = water (0.1% HFBA) and B = MeCN (0.1% HFBA), gradient 10% B 2 min, 10-80% B over 18 min, 80-100% B over 2 min, 100% B 2 min, retention time 15.6 min.



B. 9,10-bis[N-[2-(5,5-dimethylborinan-2-yl)benzyl]-N-[2-(2-hydroxyethoxy)ethylamino]methyl]anthracene.

A solution of 9,10-bis[[2-(2-hydroxyethoxy)ethylamino]methyl]anthracene (4.02 g, 9.75 mmole), DIEA (12.6 g, 17.0 mL, 97.5 mmole, 10.0 equiv.) and (2-bromomethylphenyl)boronic acid neopentyl ester (13.7 g, 48 mmole, 4.9 equiv.) in 125 mL CHCl₃ at 23°C was stirred in the dark for 46 hours. At this time, the reaction mixture was concentrated initially by rotary evaporation, then

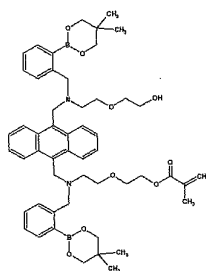
WO 02/12251

PCT/US01/24294

using a vacuum pump to remove the DIEA. The residue was purified by alumina column chromatography (150 g activated neutral alumina, 0-3% CH₃OH/CH₂Cl₂) to yield 5.67 g (70%) of a viscous oil which solidified upon standing. Product (~85 % pure by RP-HPLC) was carried on as is.

TLC: Merck basic alumina plates, Rf 0.33 with 95/5 CH₂Cl₂/CH₃OH, see with UV (254/366).

HPLC conditions: HP 1100 HPLC chromatograph, Vydac 201TP 10 x 250 mm column, 0.100 mL injection, 2 mL/min, 370 nm detection, A = water (0.1% HFBA) and B = MeCN (0.1% HFBA), gradient 10% B 2 min, 10-80% B over 18 min, 80-100% B over 2 min, 100% B 2 min, retention time 18.8 min.



C. 9-[N-[2-(5,5-dimethylborinan-2-yl)benzyl]-N-[2-(2-methacroyloxyethoxy)ethylamino]methyl]-10-[N-[2-(5,5-dimethylborinan-2-yl)benzyl]-N-[2-(2-hydroxyethoxy)ethylamino]methyl]anthracene. (Single-methacrylate monomer).

A solution of 9,10-bis[N-[2-(5,5-dimethylborinan-2-yl)benzyl]-N-[2-(2-hydroxyethoxy)ethylamino]methyl]-

WO 02/12251

PCT/US01/24294

anthracene (0.298 g, 0.359 mmole), methacrylic acid (0.304 g, 0.300 mL, 3.53 mmole, 9.84 equiv.), DCC (0.965 g, 4.68 mmole, 13.0 equiv.) and N,N-dimethylamino-pyridine (0.020 g, 0.16 mmole, 0.46 equiv.) in 15 mL CH₂Cl₂ at 23°C was stirred in the dark for 4 hours. At this time, the reaction mixture was filtered and concentrated by rotary evaporation. The residue was purified by alumina column chromatography (50 g activated neutral alumina, 0-4% CH₃OH/CH₂Cl₂) to yield 0.150 g (47%) of a yellow solid.

FAB MS: Calc'd for C₃₂H₄₆B₂N₂O, [M]⁺ 885; Found [M + 1]⁺ 886.

TLC: Merck basic alumina plates, Rf 0.45 with 95/5 CH₂Cl₂/CH₃OH, see with UV (254/366).

HPLC: HP 1100 HPLC chromatograph, Vydac 201TP 10 x 250 mm column, 0.100 mL injection, 2 mL/min, 370 nm detection, A = water (0.1% HFBA) and B = MeCN (0.1% HFBA), gradient 10% B 2 min, 10-80% B over 18 min, 80-100% B over 2 min, 100% B 2 min, retention time 21 min.

D. Water soluble copolymer of 9-[N-[2-(5,5-dimethylborinan-2-yl)benzyl]-N-[2-(2-methacroyloxyethoxy)ethylamino]methyl]-10-[N-[2-(5,5-dimethylborinan-2-yl)benzyl]-N-[2-(2-hydroxyethoxy)ethylamino]methyl]-anthracene and TMAMA (1:50 molar ratio).

To a solution of [2-(methacryloxy)ethyl]trimethylammonium chloride (TMAMA, 70 wt % aqueous solution, 0.344 g monomer, 1.66 mmole, 50 equiv.) in 0.600 mL water was added a solution of 9-[N-[2-(5,5-dimethylborinan-2-yl)benzyl]-N-[2-(2-methacroyloxyethoxy)ethylamino]methyl]-10-[N-[2-(5,5-dimethylborinan-2-yl)benzyl]-N-[2-

WO 02/12251

PCT/US01/24294

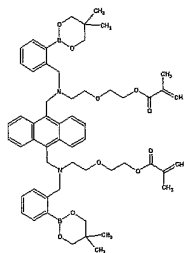
(2-hydroxyethoxy)ethylamino]methyl]anthracene (0.029 g, 0.033 mmole) in 3.00 mL MeOH. To this mixture was added 4,4'-azobis(4-cyanovaleric acid) (0.0075 g, 0.027 mmole, 1.6 mole % of total monomer). The solution was filtered through a 0.45 μ membrane filter, was purged with nitrogen gas and then heated in the dark at 55°C for 16 hours. At this time, the viscous solution was cooled to 25°C and concentrated *in vacuo*. The residue was diluted with 20 mL water and filtered through a 0.2 μ membrane filter. The polymer solution was dialyzed through a cellulose acetate membrane (MWCO 3500) against 2 x 4 L of water. From the dialysis was obtained 38.5 mL of polymer solution. Concentration of a portion of this solution to dryness indicated 0.0075g polymer per 1.0 mL solution. Overall 0.289g (77%) yield of polymer.

E. Modulation of Fluorescence With Glucose, Lactate and Acetoacetate

The modulation of the fluorescence of the copolymer (which contains two recognition elements) prepared in step D of this example by glucose, lactate and acetoacetate was determined. Figure 5 shows the normalized fluorescence emission (I/I_0 @ 428 nm) of a 1.5 mg/mL solution of anthracene bis boronate-TMAMA (1:50 mole ratio) copolymer in PBS containing a) 0-20 mM glucose; b) 0-20 mM lactate; c) 0-20 mM lithium acetoacetate. Spectra were recorded using a Shimadzu RF-5301 spectrofluorometer with excitation @365 nm; excitation slits at 1.5 nm; emission slits at 1.5 nm; ambient temperature. The fluorescence of the copolymer was affected by the presence of glucose, but not by the presence of lactate or acetoacetate.

WO 02/12251

PCT/US01/24294



F. 9,10-bis[N-[2-(5,5-dimethylborinan-2-yl)benzyl]-N-[2-(2-methacroyloxyethoxy)ethylamino]methyl]anthracene. (Dual-methacrylate monomer).

A solution of 9,10-bis[N-[2-(5,5-dimethylborinan-2-yl)benzyl]-N-[2-(2-hydroxyethoxy)ethylamino]methyl]anthracene (0.100 g, 0.120 mmole), methacrylic acid (0.112 g, 0.110 mL, 1.30 mmole, 10.8 equiv.), DCC (0.316 g, 1.53 mmole, 12.8 equiv.) and N,N-dimethylamino-pyridine (0.014 g, 0.11 mmole, 0.92 equiv.) in 5 mL CH₂Cl₂ was stirred at 0°C for 1 hour, then 23°C for 22 hours. At this time, the reaction mixture was filtered and concentrated by rotary evaporation. The residue was purified by alumina column chromatography (30 g activated neutral alumina, 0-2% CH₃OH/CH₂Cl₂) to yield 0.030 g (26%) of a yellow solid. This product may be copolymerized with one or more other monomers to form an indicator macromolecule. The boronate groups should be deprotected prior to use.

FAB MS: Calc'd for C₅₆H₇₀B₂N₂O₁₀ [M]⁺ 953; Found [M]⁺ 951 (weak molecular ion peak).

WO 02/12251

PCT/US01/24294

TLC: Merck basic alumina plates, Rf 0.67 with 95/5
CH₂Cl₂/CH₃OH, see with UV (254/366).

HPLC: HP 1100 HPLC chromatograph, Waters 5 x 100 mm
NovaPak HR C18 column, 0.100 mL injection, 0.75 mL/min, 2
5 mL injection loop, 370 nm detection, A = water (0.1%
HFBA) and B = MeCN (0.1% HFBA), gradient 10% B 2 min, 10-
80% B over 18 min, 80-100% B over 2 min, 100% B 2 min,
retention time 19.6 min.

**G. Preparation of HEMA/SPE/MAA hydrogel with glucose
10 indicator:**

A solution of hydroxyethyl methacrylate (HEMA, 0.078
mL, 0.084 g, 0.64 mmol), methacrylic acid (MAA, 0.030 mL,
0.030 g, 0.35 mmol), polyethyleneglycol dimethacrylate
1000 (PEGDMA, 0.5 mg/mL aqueous solution, 0.048 mL), and
15 N,N-dimethyl-N-methacryloxyethyl-N-(3-sulfopropyl)-
ammonium-batain (SPE, 0.462 g, 1.65 mmol) in 0.900 mL of
ethylene glycol was prepared. 9,10-bis[N-[2-(5,5-
dimethylborinan-2-yl)benzyl]-N-[2-(2-
methacroyloxyethoxy)ethylamino]methyl]anthracene
20 (0.0096g, 0.010 mmol) and 0.020 mL of 5% wt. aqueous
solution of ammonium persulfate were combined with 0.500
mL of the ethylene glycol monomer solution. This
solution was placed in glove box purged with nitrogen.
An aqueous solution of N,N,N',N'-
25 tetramethylethylenediamine (0.040 mL, 5% wt.) was added
to the monomer formulation to accelerate polymerization.
The resulting formulation was poured in a mold
constructed from microscope slides and a 100 micron
stainless steel spacer. After being kept for 8 hours in
30 nitrogen atmosphere the mold was placed in phosphate
buffered saline (PBS, pH=7.4), the microscope slides were

WO 02/12251

PCT/US01/24294

separated, and the hydrogel was removed. The hydrogel was washed with 100 mL of PBS containing 1 mM lauryl sulfate sodium salt for 3 days, the solution being changed every day, followed by washing with MeOH/PBS (20/80 by vol. 3 x 100 mL), and finally with PBS (3 X 100 ML). The resulting hydrogel polymer was stored in PBS (pH=7.4) containing 0.2% wt. sodium azide and 1 mM EDTA sodium salt.

H. Modulation of Fluorescence with Glucose:

The modulation of the fluorescence of the dual methacrylate indicator compound prepared in this example by glucose was determined. Figure 6 shows the relative fluorescence emission (I@427 nm) of a HEMA/SPE hydrogel (100 micron thickness, prepared as previously described) containing the dual methacrylate glucose recognition molecule of this example in PBS (pH 7.4 containing 0.2% NaN₃ and 1 mM EDTA) containing 0 to 20 mM α -D-glucose. The hydrogels were mounted on glass slides and covered with black polyester mesh (Sefar America, Depew, NY) in PMMA cuvettes at 45° to the incident light. All measurements were made at 37°C in a Shimadzu RF-5301 spectrofluorometer with excitation at 365 nm (slit = 1.5 nm) and emission at 427 nm (slit = 1.5 nm) at high sensitivity using a temperature controlled sample holder. The cuvettes containing 3 mL of the desired glucose solution (0, 1, 2, 4, 5, 10, 20 mM glucose) were equilibrated at 37C for 30 minutes before measurement. A single exponential function was used to fit the raw fluorescence data.

WO 02/12251

PCT/US01/24294

Example 7

Effect of glucose or lactate on acrylamide gel containing
N-[3-(methacrylamido)propyl]-3,4-dihydroxy-9,10-dioxo-2-
anthracenesulfonamide (Alizarin Red S monomer) and
5 α,α' -bis[N-[2-(5,5-dimethylborinan-2-yl)benzyl]-N-[3-
(methacrylamido)propylamino]-1,4-xylene (bis boronic acid
monomer) :

**A. 3,4-Dihydroxy-9,10-dioxo-2-anthracenesulfonyl
chloride:**

10 3,4-dihydroxy-9,10-dioxo-2-anthracenesulfonic acid
sodium salt (1.4 g, 3.9 mmoles) was combined with 30 mL
of chlorosulfonic acid and heated to 90°C for 5 hours,
after which the solution was cooled to 0°C and poured
into 100 g of ice. After the ice melted the solution was
15 extracted with CH_2Cl_2 (3 x 100 mL), methylene chloride
extracts were combined, dried with Na_2SO_4 and evaporated
to produce 0.87 g of solid (Yield 66%).

**B. N-[3-(methacrylamido)propyl]-3,4-dihydroxy-9,10-
dioxo-2-anthracenesulfonamide:**

20 3,4-dihydroxy-9,10-dioxo-2-anthracenesulfonyl chloride
(96 mg, 0.28 mmoles) and N-(3-aminopropyl) methacrylamide
hydrochloride (108 mg, 0.6 mmoles) were combined with 20
mL of CH_2Cl_2 . To this suspension Et_3N (303 mg, 3 mmoles)
was added. The mixture was stirred at room temperature
25 for 24 hours, filtered, and solvent was evaporated. The
resulting solid was subjected to column chromatography on
 SiO_2 (10 g) with $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (90/10) as an eluent. The
product was obtained as a red solid (80 mg, 64% yield).

FAB MS: Calculated for $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_7\text{S}$ M^+ 445; Found M^+ 445.

WO 02/12251

PCT/US01/24294

HPLC: HP 1100 HPLC chromatograph, Waters 5 x 100 mm NovaPak HR C18 column, 0.100 mL injection, 0.75 mL/min, 2 mL injection loop, 370 nm detection, A = water (0.1% HFBA) and B = MeCN (0.1% HFBA), gradient 10% B 2 min, 10-80% B over 18 min, 80-100% B over 2 min, 100% B 2 min, retention time 17.67 min.

C. α,α' -bis[3-(methacrylamido)propylamino]-1,4-xylene.

A solution of N-(3-aminopropyl)methacrylamide hydrochloride salt (3.00 g, 16.8 mmole, 2.21 equiv.), DIEA (6.5 g, 8.8 mL, 50 mmole, 6.6 equiv.), terephthalaldehyde (1.02 g, 7.60 mmole) and Na₂SO₄ (10.7 g, 75.3 mmole, 9.91 equiv.) in 75 mL anhydrous MeOH was stirred in the dark at 25°C for 18 hours. At this time, more Na₂SO₄ (10.7 g, 75.3 mmole, 9.91 equiv.) was added and stirring continued for 6 hours longer. At this time, the solution was filtered and NaBH₄ (1.73 g, 45.7 mmole, 6.01 equiv.) was added to the filtrate in portions and subsequently stirred at 25°C for 21 hours. The suspension was filtered through Celite and the filtrate was concentrated. The residue was dissolved in 100 mL CH₂Cl₂ and washed 1 x 25 mL saturated aqueous NaHCO₃. The organic extract was dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and concentrated to yield a viscous oil. The product was carried on as is.

HPLC: HP 1100 HPLC chromatograph, Vydac 201TP 10 x 250 mm column, 0.100 mL injection, 2.00 mL/min, 260 nm detection, A = water (0.1% HFBA) and B = MeCN (0.1% HFBA), gradient 10% B 2 min, 10-80% B over 18 min, 80-100% B over 2 min, 100% B 2 min, retention time 15.8 min.

WO 02/12251

PCT/US01/24294

D. α,α' -bis[N-[2-(5,5-dimethylborinan-2-yl)benzyl]-N-[3-(methacrylamido)propylamino]-1,4-xylene.

A solution of α,α' -bis[3-(methacrylamido)-propylamino]-1,4-xylene (2.94 g, 7.61 mmole), DIEA (2.97 g, 4.00 mL, 23.0 mmole, 3.02 equiv.), (2-bromomethyl-phenyl)boronic acid neopentyl ester (6.50 g, 23.0 mmole, 3.02 equiv.) and BHT (5 mg as inhibitor) in 75 mL CH_2Cl_2 at 25°C was stirred in the dark for 28 hours. At this time, the mixture was washed 1 x 25 mL saturated aqueous NaHCO_3 . The organic extract was dried over anhydrous Na_2SO_4 , filtered and concentrated. To the residue was added 200 mL ether and the suspension was stirred for 18 hours. The suspension was filtered and the residue dissolved in CH_2Cl_2 , filtered and the filtrate concentrated. To the solid residue was added 150 mL ether and the suspension was stirred for 18 hours. At this time, the suspension was filtered yielding 1.98 g (33%) of a fluffy pink powder, which had a maximum solubility of 1 mmolar in PBS (pH 7.4).

FAB MS: Calc'd for $\text{C}_{46}\text{H}_{64}\text{B}_2\text{N}_4\text{O}_6$ $[\text{M}]^+$ 790; Found $[\text{M} + 1]^+$ 791.

HPLC: HP 1100 HPLC chromatograph, Waters 5 x 100 mm NovaPak HR C18 column, 0.050 mL injection, 0.75 mL/min, 280 nm detection, A = water (0.1% HFBA) and B = MeCN (0.1% HFBA), gradient 10% B 2 min, 10-80% B over 18 min, 80-100% B over 2 min, 100% B 2 min, retention time 13.4 min.

WO 02/12251

PCT/US01/24294

E. Preparation of acrylamide gel containing
N-[3-(methacrylamido)propyl]-3,4-dihydroxy-9,10-dioxo-2-
anthracenesulfonamide (Alizarin Red S monomer) and
 α,α' -bis[N-[2-(5,5-dimethylborinan-2-yl)benzyl]-N-[3-
5 (methacrylamido)propylamino]-1,4-xylene:

Ethylene glycol solution containing 30% wt. acrylamide
and 0.8% wt. N,N'-methylenebisacrylamide was prepared.
N-[3-(methacrylamido)propyl]-3,4-
dihydroxy-9,10-dioxo-2-anthracenesulfonamide (1.5 mg,
10 3.38×10^{-6} mole) and α,α' -bis[N-[2-(5,5-dimethyl-
borinan-2-yl)benzyl]-N-[3-(methacrylamido)propylamino]-1,
4-xylene (28 mg, 3.54×10^{-5} mole) were combined with 800
 μ L of ethylene glycol monomer solution and 40 μ L of 5%
wt. aqueous ammonium persulfate. This formulation was
15 placed in a glove box purged with nitrogen along with a
mold constructed from glass microscope slides and 100
micron stainless steel spacer. An aqueous solution of
N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine (40 μ L, 5% wt.) was
added to the monomer solution to accelerate
20 polymerization and the final formulation was poured into
a glass mold. The mold was left under nitrogen
atmosphere for 16 hours, after which it was immersed in
PBS (pH=7.4) and the glass slides were separated to
afford a hydrogel polymer in a form of a thin film. The
25 resulting hydrogel thin film was washed with 100 mL of
phosphate buffered saline containing 1 mM lauryl sulfate
sodium salt for 3 days, the solution being changed every
day, followed by washing with MeOH/PBS (20/80 by vol., 3
 $\times 100$ mL), and finally with PBS (pH=7.4, 3 $\times 100$ mL).
30 Hydrogel polymer was stored in PBS (10 mM PBS, pH=7.4)
containing 0.2% wt. sodium azide and 1 mM EDTA sodium
salt.

WO 02/12251

PCT/US01/24294

F. Modulation of Absorbance With Glucose and Lactate

The modulation of the absorbance of the indicator hydrogel (which contains two recognition elements) prepared in this example by glucose and lactate was determined. The acrylamide gel was mounted in PMMA cell in the same way as described in Example 5. Phosphate buffered saline (PBS), pH=7.4 containing the desired amount of glucose or sodium lactate was heated to 37°C in a water bath and placed in the PMMA cell containing the gel after which the PMMA cell was allowed to equilibrate for 15 min at 37°C. Absorbance measurement for each glucose or lactate concentration was conducted in triplicate. For each measurement, absorbance at 650 nm was used as a blank, A(650 nm) was subtracted from all values of A(450nm) and A(530 nm).

Figure 7 shows the absorbance spectra for acrylamide gel (30%) containing 4 mM Alizarin Red S monomer (1:1000 molar ratio of Alizarin Red:acrylamide) and 44 mM bis boronic acid monomer with and without glucose. Figure 8 shows the effect of glucose on absorbance of acrylamide gel (30%) containing 4 mM Alizarin Red S monomer and 44 mM bis boronic acid monomer. Figure 9 shows the effect of sodium lactate on absorbance of acrylamide gel (30%) containing 4 mM Alizarin Red S monomer and 44 mM bis boronic acid monomer (1:95 molar ratio of boronic acid monomer:acrylamide). The absorbance of the indicator was affected by the presence of glucose, but not substantially affected by the presence of lactate.

WO 02/12251

PCT/US01/24294

What is claimed is:

1. An indicator macromolecule for detecting the presence or concentration of an analyte in an aqueous environment, said macromolecule comprising a copolymer of:
 - a) one or more indicator component monomers which individually are not sufficiently water soluble to permit their use in an aqueous environment for detecting the presence or concentration of said analyte; and
 - b) one or more hydrophilic monomers;
 such that the macromolecule is capable of detecting the presence or concentration of said analyte in an aqueous environment.
2. The indicator macromolecule of claim 1, wherein the macromolecule is capable of detection by an optical change.
3. The indicator macromolecule of claim 1, wherein the indicator component monomer comprises an N-(o-boronobenzyl)aminomethylantracene derivative.
4. The indicator macromolecule of claim 3, wherein the indicator component monomer is selected from the group consisting of
 - 9-[[N-methacryloylaminopropyl-N-(o-boronobenzyl)amino]-methyl]anthracene;
 - 9-[N-[2-(5,5-dimethylborinan-2-yl)benzyl]-N-[3-(methacrylamido)propylamino]methyl]-10-[N-[2-(5,5-dimethylborinan-2-yl)benzyl]-N-[2-(2-hydroxyethoxy)-ethylamino]methyl]anthracene;

WO 02/12251

PCT/US01/24294

- 9-[N-(2-boronobenzyl)-N-[3-(methacrylamido)-
propylamino]methyl]-10-[N-(2-boronobenzyl)-N-[2-(2-
hydroxyethoxy)ethylamino]methyl]anthracene;
9,10-bis[N-[2-(5,5-dimethylborinan-2-yl)benzyl]-N-[3-
5 (methacrylamido)propylamino]methyl]anthracene;
9,10-bis[N-(2-boronobenzyl)-N-[3-(methacrylamido)-
propylamino]methyl]anthracene;
9-[N-[2-(5,5-dimethylborinan-2-yl)benzyl]-N-[2-(2-
methacroyloxyethoxy)ethylamino]methyl]-10-[N-[2-(5,5-
10 dimethylborinan-2-yl)benzyl]-N-[2-(2-hydroxyethoxy)-
ethylamino]methyl]anthracene;
9-[N-(2-boronobenzyl)-N-[2-(2-methacroyloxyethoxy)-
ethylamino]methyl]-10-[N-[2-boronobenzyl]-N-[2-(2-
hydroxyethoxy)ethylamino]methyl]anthracene;
15 9,10-bis[N-[2-(5,5-dimethylborinan-2-yl)benzyl]-N-[2-
(2-methacroyloxyethoxy)ethylamino]methyl]anthracene;
9,10-bis[N-(2-boronobenzyl)-N-[2-(2-
methacroyloxyethoxy)ethylamino]methyl]anthracene;
N-[3-(methacrylamido)propyl]-3,4-dihydroxy-9,10-dioxo-
20 2-anthracenesulfonamide;
 α,α' -bis[N-[2-(5,5-dimethylborinan-2-yl)benzyl]-N-[3-
(methacrylamido)propylamino]-1,4-xylene;
and salts or derivatives thereof.
5. The indicator macromolecule of claim 3, wherein the
25 hydrophilic monomer comprises [3-(methacryloylamino)-
propyl]trimethylammonium chloride.
6. The indicator macromolecule of claim 1, wherein the
indicator component monomer is selected from the group
consisting of a lanthanide chelate and a polyaromatic
30 hydrocarbon.

WO 02/12251

PCT/US01/24294

7. The indicator macromolecule of claim 1, wherein the molar ratio of hydrophilic monomer:indicator component monomer is from about 2:1 to about 1000:1.
8. The indicator macromolecule of claim 7, wherein the ratio of hydrophilic monomer:indicator component monomer is from about 5:1 to about 50:1.
9. The indicator macromolecule of claim 8, wherein the ratio of hydrophilic monomer:indicator component monomer is about 5:1.
10. The indicator macromolecule of claim 1, wherein the analyte detected is selected from the group consisting of a vicinal diol; an α -hydroxy acid, a β -keto acid oxygen; carbon dioxide; zinc, potassium, hydrogen, or carbonate ions; a toxin; a mineral; and a hormone.
11. The indicator macromolecule of claim 10, wherein the analyte detected is a vicinal diol which comprises a saccharide.
12. The indicator macromolecule of claim 11, wherein the saccharide is glucose.
13. The indicator macromolecule of claim 1, wherein
- i) the molar ratio of hydrophilic monomer:indicator component monomer is from about 2:1 to about 15:1,
 - ii) the indicator component monomer comprises an N-(*o*-boronobenzyl)amino)methyl]anthracene derivative,
 - iii) the hydrophilic monomer comprises [3-(methacryloylamino)propyl]trimethylammonium chloride, and
 - iv) the macromolecule exhibits an excimer effect.

WO 02/12251

PCT/US01/24294

14. A method for the production of an indicator macromolecule for detecting the presence or concentration of an analyte in an aqueous environment, said method comprising copolymerizing:
- 5 a) one or more indicator component monomers which individually are not sufficiently water soluble to permit their use in an aqueous environment for detecting the presence or concentration of said analyte; and
- b) one or more hydrophilic monomers;
- 10 such that the resulting macromolecule is capable of detecting the presence or concentration of said analyte in an aqueous environment.
- 15 15. The method of claim 14, wherein the macromolecule is capable of detection by an optical change.
- 15 16. The method of claim 14, wherein the indicator component monomer comprises an N-(o-boronobenzyl)aminomethylantracene derivative.
17. The method of claim 16, wherein the indicator component monomer is selected from the group consisting
- 20 of
- 9-[[N-methacryloylaminopropyl-N-(o-boronobenzyl)amino]-methyl]anthracene;
- 9-[N-[2-(5,5-dimethylborinan-2-yl)benzyl]-N-[3-(methacrylamido)propylamino]methyl]-10-[N-[2-(5,5-
- 25 dimethylborinan-2-yl)benzyl]-N-[2-(2-hydroxyethoxy)-ethylamino]methyl]anthracene;
- 9-[N-(2-boronobenzyl)-N-[3-(methacrylamido)-propylamino]methyl]-10-[N-(2-boronobenzyl)-N-[2-(2-hydroxyethoxy)ethylamino]methyl]anthracene;

WO 02/12251

PCT/US01/24294

- 9,10-bis[N-[2-(5,5-dimethylborinan-2-yl)benzyl]-N-[3-(methacrylamido)propylamino]methyl]anthracene;
- 9,10-bis[N-(2-boronobenzyl)-N-[3-(methacrylamido)-propylamino]methyl]anthracene;
- 5 9-[N-[2-(5,5-dimethylborinan-2-yl)benzyl]-N-(2-(2-methacroyloxyethoxy)ethylamino)methyl]-10-[N-[2-(5,5-dimethylborinan-2-yl)benzyl]-N-[2-(2-hydroxyethoxy)-ethylamino]methyl]anthracene;
- 9-[N-(2-boronobenzyl)-N-[2-(2-methacroyloxyethoxy)-ethylamino]methyl]-10-[N-[2-boronobenzyl]-N-[2-(2-hydroxyethoxy)ethylamino]methyl]anthracene;
- 10 9,10-bis[N-[2-(5,5-dimethylborinan-2-yl)benzyl]-N-(2-(2-methacroyloxyethoxy)ethylamino)methyl]anthracene;
- 9,10-bis[N-(2-boronobenzyl)-N-[2-(2-methacroyloxyethoxy)ethylamino]methyl]anthracene;
- 15 N-[3-(methacrylamido)propyl]-3,4-dihydroxy-9,10-dioxo-2-anthracenesulfonamide;
- α,α' -bis[N-[2-(5,5-dimethylborinan-2-yl)benzyl]-N-[3-(methacrylamido)propylamino]-1,4-xylene;
- 20 and salts or derivatives thereof.

18. The method of claim 14, wherein the hydrophilic monomer comprises [3-(methacryloylamino)-propyl]trimethylammonium chloride.

19. The method of claim 14, wherein the indicator component monomer is selected from the group consisting of a lanthanide chelate and a polyaromatic hydrocarbon.
- 25

20. The method of claim 14, wherein the molar ratio of hydrophilic monomer:indicator component monomer is from about 2:1 to about 1000:1.

WO 02/12251

PCT/US01/24294

21. The method of claim 20, wherein the ratio of hydrophilic monomer:indicator component monomer is from about 5:1 to about 50:1.
22. The method of claim 21, wherein the ratio of hydrophilic monomer:indicator component monomer is about 5:1.
23. The method of claim 14, wherein the analyte detected is selected from the group consisting of a vicinal diol; an α -hydroxy acid; a β -keto acid; oxygen; carbon dioxide; zinc, potassium, hydrogen, or carbonate ions; a toxin; a mineral; and a hormone.
24. The method of claim 23, wherein the analyte detected is a vicinal diol which comprises a saccharide.
25. The method of claim 24, wherein the saccharide is glucose.
26. The method of claim 14, wherein
- i) the molar ratio of hydrophilic monomer:indicator component monomer is from about 2:1 to about 15:1,
 - ii) the indicator component monomer comprises an N-(o-boronobenzyl)aminomethylanthracene derivative,
 - iii) the hydrophilic monomer comprises [3-(methacryloylamino)propyl]trimethylammonium chloride, and
 - iv) the macromolecule exhibits an excimer effect.
27. A method for detecting the presence or concentration of an analyte in a sample having an aqueous environment, said method comprising:

WO 02/12251

PCT/US01/24294

- a) exposing the sample to an indicator macromolecule, said macromolecule comprising a copolymer of:
- i) one or more indicator component monomers which individually are not sufficiently water soluble to permit their use in an aqueous environment for detecting the presence or concentration of said analyte; and
 - ii) one or more hydrophilic monomers;
- such that the resulting macromolecule is capable of detecting the presence or concentration of said analyte in an aqueous environment, and wherein the indicator macromolecule has a detectable quality that changes in a concentration-dependent manner when said macromolecule is exposed to said analyte; and
- b) measuring any change in said detectable quality to thereby determine the presence or concentration of said analyte in said sample.
28. The method of claim 27, wherein the change in said detectable quality is an optical change.
29. The method of claim 27, wherein the indicator component monomer comprises an N-(o-boronobenzyl)aminomethylantracene derivative.
30. The method of claim 29, wherein the indicator component monomer is selected from the group consisting of
- 9-[[N-methacryloylaminopropyl-N-(o-boronobenzyl)amino]-methyl]anthracene;
 - 9-[N-[2-(5,5-dimethylborinan-2-yl)benzyl]-N-[3-(methacrylamido)propylamino]methyl]-10-[N-[2-(5,5-

WO 02/12251

PCT/US01/24294

- dimethylborinan-2-yl)benzyl]-N-[2-(2-hydroxyethoxy)-ethylamino]methyl]anthracene;
- 9-[N-(2-boronobenzyl)-N-[3-(methacrylamido)-propylamino]methyl]-10-[N-(2-boronobenzyl)-N-[2-(2-hydroxyethoxy)ethylamino]methyl]anthracene;
- 5 9,10-bis[N-[2-(5,5-dimethylborinan-2-yl)benzyl]-N-[3-(methacrylamido)propylamino]methyl]anthracene;
- 9,10-bis[N-(2-boronobenzyl)-N-[3-(methacrylamido)-propylamino]methyl]anthracene;
- 10 9-[N-[2-(5,5-dimethylborinan-2-yl)benzyl]-N-[2-(2-methacroyloxyethoxy)ethylamino]methyl]-10-[N-[2-(5,5-dimethylborinan-2-yl)benzyl]-N-[2-(2-hydroxyethoxy)-ethylamino]methyl]anthracene;
- 9-[N-(2-boronobenzyl)-N-[2-(2-methacroyloxyethoxy)-ethylamino]methyl]-10-[N-[2-boronobenzyl]-N-[2-(2-hydroxyethoxy)ethylamino]methyl]anthracene;
- 15 9,10-bis[N-[2-(5,5-dimethylborinan-2-yl)benzyl]-N-[2-(2-methacroyloxyethoxy)ethylamino]methyl]anthracene;
- 9,10-bis[N-(2-boronobenzyl)-N-[2-(2-methacroyloxyethoxy)ethylamino]methyl]anthracene;
- 20 N-[3-(methacrylamido)propyl]-3,4-dihydroxy-9,10-dioxo-2-anthracenesulfonamide;
- α,α' -bis[N-[2-(5,5-dimethylborinan-2-yl)benzyl]-N-[3-(methacrylamido)propylamino]-1,4-xylene;
- 25 and salts or derivatives thereof.

31. The method of claim 27, wherein the hydrophilic monomer comprises [3-(methacryloylamino)-propyl]trimethylammonium chloride.

32. The method of claim 27, wherein the indicator
- 30 component monomer is selected from the group consisting of a lanthanide chelate and a polyaromatic hydrocarbon.

WO 02/12251

PCT/US01/24294

33. The method of claim 27 wherein the molar ratio of hydrophilic monomer:indicator component monomer is from about 2:1 to about 1000:1.
34. The method of claim 33, wherein the ratio of hydrophilic monomer:indicator component monomer is from about 5:1 to about 50:1.
35. The method of claim 34 wherein the ratio of hydrophilic monomer:indicator component monomer is about 5:1.
36. The method of claim 27, wherein the analyte detected is selected from the group consisting of a saccharide; oxygen; carbon dioxide; and zinc, potassium, hydrogen, or carbonate ions.
37. The method of claim 36, wherein the analyte detected is a saccharide.
38. The method of claim 37, wherein the saccharide is glucose.
39. The method of claim 27, wherein
- i) the molar ratio of hydrophilic monomer:indicator component monomer is from about 2:1 to about 15:1,
 - ii) the indicator component monomer comprises an N-(o-boronobenzyl)aminomethylanthracene derivative,
 - iii) the hydrophilic monomer comprises [3-(methacryloylamino)propyl]trimethylammonium chloride, and
 - iv) the macromolecule exhibits an excimer effect.

WO 02/12251

PCT/US01/24294

40. The method of claim 39, wherein said macromolecule serves as both an indicator and a reference.

41. A macromolecule which is capable of exhibiting an excimer effect, which comprises a copolymer of:

- 5 a) one or more excimer forming monomers, the molecules of which are capable of exhibiting an excimer effect when suitably oriented with respect to each other; and
b) one or more other monomers;
such that the resulting macromolecule exhibits said
10 excimer effect.

42. The macromolecule of claim 41, wherein the macromolecule is capable of detecting the presence or concentration of an analyte.

43. The macromolecule of claim 42, wherein

- 15 a) the excimer forming monomer individually is not sufficiently water soluble to permit its use in an aqueous environment for detecting the presence or concentration of said analyte; and
b) the other monomer is a hydrophilic monomer;
20 such that the macromolecule is capable of detecting the presence or concentration of said analyte in an aqueous environment.

44. The macromolecule of claim 42, wherein the excimer effect does not substantially change in response to
25 changes in the presence or concentration of the analyte.

45. The macromolecule of claim 44, wherein

- i) the molar ratio of other monomer:excimer forming monomer is from about 2:1 to about 15:1,

WO 02/12251

PCT/US01/24294

- ii) the excimer forming monomer comprises an N-(o-boronobenzyl)aminomethylantracene derivative, and
- iii) the other monomer comprises {3-(methacryloylamino)propyl}trimethylammonium chloride.

5 46. The macromolecule of claim 41, wherein the excimer forming monomer is selected from the group consisting of a lanthanide chelate and a polyaromatic hydrocarbon.

47. The macromolecule of claim 45, wherein the excimer forming monomer is selected from the group consisting of
10 9-([N-methacryloylamino]propyl-N-(o-boronobenzyl)amino)-methyl]anthracene;

9-[N-[2-(5,5-dimethylborinan-2-yl)benzyl]-N-[3-(methacrylamido)propylamino]methyl]-10-[N-[2-(5,5-dimethylborinan-2-yl)benzyl]-N-[2-(2-hydroxyethoxy)-ethylamino]methyl]anthracene;

15 9-[N-(2-boronobenzyl)-N-[3-(methacrylamido)propylamino]methyl]-10-[N-(2-boronobenzyl)-N-[2-(2-hydroxyethoxy)ethylamino]methyl]anthracene;

9,10-bis[N-[2-(5,5-dimethylborinan-2-yl)benzyl]-N-[3-(methacrylamido)propylamino]methyl]anthracene;

20 9,10-bis[N-(2-boronobenzyl)-N-[3-(methacrylamido)propylamino]methyl]anthracene;

9-[N-[2-(5,5-dimethylborinan-2-yl)benzyl]-N-[2-(2-methacroyloxyethoxy)ethylamino]methyl]-10-[N-[2-(5,5-dimethylborinan-2-yl)benzyl]-N-[2-(2-hydroxyethoxy)-ethylamino]methyl]anthracene;

25 9-[N-(2-boronobenzyl)-N-[2-(2-methacroyloxyethoxy)ethylamino]methyl]-10-[N-(2-boronobenzyl)-N-[2-(2-hydroxyethoxy)ethylamino]methyl]anthracene;

30 9,10-bis[N-[2-(5,5-dimethylborinan-2-yl)benzyl]-N-[2-(2-methacroyloxyethoxy)ethylamino]methyl]anthracene;

WO 02/12251

PCT/US01/24294

9,10-bis[N-(2-boronobenzyl)-N-[2-(2-methacroyloxyethoxy)ethylamino)methyl]anthracene;
N-[3-(methacrylamido)propyl]-3,4-dihydroxy-9,10-dioxo-2-anthracenesulfonamide;
5 α,α' -bis[N-[2-(5,5-dimethylborinan-2-yl)benzyl]-N-[3-(methacrylamido)propylamino]-1,4-xylene;
and salts or derivatives thereof.

48. A method for producing a macromolecule which is capable of exhibiting an excimer effect, which method
10 comprises copolymerizing:
a) one or more excimer forming monomers, the molecules of which are capable of exhibiting an excimer effect when suitably oriented with respect to each other; and
b) one or more other monomers;
15 such that the resulting macromolecule exhibits said excimer effect.

49. The method of claim 48, wherein the macromolecule is capable of detecting the presence or concentration of an analyte.

20 50. The method of claim 49, wherein
a) the excimer forming monomer individually is not sufficiently water soluble to permit its use in an aqueous environment for detecting the presence or concentration of said analyte; and
25 b) the other monomer is a hydrophilic monomer;
such that the macromolecule is capable of detecting the presence or concentration of said analyte in an aqueous environment.

WO 02/12251

PCT/US01/24294

51. The method of claim 49, wherein the excimer effect does not substantially change in response to changes in the presence or concentration of the analyte.

52. The method of claim 51, wherein
- 5 i) the molar ratio of other monomer:excimer forming monomer is from about 2:1 to about 15:1,
 - ii) the excimer forming monomer comprises an N-(o-boronobenzyl)aminomethylanthracene derivative, and
 - 10 iii) the other monomer comprises [3-(methacryloylamino)propyl]trimethylammonium chloride.

53. The method of claim 48, wherein the excimer forming monomer is selected from the group consisting of a lanthanide chelate and a polyaromatic hydrocarbon.

54. The method of claim 52, wherein the excimer
- 15 forming monomer is selected from the group consisting of
 - 9-[N-methacryloylamino]propyl-N-(o-boronobenzyl)amino]-methyl]anthracene;
 - 9-[N-[2-(5,5-dimethylborinan-2-yl)benzyl]-N-[3-(methacrylamido)propylamino]methyl]-10-[N-[2-(5,5-
 - 20 dimethylborinan-2-yl)benzyl]-N-[2-(2-hydroxyethoxy)ethylamino]methyl]anthracene;
 - 9-[N-(2-boronobenzyl)-N-[3-(methacrylamido)propylamino]methyl]-10-[N-(2-boronobenzyl)-N-[2-(2-hydroxyethoxy)ethylamino]methyl]anthracene;
 - 25 9,10-bis[N-[2-(5,5-dimethylborinan-2-yl)benzyl]-N-[3-(methacrylamido)propylamino]methyl]anthracene;
 - 9,10-bis[N-(2-boronobenzyl)-N-[3-(methacrylamido)propylamino]methyl]anthracene;
 - 9-[N-[2-(5,5-dimethylborinan-2-yl)benzyl]-N-[2-(2-
 - 30 methacryloyloxyethoxy)ethylamino]methyl]-10-[N-[2-(5,5-

WO 02/12251

PCT/US01/24294

- dimethylborinan-2-yl)benzyl]-N-[2-(2-hydroxyethoxy)-ethylamino]methyl]anthracene;
 9-[N-(2-boronobenzyl)-N-[2-(2-methacroyloxyethoxy)-ethylamino]methyl]-10-[N-(2-boronobenzyl)-N-[2-(2-hydroxyethoxy)ethylamino]methyl]-anthracene;
 5 9,10-bis[N-[2-(5,5-dimethylborinan-2-yl)benzyl]-N-[2-(2-methacroyloxyethoxy)ethylamino]methyl]anthracene;
 9,10-bis[N-(2-boronobenzyl)-N-[2-(2-methacroyloxyethoxy)ethylamino]methyl]anthracene;
 10 N-[3-(methacrylamido)propyl]-3,4-dihydroxy-9,10-dioxo-2-anthracenesulfonamide;
 α,α' -bis[N-[2-(5,5-dimethylborinan-2-yl)benzyl]-N-[3-(methacrylamido)propylamino]-1,4-xylene;
 and salts or derivatives thereof.
- 15 55. A method for detecting the presence or concentration of an analyte in a sample, said method comprising:
 a) exposing the sample to an indicator macromolecule, said macromolecule comprising a copolymer of:
 20 i) one or more indicator component monomers, the molecules of which are capable of exhibiting an excimer effect when suitably oriented with respect to each other, and which are also capable of
 25 detecting the presence or concentration of an analyte; and
 ii) one or more other monomers;
 such that the resulting macromolecule exhibits said excimer effect, and wherein the indicator macromolecule
 30 has a detectable quality that changes in a concentration-dependent manner when said macromolecule is exposed to said analyte; and

WO 02/12251

PCT/US01/24294

b) measuring any change in said detectable quality to thereby determine the presence or concentration of said analyte in said sample.

56. The method of claim 55, wherein the excimer effect
5 does not substantially change in response to changes in the presence or concentration of the analyte.

57. The method of claim 56, wherein
i) the molar ratio of other monomer:indicator component monomer is from about 2:1 to about 15:1,
10 ii) the indicator component monomer comprises an N-(o-boronobenzyl)amino)methyl]anthracene derivative, and
iii) the other monomer comprises [3-(methacryloylamino)propyl]trimethylammonium chloride.

58. The method of claim 55, wherein the indicator
15 component monomer is selected from the group consisting of a lanthanide chelate and a polyaromatic hydrocarbon.

59. The method of claim 57, wherein the indicator component monomer is selected from the group consisting of
20 9-[[N-methacryloylamino]propyl-N-(o-boronobenzyl)amino]-methyl]anthracene;
9-[N-(2-boronobenzyl)-N-[3-(methacrylamido)-propylamino]methyl]-10-[N-[2-(5,5-dimethylborinan-2-yl)benzyl]-N-[2-(2-hydroxyethoxy)ethylamino]-methyl]anthracene;
25 9-[N-(2-boronobenzyl)-N-[2-(2-methacryloxyethoxy)-ethylamino]methyl]-10-[N-(2-boronobenzyl)-N-[2-(2-hydroxyethoxy)ethylamino]methyl]-anthracene; and

WO 02/12251

PCT/US01/24294

9,10-bis[N-(2-boronobenzyl)-N-[2-(2-methacroyloxyethoxy)ethylamino]methyl]anthracene;
and salts or derivatives thereof.

WO 02/12251

PCT/US01/24294

1/9

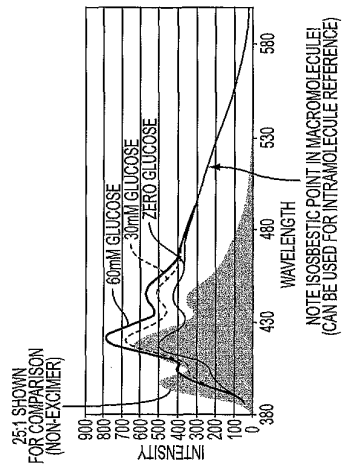


FIG. 1

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/12251

PCT/US01/24294

2/9

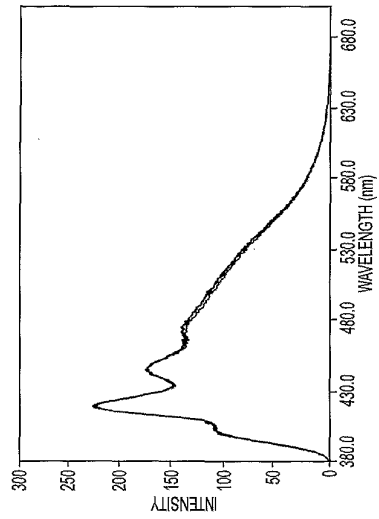


FIG. 2



WO 02/12251

PCT/US01/24294

4/9

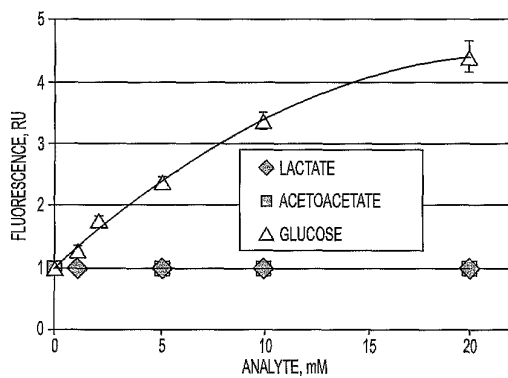


FIG. 4

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/12251

PCT/US01/24294

5/9

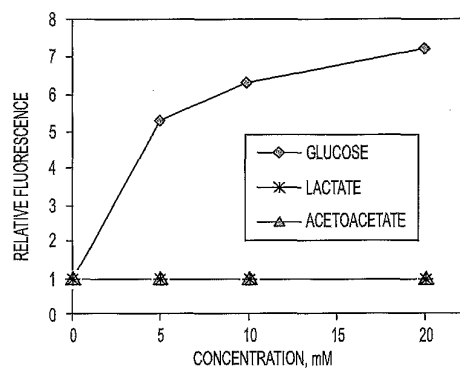


FIG. 5

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/12251

PCT/US01/24294

6/9

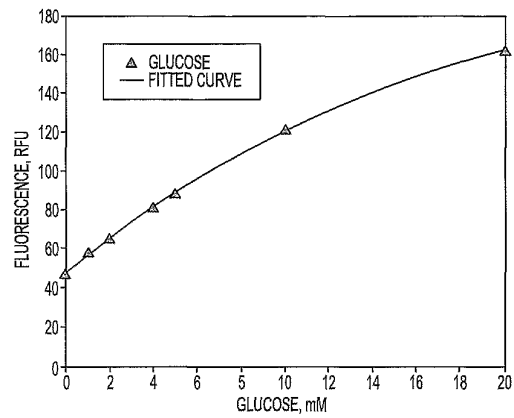


FIG. 6

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/12251

PCT/US01/24294

7/9

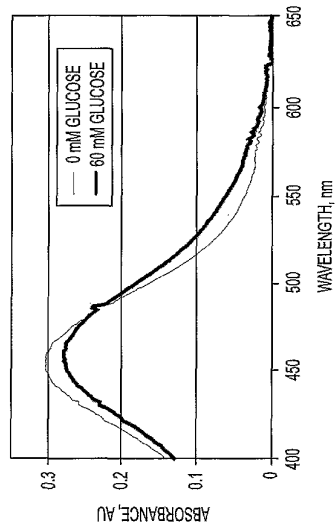


FIG. 7

WO 02/12251

PCT/US01/24294

8/9

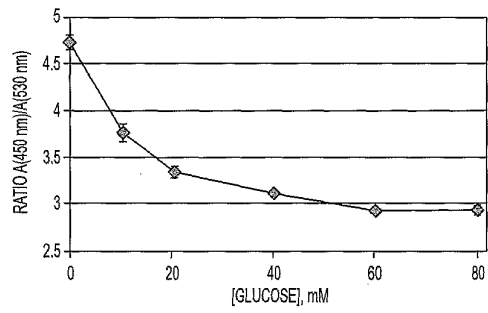


FIG. 8

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/12251

PCT/US01/24294

9/9

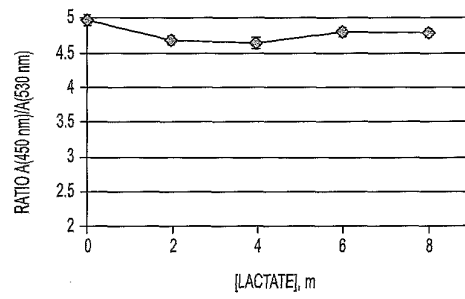


FIG. 9

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/US 01/24294
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C07F5/02 C07F5/04 G01N33/66		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C07F 601N C12Q		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 0 430 510 A (GEN ELECTRIC CO PLC) 5 June 1991 (1991-06-05) abstract, col. 1, lines 25 - 45, col. 2, lines 12 - 15, col. 3, line 38 - col. 4, line 15, claims 1 - 6	1-4, 7-9, 14-18, 20-22, 27-31, 33-35
X	US 5 661 040 A (HORNG WAYNE J ET AL) 26 August 1997 (1997-08-26) abstract, col. 3, lines 43 - 67, col. 6, line 45 - col. 7, line 8, examples 1 - 5 -/-	1-9, 14-22, 27-35
☒ Further documents are listed in the continuation of box C. ☒ Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents: *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another claim or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art *S* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 10 December 2001		Date of mailing of the international search report 18/12/2001
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. 5016 Patentien 2 NL - 5200 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 240-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax. (+31-70) 240-3016		Authorized officer Hoese1, H

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2002)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International Application No.
 PCT/US 01/24294

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5 256 535 A (HURSKAINEN PERTTI ET AL) 26 October 1993 (1993-10-26) abstract, col. 4, lines 22 - 42, col. 5, lines 32 - 52, line 65 - col. 6, line 8, col. 8, line 12 - col. 9, line 3, examples 4, 5 -----	1-9, 14-22, 27-35
X	WO 99 46600 A (SENSORS FOR MEDICINE AND SCIEN) 16 September 1999 (1999-09-16) p. 6, lines 10 - 15 and 30 - 35, p. 13, lines 6 - p. 34, p. 24, line 1 - p. 25, line 18 -----	1-6, 10-12, 14-19, 23-25, 27-32, 36-38
X	NEZU T ET AL: "Interaction of water-soluble collagen with poly(acrylic acid) - a study of poly(acrylic acid)s labelled with pyrenyl and naphthyl groups" BIOMATERIALS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS BV., BARKING, GB, vol. 21, no. 4, February 2000 (2000-02), pages 415-419, XP004184125 ISSN: 0142-9612 abstract, p. 416, 2.1. Materials -----	1,2,6, 14,15, 19,27, 28,32, 41-43, 46, 48-50, 53,55,58
X	GRUBER H J ET AL: "Accurate titration of avidin and streptavidin with biotin-fluorophore conjugates in complex, colored biofluids" BBA - GENERAL SUBJECTS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, NL, vol. 1381, no. 2, 23 July 1998 (1998-07-23), pages 203-212, XP004276163 ISSN: 0304-4165 abstract, p. 204/205, "2.1. Reagents and buffers", "2.3. Cumulative titration of...", p. 205, col. 2, line 1 - p. 206, col. 2, line 20 -----	1,2,6, 14,15, 19,27, 28,32, 41-43, 46, 48-50, 53,55,58
X	WILKEN R ET AL: "END-GROUP DYNAMICS OF FLUORESCENTLY LABELED DENDRIMERS" MACROMOLECULAR: RAPID COMMUNICATIONS, WILEY VCH, WEINHEIM, DE, vol. 18, no. 8, 1 August 1997 (1997-08-01), pages 659-665, XP000698405 ISSN: 1022-1336 abstract, p. 559, last paragraph. p. 664, lines 26 - 32 -----	41,42, 46,48,49

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1993)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/US 01/24294

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0430510 A	05-06-1991	EP 0430510 A2	05-06-1991
		GB 2238384 A	29-05-1991
		JP 3255959 A	14-11-1991
		US 5225516 A	06-07-1993
US 5661040 A	26-08-1997	AU 7331794 A	13-02-1995
		CA 2172999 A1	26-01-1995
		EP 0708837 A1	01-06-1996
		JP 9500411 T	14-01-1997
US 5256535 A	26-10-1993	WO 9502700 A1	26-01-1995
		SE 454781 B	30-05-1988
		AT 85367 T	15-02-1993
		DE 3784058 D1	18-03-1993
		DE 3784058 T2	19-05-1993
		EP 0288513 A1	02-11-1988
		JP 1501681 T	15-06-1989
		SE 8604436 A	18-04-1988
WO 9946600 A	16-09-1999	WO 8802784 A1	21-04-1988
		AU 3078599 A	27-09-1999
		CN 1300368 T	20-06-2001
		EP 1062516 A1	27-12-2000
		WO 9946600 A1	16-09-1999

フロントページの続き

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,UA,UG,UZ,VN,YU,ZA,ZW

(74)代理人 100096013

弁理士 富田 博行

(74)代理人 100083747

弁理士 狩野 剛志

(72)発明者 コルヴィン, アーサー・イー, ジュニア

アメリカ合衆国メリーランド州 2 1 7 7 1, マウント・エアリー, バルティモア・ナショナル・パーク 4 1 5 5

Fターム(参考) 4J031 BA09 BA13 BA28 BD03 BD07 BD09

4J100 AL08Q AM21P AM21Q BA02Q BA03Q BA06Q BA28Q BA31Q BA33P BA59Q

BB01P BC43Q BC48Q BC51Q CA04 JA15