

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号
特許第5017377号
(P5017377)

(45) 発行日 平成24年9月5日 (2012.9.5)

(24) 登録日 平成24年6月15日 (2012.6.15)

(51) Int.Cl.	F I
GO 1 N 21/78 (2006.01)	GO 1 N 21/78 C
GO 1 N 33/66 (2006.01)	GO 1 N 33/66 A
GO 1 N 33/84 (2006.01)	GO 1 N 33/84 A
GO 1 N 21/64 (2006.01)	GO 1 N 21/64 Z
CO 9 K 11/06 (2006.01)	CO 9 K 11/06

請求項の数 21 (全 35 頁)

(21) 出願番号	特願2009-549167 (P2009-549167)	(73) 特許権者	505370235
(86) (22) 出願日	平成20年1月28日 (2008.1.28)		グルメトリクス, インコーポレイテッド
(65) 公表番号	特表2010-518397 (P2010-518397A)		アメリカ合衆国 カリフォルニア 926
(43) 公表日	平成22年5月27日 (2010.5.27)		18, アーバイン, バランカ パーク
(86) 国際出願番号	PCT/US2008/052204		ウェイ 15375, スイート アイー
(87) 国際公開番号	W02008/097747		108
(87) 国際公開日	平成20年8月14日 (2008.8.14)	(74) 代理人	100100549
審査請求日	平成23年1月18日 (2011.1.18)		弁理士 川口 嘉之
(31) 優先権主張番号	11/671,880	(74) 代理人	100090516
(32) 優先日	平成19年2月6日 (2007.2.6)		弁理士 松倉 秀実
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100106622
			弁理士 和久田 純一
		(74) 代理人	100089244
			弁理士 遠山 勉

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 pH及びグルコースの光学的決定

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

2つ又はそれより多くの分析物濃度の決定に用いるための光学センサーであって、
光路を規定し、血管内配置のための大きさに作られた光ファイバーと、該光ファイバーに会合され、少なくとも部分的に光路内に配置された指示薬系を含み、前記指示薬系は、

第一分析物の濃度に応じて少なくとも第一及び第二の異なる形態で存在するフルオロフォアであって、前記異なる形態がそれらのそれぞれの第一の放出及び第二の放出に基づいて区別され得るフルオロフォアと 第二分析物を結合する結合部分であって、該結合部分が前記フルオロフォアと操作可能的に結合され、そして前記結合部分による前記第二分析物の結合が前記第二分析物の濃度に関連づけられる前記フルオロフォアの見掛けの濃度における光学的変化を引き起こす結合部分とを含み、

前記第一の放出及び前記第二の放出の比は前記第二分析物の濃度とは無関係である、光学センサー。

【請求項 2】

前記フルオロフォアが蛍光染料である請求項 1 記載の光学センサー。

【請求項 3】

前記蛍光染料が独立した化合物である請求項 2 記載の光学センサー。

【請求項 4】

前記蛍光染料が H P T S、S N A R F - 1、S N A F L - 1、テトラキス (4 - スルホ

フェニル) ポルフィン及びその誘導体から選択される請求項 3 記載の光学センサー。

【請求項 5】

前記蛍光染料が、HPTS - CysMA、HPTS - LysMA 及びそれらで構成されるポリマーから成る群から選択される請求項 2 記載の光学センサー。

【請求項 6】

前記結合部分が消光剤、及び第二分析物を可逆的に結合するための 1 つ又は複数の結合部位を含む請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項記載の光学センサー。

【請求項 7】

前記消光剤がビオロゲンである請求項 6 記載の光学センサー。

【請求項 8】

前記 1 つ又は複数の結合部位がフェニルボロン酸基を含む請求項 6 記載の光学センサー。

【請求項 9】

前記結合部分がビオロゲン - ボロン酸付加物である請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項記載の光学センサー。

【請求項 10】

前記結合部分が 3, 3' - oBBV 又はその誘導体である請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項記載の光学センサー。

【請求項 11】

前記光学センサーが生理学的適合性物質を含む請求項 1 ~ 10 のいずれか 1 項記載の光学センサー。

【請求項 12】

前記第一分析物が H^+ (pH) である請求項 1 ~ 11 のいずれか 1 項記載の光学センサー。

【請求項 13】

前記第二分析物がポリヒドロキシル化合物である請求項 12 記載の光学センサー。

【請求項 14】

前記ポリヒドロキシル化合物がグルコースである請求項 13 記載の光学センサー。

【請求項 15】

前記指示薬系が前記フルオロフォア及び前記結合部分を固定するための手段をさらに包含する請求項 1 ~ 14 のいずれか 1 項記載の光学センサー。

【請求項 16】

前記固定するための手段がヒドロゲルを包含する請求項 15 記載の光学センサー。

【請求項 17】

前記指示薬系の前記フルオロフォア及び結合部分が単一分子を含む請求項 1 ~ 16 のいずれか 1 項記載の光学センサー。

【請求項 18】

請求項 1 ~ 17 のいずれか 1 項記載の光学センサーと励起光源と放出光検出器とを包含する、2 つ又はそれより多くの分析物濃度を決定するためのデバイス。

【請求項 19】

制御装置をさらに包含する請求項 18 記載のデバイス。

【請求項 20】

血中 pH 及びグルコース濃度の決定に用いるためのセンサーであって、
血管内配置のための大きさに作られる光ファイバーを含み、
水不溶性ポリマーマトリックスであって、該ポリマーマトリックスはグルコースに対して透過性である水不溶性ポリマーマトリックス；
前記ポリマーマトリックスと会合される蛍光染料であって、該蛍光染料は pH に応じて少なくとも第一及び第二の異なる形態を示し、該異なる形態はそれらのそれぞれの第一の放出及び第二の放出に基づいて区別され得る蛍光染料；

血中グルコース濃度に関連づけられる量のグルコースを可逆的に結合するようになって

いる芳香族ボロン酸置換ビオロゲンを含む消光剤であって、該消光剤は前記ポリマーマトリックスと会合されかつ蛍光染料と操作可能的に結合され、そして該消光剤は結合ポリヒドロキシル化合物の量に関連づけられる前記蛍光染料により放出される光を調整するように設計される、消光剤、

をさらに含むセンサー。

【請求項 2 1】

請求項 2 0 項に記載のセンサーと少なくとも 1 つの励起光源と放出光検出器とを包含する、血中 pH 及びグルコース濃度を決定するためのデバイス。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

10

【0001】

本発明の実施形態は、単一指示薬系を用いて同時に 2 つの分析物を測定し得る光学センサーに関する。好ましい実施形態では、センサーは、レシオメトリック pH 感知を促す酸形態及び塩基形態を有する蛍光染料を含み、この場合、染料はグルコース結合部分とさらに会合され、そしてグルコースの濃度に伴って強度が変わるシグナルを生じるように構成される。

【背景技術】

【0002】

体液中のポリヒドロキシル化合物（例えばグルコース）濃度を測定するための蛍光技法を用いるために、長年に亘って努力がなされており、今も進行中である。しかしその努力にもかかわらず、*in vivo* モニタリングのための実用的な系は開発されておらず、市販されていない。ボロン酸基と会合された染料を用いて蛍光によりグルコースを検出するためにいくつかの試みがなされてきた。ボロン酸塩部分は、グルコースを可逆的に結合する。ボロン酸官能基化蛍光染料がグルコースを結合する場合、グルコースの濃度に関連したシグナルが発生され、そして検出され得るよう、染料の特性は影響を及ぼされる。これらの変化は、グルコース濃度を測定するために従来用いられてきた。

20

【0003】

Russell（特許文献 1 及び特許文献 2）は、グルコースを結合し、グルコース濃度に関連したシグナルを発生するボロン酸官能基化染料を用いた。James 他（特許文献 3）は、同様の原理を用いたが、しかし単一複合体中で蛍光染料、アミン消光機能性及びボロン酸を組み合わせた。複合体からの蛍光放出は、結合しているグルコースの量に伴って変化した。Van Antwerp 他（特許文献 4 及び特許文献 5）は、前に引用した参考文献の特徴を組み合わせ、そして埋め込み可能であると主張されるデバイスを開示している。A.E. Colvin, Jr.（特許文献 6）も、ボロン酸塩官能基化染料を利用するヒトにおける *in situ* 感知のための光学ベースの感知デバイスを開示している。

30

【0004】

血液又は体液を用いる或る測定可能なパラメーター、例えば pH 並びに O_2 、 CO_2 、 Na^+ 、 K^+ 及びポリヒドロキシル化合物、例えばグルコースの濃度は、*in vivo* で決定されている。患者をモニタリングする場合、このような分析物をしばしば決定することが必要であるため、これらの測定を *in vivo* で実行する能力は重要である。典型的には、各分析物に関する一センサーは、患者の血管（単数又は複数）中に配置されている。いくつかの分析物を測定することが望ましい場合、複数のセンサーがしばしば必要とされ、これが患者に対する付随的不快並びに電子モニタリング装置の複雑性を生じ得る。

40

【0005】

in vivo モニタリングのための物理的寸法の制限により持ち出されるデザイン問題を解決しようと努力して、異なる染料を 1 つのデバイスに組み入れて、2 つのパラメーターの同時読取を得た人達もいた。例えば Alder 他（特許文献 7）は、1 つのセンサーで 2 つの異なる染料を用いて水性試料の pH 及びイオン強度を光学的に決定する方法を開示している。Gray 他（特許文献 8）は、固定化 pH 感受性染料及びカリウム又はカルシウム感受性蛍光染料を伴う親水性ポリマーを組み入れて、pH と一緒に分析物濃度を測定する

50

光ファイバーデバイスの使用を教示している。特許文献 9 において、Kane も、血中の pH 及び酸素含量の同時測定のための複合膜中に埋め込まれた 2 つの染料の使用を開示している。しかしながら、単一センサー中への多数の染料の組み入れは、このようなセンサーの製造を複雑にする。

【 0 0 0 6 】

特に集中治療設定において、モニタリングされている各分析物に関する別個の留置センサー、並びに多染料センサーに関連した上記の問題に加えて、多数の染料ベースの分析物センサーに関連した別の問題は、pH 感受性である。pH におけるわずかな変化は、蛍光放出を変更するか又は弱め、そして不正確な読取を引き起こし得る。この問題は、その血中 pH が急速に変動し得る糖尿病患者における血中グルコースレベルをモニタリングするためには特に深刻である。正確な血中グルコースレベル測定はこれらの患者を治療するためには不可欠であるため、別個の留置型 pH 及び分析物センサー、又は多染料を有するセンサーを必要とせずに、pH 作用の実時間補正を促すグルコースセンサーに対する有意の必要性が存在する。

【 0 0 0 7 】

蛍光染料（単数又は複数）を用いるレシオメトリック pH 決定が知られている。酸形態及び塩基形態を有するフルオロフォアを考えると、2 つの形態の放出強度の比は、フルオロフォア濃度に対して非感受性である pH の測定値として用いられ得る。例えば、特許文献 10（HPTS 由来 pH 感受性染料を記載）（この記載内容の全体は参照により本明細書中で援用される）；非特許文献 1（蛍光レシオメトリック測定のための指示薬としての pH 感受性染料 メソ - 5 , 10 , 15 , 20 - テトラ - (4 - アリルオキシフェニル) ポルフィリン (TAPP)、並びに参照としての pH 非感受性ベンゾチオキサンテン誘導体を記載）；非特許文献 2（フルオロフォア、カルボキシセミナフトロダフルオル - 1 を用いる二重放出レシオメトリック画像法（その放出スペクトルの pH 依存性シフトを示す）を開示）；並びに非特許文献 3（波長 - レシオメトリック的方法での pH に伴うスペクトルシフト及び強度変化を示す 6 - アミノキノリウムボロン酸染料の使用を記載）参照。

【 先行技術文献 】

【 特許文献 】

【 0 0 0 8 】

【 特許文献 1 】 米国特許第 5 , 1 3 7 , 8 3 3 号

【 特許文献 2 】 米国特許第 5 , 5 1 2 , 2 4 6 号

【 特許文献 3 】 米国特許第 5 , 5 0 3 , 7 7 0 号

【 特許文献 4 】 米国特許第 6 , 0 0 2 , 9 5 4 号

【 特許文献 5 】 米国特許第 6 , 0 1 1 , 9 8 4 号

【 特許文献 6 】 米国特許第 6 , 3 0 4 , 7 6 6 号

【 特許文献 7 】 米国特許第 5 , 9 2 2 , 6 1 2 号

【 特許文献 8 】 米国特許第 5 , 1 7 6 , 8 8 2 号

【 特許文献 9 】 米国特許第 4 , 7 8 5 , 8 1 4 号

【 特許文献 10 】 米国特許出願公開第 2 0 0 5 / 0 0 9 0 0 1 4 号

【 非特許文献 】

【 0 0 0 9 】

【 非特許文献 1 】 Niu C.G. et al. 2005 Anal. Bioanal. Chem. 383(2): 349-357

【 非特許文献 2 】 Turner N.G. et al. 1998 J. Investig. Dermatol. Symp. Proc. Aug 3 (2): 110-3

【 非特許文献 3 】 Badugu R. et al. 2005 Talanta 66: 569-574

【 発明の概要 】

【 発明が解決しようとする課題 】

【 0 0 1 0 】

しかしながら、pH 及びグルコースの連続血管内モニタリング（この場合、グルコース

10

20

30

40

50

測定値はpH作用に関して補正され得る)を提供するよう適合されたセンサーに対する実質的に満たされていない必要性についての本発明者の認識にもかかわらず、フルオロフォア濃度と無関係であるレシオメトリックpH測定を実行するのに適した特性を示す単一フルオロフォアを含むセンサーを用いる(この場合、同一フルオロフォアはグルコースを結合し、そしてその強度がグルコース濃度と関連するシグナルを生じるよう官能基化される)ことを開示した人はいないし、示唆することさえなされていない。

【課題を解決するための手段】

【0011】

本発明の好ましい実施の形態によれば、2つ又はそれより多くの分析物濃度を決定するためのデバイスが開示される。デバイスは、光学センサーであって、第一分析物の濃度に 10
応じて少なくとも第一及び第二の異なる形態で存在するフルオロフォアであって、異なる形態がそれらのそれぞれの第一の放出及び第二の放出に基づいて区別され得るフルオロフォア;第二分析物を結合する結合部分であって、結合部分がフルオロフォアと操作可能的に結合され、そして結合部分による第二分析物の結合が第二分析物の濃度に関連づけられるフルオロフォアの見掛けの濃度における光学的变化を引き起こす結合部分を含む指示薬系を含む光学センサーであって、第一の放出及び第二の放出は第二分析物の濃度とは実質的に無関係である、センサーと、光源と、検出器とを包含する。

【0012】

いくつかの実施の形態では、フルオロフォアが蛍光染料である。いくつかの実施の形態では、蛍光染料が独立した化合物である。いくつかの好ましい別個の蛍光染料がHPTS 20
、SNARF-1、SNAFL-1、TSPP及びその誘導体から選択され得る。

【0013】

いくつかの実施の形態では、好ましい蛍光染料がHPTS-CysMA、HPTS-LysMA及びそれで構成されるポリマーから成る群から選択される。

【0014】

いくつかの実施の形態による結合部分が消光剤並びに第二分析物を可逆的に結合するための1つ又は複数の結合部位を含む。消光剤が好ましくはビオロゲンである。1つ又は複数の結合部位が好ましくはベンジルボロン酸基を含む。いくつかの実施の形態では、結合部分がビオロゲン-ボロン酸付加物である。好ましい一実施の形態では、結合部分が3, 3'-oBBV又はその誘導体である。 30

【0015】

好ましい実施の形態では、光学センサーが生理学的適合性物質を含み、血管内配置のための大きさに作られる。

【0016】

一実施の形態では、第一分析物が H^+ (pH)である。別の実施の形態では、第二分析物がポリヒドロキシル化合物、好ましくはグルコースである。

【0017】

いくつかの実施の形態では、デバイスは制御装置をさらに包含する。

【0018】

特定の好ましい実施の形態による指示薬系がフルオロフォア及び結合部分を固定するための手段をさらに包含する。固定手段が好ましくはヒドロゲルを包含する。一実施の形態では、指示薬系のフルオロフォア及び結合部分が単一分子を含む。 40

【0019】

本発明の好ましい一実施の形態では、血中pH及びグルコース濃度を決定するためのデバイスが開示される。デバイスは、血管内配置のための大きさに作られる光ファイバーを含むセンサーを包含する。該センサーは、水不溶性ポリマーマトリックスであって、該ポリマーマトリックスはグルコースに対して透過性である、水不活性ポリマーマトリックス;該ポリマーマトリックスと会合される蛍光染料であって、該蛍光染料はpHに応じて少なくとも第一及び第二の異なる形態を示し、この場合、異なる形態はそれらのそれぞれの第一の放出及び第二の放出に基づいて区別され得る蛍光染料;血中グルコース濃度に関連 50

づけられる量のグルコースを可逆的に結合するようになっている芳香族ボロン酸置換ピオロゲンを含む消光剤であって、該消光剤はポリマーマトリックスと会合されるか又は蛍光染料と操作可能的に結合され、そしてまた該消光剤は結合ポリヒドロキシル化合物の量に関連づけられる蛍光染料により放出される光を調整するよう設計される、消光剤を包含し、少なくとも1つの励起光源と、放出光検出器とをさらに包含する。

【0020】

一蛍光染料による血中pH及びグルコース濃度の決定方法も開示される。方法は、上述したデバイスのいずれかを提供するステップと、血管内にセンサーを挿入するステップと、第一の励起波長でセンサーを照射するステップと、放出波長でセンサーの第一の蛍光放出を検出するステップと、第二の励起波長でセンサーを照射するステップと、放出波長でセンサーの第二の蛍光放出を測定するステップと、血中pHをレシオメトリック決定するステップと、pHに関して補正された血中グルコース濃度を決定するステップとを包含する。

10

【0021】

一変形では、方法はまた、第一の蛍光放出及び第二の蛍光放出の強度の比を算定するステップと、比をpH標準曲線と比較することにより試料のpHを決定するステップと、標準グルコース応答曲線を選択するステップであって、該標準グルコース応答曲線は決定pHに対応している、選択するステップと、第一の蛍光放出又は第二の蛍光放出を標準グルコース応答曲線と比較することによりグルコース濃度を決定するステップとを包含し得る。

20

【図面の簡単な説明】

【0022】

【図1】本発明の一実施形態の感知メカニズムを示すフローチャートである。

【図2】本発明の好ましい一実施形態に従ったグルコース及びpHセンサー、並びに2つの励起光源及び2つの検出器を含む光学系を示す図である。

【図3】異なるpHでのHPTSの吸収スペクトルを示す図である。

【図4】 $I_{(塩基)} / I_{(等吸収点)}$ 比を用いるHPTS / MABP4を用いたレシオメトリックpH感知の、グルコース濃度からの独立性を示す図である。454nm(塩基)及び422nm(等吸収点)での励起に対応する蛍光放出対種々のグルコース濃度でのpHの比として、データをプロットする。

30

【図5】異なるpHで422nm(等吸収点)で励起されるHPTS / MABP4に関するグルコース応答曲線を示す図である。

【図6】溶液中の異なるpHでのSNARF-1の吸収スペクトルを示す図である。

【図7】514nmで励起され/587nmで放出される異なるpHで溶液中でのSNARF-1 / 3,3'-oBBVに関するグルコース応答曲線を示す図である。

【図8】514nmで励起され/625nmで放出される異なるpHで溶液中でのSNARF-1 / 3,3'-oBBVに関するグルコース応答曲線を示す図である。

【図9】 $I_{(塩基)} / I_{(酸)}$ 比を用いる溶液中のSNARF-1 / 3,3'-oBBVによる異なるグルコース濃度でのpHのレシオメトリック感知を示す図である。

【図10】異なるpHでのHPTS-トリLysMA / 3,3'-oBBV / DMAAに関するグルコース応答曲線を示す図である。

40

【図11】 $I_{(塩基)} / I_{(酸)}$ 比を用いるHPTS-トリLysMA / 3,3'-oBBV / DMAAを用いた異なるグルコース濃度でのpHのレシオメトリック感知を示す図である。

【図12】指示薬系が $I_{(塩基)} / I_{(酸)}$ 比を用いて光ファイバーの末端上に固定されるHPTS-トリCysMA / 3,3'-oBBV / DMAAを用いた異なるグルコース濃度でのpHのレシオメトリック感知を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0023】

好ましい一実施形態において、本発明は、単一指示薬系を用いて2つの分析物を測定し

50

得る光学センサーに向けられる。さらに詳細には、好ましいセンサーは、以下のために単一フルオロフォア（例えば蛍光染料）を用いる：（１）レシオメトリック法により、第一分析物、例えば H^+ （ pH ）の濃度を決定するため（この場合、このような決定はフルオロフォアの濃度と無関係である）；そして（２）見掛けのフルオロフォア濃度（例えば励起時のフルオロフォアの放出強度）を測定することにより、第二分析物、例えばポリヒドロキシル化合物（例えば好ましくはグルコース）の濃度を決定するため（この場合、見掛けのフルオロフォア濃度は第二分析物の濃度に依存する）。さらに、第二分析物濃度の測定値が第一分析物濃度に応じて決まる場合（例えばグルコース測定値が pH に伴って変わる光学系において - この分野における共通問題）には、本発明の好ましい実施形態に従って、測定第二分析物濃度は第一分析物濃度の寄与のために補正され得る。センサーは、好ましくは水性媒質（例えば生理学的媒質、血液、間質液等）中で安定であり、さらに好ましくは、センサーは、それが或る期間留置したままであり得る血管中に挿入されるよう設計される。したがって本発明の好ましい実施形態に従って、血管内配置のために設計される光学センサーが開示され、このセンサーは、単一指示薬系を用いて２つの分析物（好ましくは pH 及びグルコース）を測定し、そして pH の任意の寄与に関してグルコース測定値を補正し得る。

10

【００２４】

センサーの好ましい実施形態は、とりわけ、レシオメトリック pH 感知に向けられるが、しかしその濃度が第一分析物の濃度と関連する少なくとも２つの形態で存在するフルオロフォアを指示薬系が含み、そしてその放出比がフルオロフォア濃度と無関係である限り、本発明のより広範な範囲に従って、他の第一分析物濃度は決定され得る。同様に、グルコースは本明細書中では第二分析物例として用いられるが、しかし溶液中の他のポリヒドロキシル含有有機化合物（炭水化物、１，２ - ジオール、１，３ - ジオール等）の濃度は、第二分析物を結合する結合部分と操作可能的に結合されるフルオロフォアを指示薬系が含む限り、本発明の実施形態を用いて決定され得ると理解される（この場合、フルオロフォアのシグナル強度は第二分析物の濃度に伴って変わる）。いくつかの実施形態では、第二分析物の濃度は、非炭水化物を含み得る。

20

【００２５】

指示薬系

本発明の好ましい実施形態に従って用いられる指示薬系は、分析物結合部分と操作可能的に結合されるフルオロフォアを含み、この場合、分析物結合はフルオロフォア濃度における見掛けの光学的変化（例えば放出強度）を引き起こす。さらに、レシオメトリック pH 感知が可能にされ得るよう、フルオロフォアはスペクトル特性における検出可能な差を示す異なる酸形態及び塩基形態を有する、ということが望ましい。例えば、 $HPTS - \text{トリリスMA}$ （以下で詳細に記載される）のような蛍光染料と操作可能的に結合されるグルコース結合部分、例えば $3, 3' - oBBV$ （以下で詳細に記載される）は、蛍光染料の放出強度を抑制するが、この場合、消光の程度はグルコース結合時に低減され、グルコース濃度に関連した放出強度の増大を生じる。好ましい実施形態では、指示薬系は、少なくとも２つの陰イオン基を有する染料、及び少なくとも２つのボロン酸を有する消光剤を含む。さらなる好ましい実施形態では、反応（消光）するために互いに十分に物理的に近いままであるよう、指示薬系は感知部分（例えば染料 - 消光剤）を固定するための手段も含む。 $in vivo$ 感知が望ましい場合、このような固定化手段は、好ましくは水性環境（例えば血管内）中で不溶性であり、標的分析物に対して透過性であり、そして感知部分に対して不透過性である。典型的には、固定化手段は、水不溶性有機ポリマーマトリックスを含む。例えば $HPTS - \text{トリリスMA}$ 染料及び $3, 3' - oBBV$ 消光剤は、 $DMAA(N, N - \text{ジメチルアクリルアミド})$ ヒドロゲルマトリックス（以下で詳細に記載される）内で有効に固定され、これが $in vivo$ での pH 及びグルコース感知を可能にする。

30

40

【００２６】

いくつかの例示的及び好ましいフルオロフォア、分析物結合部分及び固定するための手

50

段は、以下でさらに詳細に記述される。

【 0 0 2 7 】

フルオロフォア

「フルオロフォア」は、特定波長での光に照らされた場合、より長い波長での光を放出する、即ちそれが蛍光発光する物質を指す。フルオロフォアとしては有機染料、有機金属化合物、金属キレート化合物、蛍光共役ポリマー、量子ドット又はナノ粒子、並びに上記のものの組み合わせが挙げられるが、これらに限定されない。フルオロフォアは、ポリマーに結合される別個の部分又は置換基であり得る。

【 0 0 2 8 】

好ましい実施形態に用いられ得るフルオロフォアは、約 4 0 0 n m 以上の波長の光により励起され、励起及び放出波長が少なくとも 1 0 n m だけ分離可能であるのに十分に大きいストークスシフトを有する。いくつかの実施形態では、励起及び放出波長間の分離は約 3 0 n m 以上であり得る。これらのフルオロフォアは、好ましくは、電子受容体分子、例えばピオロゲンによる消光に対して感受性であり、そして光退色に対して抵抗性である。それらはさらにまた、好ましくは、光酸化、加水分解及び生分解に対して安定である。

【 0 0 2 9 】

いくつかの実施形態では、フルオロフォアは独立した化合物であり得る。

【 0 0 3 0 】

いくつかの実施形態では、フルオロフォアは、約 1 0 0 0 0 ダルトン以上の分子量を有し、染料 - ポリマー単位を構成する水溶性又は水分散性ポリマー中のペンダント基又は鎖単位であり得る。一実施形態では、このような染料 - ポリマー単位はさらにまた、水不溶性ポリマーマトリックス M^1 と非共有的に会合され、そしてポリマーマトリックス M^1 (ここで、 M^1 は分析物溶液に透過性であるか、又はそれと接触する) 内に物理的に固定される。別の実施形態では、染料 - ポリマー単位上の染料は負に荷電され、そして染料 - ポリマー単位は陽イオン性水溶性ポリマーとの複合体として固定され得るが、この場合、上記複合体は、分析物溶液に透過性であるか又はそれと接触する。一実施形態では、染料は、ヒドロキシピレン・トリスルホン酸の高分子誘導体の 1 つであり得る。高分子染料は、水溶性、水膨潤性又は水分散性であり得る。いくつかの実施形態では、高分子染料はさらにまた架橋され得る。好ましい実施形態では、染料は負電荷を有する。

【 0 0 3 1 】

他の実施形態では、染料分子は、水不溶性ポリマーマトリックス M^1 と共有結合され得るが、この場合、上記 M^1 は分析物溶液に透過性であるか又はそれと接触する。 M^1 と結合される染料分子は、構造 $M^1 - L^1 - \text{染料}$ を構成し得る。 L^1 は、感知部分をポリマー又はマトリックスに共有的に接続する加水分解的に安定な共有結合リンカーである。 L^1 の例としては、スルホンアミド ($-SO_2NH-$)、アミド ($(C=O)N-$)、エステル ($(C=O)-O-$)、エーテル ($-O-$)、スルフィド ($-S-$)、スルホン ($-SO_2-$)、フェニレン ($-C_6H_4-$)、ウレタン ($-NH(C=O)-O-$)、尿素 ($-NH(C=O)NH-$)、チオ尿素 ($-NH(C=S)-NH-$)、アミド ($(C=O)NH-$)、アミン ($-NR-$) (ここで、 R は 1 ~ 6 個の炭素原子を有するアルキルと定義される) 等、又はその組み合わせから選択される 1 つ又は複数の二価結合基で任意に末端化されるか又はそれらにより中断される低級アルキレン (例えば $C_1 \sim C_8$ アルキレン) が挙げられる。一実施形態では、染料は、スルホンアミド官能基を介してポリマーマトリックスに結合される。

【 0 0 3 2 】

いくつかの実施形態では、有用な染料としては、ピラニン誘導体 (例えばヒドロキシピレントリスルホンアミド誘導体等) が挙げられるが、これは以下の式を有する：

【 0 0 3 3 】

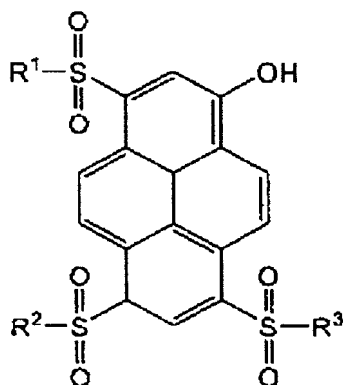
10

20

30

40

【化 1】



10

【 0 0 3 4 】

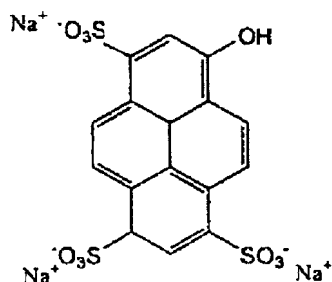
(式中、 R^1 、 R^2 、 R^3 は各々 $-NHR^4$ であり、 R^4 は $-CH_2CH_2(-OCH_2CH_2-$ 20
 $)_nX^1$ であって；ここで、 X^1 は $-OH$ 、 $-OCH_3COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-SO_3H$ 、
 $-NH_2$ 又は OMe であり；そして n は約 70 ~ 10000である)。一実施形態では、
 染料はスルホンアミド官能基を介してポリマーに結合され得る。他の実施形態では、染料
 はヒドロキシピレントリスルホン酸の高分子誘導体のうちの 1 つであり得る。

【 0 0 3 5 】

いくつかの実施形態では、蛍光染料は、8 - ヒドロキシピレン - 1 , 3 , 6 - トリスル 30
 ホネート (HPTS) であり得る。対イオンは、 H^+ 又は任意の他の陽イオンであり得る。
 HPTSは、約 450 nm 及び約 405 nm の 2 つの励起波長を示し、これは、酸及び
 その共役塩基の吸収波長に対応する。励起波長におけるシフトは、HPTS 上のヒドロキ
 シル基の pH 依存性イオン化のためである。pH が増大すると、HPTS は、約 450 n 30
 m での吸光度の増大、及び約 420 nm より低い吸光度の低減を示す。吸収極大での pH
 依存性シフトは、生理学的範囲での二重励起レシオメトリック検出を可能にする。この染
 料は 500 ダルトン未満の分子量を有し、したがってそれはポリマーマトリックス内に留
 まらないが、それは陰イオン排除膜と共に用いられ得る。

【 0 0 3 6 】

【化 2】



40

50

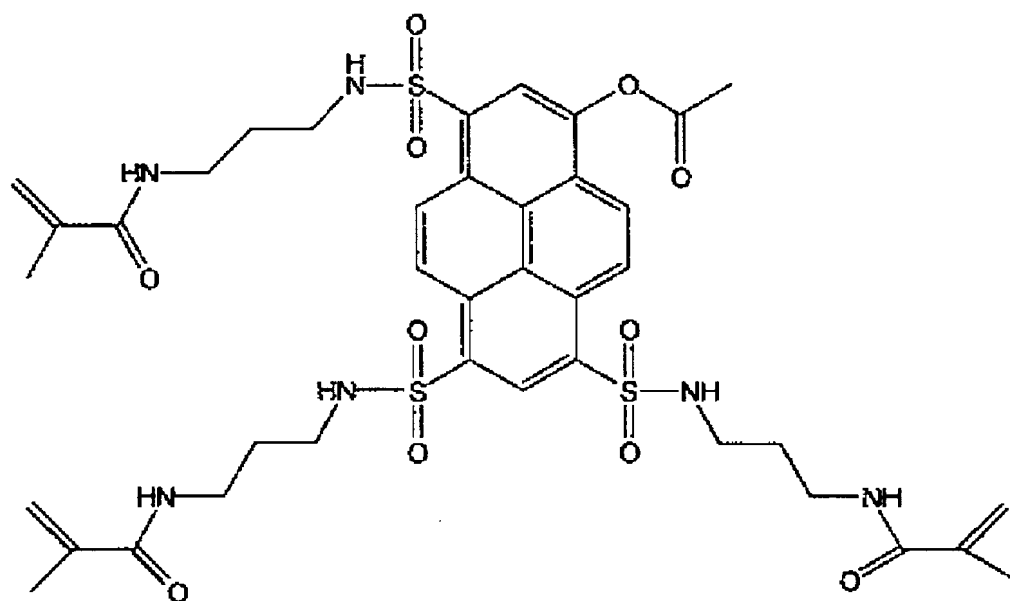
(HPTSのNa⁺塩 - 「ピラニン」)

【0037】

別の実施形態では、蛍光染料は8 - アセトキシ - ピレン - 1, 3, 6 - N, N', N' - トリス - (メタクリルプロピルアミドスルホンアミド) (アセトキシ - HPTS - MA) であり得る:

【0038】

【化3】



【0039】

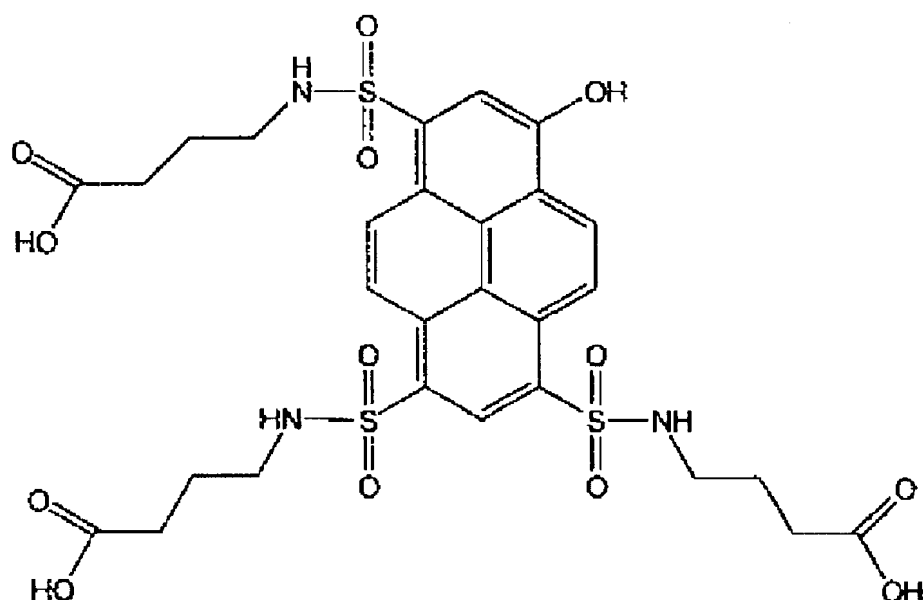
陰イオン基を有さないアセトキシ - HPTS - MA (上記) のような染料は、ビオロゲン消光剤、特に単一ボロン酸部分のみを有するビオロゲン消光剤と操作可能に結合される場合、非常に強力なグルコース応答を示し得ない、ということが注目される。

【0040】

別の実施形態では、蛍光染料は8 - ヒドロキシ - ピレン - 1, 3, 6 - N, N', N' - トリス - (カルボキシプロピルスルホンアミド) (HPTS - CO₂) であり得る:

【0041】

【化4】



10

20

30

40

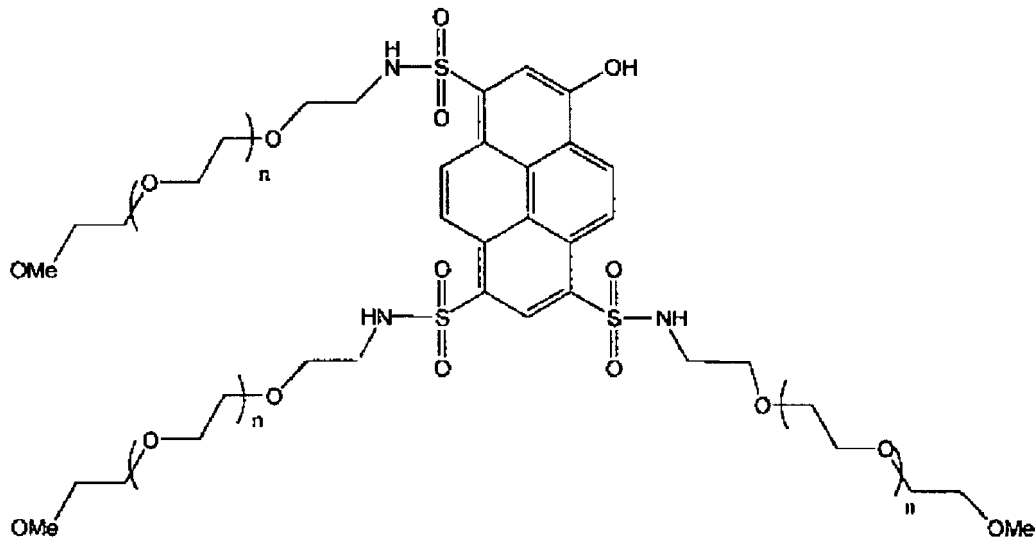
50

【 0 0 4 2 】

別の実施形態では、蛍光染料は 8 - ヒドロキシ - ピレン - 1 , 3 , 6 - N , N ' , N ' ' - トリス - (メトキシポリエトキシエチル (~ 1 2 5) スルホンアミド) (H P T S - P E G) であり得る :

【 0 0 4 3 】

【 化 5 】



【 0 0 4 4 】

陰イオン基を有さない H P T S - P E G (上記) のような染料は、ピオロゲン消光剤、特に単一ボロン酸部分のみを有するピオロゲン消光剤と操作可能に結合される場合、非常に強力なグルコース応答を示し得ない、ということが注目される。

【 0 0 4 5 】

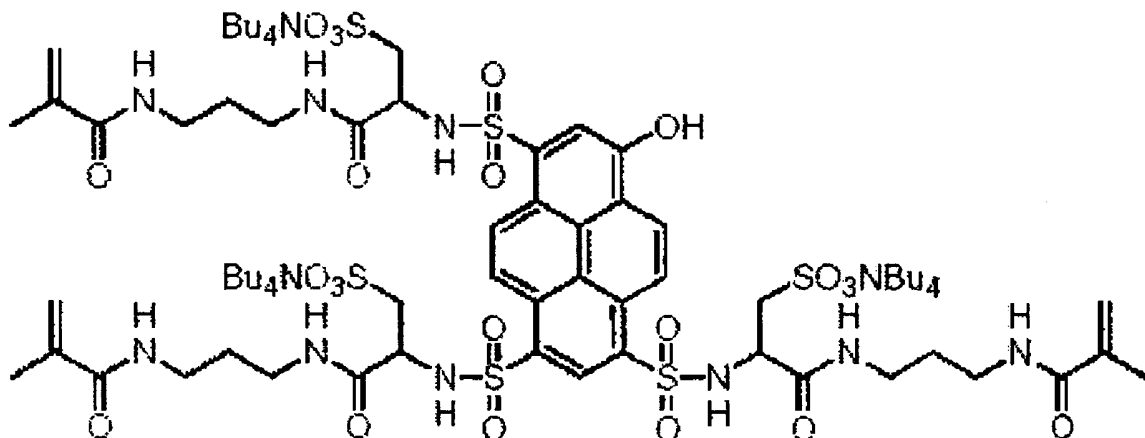
独立した化合物としての代表的染料は、8 - アセトキシピレン - 1 , 3 , 6 - トリスルホンクロリド (H P T S - C 1) をアミノ酸、例えばアミノ酪酸と反応させることにより形成されるトリス付加物である。ポリマーに結合され、そして1つ又は複数の陰イオン基を保有するヒドロキシピレントリスルホンアミド染料、例えば 8 - ヒドロキシピレン - 1 - N - (メタクリルアミドプロピルスルホンアミド) - N ' , N ' ' - 3 , 6 - ビス (カルボキシプロピルスルホンアミド) H P T S - C O 2 - M A と H E M A 、 P E G M A 等とのコポリマーが最も好ましい。

【 0 0 4 6 】

別の実施形態では、蛍光染料は H P T S - トリ C y s - M A であり得る :

【 0 0 4 7 】

【 化 6 】



【 0 0 4 8 】

この染料は、ポロン酸を含む消光剤、例えば 3, 3' - o B B V と共に用いられ得る。

【 0 0 4 9 】

もちろん、いくつかの実施形態では、H P T S コア上の C y s - M A 以外の置換は、該置換が負に帯電し、且つ重合性基を有する限り、本発明の態様と一致する。システインの L 又は D 立体異性体が用いられ得る。いくつかの実施形態では、スルホン酸のうちの 1 又は 2 つのみが置換され得る。同様に、上記の H P T S - C y s M A に対する変形形態では、 NBu_4^+ と並んで他の対イオン、例えば正荷電金属、例えば Na^+ が用いられ得る。他の変形形態では、スルホン酸基は、例えばリン酸基、カルボン酸基等の官能基と取り替えられ得る。

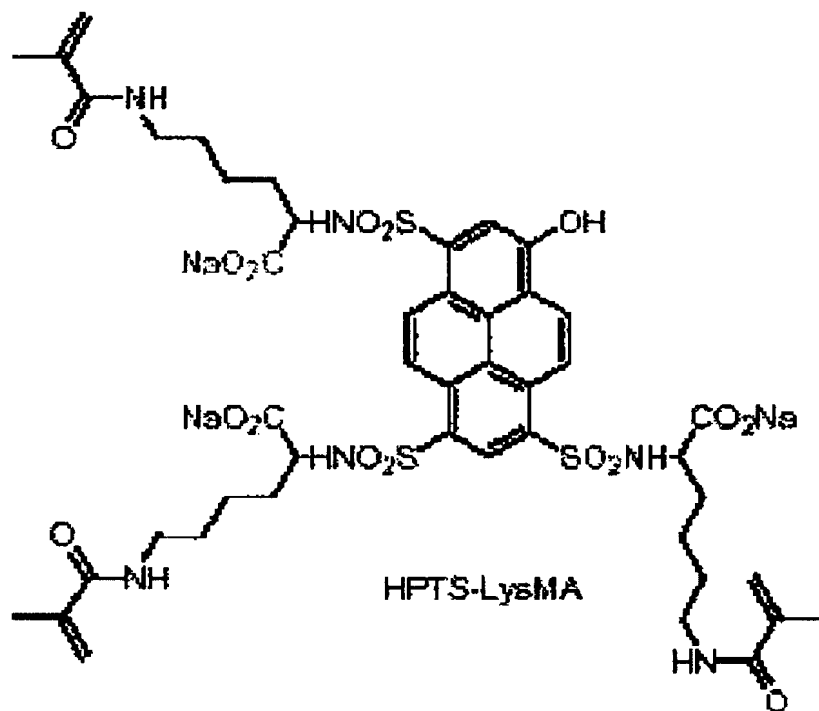
10

【 0 0 5 0 】

別の適切な染料は H P T S - L y s M A であって、これは以下のように図示される：

【 0 0 5 1 】

【 化 7 】



20

30

【 0 0 5 2 】

他の例としては、8 - アセトキシピレン - 1, 3, 6 - N, N', N'' - トリス (メタクリルアミドプロピルスルホンアミド) と H E M A、P E G M A 又は他の親水性モノマーとの水溶性コポリマーとが挙げられる。染料中のフェノール置換基は、重合完了後に加水分解により除去され得るブロック基によって重合中に保護される。このような適切なブロック基、例えばアセトキシ、トリフルオロアセトキシ等は、当該技術分野でよく知られている。

40

【 0 0 5 3 】

蛍光染料、例えば H P T S 及びその誘導体は既知であり、そして多くが分析物検出に用いられてきた。例えば米国特許第 6, 653, 141 号、同第 6, 627, 177 号、同第 5, 512, 246 号、同第 5, 137, 833 号、同第 6, 800, 451 号、同第 6, 794, 195 号、同第 6, 804, 544 号、同第 6, 002, 954 号、同第 6, 319, 540 号、同第 6, 766, 183 号、同第 5, 503, 770 号及び同第 5, 763, 238 号；並びに同時係属中の米国特許出願第 11 / 296, 898 号、及び同第 60 / 833, 081 号（これらの記載内容の全体は参照により本明細書中に援用される）を参照のこと。

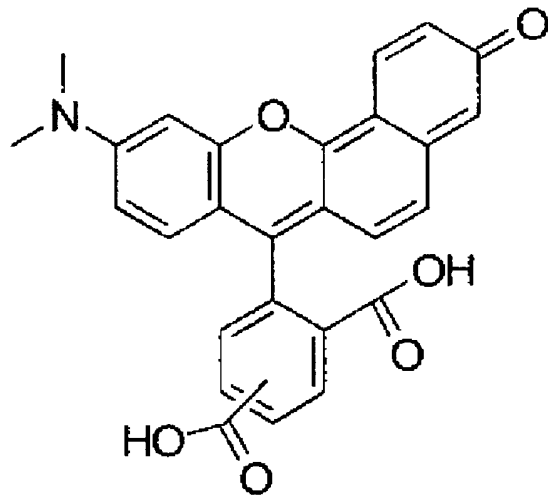
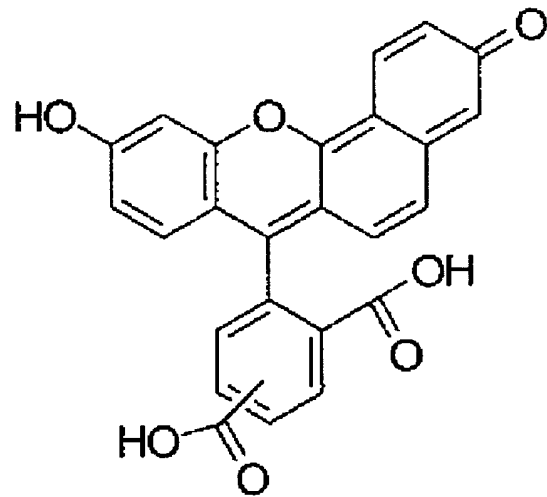
50

【 0 0 5 4 】

S N A R F 及び S N A F L 染料 (Molecular Probes) も、本発明の態様に従って有用なフルオロフォアであり得る。S N A R F - 1 及び S N A F L - 1 の構造を以下に示す：

【 0 0 5 5 】

【 化 8 】

**SNARF-1****SNAFL-1**

【 0 0 5 6 】

付加的には、波長 - レシオメトリック及び比色的に、p Hに伴うスペクトルシフト及び強度変化を示す 6 - アミノキノリニウム及びボロン酸部分の両方を基礎にした一組の異性体水溶性蛍光プローブは、本発明のいくつかの実施形態に従って有用であり得る（例えば Badugu, R. et al. 2005 Talanta 65(3): 762-768 ; 及び Badugu, R. et al. 2005 Bioorg . Med. Chem. 13(1): 113-119 参照）（これらの記載内容の全体は参照により本明細書中に援用される）。

【 0 0 5 7 】

p H 及び糖類感受性であり得る蛍光染料の別の例は、テトラキス（ 4 - スルホフェニル ）ポルフィン（ T S P P ）（以下に示す）である。T S P P は、ポルフィリン環が或る金属イオン、例えば第二鉄イオンと反応し得る血中では最適に働かず、非蛍光性になる。

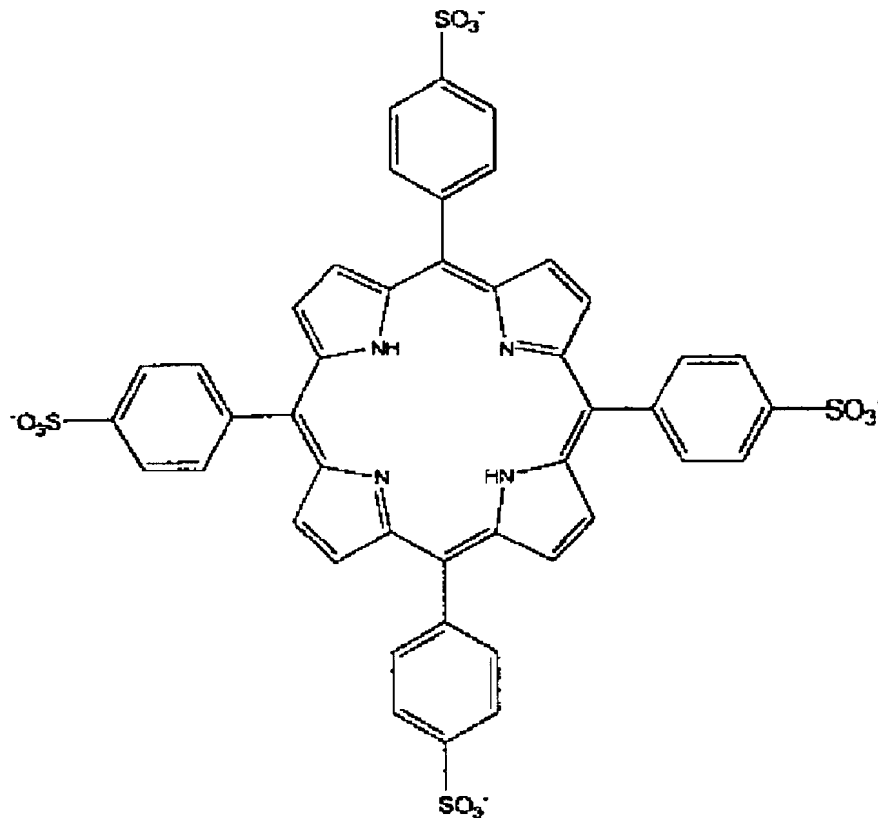
【 0 0 5 8 】

10

20

30

【化 9】



(TSPP)

【0059】

本発明のセンサーにおけるpH及びグルコースの同時決定のために有用であり得るpH感受性蛍光表示器のさらなる例は、米国特許出願第2005/0233465号及び米国特許出願第2005/0090014号（これらの記載内容の全体は各々、参照により本明細書中に援用される）に記載されている。

【0060】

分析物結合部分 - 消光剤

本発明の広範な態様に従って、分析物結合部分は、分析物結合の量に関連したやり方で、分析物と結合することができ且つフルオロフォアの見掛けの濃度（例えば放出シグナル強度の変化として検出される）を調整することができる少なくとも二重の機能性を提供する。好ましい実施形態では、分析物結合部分は、消光剤と会合される。「消光剤」は、その存在下で、フルオロフォアの放出を低減する化合物を指す。消光剤（Q）は、独立した化合物、例えば、第二の独立した化合物に、又は重合性化合物に転化可能である反応性中

【0061】

一例では、実施形態におけるグルコース認識を提供する部分は、芳香族ボロン酸である。ボロン酸は、共役窒素含有複素環式芳香族ビス - オニウム構造（例えばピオロゲン）と共有結合する。「ピオロゲン」は、一般的に、窒素含有共役N - 置換複素環式芳香族ビス - オニウム塩の基本構造を有する化合物、例えば2, 2' -、3, 3' - 又は4, 4' - N, N' - ビス - （ベンジル）ピピリジウムニハロゲン化物（即ち二塩化物、臭化物、塩化物）等を指す。ピオロゲンは、置換フェナントロリン化合物も包含する。ボロン酸置換消

光剤は、好ましくは約4～9のpKaを有し、そして約6.8～7.8のpHの水性媒質中でグルコースと可逆的に反応して、ボロン酸エステルを形成する。反応の程度は、媒質中のグルコース濃度に関連する。ボロン酸エステルの形成は、ピオロゲンによるフルオロフォア (fluorophore) の消光を減少させて、グルコース濃度に応じた蛍光の増大を引き起こす。有用なビス - オニウム塩は分析物溶液と相溶性であり、そして検出されるべき分析物の存在下で染料の蛍光放出における検出可能な変化を生じ得る。

【0062】

本発明の実施形態におけるビス - オニウム塩は、共役複素環式芳香族二窒素化合物から調製される。共役複素環式芳香族二窒素化合物は、ジピリジル、ジピリジリエチレン、ジピリジルフエニレン、フェナントロリン及びジアザフルオレンから選択され、この場合、窒素原子は異なる芳香族環中に存在し、そしてオニウム塩を形成し得る。両方の窒素が置換され得る上記共役複素環式芳香族二窒素化合物の異性体は全て、本発明において有用である、と理解される。一実施形態では、消光剤は、3, 3' - ジピリジル、4, 4' - ジピリジル及び4, 7 - フェナントロリンに由来するビス - オニウム塩のうちの1つであり得る。

10

【0063】

いくつかの実施形態では、ピオロゲン - ボロン酸付加物は約400ダルトン以上の分子量を有する独立した化合物であり得る。他の実施形態では、それは、約10000ダルトンより大きい分子量を有する水溶性又は水分散性ポリマーのペンダント基又は鎖単位でもあり得る。一実施形態では、消光剤 - ポリマー単位はポリマーマトリックスと非共有的に会合され得るし、そしてその中に物理的に固定される。さらに別の実施形態では、消光剤 - ポリマー単位は、負電荷水溶性ポリマーとの複合体として固定され得る。

20

【0064】

他の実施形態では、ピオロゲン - ボロン酸部分は、平衡を確立させるのに十分に分析物（例えばグルコース）に対して透過性である架橋親水性ポリマー又はヒドロゲル中のペンダント基又は鎖単位であり得る。

【0065】

他の実施形態では、消光剤は、構造 $M^2 - L^2 - Q$ により表わされ得る第2の水不溶性ポリマーマトリックス M^2 と共有結合し得る。 L^2 は、低級アルキレン（例えば $C_1 \sim C_8$ アルキレン）、スルホンアミド、アミド、第四級アンモニウム、ピリジニウム、エステル、エーテル、スルフィド、スルホン、フェニレン、尿素、チオ尿素、ウレタン、アミン及びその組み合わせから成る群から選択されるリンカーである。消光剤は、いくつかの実施形態では、1つ又は2つの部位で M^2 に連結され得る。

30

【0066】

高分子消光剤前駆体に関しては、ボロン酸部分、及び重合性基又はカップリング基であり得る反応性基を、ヘテロ芳香族中心位置基中の2つの異なる窒素と結合させるために、多くの選択肢が利用可能である。これらは以下のものである：

a) 第1の芳香族部分上の反応性基は1つの窒素と結合され、そして少なくとも1つの $-B(OH)_2$ 基を含有する第二芳香族基は第二窒素と結合される；

b) 1つ又は複数のボロン酸基は、1つの窒素と結合される第一芳香族部分と結合され、そして1つのボロン酸及び反応性基は第二窒素と結合される第二芳香族基に結合される；

40

c) 1つのボロン酸基及び反応性基は1つの窒素と結合される第一芳香族基の第一芳香族部分と結合され、そしてボロン酸基及び反応性基は第二窒素と結合される第二芳香族部分と結合される；そして

d) 1つのボロン酸は各窒素と結合され、そして反応性基はヘテロ芳香族環と結合される。

【0067】

好ましい実施形態は、2つのボロン酸部分及び1つの重合性基又はカップリング基を含み、この場合、芳香族基は窒素と結合されるベンジル置換基であり、そしてボロン酸基は

50

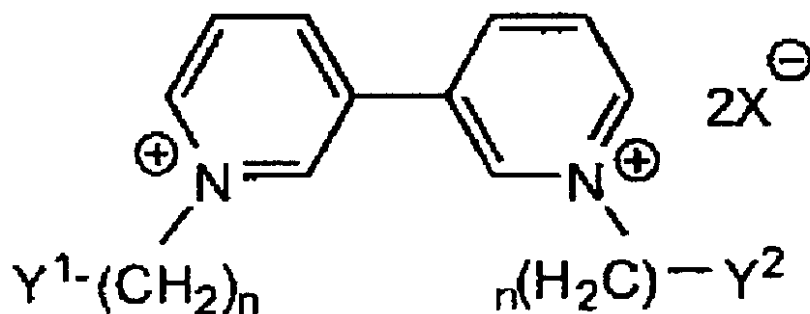
ベンジル環と結合され、オルト - 、メタ又はパラ - 位であり得る。

【 0 0 6 8 】

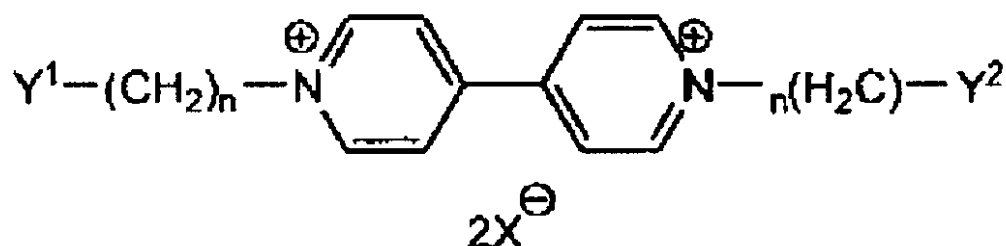
いくつかの実施形態では、*in vitro* 感知のために有用な独立した化合物としてのボロン酸置換ピオロゲンは、以下の式のうちの 1 つにより表され得る：

【 0 0 6 9 】

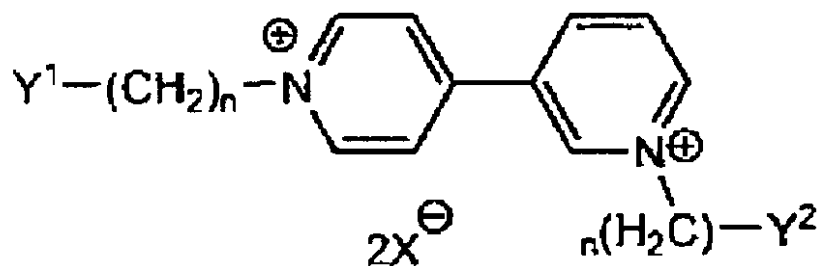
【 化 1 0 】



10



20



30

【 0 0 7 0 】

(式中、 $n = 1 \sim 3$ であり、 X はハロゲンであり、且つ Y^1 及び Y^2 は、独立して、フェニルボロン酸 (*o* - 、*m* - 又は *p* - 異性体) 及びナフチルボロン酸から選択される) 。別の実施形態では、消光剤は、ピオロゲンの複素環上の置換基としてボロン酸基を含み得る。

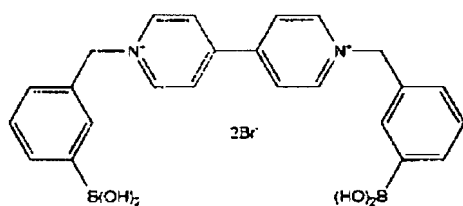
40

【 0 0 7 1 】

T S P P と共に用いられる特定の例は、*m* - B B V である：

【 0 0 7 2 】

【化 1 1】



m-BBV

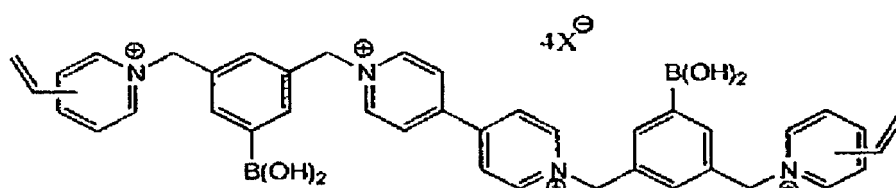
10

【 0 0 7 3】

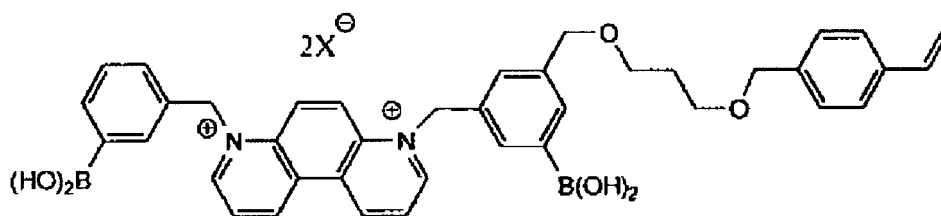
センサーの製造に適した消光剤前駆体は、以下のものから選択され得る：

【 0 0 7 4】

【化 1 2 A】

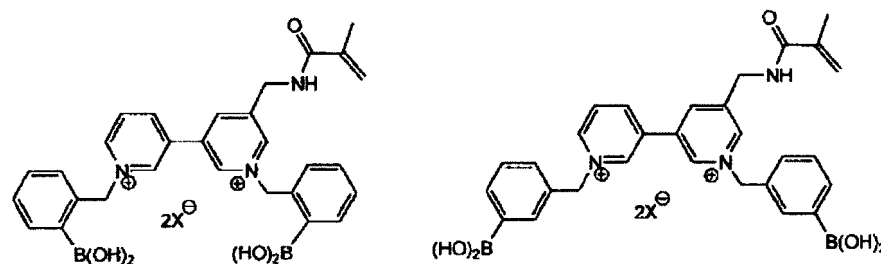
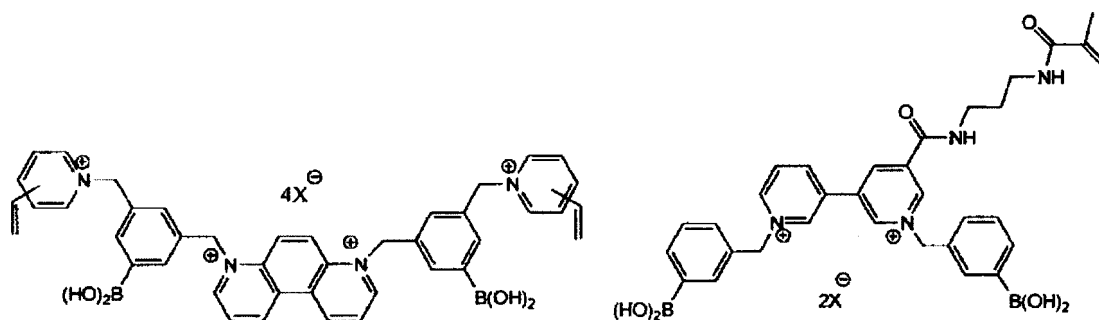


20



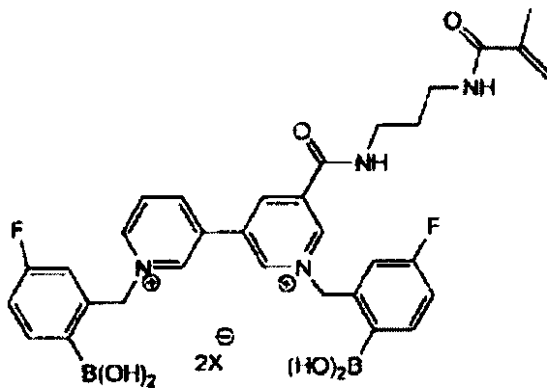
【化 1 2 B】

30

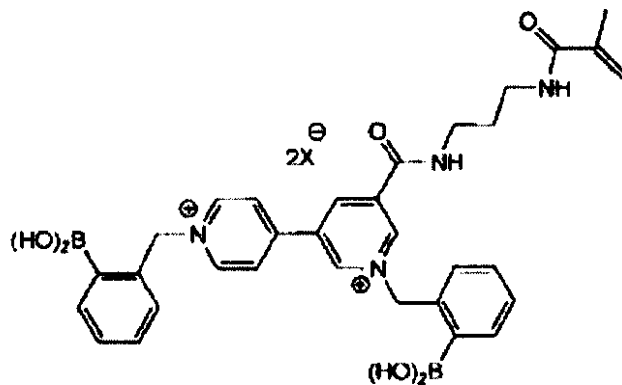


40

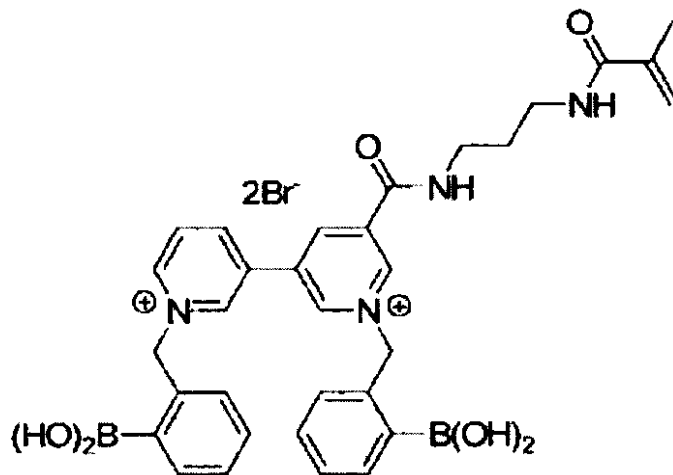
【化 1 2 C】



10



20



30

3,3'-oBBV

40

【0075】

本発明の好ましい態様に従って、消光剤前駆体 3, 3' - oBBV は、HPTS - LysMA 又は HPTS - CysMA と共に用いられて、ヒドロゲルを作製し得る。

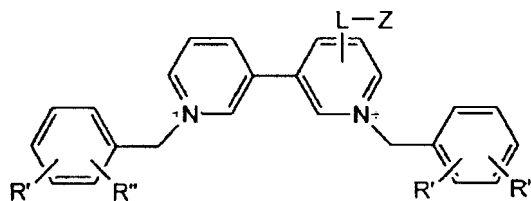
【0076】

好ましい消光剤は、ベンジルボロン酸基を用いて窒素上で、重合性基又はカップリング基を用いてジピリジル環上の他の位置で置換される 3, 3' - ジピリジルに由来するピオロゲンを含む前駆体から調製される。代表的ピオロゲンとしては以下のものが挙げられる：

50

【 0 0 7 7 】

【 化 1 3 】



10

【 0 0 7 8 】

(式中、L は、L 1 又は L 2 であり、且つ連結基であり；

Z は、反応性基であり；且つ

R ' は、ベンジル環上のオルト - 、メタ - 又はパラ - 位における - B (O H)₂ であり、そして R ' ' は H - であり；或いは任意に R ' ' は、本明細書中で定義されるようなカップリング基、又はボロン酸の酸性を改質するために特定の用いられる置換基、例えばフルオロ - 又はメトキシ - である) 。

【 0 0 7 9 】

L は、ビオロゲンをポリマー又はマトリックスに結合するために用いられる反応性基に感知部分を共有結合する二価部分である。L の例としては、直接結合、或いは 1 ~ 8 個の炭素原子を有し、任意にスルホンアミド (- S O₂ N H -)、アミド - (C = O) N - 、エステル - (C = O) - O - 、エーテル - O - 、スルフィド - S - 、スルホン (- S O₂ -)、フェニレン - C₆H₄ - 、ウレタン - N H (C = O) - O - 、尿素 - N H (C = O) N H - 、チオ尿素 - N H (C = S) - N H - 、アミド - (C = O) N H - 、アミン - N R - (ここで、R は 1 ~ 6 個の炭素原子を有するアルキルと定義される) 等から選択される 1 つ又は複数の二価結合基で末端化されるか又はそれにより中断される低級アルキレンから各々独立して選択されるものが挙げられる。

【 0 0 8 0 】

Z は、メタクリルアミド - 、アクリルアミド - 、メタクリロイル - 、アクリロイル - 、又はスチリル - (これらに限定されない) から選択される重合可能なエチレン性不飽和基であり、或いは任意に Z は、ポリマー又はマトリックスと共に共有結合を形成し得る反応性官能基である。このような基としては、- B r、- O H、- S H、- C O₂ H 及び - N H₂ が挙げられるが、これらに限定されない。

【 0 0 8 1 】

ボロン酸置換ポリビオロゲンは、別のクラスの好ましい消光剤である。ポリビオロゲンという用語は、以下のものを包含する：連結基により互いに共有結合される 2 つ以上のビオロゲンから成る独立した化合物、鎖中のビオロゲン反復単位から成るポリマー、鎖にぶら下がったビオロゲン基を有するポリマー、好ましくはビオロゲン末端基を含めたビオロゲン単位から成るデンドリマー、好ましくはビオロゲン末端基を含めたビオロゲン単位から成るオリゴマー、並びにその組み合わせ。ビオロゲン基単体が少量成分を成すポリマーは含まれない。好ましい消光剤は、センサーの一部として機能するのに十分にグルコースに対して透過性である水溶性又は水分散性ポリマー、或いは架橋親水性ポリマー、或いはヒドロゲルである。代替的には、ポリビオロゲンボロン酸は、不活性基質に直接結合され得る。

【 0 0 8 2 】

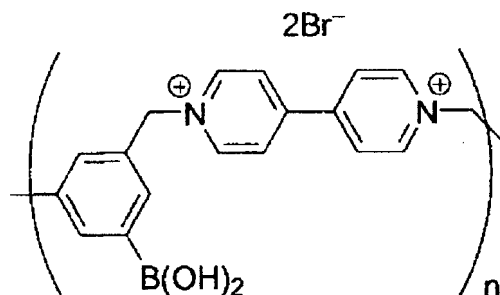
ビオロゲン反復単位から成るポリマーとしてのポリビオロゲン消光剤は、次式を有する

:

【 0 0 8 3 】

50

【化 1 4】



10

【0084】

別の実施形態では、ポリピオロゲンボロン酸付加物は、2つ以上のピオロゲン／ボロン酸中間体を共有的に連結することにより形成される。架橋基は、典型的には、各ピオロゲン中の1つの窒素に、或いは各ピオロゲンの芳香族環中の炭素に結合される小型二価ラジカルであるか、或いは1つの結合は1つのピオロゲン中の環炭素に対し、且つ別のピオロゲン中の窒素に対するものであってもよい。2つ以上のボロン酸基は、ポリピオロゲンと結合される。任意に、ポリピオロゲンボロン酸付加物は、ピオロゲンに又は架橋基に直接結合する重合性基又はカップリング基で置換される。好ましくはポリピオロゲン部分は、このような基を1つだけ含む。好ましくは架橋基は、グルコースとのボロン酸の協同的結合を増強するために選択される。

20

【0085】

カップリング部分は上記のような連結基であるが、但し、連結基は任意に、ボロン酸、重合性基、付加のカップリング基でさらに置換されるか、或いはピオロゲンが鎖単位、ペンダント基又はその任意の組み合わせであるポリマー鎖中の一セグメントである。

【0086】

固定化手段

いくつかの実施形態では、動いている流れを包含しない *in vitro* で用いるために、感知構成成分は個々の（別個の）構成成分として用いられる。染料及び消光剤は液体溶液中と一緒に混合され、分析物が付加され、蛍光強度における変化が測定され、そして構成成分が廃棄される。滲出を防止するために感知構成成分を閉じ込めるために用いられ得る高分子マトリックスは、存在する必要がない。任意に、感知構成成分が固定され、これが移動流中の分析物を測定するためのそれらの使用を可能にする。

30

【0087】

in vivo 適用に関しては、センサーは、1つ又は複数のポリヒドロキシル有機化合物を含有する生理学的流体の移動流中で用いられるか、或いは上記化合物を含有する筋肉のような組織中に埋め込まれる。したがって、センサー部分は何れもセンサーアセンブリーから抜け出さないことが好ましい。したがって、*in vivo* での使用に関しては、感知構成成分は、好ましくは、有機ポリマー感知アセンブリーの一部である。可溶性染料及び消光剤は、分析物の通過を可能にするが感知部分の通過を遮断する半透膜により限定され得る。これは、感知部分として、分析物分子より実質的に大きい可溶性分子（分析物の分子量より少なくとも2倍の、或いは1000倍より大きい、好ましくは5000倍より大きい分子量）を用い且つ感知部分が定量的に保持されるよう、2つの間の特定分子量カットオフを有する透析又は限外濾過膜のような選択的半透性膜を用いることにより、実現され得る。

40

【0088】

好ましくは感知部分は、グルコースに対して自由に透過可能である不溶性ポリマーマトリックス中に固定される。ポリマーマトリックスは、有機、無機ポリマー又はそのポリマーの組み合わせから成る。マトリックスは、生体適合性物質で構成され得る。代替的には、マトリックスは、対象の分析物に対して透過性である第二生体適合性ポリマーで被覆され

50

る。

【0089】

ポリマーマトリックスの機能は、フルオロフォア及び消光剤部分を一緒に保持し、固定する一方で、同時に、分析物と接触させ、そして分析物をボロン酸と結合することである。この作用を達成するために、マトリックスは、密接に関連して、マトリックス及び分析物溶液間に高表面積界面を確立することにより、媒質中で不溶性でなければならない。例えば超薄皮膜又は微小孔支持マトリックスが用いられる。代替的には、マトリックスは分析物溶液中で膨潤性であり、例えばヒドロゲルマトリックスは水性系のために用いられる。いくつかの例では、感知ポリマーは、表面、例えば光導管の表面に結合されるか、又は微小孔膜中に含浸される。全ての場合に、2つの相間で平衡が確立され得るよう、マトリックスは結合部位への分析物の輸送を妨げてはならない。超薄皮膜、微小孔ポリマー、微小孔ゾル-ゲル及びヒドロゲルを調製するための技法は、当該技術分野で確立されている。有用なマトリックスは全て、分析物透過性であると定義される。

10

【0090】

ヒドロゲルポリマーは、いくつかの実施形態で用いられる。ヒドロゲルという用語は、本明細書中で用いる場合、実質的に膨潤性であるが、水中に溶解しないポリマーを指す。このようなヒドロゲルは、線状、分枝鎖、又は網状ポリマー、或いは高分子電解質複合体であり得るが、但し、それらは可溶性又は滲出可能分画を含有しない。典型的には、ヒドロゲル網状構造は架橋工程により調製され、これは、それらが膨潤性であるがしかし水性媒質中に溶解しないよう、水溶性ポリマーに関して実施される。代替的には、ヒドロゲルポリマーは、水膨潤性網状ポリマーを得るために、親水性及び架橋モノマーの混合物を共重合することにより調製される。このようなポリマーは、付加又は縮合重合により、或いは組み合わせ法により形成される。これらの場合、感知部分は、網状構造形成モノマーと組み合わせてモノマー誘導体を用いる共重合により、ポリマー中に組み入れられる。代替的には、反応性部分は、後重合反応を用いてすでに調製されたマトリックスと結合される。上記の感知部分は、ポリマー鎖又は鎖に結合されたペンダント基中の単位である。

20

【0091】

本発明において有用なヒドロゲルは、モノリス型ポリマー、例えば染料及び消光剤がともに共有結合される単一網状構造、又は多成分ヒドロゲルでもある。多成分ヒドロゲルとしては、相互侵入網目、高分子電解質複合体、並びにヒドロゲルマトリックス及び交互ミクロ層アセンブリー中の二次ポリマーの分散を含む水膨潤性複合体を得るための2つ以上のポリマーの種々の他の配合物が挙げられる。

30

【0092】

モノリス型ヒドロゲルは、典型的には、親水性モノマーの混合物のフリーラジカル共重合により形成され、例としてはHEMA、PEGMA、メタクリル酸、ヒドロキシエチルアクリレート、N-ビニルピロリドン、アクリルアミド、N,N'-ジメチルアクリルアミド等が挙げられるが、これらに限定されず、イオン性モノマーとしては、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、ジアリルジメチルアンモニウムクロリド、ビニルベンジルトリメチルアンモニウムクロリド、ナトリウムスルホプロピルメタクリレート等が挙げられ、架橋剤としては、エチレンジメタクリレート、PEGDMA、トリメチロールプロパントリアクリレート等が挙げられる。モノマーの比は、当該技術分野で十分に確立された原則を用いて、透過性、膨潤指数及びゲル強度を含めた網目特性を最適化するよう選択される。一実施形態では、染料部分は、染料分子のエチレン性不飽和誘導体、例えば8-アセトキシピレン-1,3,6-N,N',N''-トリス(メタクリルアミドプロピルスルホンアミド)より得られ、消光剤部分は、エチレン性不飽和ピオロゲン、例えば4-N-(ベンジル-3-ボロン酸)-4'-N'-(ベンジル-4エテニル)-ジピリジニウム二ハロゲン化物(m-SBBV)より得られ、そしてマトリックスはHEMA及びPEGDMAから作られる。染料の濃度は、放出強度を最適にするよう選択される。消光剤対染料の比は、所望の測定可能シグナルを生じるのに十分な消光を提供するよう調整される。

40

50

【0093】

いくつかの実施形態では、モノリス型ヒドロゲルは縮合重合により形成される。例えばアセトキシピレントリルスルホニルクロリドを、余分量のPEGジアミンと反応させて、非反応ジアミン中に溶解されたトリス - (アミノPEG) 付加物を得る。余分量のトリメソイルクロリド及び酸受容体の溶液を4 - N - (ベンジル - 3 - ボロン酸) - 4' - N' - (2ヒドロキシエチル) ピピリジニウムニハロゲン化物と反応させて、ビオロゲンの酸塩化物機能性エステルを得る。例えば一方の混合物の薄い皮膜を成形し、そしてそれを他方に浸漬することにより、2つの反応性混合物を互いに接触させて、反応させ、ヒドロゲルを形成する。

【0094】

他の実施形態では、染料が一成分中に組み入れられ、そして消光剤が別の成分中に組み入れられる多成分ヒドロゲルが、本発明のセンサーの製造のために好ましい。さらに、これらの系は、任意に分子インプリントされて、成分間の相互反応を増強し、そして他のポリヒドロキシ分析物を上回るグルコースに対する選択性を提供する。好ましくは多成分系は、相互侵入ポリマー網目 (IPN) 又は半相互侵入ポリマー網目 (半IPN) である。

【0095】

IPNポリマーは、典型的には、逐次重合により作られる。まず、消光剤を含む網目が形成される。次に網目は、染料モノマーを含むモノマーの混合物で膨潤され、そして二次重合が実行されて、IPNヒドロゲルを得る。

【0096】

消光剤モノマーを含めたモノマーの混合物中に染料部分を含有する可溶性ポリマーを溶解し、その混合物を重合することによって、半IPNヒドロゲルを形成する。いくつかの実施形態では、ポリヒドロキシル化合物を自由に透過可能である不溶性ポリマーマトリックスにより、感知部分を固定する。ヒドロゲル系に関する付加的詳細は、米国特許出願公開第2004/0028612号及び同第2006/0083688号(これらの記載内容の全体は参照により本明細書中に援用される)に開示されている。

【0097】

ポリマーマトリックスは、有機ポリマー、無機ポリマー又はそのポリマーの組み合わせで構成される。マトリックスは、生体適合性物質から成り得る。代替的には、マトリックスは、対象の分析物に対して透過性である第二生体適合性ポリマーで被覆される。ポリマーマトリックスの機能は、蛍光染料及び消光剤部分を一緒に保持し、固定する一方で、同時に、分析物(例えばポリヒドロキシル化合物、 H^+ 及び OH^-)と接触させ、そしてポリヒドロキシル化合物をボロン酸と結合することである。したがってマトリックスは、密接に関連して、マトリックス及び分析物溶液間に高表面積界面を確立することにより、媒質中で不溶性である。2つの相間で平衡が確立され得るよう、マトリックスはさらにまた結合部位への分析物の輸送を妨げない。一実施形態では、超薄皮膜又は微小孔支持マトリックスが用いられ得る。別の実施形態では、分析物溶液中で膨潤性であるマトリックス(例えばヒドロゲルマトリックス)が、水性系のために用いられ得る。いくつかの実施形態では、感知ポリマーは、表面、例えば光導管の表面に結合されるか、又は微小孔膜中に含まれる。超薄皮膜、微小孔ポリマー、微小孔ゾル-ゲル及びヒドロゲルを調製するための技法は、従来技術で確立されている。

【0098】

好ましい一実施形態では、ボロン酸置換ビオロゲンは、蛍光染料と共有結合され得る。付加物は、重合性化合物又はポリマー中の一単位であり得る。例えばこのような一付加物は、まず、ベンジル - 3 - ボロン酸基を一方の窒素に結合し、そしてアミノエチル基を他の窒素原子に結合することにより4, 4' - ジピリジルから非対称ビオロゲンを形成することにより調製され得る。ビオロゲンは、まず、1:1モル比で8 - アセトキシ - ピレン - 1, 3, 6 - トリスルホニルクロリドと順次縮合され、その後、余分量のPEGジアミンと反応されて、プレポリマー混合物を得る。副産物である酸を捕捉する(scavange)ために、酸受容体が両方の工程に含まれる。ポリイソシアネートとの反応によりプレポリマ

10

20

30

40

50

ー混合物を架橋して、ヒドロゲルを得る。生成物を塩基で処理して、アセトキシ・ブロッキング基を除去する。さらなる使用の前に、脱イオン水を用いた網羅的抽出により、不完全反応生成物及び非反応出発物質をヒドロゲルから濾し取る。生成物は、本明細書中に記載したような感知構成成分として用いられる場合、グルコースに対して応答性である。

【0099】

代替的には、このような付加物は、エチレン性不飽和モノマー誘導体である。例えばジメチルビス-ブロモメチルベンゼンボロネートを、余分量の4,4'-ジピリジルと反応させて、半ビオロゲン付加物を形成する。余分量のジピリジルを除去後、付加物をさらに余分量のブロモエチルアミン塩酸塩と反応させて、ビス-ビオロゲン付加物を形成する。この付加物を、酸受容体の存在下で1:1モル比で8-アセトキシビレン-トリスルホンクロリドとの反応と、その後の余分量のアミノプロピルメタクリルアミドとの反応により、ピラニン染料とカップリングさせる。最後に、任意の残留アミノ基をメタクリロルクロリドと反応させ得る。精製後、染料/ビオロゲンモノマーをHEMA及びPEGDMAと共重合させて、ヒドロゲルを得る。

【0100】

レシオメトリックpH感知

レシオメトリックpH感知は知られている。例えば米国特許出願公開第2006/0105174号；同第2005/0090014号（これらの記載内容の全体は参照により本明細書中で援用される）参照。2つの形態（酸形態及び塩基形態）で存在するフルオロフォアを含む指示薬系（例えば蛍光指示薬染料）を考えると、2つの波長での放出強度の比は、フルオロフォア濃度のpH非依存性を測定するために用いられ得る。レシオメトリックpH感知に適した蛍光指示薬染料は、以下のものであり得る：（1）二重励起波長（酸形態及び共役塩基形態に対応する）及び単一放出波長を示す染料（例えばHPTS染料）；（2）単一励起波長及び二重放出波長（酸形態及び塩基形態）；或いは（3）二重励起-二重放出染料。いくつかの染料、例えばSNARF又はSNAFL染料は、二重放出特性及び二重励起特性の両方を有し得る。しかしながら二重-二重染料、例えばSNARFは、単一-二重又は二重-単一として用いられ得る。

【0101】

セミナフトフルオレセイン及びカルボキシナフトフルオロセインを基礎にした二重放出ファイバーセンサーが記載されており、これは迅速に且つ信頼可能的に、強度比をpHと相関させる。例えばそれぞれ、Xu, Z., A. Rollins, et al. (1998) "A novel fiber-optic pH sensor incorporating carboxy SNAFL-2 and fluorescent wavelength-ratiometric detection" Journal of Biomedical Materials Research 39: 9-15及びSong, A., S. Parus, et al. (1997) "High-performance fiber-optic pH microsensors for practical physiological measurements using a dual-emission sensitive dye" Analytical Chemistry 69: 863-867参照。これらの染料に関して観察される広範な光褪色はレシオメトリック・アプローチにより説明され得るが、しかしそれは依然としてセンサーの有用な寿命を限定する。

【0102】

蛍光染料8-ヒドロキシ-1,3,6-ピレントリスルホン酸三ナトリウム塩（HPTS）は、3つのスルホン酸基及び1つのヒドロキシル基を有するピレンコアから成り、これが約7.3のpKaほどのpH感受性を付与する（Wolfbeis, O.S., E. Fuerlinger, et al. (1983). "Fluorimetric analysis. 1. Study on fluorescent indicators for measuring near neutral ('physiological') pH values." Fresenius' Z. Anal. Chem. 314(2): 119-124)；Wolfbeis等は固定化HPTSに関するいくつかの特許も有する。YafusoとHuiは、米国特許第4,886,338号（この記載内容の全体は参照により本明細書中で援用される）において別の固定化蛍光染料pHセンサーを記載している。HPTSは、酸及びその共役塩基に対応する2つの励起波長（1つは405nmそして1つは457nm）を示す（Agayn, V.I. and Dr. R. Walt (1993) "Fiber-optic sensor for continuous monitoring of fermentation pH." Biotechnology 72(6): 6-9）。最大約7.3のp

K_aの励起におけるその後のpH依存性シフトは、生理学的範囲における二重励起/単一放出レシオメトリック検出を可能にする。これは、低毒性(Lutty, G.A. (1978). "The acute intravenous toxicity of stains, dyes, and other fluorescent substances." *Toxicol Pharmacol.* 44: 225-229)及び酸素濃度に対する非感受性(Zhujun, Z. and W.R. Seitz (1984). "A fluorescence sensor for quantifying pH in the range from 6.5 to 8.5." *Analytical Chimica Acta* 160: 47-55)と共に、HPPTSを生理学的及びバイオプロセスpH測定のための適切なプローブにする。

【0103】

3つの強陰イオン性スルホン酸基の存在は、イオン結合により陽イオン性支持体にHPPTSを固定させる。現在まで、HPPTSの共有結合は、スルホンアミドカップリングによるものであった(米国特許第4,798,738号)。染料を固定し、pH感受性を存続させるのに有効である一方、ポリマー基質は、第一級アミンを含有するものに限定される。さらに、カップリング後に基質上に残存するアミン基は、ポリマーマトリックス内部の局所的pHに影響を及ぼす。染料は、中性及び酸性環境で、並びに血管内血中ガスモニタリング系(この場合、それはpH及びpCO₂検出の両方のために用いられた)で操作する蛍光ベースのpHセンサーの開発(Gehrich, J.I., D.W. Lubbers, et al. (1986). "Optical fluorescence and its application to an intravascular blood gas monitoring system." *IEE TBio-med Eng BME-33*: 117-132)において、制御細孔ガラス(Offenbacher, H., O.S. Wolfbeis, et al. (1986). "Fluorescence optical sensors for continuous determination of near-neutral pH values." *Sensor Actuator* 9: 73-84)及びアミノエチルセルロース(Schulman, S.G., S. Chen, et al. (1995). "Dependence of the fluorescence of immobilized 1-hydroxypyrene-3,6,8-trisulfonate on solution pH: extension of the range of applicability of a pH fluorosensor." *Anal Chim Acta* 304: 165-170)と共有結合されてきた。光ファイバーpHセンサーは、陰イオン交換膜(Zhujun, Z. and W.R. Seitz (1984))又は樹脂(Zhang, S., S. Tanaka, et al. (1995). "Fibre-optical sensor based on fluorescent indicator for monitoring physiological pH values." *Med Biol Eng Comput* 33: 152-156)に結合され、そして光ファイバーの先端に取り付けられたHPPTSと共に記載されている。

【0104】

例えば米国特許第5,114,676号(この記載内容の全体は参照により本明細書中で援用される)は、粒子と又は微晶質セルロース繊維と共有結合され得る蛍光指示薬を有するpHセンサーを提供する。センサーは、光学的に透明な基質、熱可塑性層及びヒドロゲルを包含する。それに結合された指示薬を有する粒子の一部は、基質上に被覆されると共に熱及び圧力を用いて機械的に接着される熱可塑性層中に埋め込まれる。粒子/指示薬の大多数は、熱可塑性層上に適用されるヒドロゲル層内に埋め込まれる。pHセンサーは、光学導波管の先端に適用される。

【0105】

さらに、低コストUV LEDの近年の利用可能性に伴って、UV及び青色LED及びフォトダイオードモジュールを組み合わせる相対的に安価な計器使用により測定され得る。このような手順は、発酵媒質中に直接溶解されたHPPTSにより高処理量マイクロバイオリアクター系のpHを検出するために記載されている(Kostov, Y., P. Harms, et al. (2001). "Low-cost microbioreactor for high-throughput bioprocessing." *Biotechnol Bioeng* 72: 346-352)。

【0106】

本発明の一実施形態では、好ましい感知デバイスは、少なくとも1つの光源と、検出器と、蛍光レポーター染料系を含むセンサーとを包含する。一実施形態では、蛍光レポーター染料系は、分析物結合消光剤と操作可能的に結合される蛍光染料を含む。染料は、消光剤と共有結合されるか、又は単に消光剤と会合され得る。染料及び消光剤は好ましくは操作可能的に結合され、これは、操作に際して、消光剤がその蛍光と相互作用し、そして調整するのに十分に染料にごく近接して存在する、ということを意味する。一実施形態では

、染料及び消光剤は、分析物透過性ヒドロゲル又は他の高分子マトリックス内に一緒に閉じ込められ得る。適切な波長の光により励起される場合、蛍光染料は光を放出する（例えば蛍光発光する）。光の強度は、結合している分析物の量に伴って変わる消光の程度に応じて決まる。他の実施形態では、蛍光染料及び消光剤は、互いの代わりに、ヒドロゲル又は他の高分子マトリックスと共有結合され得る。

【0107】

一実施形態では、2つの染料系がセンサー中に一緒に（例えばヒドロゲル中に）固定されるよう、別個のpH指示薬染料は、分析物結合部分を用いて官能基化される異なる染料と組み合わされる。

【0108】

いくつかの蛍光pH指示薬分子は、特定波長で光を吸収し、そして第二のより長い波長で光を放出する。それらのpH指示機能は、典型的には、プロトン付加及び脱プロトン化を包含する。これは、これらの蛍光pH指示薬が、或るpH範囲では分子の一部を構成する（分子に結合される）水素原子（プロトン、 H^+ ）を含むが、しかし別のpH範囲内では、プロトンが分子から解離される、ということを意味する。プロトンが分子から解離されると、分子は負の電荷を呈し、これは、指示薬を有する溶液中の正荷電イオン（例えば Na^+ ）により釣り合いを保たれる。この配列は、方程式1（ $R-H \rightleftharpoons R^- + H^+$ ）で示される。

【0109】

Rが蛍光分子を表す場合、それは一般的に、それが $R-H$ 形態であるか R^- 形態であるかに基づいて、異なる波長での蛍光を示す（非常に異なる色として目に見える）。Rにより表されるほとんどの分子に関して、この変化は一般的に、非常に狭いpH範囲内で全く突然に起こって、Rを非常に簡単な且つ信頼できるpH指示薬として役立たせる。溶液中に置かれた場合、或るものは非常に異なる色（その $R-H$ 形態と関連した色）を、そして別のものはその R^- と関連した非常に別個の色を示す。

【0110】

例えば、その優れた光安定性、高収量、二重励起、大ストークス・シフト及び長い蛍光放出のため、8-ヒドロキシル-1,3,6-ピレントリスルホネート（HPTS）は、pH決定のための最良の潜在的指示薬の1つと考えられてきた。この指示薬の望ましい特徴は、酸性（会合HPTS形態）及び塩基性（解離 $P T S^-$ ）形態が406nm及び460nmで異なる励起波長を有し、等吸収点は418nmであるが、しかし515nmで同様の蛍光放出最大を示すということである。二重励起及び単一放出は、HPTSをpHのレシオメトリック検出に適したものに作る。酸形態に関する406nmでの蛍光強度は低減するが、しかし塩基形態に関する460nmでの強度は、pHが染料の酸性形態から塩基性形態への変換に伴って上がるにつれて高められる。

【0111】

HPTS及びその誘導体のような染料上のヒドロキシル（-OH）基のため、これらの染料は環境のpH変化に感受性である。ヒドロキシル基のpH依存性イオン化は、これらのピラニン誘導体にその酸性形態及び塩基性形態で異なる吸収最大を有するpH依存性吸収スペクトルを持たせる。一次吸収最大は第一の励起波長であり、そして二次吸収最大は第二の励起波長である。第一の励起波長及び第二の励起波長で蛍光染料により吸収される光の量は、蛍光染料が接触している媒質のpHによるか又は関連する。放出波長で染料により放出される光（例えば蛍光放出）の量は、染料が励起波長で照射される場合、光吸収の量に応じて決まる。吸収は媒質のpHにより影響を及ぼされるため、蛍光放出はpHによっても影響される。これは、pH決定のための基礎を提供し、一方で、ポリヒドロキシル化合物濃度を測定し得る。

【0112】

本発明の好ましい一実施形態では、レシオメトリックpH感知は、光ファイバーの近位末端領域に操作可能に連結された少なくとも1つの励起光源を包含する光学センサーを用いて成し遂げられるが、この場合、ファイバーはファイバーの光路内のその遠位末端領

10

20

30

40

50

域に沿って配置され、指示薬系は励起光に応答して検出可能な放出シグナルを発生するよう設計される。センサーの好ましい実施形態は、放出シグナルを検出器に送るための光学手段をさらに包含する。このような光学手段は当該技術分野でよく知られており、そして例えば光を戻すための鏡、フィルター、レンズ、ビームスプリッター、及び光ファイバー束及び分割形状を包含し得る。

【0113】

好ましい実施形態では、指示薬系は、少なくとも2つの異なる形態、並びにこれらの異なる形態間のpH依存性シフト（ここで、このシフトは単一波長での又は2つの異なる波長での放出強度の変化として検出され得る）を示すフルオロフォアを含む。例えば、レシオメトリックpH感知のための或る指示薬系は、染料がその酸形態であるか又は塩基形態であるかによって2つの異なる波長最大（酸及び塩基）で光を吸収する蛍光染料（例えばHPPTS）を含み、そしてそれは単一のより長い放出波長で光を放出する。さらに特定のには、pHが増大されると、HPPTSは、塩基に対応する吸光度の増大、及び酸に対応する吸光度の低減を示す。これらの変化は、ヒドロキシル基のpH依存性イオン化に起因する。HPPTSに関する放出スペクトルはpHと無関係であり、約511nmのピーク放出波長を有するが、しかし放出光の強度は吸収される光の量に応じて決まる（これはpH及び励起波長に伴って変わる）。したがって、例えば一次波長（例えば酸）の光で所定のpHでHPPTSを励起する場合、単一放出波長で放出強度を測定し得る；強度は、染料の形態（即ち、イオン化の程度 - これはpHに応じて決まる）による。二次波長（例えば塩基）で励起し、同一所定pHで放出強度を測定することもできる。放出強度の比はpHに関連し、そして染料の、並びに系中の或る光学的人工産物の量とは無関係である。任意の励起波長はレシオメトリック感知のために用いられ得るが、しかし酸及び塩基は本発明の一実施形態に従って選択される、ということに留意されたい。吸収が染料の酸形態及び塩基形態に関して同一である波長は、等吸収点と呼ばれる - この波長（ λ_{is} ）での励起も、本発明に対するその他の好ましい変更に従って、レシオメトリック感知に用いられ得る。放出強度の比（例えば $I_{塩基} / I_{is}$ 又は $I_{塩基} / I_{酸}$ ）がpHに対してプロットされる場合、標準曲線又は校正曲線が作成される（例えば図3、図5及び図9参照）。用いられる染料が二重エキサイター - 単一エミッター（例えばHPPTS）であるか、単一エキサイター - 二重エミッターであるか、又は二重エキサイター - 二重エミッターであるか否かに拘わらず、スペクトル特性における検出可能な変化を生じる形態でのpH感受性シフトを染料が受ける限り、レシオメトリック法は同様である。

【0114】

光学的グルコース感知

蛍光染料、例えばHPPTS及びその誘導体を含む指示薬系は、分析物検出に用いられてきた。例えば米国特許第6,653,141号、同第6,627,177号、同第5,512,246号、同第5,137,833号、同第6,800,451号、同第6,794,195号、同第6,804,544号、同第6,002,954号、同第6,319,540号、同第6,766,183号、同第5,503,770号、及び同第5,763,238号；並びに同時係属中の米国特許出願第11/296,898号及び同第60/833,081号（これらの記載内容の全体は各々、参照により本明細書中で援用される）参照。特にいくつかの好ましい蛍光染料、消光剤/分析物結合部分、並びにポリヒドロキシル化合物濃度を光学的に決定するための方法に関連した詳述は、米国特許第6,653,141号及び第6,627,177号、並びに米国特許出願第11/296,898号及び第60/833,081号に開示されている。

【0115】

pH及びグルコースの血管内決定のためのデバイス

一実施形態では、方法及びセンサーは、*in vitro*で媒質のpH並びに分析物の濃度をモニタリングする。別の実施形態では、方法及びセンサーは、*in vivo*でpH及び分析物濃度をモニタリングする。別の実施形態では、測定pH値は、*in vitro*又は*in vivo*でグルコース濃度をより正確に決定するためにも用いられ得る。

特定のには、pH値及びグルコース濃度の同時測定は、グルコース応答のシグナルの実時間補正を可能にする。しかしながら、いくつかの実施形態によるデバイスはpH又は分析物を決定するためにだけ用いられ得るセンサーを包含すると理解される（pHに関するその補正は、慣用的な2つのセンサー技術により、又は*in vitro*で血中pHを試験することにより実行され得る）。

【0116】

一実施形態は、pH及びポリヒドロキシル化合物の濃度を同時に決定するためのデバイスであって、消光剤と操作可能的に結合される蛍光染料を含むセンサーと、1つ又は複数の励起波長を上記センサーに送達するための手段と、上記センサーからの蛍光放出を検出するための手段とを包含するデバイスを提供する。

10

【0117】

別の実施形態は、生理学的流体中のpH及びポリヒドロキシル化合物濃度を決定するためのデバイスであって、水不溶性ポリマーマトリックスであって、該ポリマーマトリックスはポリヒドロキシル化合物に対して透過性である、水不溶性ポリマーマトリックス；該ポリマーマトリックスと会合される蛍光染料であって、該蛍光染料は第一の励起波長及び第二の励起波長で光を吸収するよう、そして放出波長で光を放出するよう設計される、蛍光染料；ポリヒドロキシル化合物濃度に依存する量のポリヒドロキシル化合物を可逆的に結合するようになっている芳香族ボロン酸置換ビオロゲンを含む消光剤であって、該消光剤は上記ポリマーマトリックスと会合され、そして蛍光染料と操作可能的に結合され、また、消光剤は結合ポリヒドロキシル化合物の量に関連した上記蛍光染料により放出される光強度を低減するよう設計される、消光剤、少なくとも1つの励起光源と、放出光検出器とを包含するデバイスを提供する。

20

【0118】

一態様において、本発明は、生理学的pH又はそれに近いpHでの水性媒質中のポリヒドロキシル化合物、例えばグルコースの存在に応答性である一クラスの蛍光消光性化合物を包含する。言い換えれば、消光効率は、媒質中のこれらの化合物の濃度により制御される。好ましい消光剤は、少なくとも1つのボロン酸基で置換されるビオロゲンを含むが、この場合、付加物がポリマー中に固定されるか又はポリマーと共有結合される。消光剤、染料及びポリマーも、互いに共有結合され得る。別の態様では、本発明は、ビオロゲン/ボロン酸付加物による消光に感受性である一クラスの蛍光染料を包含する。

30

【0119】

蛍光染料及び消光剤は、ポリヒドロキシル化合物感知のために互いに操作可能的に結合される。染料及び消光剤は、いくつかの実施形態ではポリマー主鎖を介して連結され得る。他の実施形態では、染料及び消光剤は、蛍光染料の消光が生じるよう互いにごく近接して存在し、それにより染料の蛍光放出を低減し得る。ポリヒドロキシル化合物（例えばグルコース）がボロン酸と結合してボロン酸エステルを形成する場合、ボロン酸エステルはビオロゲンと相互作用して、ポリヒドロキシル化合物結合の程度に応じてその消光効力を変更する。その結果、より多くのポリヒドロキシル化合物が消光剤と結合されるにつれ、蛍光放出の強度は増大する。

【0120】

40

好ましい一実施形態では、デバイスは、その中に配置されたキャビティを含むと共にキャビティ内に上記のような指示薬系（例えばグルコース結合部分/消光剤に操作可能的に結合されたフルオロフォア、及び固定化高分子マトリックス）を固定されている光ファイバーを包含する。デバイスはさらに、光源及び検出器を包含する。

【0121】

pH及びグルコースを同時決定するための方法

一実施形態は、蛍光染料を用いてpH及びポリヒドロキシル化合物濃度を決定するための方法であって、消光剤と操作可能的に結合される蛍光染料を含むセンサーを提供するステップと、上記センサーを試料と接触させるステップと、第一の励起波長で上記センサーを照射するステップと、放出波長で上記センサーの第一の蛍光放出を検出するステップと

50

、第二の励起波長で上記センサーを照射するステップと、上記放出波長で上記センサーの第二の蛍光放出を測定するステップと、第一の放出及び第二の放出の比をpH較正曲線と比較して試料のpHを決定するステップと、放出消光を既知のpHで標準曲線と相関させて上記試料中のポリヒドロキシ化合物濃度を決定するステップとを包含する方法を提供する。もちろん、他のアルゴリズムがレシオメトリックpH感知に関して知られており、そして本発明の実施形態に従って用いられ得る。制御装置、例えばコンピューター又は専用デバイスは、いくつかの実施形態では、励起光の適用、検出器シグナルのモニタリング、比の決定、比を較正曲線と相関させること、グルコースシグナルを標準曲線と相関させること、pH変化に関して補正すること、ルーチンセンサー較正操作を実行すること、オペレーター動作を促すこと、正確性を保持するためにプログラムされたようにユーザーデータ入力を組み込むこと（例えばフィンガースティック・グルコース測定）等を含めた操作を制御するために用いられ得る。

10

【0122】

図1に関して、本発明の一実施形態による感知装置100は、少なくとも1つの光源11（例えば励起光源）、検出器15（例えば放出光検出器）、並びに消光剤及び光学的ポリマーマトリックスに操作可能的に結合される蛍光染料を含むセンサー13を包含する。いくつかの実施形態では、光源11は、蛍光染料の励起のために2又はそれより多くの異なる波長を選択的に送達するよう適合され得る。この型の光源は、波長可変光源であり得る。他の実施形態では、波長を減衰させるために、1つ又は複数の光源が光ファイバー12と一緒に用いられ得る。他の実施形態では、1つより多くの光源11を用いて、異なる励起波長を送達し得る。このような光源は、第一の励起波長及び第二の励起波長をセンサーに送達するための一手段でもある。

20

【0123】

センサー13は、染料が消光剤と操作可能的に結合される場合、媒質のpH及びポリヒドロキシ化合物（例えば糖又はグルコース）濃度の両方に感受性である蛍光染料を包含する。このような蛍光染料は、蛍光染料の局所的環境のpHにおける対応するシフトに伴って励起波長最大でのシフトを示す。局所的環境のpHが変わると、第一の励起波長での吸収は増大し、一方、第二の励起波長での吸収は低減するか、或いはその逆もある。選択波長での吸収の変化は蛍光放出のレベルに影響を及ぼし、したがって最終的にはpH検出を可能にし得る。pH検出は、環境中のポリヒドロキシ化合物の濃度とは無関係である。適切な蛍光染料は、ピオロゲンのような分子による消光にも感受性である。蛍光染料が消光剤（例えばピオロゲン）と操作可能的に結合される場合、蛍光放出は減衰される。消光剤は、グルコース認識を提供し得る芳香族ボロン酸部分を有し得る。ボロン酸は、水性媒質中でグルコースと可逆的に反応して、ボロン酸エステルを形成し、このような反応の程度は媒質中のグルコース濃度に関連する。より多くのグルコースが消光剤と反応するのに利用可能である場合、染料から電子を受け取る消光剤の能力は減少する。その結果、消光剤による蛍光放出の減衰は、検出されるべきポリヒドロキシ化合物（例えばグルコース）の濃度に依存する。

30

【0124】

検出器15は蛍光放出を検出するために用いられ、好ましい実施形態では、分析のために電子制御装置20に連結され得る。光フィルター、例えば14は、波長選択のためにセンサー13と検出器15の間に配置され得る。他の光学部品、例えば鏡、照準及び/又は焦点レンズ、ビームスプリッター等も利用され得る。光フィルターは、選択波長をセンサーに送達するために、そしてセンサーからの蛍光放出を検出器に送達するために用いられ得る。光源及び検出器は、コンピューターのような電子制御装置20により制御され得る。

40

【0125】

本発明の一実施形態は、単一蛍光染料を用いてpH及びポリヒドロキシ化合物濃度を測定するための方法を提供する。測定は、*in vitro*又は*in vivo*で実行され得る。一次測定を実施する前に、センサーを較正することが必要であり得る。これは、

50

先ず、種々の pH でセンサーの吸光度スペクトルを得て、等吸収点並びに酸形態及び塩基形態に関する吸収最大が生じる波長を決定し、次に少なくとも 1 つの既知の pH 及びグルコース濃度でこれらの波長のうちの少なくとも 2 つから放出シグナルを獲得することにより実行され得る。

【 0 1 2 6 】

pH 及びポリヒドロキシル濃度測定に関して、センサー 13 が先ず試料と接触して配置される。次にセンサー 13 は第一の励起波長で、その後、第二の励起波長で照射される。第一の励起波長及び第二の励起波長は典型的には、蛍光染料の酸性形態に関しては吸収最大の波長（酸）、塩基性形態の蛍光染料に関しては吸収最大の波長（塩基）、或いは等吸収点の波長（ λ_{iso} ）又はその他の選択波長の近くで選択される。第一の励起波長及び第二の励起波長からの放出の比を用いて、試料 pH を決定する。第一の放出及び第二の放出は、pH に関して一旦補正されると、試料グルコース濃度を決定するために用いられ得る。

【 0 1 2 7 】

図 1 に示した感知デバイスに対する変更に際して、検出器は、標準フォトダイオード検出器であり得る。2 つのダイオード検出器（参照シグナルに関するものと、放出シグナルに関するもの）が存在し得る。ダイオード検出器の代わりに、光ファイバー保有センサー出力（蛍光放出及び/又は反射励起光）は、分光分析計又はマイクロ分光計に入力を直接提供し得る。好ましい一実施形態では、検出器は、マイクロ分光計、例えば UV/VIS マイクロ分光計モジュール（製造：Boehringer Ingelheim）を包含する。

【 0 1 2 8 】

図 2 は、本発明の好ましい態様に従って用いられ得る光学系の一実施形態を示す。図 2 を参照すると、或る実施形態は、少なくとも 2 つの光源 301A 及び 301B を包含する。光源は、コリメーターレンズ 302A 及び 302B を通して送られ得る（図示されているように）励起光を発生する。或る実施形態では、その結果生じるコリメーターレンズからの光は、（図示されているように）干渉フィルター 303A 及び 303B に送られ得る。或る実施形態では、その結果生じる干渉フィルターからの光は、焦点レンズ 304A 及び 304B により、光ファイバーライン 305A 及び 305B に集められ得る（図示されているように）。或る実施形態では、光ファイバーラインは、埋め込み指示薬系 307A を有するセンサー 307 と連続する単一ファイバー 306 に合流する。ファイバーの横断面は、（図示されているように）中心光ファイバー 306A を取り囲むファイバーの束から単一ファイバー 307A に変わり得る。

【 0 1 2 9 】

或る実施形態では（図示されているように）、指示薬系 307A により発生される放出光シグナル、並びに励起光シグナルは、鏡 308 により反射されて、センサーから光ファイバーライン 309 及び 309A に送り戻される。図示された系では、出口ラインは 2 つの干渉フィルター 312A、312B 及び 2 つの検出器 313A、313B を含めることにより増す。好ましい実施形態では、干渉フィルター 312A は、励起光を遮断し、放出光を検出器 313A に通させて、ここで放出光が検出されるよう設計される。或る実施形態では、検出器 313A により作り出されるシグナルは増幅器 314A により増幅され、そしてアナログ - デジタル変換器 315A によりデジタルシグナルに変換されて、コンピューター 316 に送られる。或る実施形態では、干渉フィルター 312B は、放出光を遮断し、励起光を検出器 313B に通させて、ここで励起光が測定されるよう設計される。或る実施形態では、検出器 313B により作り出されるシグナルは増幅器 314B により増幅され、そしてアナログ - デジタル変換器 315B によりデジタルシグナルに変換されて、コンピューター 316 に送られる。レシオメトリック計算を用いて、放出光の強度に影響を及ぼす非グルコース関連因子を実質的に除去又は低減し得る；これらの方法は、同時係属中の米国特許仮出願第 号（表題「血管内フルオロフォアセンサーを用いるグルコースのレシオメトリック測定のための光学系及び方法（Optical systems and methods for ratiometric measurement of glucose using intravascular fluorophore sensors

10

20

30

40

50

」) (本明細書と同一日に提出) (この記載内容の全体は参照により本明細書中で援用される) に詳細に開示されている。

【実施例】

【0130】

実施例 1

図 3 は、蛍光染料 (この場合は H P T S) の励起 / 吸収スペクトルの一例を示す。異なる pH で得られた蛍光染料の吸収スペクトルから、酸、塩基及び i_{so} が決定され得る。より低い pH (例えばより酸性の条件) では、約 405 nm でのピークは約 460 nm でのピークより高く、したがって酸性形態の蛍光染料に関する吸収最大である。より高い pH (例えばより塩基性の条件) では、約 460 nm でのピークは約 405 nm でのピークより高く、したがって塩基性形態の蛍光染料に関する吸収最大である。 i_{so} は、吸収が pH と無関係である波長であり、そしてそれは、例えば H P T S に関しては約 422 nm である。

【0131】

第一の励起波長 (例えば 酸、塩基又は i_{so}) での照射の結果として生じる放出波長での第一の蛍光放出強度 (I_x 、これは $I_{酸}$ 、 $I_{塩基}$ 又は $I_{i_{so}}$ であり得る) は次に検出器により測定され、そして結果は電子制御装置に保存される。次に、センサーは再び第二の励起波長で照射される。第二の励起波長は第一の励起波長とは異なり、そしてこれも酸、塩基又は i_{so} から選択され得る。検出器は次に、第二の励起波長 (例えば 酸、塩基又は i_{so}) での照射の結果として生じる第二の蛍光放出強度 (I_y 、これは $I_{酸}$ 、 $I_{塩基}$ 又は $I_{i_{so}}$ であり得る) を検出し / 測定する。次に、第一の蛍光放出及び第二の蛍光放出の比 (I_x / I_y) がコンピューター計算され得る。 I_x / I_y はポリヒドロキシル濃度とは無関係であるため、pH 標準曲線 (I_x / I_y 対 pH) は、ポリヒドロキシル濃度の作用を考慮することなくプロットされ得る。

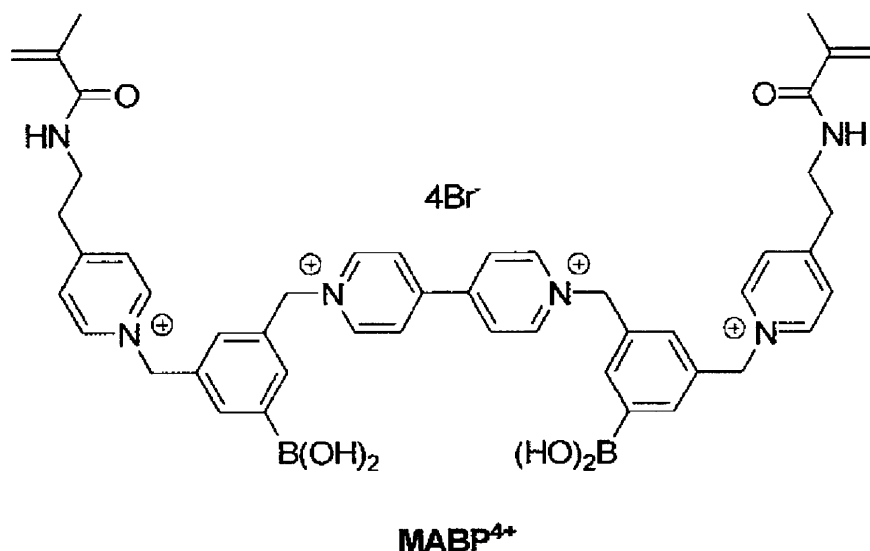
【0132】

実施例 2 (H P T S / M A B P 4)

図 4 は、 $I_{(塩基)} / I_{(i_{so})}$ 比を用いる H P T S / M A B P 4 を用いたレシオメトリック pH 感知がグルコース濃度と無関係であることを示す。M A B P 4 の構造を以下に示す：

【0133】

【化 15】



10

20

30

40

50

【 0 1 3 4 】

データは、種々のグルコース濃度での454nm（塩基）及び422nm（等吸収点）での励起に対応する蛍光放出対pHの比としてプロットされる。グルコース濃度の変化は、各特定pHでの $I_{\text{塩基}} / I_{\text{iso}}$ の値に識別可能な影響を及ぼさない。したがって、試料中のポリヒドロキシル化合物濃度にかかわらず、試料のpHは I_x / I_y 対pHの標準曲線を用いて測定され得る。測定 I_x / I_y を標準曲線と関連させるか又は比較することにより、測定中の試料のpHを決定し得る。

【 0 1 3 5 】

図5は、異なるpHで、422nm（等吸収点）で励起されたHPTS/MABP4に関するグルコース応答曲線を示す。種々のグルコースレベル（ I ）での I_x / I_y 対ゼログルコース濃度（ I_0 ）での I_x / I_y の比をグルコース濃度に対してプロットすることにより、標準ポリヒドロキシル応答曲線を用いて、測定 I / I_0 値から試料中のグルコース濃度を決定し得る。しかしながら、 I / I_0 値は試料のpHに依存するため、標準グルコース応答曲線は異なるpHにより影響を及ぼされ得る。これを回避するために、生理学的範囲内の異なるpHでのいくつかの標準グルコース応答曲線がプロットされ、そして電子制御装置又はセンサーデバイスのオペレーターによる選択のために利用可能である。試料の I_x / I_y 測定値が利用可能である場合、電子制御装置又はオペレーターは標準 I_x / I_y 対pH曲線から試料のpHを知り、そして正しい標準ポリヒドロキシル応答曲線（例えばグルコース応答曲線）が正確なグルコース濃度を決定するために用いられ得る。図に示された例はグルコース濃度の決定に関するが、しかし本発明の方法及びデバイスの適用はグルコース濃度を検出することに限定されない。蛍光系はポリヒドロキシル化合物に反応し、同様に、それはグルコースに反応するため、センサーデバイスを用いて、同時に任意のポリヒドロキシル化合物濃度及びpHを検出し得る。

【 0 1 3 6 】

実施例3（SNARF-1）

図6は、溶液中の異なるpHでのSNARF-1の吸収スペクトルを示す。SNARFは、Molecular Probes, Inc.からの市販染料のクラスに関する商標名である。SNARF-1を用いて、これらの実験を実行した。図7及び図8は、514nm励起/587nm放出（図7）又は514nm励起/625nm放出（図8）で決定された異なるpHでの溶液中のSNARF-1/3,3'-oBBVに関するグルコース応答曲線を示す。図9は、514nmの単一励起波長並びに587nm及び625nmの放出波長で決定された $I_{\text{塩基}} / I_{\text{酸}}$ 比を用いた溶液中のSNARF-1/3,3'-oBBVに関する異なるグルコース濃度でのpHのレシオメトリック感知を示す。したがって、消光剤3,3'-oBBV（溶液中）と操作可能的に結合された二重-二重染料SNARF-1を単一エキサイター-二重エミッター・フルオロフォアとして用いて、pH（レシオメトリック）及びグルコースを共に決定し得る。

【 0 1 3 7 】

実施例4（HPTS-トリLysMA/3,3'-oBBV/DMAA）

図10は、異なるpHでのHPTS-トリLysMA/3,3'-oBBV/DMAA指示薬系のグルコース応答を示す。図11は、 $I_{\text{塩基}} / I_{\text{酸}}$ 比を用いたHPTS-トリLysMA/3,3'-oBBV/DMAAに関する異なるグルコース濃度でのpHのレシオメトリック感知を示す。この指示薬系は、生理学的pH範囲に亘って線形pH曲線を示すことが分かる。

【 0 1 3 8 】

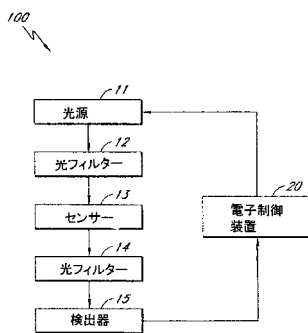
実施例5（HPTS-トリCysMA/3,3'-oBBV/DMAA）

図12は、 $I_{\text{塩基}} / I_{\text{酸}}$ 比を用いたHPTS-トリCysMA/3,3'-oBBV/DMAA指示薬系に関する異なるグルコース濃度でのpHのレシオメトリック感知を示す。この指示薬系は、生理学的pH範囲に亘って線形pH曲線を提供することが分かる。この実施例に関しては、光ファイバーの末端に埋め込まれたヒドロゲル中に、指示薬系を固定した。手で持てる大きさの検出器を用いて、酸及び塩基放出シグナルを測定した。

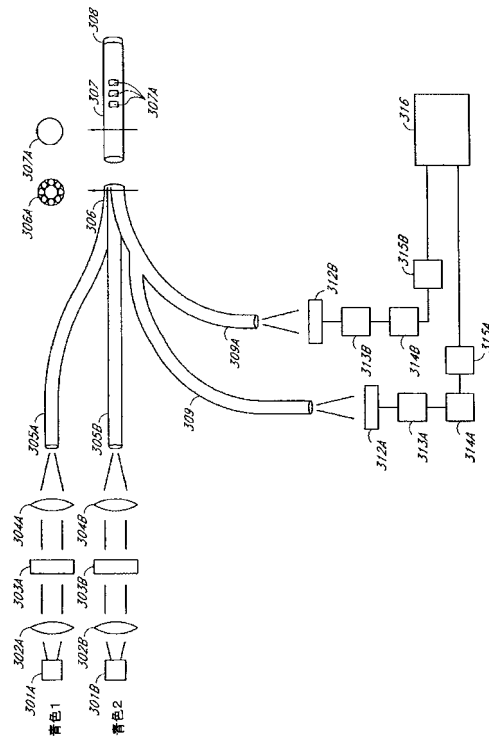
【 0 1 3 9 】

本発明の多数の好ましい実施形態及びその変形を詳細に記載してきたが、その他の修正並びにその使用方法及び医学的適用は当業者には明らかである。したがって、本発明の精神或いは特許請求の範囲を逸脱しない限り、種々の適用、修正及び置換が均等物から成され得る、と理解されるべきである。

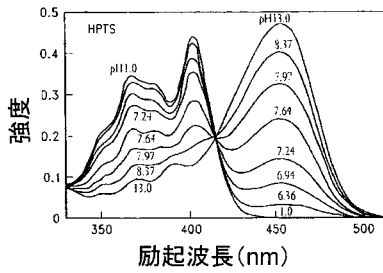
【 図 1 】



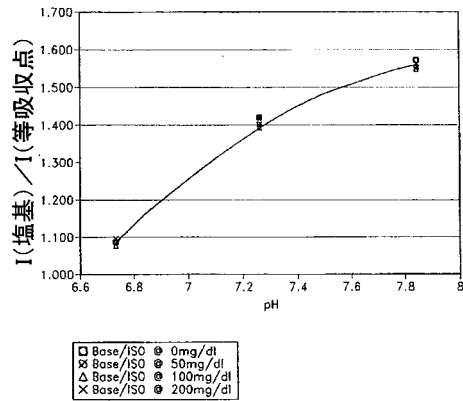
【 図 2 】



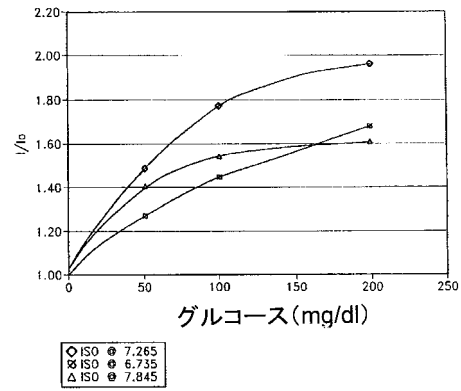
【図 3】



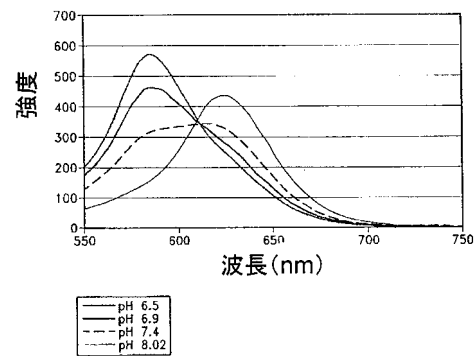
【図 4】



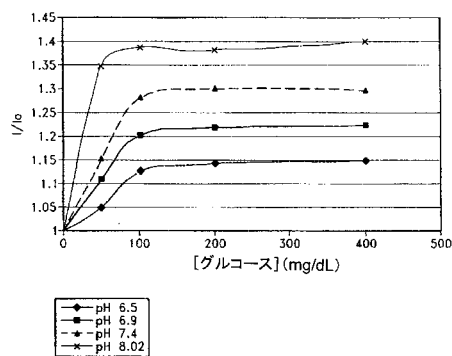
【図 5】



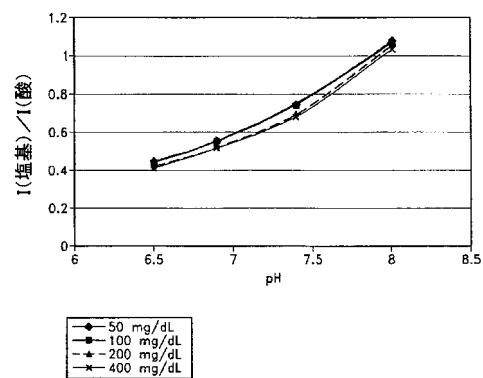
【図 6】



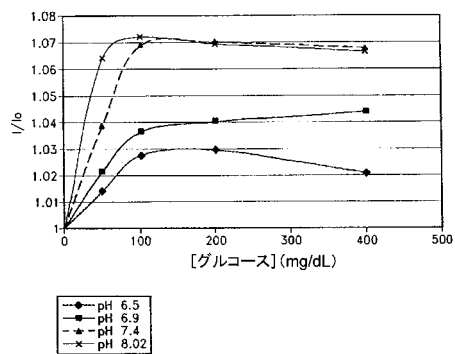
【図 7】



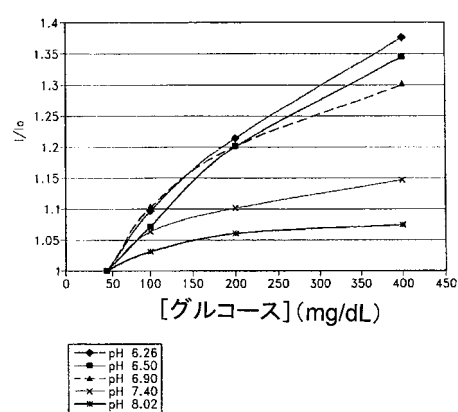
【図 9】



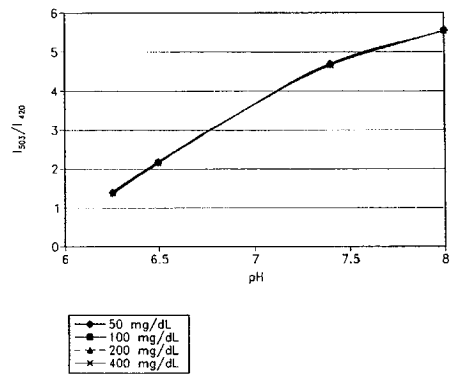
【図 8】



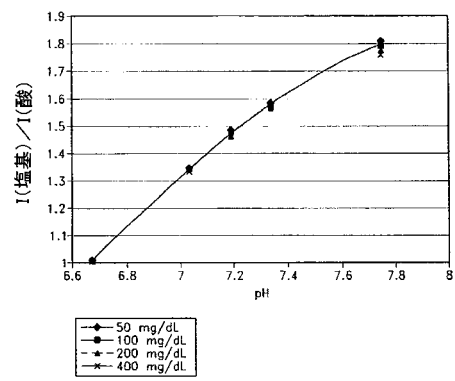
【図 10】



【図 1 1】



【図 1 2】



フロントページの続き

- (74)代理人 100126505
弁理士 佐貫 伸一
- (74)代理人 100131392
弁理士 丹羽 武司
- (72)発明者 マークル, デヴィッド アール .
アメリカ合衆国 ペンシルバニア 1 9 3 1 2 パーウィン カーウィン レーン 3 8 0
- (72)発明者 スリ, ジェフ ティー .
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 2 6 8 8 ランチョ サンタ マルガリータ ポメロ 7 8
- (72)発明者 ヴェスリング, リッチー エー .
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 5 0 7 6 ワトソンビル カラバサズ ロード 8 6 7
- (72)発明者 ロメイ, マシュー エー .
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 2 6 5 2 アリソ ビエジョ ヴェリシモ ドライブ 2 3

審査官 伊藤 裕美

- (56)参考文献 国際公開第 2 0 0 6 / 0 2 3 7 2 5 (W O , A 2)
特表 2 0 0 2 - 5 2 3 7 7 4 (J P , A)
特表 2 0 0 4 - 5 3 6 2 7 9 (J P , A)
国際公開第 2 0 0 5 / 0 6 5 2 4 1 (W O , A 2)
特表 2 0 1 0 - 5 1 7 6 9 3 (J P , A)
BADUGU R , TALANTA , NL , ELSEVIER , 2 0 0 5 年 4 月 3 0 日 , V66 N3 , P569-574
CAPPUCCIO FRANK E , JOURNAL OF FLUORESCENCE , 2 0 0 4 年 9 月 , V14 N5 , P521-533
GAMSEY SOYA , LANGMUIR , THE ACS JOURNAL OF SURFACES AND COLLOIDS , 2 0 0 6 年 1 0 月 1 0 日 , V22 N21 , P9067-9074

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

G01N 21/62-21/83
C09K 11/06
G01N 33/66
G01N 33/84