



(12) PATENT

(19) NO

(11) 332247

(13) B1

NORGE

(51) Int Cl.

G01N 33/543 (2006.01)

A61B 5/1455 (2006.01)

A61B 5/1473 (2006.01)

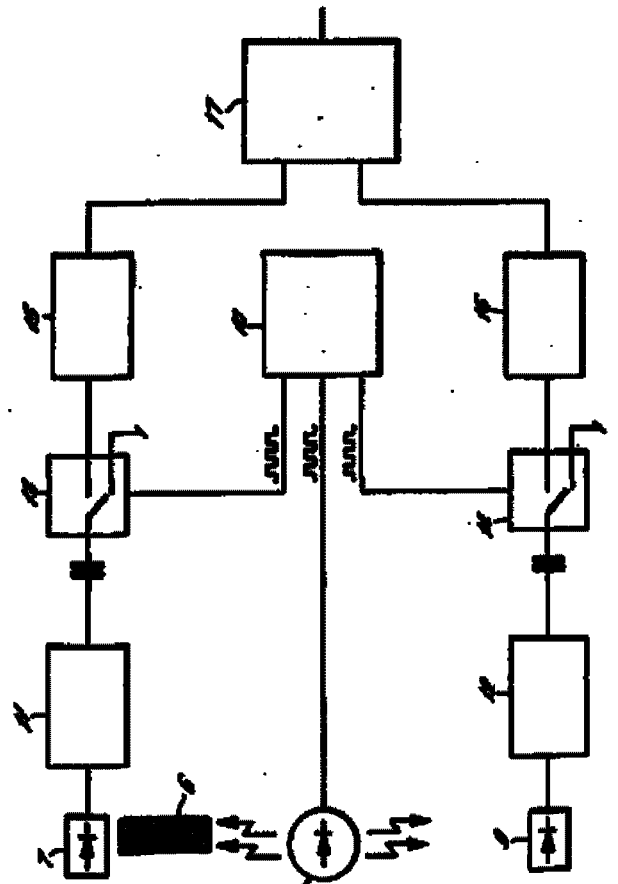
B82Y 5/00 (2011.01)

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	20040098	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	2002.06.27 PCT/EP2002/07108
(22)	Inng.dag	2004.01.09	(85)	Videreføringsdag	2004.01.09
(24)	Løpedag	2002.06.27	(30)	Prioritet	2001.07.10, GB, 0116853
(41)	Alm.tilgj	2004.03.09			
(45)	Meddelt	2012.08.06			
(73)	Innehaver	Precisense A/S, Dr. Neergaards Vej 3, DK-2970 HØRSHOLM, Danmark			
(72)	Oppfinner	Bo Petersson, Sophienberg Vænge 17, DK-2690 Rungsted, Danmark Jesper Svenning Kristensen, Virumvej 77 B, DK-2830 VIRUM, Danmark			
(74)	Fullmektig	Zacco Norway AS, Postboks 2003 Vika, 0125 OSLO, Norge			

(54)	Benevnelse	Optisk sensor inneholdende partikler for in situ måling av analytter
(56)	Anførte publikasjoner	CLARK, H.A. et al., Optical nanosensors for chemical analysis inside single living cells, 1. fabrication, characterization, and methods for interacellular delivery of PEBBLE sensors, Analytical Chemistry, 1999, Vol.71, Nr.21, side 4831-4836., US 6163714 A
(57)	Sammendrag	

Oppfinnelsen vedrører en sensor for in vivo-måling av en analytt omfattende et flertall partikler av egnet størrelse slik at når de implanteres i kroppen til et pattedyr, kan partiklene ingesteres av makrofager og transporteres vekk fra implantasjonsstedet, hver partikkel inneholder komponenter til en analyse som har en utsending som er et optisk signal påvisbart transdermalt av eksterne optiske innretninger, og enten er hver partikkel inneholdt inne i et biologisk nedbrytbart materiale som forhindrer ingesting av makrofagene, eller så er hver partikkel ikke-biologisk nedbrytbare. Oppfinnelsen vedrører en fremgangsmåte for påvisning av en analytt ved anvendelse av en slik sensor, omfattende implantasjon av sensoren inn i huden til et pattedyr, transdermal påvisning av en analytt ved anvendelse av eksterne optiske innretninger, nedbryting av de biologisk nedbrytbare materialer, ingesting av partiklene av makrofager, og fjerning av partiklene fra implantasjonsstedet av makrofager.



Den foreliggende oppfinnelsen vedrører en sensor for anvendelse ved måling og overvåking av analyter i kroppsvæsker ved anvendelse av optiske teknikker. Sensoren er spesielt egnet for anvendelse i situasjoner der analyttnivåer må overvåkes nøyaktig, for eksempel med medikamenter som holdes innenfor et smalt terapeutisk vindu eller
5 der analyttmålinger må tas gjentatte ganger, slik som ved behandling av diabetes.

Når det gjelder diabetesbehandling, er den regelmessige målingen av glukose i blodet svært viktig for å sikre korrekt insulindosering. Videre har det vært demonstrert at ved langtidsbehandling av diabetespasienter kan bedre kontroll av blodglukosenivåene
10 forsinke, hvis ikke til og med forhindre, begynnelsen av retinopati, sirkulasjonsproblemer og andre degenerative sykdommer som ofte assosieres med diabetes. Det er derfor et behov for pålitelig og nøyaktig selvmåling av blodglukosenivåer for diabetespasienter.

15 I dag måles blodglukose av diabetespasienter ved anvendelse av kommersielt tilgjengelige kolorimetriske testremser eller elektrokjemiske biosensorer (for eksempel enzynelektroder), begge disse krever regelmessig anvendelse av et lansetttypeinstrument for å trekke ut en egnet blodmengde hver gang det gjøres en måling. Gjennomsnittlig vil hoveddelen av diabetespasienter anvende slike
20 instrumenter for å ta måling av blodglukose to ganger om dagen. Imidlertid anbefalte nylig US Natonal Institutes of Health at blodglukosetesting bør utføres minst fire ganger om dagen, en anbefaling som støttes av the American Diabetes Association. Denne økningen i frekvensen av blodglukosetesting pålegger en betydelig byrde på diabetespasienten, både når det gjelder de finansielle kostnadene og når det gjelder smerte og
25 ukomfort, spesielt ved langtidsdiabetes som trenger å anvende bruk av en lansett for å trekke ut blod fra fingertuppene. Således er det klart et behov for et bedre langtidsglukosemålingssystem som ikke involverer taking av blodprøver fra pasienten.

I den senere tid har det vært en lang rekke forskjellige forslag for glukosemålings-
30 teknikker som ikke krever at det tas blodprøve av pasienten. Forskjellige forsøk har blitt gjort for å konstruere innretninger der en enzynelektrodebiosensor plasseres på enden av en nål eller kateter som så innføres i en blodåre (Wilkins, E. og Atanasov, P., Med. Eng. Phys. (1996) 18: 273-288). Mens selve følerinnretningen er lokalisert inne i en blodåre, forblir nålen eller kateteret tilkoblet til det ytre miljøet. I praksis er slike
35 innretninger ikke egnet for anvendelse på mennesker, først på grunn av at innføringen av en nål eller kateter i en blodåre innebærer en infeksjonsrisiko og er også ubehagelig for pasienten og derfor ikke egnet for kontinuerlig bruk. For det andre har innretninger

av denne typen ikke oppnådd godkjenning for anvendelse på pasienter siden det har blitt foreslått at innretningen i seg selv, på enden av nålen eller kateteret, kan være ansvarlig for å forårsake tromboser inn i pasientens blodsirkulasjon. Dette innebærer selvfølgelig en svært alvorlig risiko for pasientens helse.

5

Mansouri og Schultz (Biotechnology 1984), Meadows og Schultz (Anal. Chim. Acta. (1993) **280**: pp21-30) og US patent nr 4 344 438 beskriver alle innretninger for in situ-måling av lavmolekylære vektforbindelser i blodet ved optiske innretninger. Disse innretningene er utformet til å innføres inn i en blodåre eller plasseres subkutant, men krever fiberoptisk forbindelse til en ytre lyskilde eller en ytre detektor. Igjen medfører lokaliseringsinnretningene i en blodåre en assosiert risiko for å fremme tromboser og i tillegg, i en utførelsesform er behovet for å opprettholde en fiberoptisk forbindelse til det ytre miljøet upraktisk for lang tids anvendelse og innebærer en risiko for infeksjon.

15 I søket etter en mindre invasiv glukosemålingsteknikk har noe oppmerksomhet også blitt fokusert på anvendelse av infrarød spektroskopi for direkte å måle blodglukosekonsentrasjon i blodårer i vev slik som øreflippen eller fingertuppen som er relativt "lystransparente" og har blodårer som sitter nær overflaten av huden (Jaremko, J. og Rorstad, O. Diabetes Care 1998 **21**: 444-450 og Fogt, E.J. Clin. Chem. (1190) **36**:, 20 1573-80). Denne tilnærmingen er opplagt minimalt invasiv, men den har vist seg å ha liten praktisk verdi på grunn av det faktum at det infrarøde spektrum av glukose i blodet er så likt det til det omgivende vevet at i praktisk bruk er det så å si umulig å oppløse de to spektrene.

25 Det har også blitt observert at konsentrasjonen av analyter i subkutan fluid korrelerer med konsentrasjonen av nevnte analyter i blodet, og følgelig har det vært flere rapporter på anvendelse av glukosemålingsinnretninger som er anbragt i et subkutant sted. Spesielt Atanasov et al. (Med. Eng. Phys. (1996) **18**: sidene 632-640) beskriver anvendelse av en implanterbar glukosefølingsinnretning (dimensjoner 5,0 x 7,0 x 1,5 30 cm) for å måle glukose i subkutan fluid til en hund. Innretningen består av en amperometrisk glukosesensor, en miniatyr potensiostat, en FM signaltransmitter og en strømtilførsel og kan fjernkontaktes, via antenne og mottaker koblet til et datamaskinbasert dataakvisisjonssystem, uten noe behov for tilkobling til det ytre miljø. Imidlertid gjør den store dimensjonen av denne innretningen at den opplagt er upraktisk for 35 anvendelse i et menneske.

Ryan J. Russell et al, *Analytical Chemistry*, Vol. 71, Number 15, 3126-3132 beskriver en implanterbar hydrogel basert på polyetylenglykol inneholdende fluorescein isotiocyanatdekstran (FITC-dekstran) og tertrametylrhodamin isotiocyanat konkavalin A kjemisk konjugert til hydrogelnettverket for dermal implantasjon. De implanterte
5 hydrogelkulene kan utspørres/kontaktet transdermalt.

R. Ballerstadt et al, *Analytica Chimica Acta*, 345 (1997), 203-212 beskriver et analyse-system der to polymere (dekstran) molekyler respektivt merkes med første og andre fluoroforer og er bundet sammen av multivalente lektinmolekyler, som produserer
10 dempning. Glukose metter bindingssetene til lektinet som forårsaker dissosiasjon av de to polymerene som gir en økning i fluorescens.

Josept R. Lakowicz et al, *Analytica Chimica Acta*, 271, (1993), 155-164 beskriver anvendelse av fasemodulasjon og fluorimetri. Dette substituerer en fluorescenslevetid-
15 basert måling for fluorescensintensitetsbaserte målinger beskrevet i tidligere kjente teknikker.

Fluorescenslevetid kan måles av en fasemodulasjonsteknikk ved eksitering av fluorescens ved anvendelse av lys som er intensitetsmodulert ved 1-200 MHz og måling
20 av faseskiftet til emisjonen relativt det innfallende lyset og modulasjonen til emisjonen.

I WO91/09312 er det beskrevet en subkutan fremgangsmåteinnretning som anvender en affinitetsanalyse for glukose som kan kommunisere fjernstyrt ved optiske innretninger. I WO97/19188 er det er et ytterligere eksempel på et implanterbart analysesystem for
25 glukose som produserer et optisk signal som kan fjernutsendes. Innretningen beskrevet i WO91/09312 og WO97/19188 vil være jevn i kroppen for utstrakte perioder etter at analysekjemien har sluttet å drives korrekt, og dette er en hovedulempe for kroniske anvendelser. Fjerning av innretningene vil kreve et kirurgisk inngrep.

30 WO00/02048 tar for seg dette problemet ved anvendelse av et biologisk nedbrytbart materiale som inneholder analysereagenser. Der vil analysematerialene sannsynligvis være i kontakt med blodstrømmingen når det biologisk nedbrytbare materialet har blitt nedbrutt. Det vil være ønskelig å minimalisere eller unngå dette.

35 Clark, H. A. et al, *Analytical Chemistry*, Vol. 71, Number 21, side 4831 – 4836 beskriver fremstilling av optiske nanosensorer med en dimensjon på partiklene mellom

20 nm – 200 nm. Videre beskriver publikasjonen at partiklene kan leveres inn i celler ved hjelp av liposomer som fuserer med cellene og slipper partiklene ut i cytoplasma.

Det forblir et klart behov for følsomme og nøyaktige blodglukosemålingsteknikker som ikke krever regelmessige blodprøver fra pasienten, som ikke medfører en risiko for infeksjoner eller ubekvemhet og som ikke lider av de praktiske ulempene til de tidligere beskrevne implanterbare innretningene.

Følgelig, i et første aspekt i den foreliggende oppfinnelsen er det frembragt en sensor for in vivo måling av en analytt, omfattende flere ikke-biologisknedbrytbare partikler av som er mindre enn 5 μm i sin største dimensjon slik at når de implanteres inn i kroppen til et pattedyr kan partiklene inntas av makrofager og transporteres vekk fra implantasjonsstedet, hver partikkel inneholder komponentene til en analyse som har en utsendelse/signalutsendelse som er et optisk signal som kan påvises eller måles transdermalt av eksterne optiske innretninger, og enten er hver partikkel inneholdt inne i et biologisk nedbrytbart gel som forhindrer innføring av makrofaget.

Sensorpartiklene er fortrinnsvis innelukket i en matriks av biologisk nedbrytbart materiale, men kan alternativt inneholdes i en ”konvolutt” av biologisk nedbrytbart materiale, eller kan adskilt dekket med biologisk nedbrytbart materiale.

Sensoren kan innføres inn i huden ved innsprøyting, fortrinnsvis ved bruk av en sprøyte, eller ved andre metoder, spesielt ved fremgangsmåten beskrevet i WO00/02048. Sensoren kan innføres inn i tykkelsen til dermis, eller subdermalt, eller kan innføres inn i epidermis, selv om det i det sistnevnte tilfellet vil være sannsynlig at den frastøtes fra huden ved voksing av de epidermiske lagene, muligens før det biologisk nedbrytbare materialet, hvis det er til stede, har blitt nedbrutt.

Siden sensoren er lokalisert inne i huden, kan et optisk signal generert i sensorpartiklene påvises transkutant (det vil si gjennom de høyere lagene av huden) og således unngås behovet for noen direkte forbindelse mellom sensoren og det ytre miljøet. Straks sensoren er på plass i et kutant sted, kan analyttmålinger tas så ofte som det er nødvendig uten noen skadelige virkninger. Dette er spesielt fordelaktig når det gjelder langtidsbehandling av diabetespasienter siden når glukosemålinger tas hyppigere, kan det holdes en tettere kontroll over nivået av glukose i blodet og risikoen for å utvikle tilstander vedrørende dårlig regulert blodglukose, slik som retinopati, nefropati,

neuropati, generelle mikro- og makrovaskulære skader og dårlig blodsirkulasjon, vil reduseres.

Det biologisk nedbrytbare gel, hvis det er til stede, og sensorpartiklene er fortrinnsvis
5 gjennomtrengelige for kroppsvæsker, derved tillates analyter slik som glukose å komme inn i partiklene med diffusjon og å samvirke med komponentene i analysen.

Siden sensoren ifølge oppfinnelsen ikke selv inneholder noen av de optiske komponentene som kreves for å kommunisere signalutsendelsene av analysen (disse
10 frembringes separat og er lokalisert utenfor kroppen) kan sensoren lett frembringes i en form som er injiserbar med minimal ukomfort for pasienten.

Det biologiske nedbrytbare gel kan være en injiserbar formulering som danner en gel ved injiseringspunktet inne i huden til pasienten. Sensorpartiklene kan dannes fra et fast
15 polymermateriale som innlemmer komponentene i analysen som igjen injiseres eller implanteres subkutant, det polymere materialet er typisk av en størrelse som er egnet for innsprøyting/injisering gjennom en smal målesprøyte for å minimalisere ubehaget for pasienten. Når det er plassert subkutant, absorberer det faste polymer-materialet vann og ekspanderer til å danne en gel, således hydratiseres komponentene i analysen.

20 Det biologisk nedbrytbare gel inneholder sensorpartikler slik at de holdes i posisjon ved injiseringsstedet. Dette muliggjør at optiske målinger kan tas på hudoverfalten over dette stedet. Analysen inneholdt i alle sensorpartiklene kan således utspørres/kommuniseres samtidig for å gi et målbart signal.

25 Det biologisk nedbrytbare gel vil nedbrytes over en tids-periode inne i huden, og frigjøre sensorpartiklene. Ved dette punktet er den nyttige levetiden til sensoren over, og det er ønskelig å fjerne partiklene fra kroppen eller å holde partiklene inne i kroppen vekk fra sensor/følestedet. Hvis partiklene skal fjernes fra kroppen, er det ønskelig å
30 oppnå dette uten kirurgisk inngrep.

Makrofagceller finnes i kroppen som en del av immunsystemet. Disse cellene produseres i benmargen, og er i stand til å innta/ingestere fremmede partikler (innbefattende nekrotiske celler) ved å omgi slike partikler med utstøtinger/ekstrusjoner
35 av cellemembranen i en prosess som kalles fagocytose. Makrofager sekreterer også enzymer som skader fremmedorganismer.

Makrofager er i stand til å innta/ingestere og transportere fremmede partikler opptil en viss størrelse, for eksempel 5 μm i største dimensjon. Derfor, når sensorbiologisk nedbrytbart gel ifølge denne oppfinnelsen nedbrytes til å frigjøre egnede små sensorpartikler, vil sensorpartiklene ingesteres av makrofager. Sensorpartiklene kan
5 også ingesteres av andre komponenter av immunsystemet.

Hvis sensorpartiklene ikke er inneholdt i et biologisk nedbrytbart materiale, kan sensorpartiklene ingesteres av makrofager uten forsinkelse forbundet med nedbrytning av det biologisk nedbrytbare materialet. Optiske målinger målt således ble tatt over den
10 relativt korte tidsperioden mellom innføring av sensorpartiklene i kroppen og fjerning av sensorpartiklene av makrofagene.

Fortrinnsvis har sensorpartiklene ifølge oppfinnelsen egnede overflatekarakteristikker for ingestering av makrofager.

15

Etter fagocytosen, går makrofagene til lymfesystemet. Siden sensorpartiklene ikke er biologisk nedbrytbare, vil de forbli i lymfeknutene. Dette betyr at reagensene i oppfinnelsen vil elimineres via lymfesystemet fremfor å bli frigjort i huden.

20

Hver av sensorpartiklene kan inneholde analysekomponenter enten innkapslet inne i en hul mikropartikkel, eller dispergert inne i materialet av en fast mikropartikkel. Teknikker for å danne slike mikropartikler er kjent på feltet. Typisk er analysekomponenter, polymer og løsningsmiddel kombinert for å danne en liten dråpe. Løsningsmiddelet fjernes og de små dråpene samles opp, tørkes og filtreres for å
25 produsere et tørt, frittstrømmende pulver av faste mikropartikler som inneholder dispergerte analysekomponenter. Alternativt kan emulsjons- eller koaservasjons-teknikker anvendes. Begge prosessene kan inkorporere stabiliseringsteknikker.

30

Materialer egnet som biologisk nedbrytbare materialer for en sensor ifølge oppfinnelsen innbefatter biologisk nedbrytbare blokkopolymerer slik som de beskrevet av Jeong et al., Nature 388: side 860-862. Vandige løsninger av disse materialene er termosensitive, fremviser temperaturavhengige reversible gel-soloverganger. Det
35 polymere biologisk nedbrytbare materialet kan opplastes med sensorpartikler ved en forhøyet temperatur der materialet danner en sol. I denne formen er materialet injiserbart og ved en kutan injisering og påfølgende hurtig nedkjøling til kropps-

temperatur danner materialet en gelmatriks. Sensorpartiklene er suspendert inne i denne gelmatriksen som således utgjør en sensor egnet for påvisning av eller måling av analyter i kroppsvæske. Lavmolekylære vektanalyter, slik som glukose, kan fritt diffundere inn i gelmatriksen fra omgivende kroppsfliuid. Kutane injiseringer av
5 solfasematerialet forårsaker verken betydelige smerter eller vevsskade.

Som et alternativ den gelbaserte sensoren beskrevet ovenfor, kan sensoren omfatte et fast eller gellignende polymerbiologisk nedbrytbart materiale inn i hvilken sensorpartiklene fordeles. Når den injiseres eller implanteres kutant, hydratiseres eller sveller
10 denne faste polymersensoren, og analytt trenger igjennom strukturen og møter sensorpartiklene.

Biologisk nedbrytbare materialet egnet for anvendelse i konstruksjonen av sensorene innbefatter kryssbundne proteiner slik som menneskealbumin, fibringeler,
15 polysakkarider slik som stivelse eller agarose, polyaktider (PLA) slik som poly (DL-laktid), polyglykolider (PGA) slik som poly (DL-glykolid), poly(laktid-ko-glykolider) (PLGA), polyanhydrider, polyortoestere, fettstyre/kolesterolblandinger som danner halvfaste derivater, hyaluronater og flytende krystaller av monoolein og vann. Disse materialene har den fordelen at de brytes ned til biologisk aksepterbare molekyler som
20 metaboliseres og fjernes fra kroppen via normale veier.

I de foretrukne utførelsesformene av sensoren er det fordelaktig at analysekomponentene har en begrenset diffusjon for å minimalisere deres tap fra sensorpartiklene inn i det biologisk nedbrytbare materialet og potensielt inn i
25 blodstrømningen. Dette kan oppnås ved å sikre at sensorpartiklene har en porestørrelse som tillater diffusjon av lavmolekylære vektanalyter slik som glukose, men ikke diffusjon av selve analysekomponentene. Analysekomponentene er fortrinnsvis høymolekylærvekt, slik som protein eller polymerer, for å begrense deres tap fra sensorpartiklene.

30 Analyser egnet for anvendelse i sensoren innbefatter reaksjoner slik som hydrolyseoksidasjon som fører til påvisbar optisk endring, det vil si fluorescensfremming eller -demping som kan observeres transkutant. En foretrukket analyse for anvendelse i sensoren ifølge oppfinnelsen er en bindingsanalyse,
35 utsendelsen av denne er et påvisbart eller målbart optisk signal som kan kommuniseres transkutant ved anvendelse av optiske innretninger. Bindingsanalysen som genererer det optiske signalet bør fortrinnsvis være reversibelt slik at en kontinuerlig overvåking

av fluktuerende nivåer av analytten kan oppnås. Denne reversibiliteten er spesielt fordelaktig hvor anvendelse av et bindingsanalyseformat komponentene til analysen ikke forbrukes. Bindingsanalyser foretrekkes også for anvendelse i sensorene ifølge oppfinnelsen av sikkerhetsgrunner ettersom de ikke kan generere uønskede produkter, 5 noe som kan genereres ved en enzymatisk eller elektrokjemisk reaksjon.

Foretrukne bindingsanalysekonfigurasjoner for anvendelse i sensoren ifølge oppfinnelsen innbefatter en reversibel kompetitiv, reagensbegrenset, bindingsanalyse, komponentene av denne innbefatter en analyttanalog og en analyttbindemiddel som er i 10 stand til reversibelt å binde både analytene av interesse og analyttanalogen. Analytten av interesse og analyttanalogen konkurrerer for binding til det samme bindingssetet på analyttbindemiddelet. Slike kompetitive bindingsanalysekonfigurasjoner er godt kjent på feltet med klinisk diagnostikk og er beskrevet for eksempel i The Innonuassay Handbook, red. David Wild, Macmillan Press 1994. Egnede analyttbindingsmidler for 15 anvendelse i analysen bør innbefatte antistoffer eller antistofffragmenter som bibeholder et analyttbindingssete (for eksempel Fab-fragmenter), lektiner (for eksempel konkanavalin A), hormonreseptorer, medikamentreseptorer, aptamerer og molekylær-pregede polymerer. Fortrinnsvis bør analyttanalogen være et stoff med høyere molekylvekt enn analytten slik at den ikke fritt kan diffundere ut av sensorpartikkelen. 20 For eksempel kan en analyse for glukose anvende en høymolekylvektglukosepolymer slik som dekstran som analyttanalogen.

Egnede optiske signaler som kan anvendes som en analyseutsendelse i samsvar med oppfinnelsen innbefatter hvilke som helst slags optiske signaler som kan genereres av 25 en proksimitetsanalyse, slik som de som genereres ved fluorescencesonnanasenergi-overføring, fluorescenspolarisasjon, fluorescensdemping, fosforescenssteknikk, luminescensøkning, luminescensdempning, difraksjon av plasmonresonans, alle av disse er i og for seg kjent teknikk.

30 Den mest foretrukne utførelsesformen av sensoren i den foreliggende oppfinnelsen inkorporerer en kompetitiv, reagensbegrenset bindingsanalyse som genererer en optisk utsendelse/signalutsendelse ("read-out") ved anvendelse av fluorescensresonans-energioverføringsteknikken. I dette analyseformatet er analyttanalogen merket med en første kromofor og analyttbindemiddelet er merket med en andre kromofor. Den ene av 35 den første og andre kromoforen virker som en donorkromofor og den andre virker som en mottakerkromofor. Det er et viktig trekk ved analysen at fluorescensemisjons-spektrumet til donorkromoforen overlapper med absorpsjonsspekteret til mottaker-

kromoforen, slik at når donor- og akseptorkromoforene bringes nær hverandre av bindemiddelet, vil en andel av energien som normalt ville produsere fluorescens sendt ut fra donorkromoforen (etterfulgt av utstråling med innfallende stråling av en bølgelengde absorbert av donorkromoforen) være ikke-strålingsoverført til den nærliggende mottakerkromoforen, en prosess kjent på feltet som fluorescensresonansenergi-
5 overføring, med det resultatet at en andel av fluorescenssignalet sendt ut fra donorkromoforen er dempet, slik at levetiden til fluorescensen endres, og, i noen tilfeller, at mottakerkromoforen emitterer fluorescens. Akseptor/mottakerkromoforen kan imidlertid være et ikke-fluorescent fargestoff. Fluorescensresonansenergioverføring
10 vil kun skje når donor og mottakerkromoforene bringes nær hverandre av bindingen av analyttanalogen til analyttbindemiddelet. Således, ved tilstedeværelse av analytt, som konkurrerer med analyttanalogen for binding til analyttbindemiddelet, vil mengden av demping være redusert (resulterende i en målbar økning i intensiteten til fluorescent-signal emittert av donorkromoforen eller et fall i intensiteten til signalet sendt ut fra
15 mottakerkromoforen) som merket analyttanalog forskyves fra binding til analyttbindemiddelet. Intensiteten eller levetiden til fluorescenssignalet sendt ut fra donorkromoforen korrelerer således med konsentrasjonen av analytt i det subkutane fluid som sensoren "bader i".

20 Et tilleggsfordelaktig trekk ved fluorescensresonansenergioverføringsanalyseformatet oppstår fra det faktum at eventuelt fluorescenssignal emittert fra mottakerkromoforen etterfølgende eksitasjon med en stråle av innfallende stråling ved en bølgelengde innenfor absorpsjonsspekteret til mottakerkromoforen er upåvirket av fluorescensresonansenergioverføringsprosessen. Det er derfor mulig å anvende intensiteten av
25 fluorescenssignalet emittert fra mottakerkromoforen som et indre referansesignal, for eksempel ved kontinuerlig kalibrering av sensoren eller for å måle i hvilken grad sensoren har degradert og således angir behovet får å implantere eller injisere en fersk/ny sensor. Når det sensorbiologisk nedbrytbare materialet nedbrytes og sensorpartikler frigjøres, vil mengden av mottakerkromofor som er til stede i sensoren minke, og
30 således vil intensiteten av fluorescentisignal påvist ved eksitasjon av mottakerkromoforen også minke. Fallet av dette signalet under et aksepterbart basislinjenivå, vil angi behovet for å implantere eller injisere en ny sensor. Kompetitive bindingsanalyser ved anvendelse av fluorescensresonansenergioverføringsteknikk som er i stand til å bli tilpasset ved anvendelse i sensoren i oppfinnelsen er kjent på feltet.
35 US patent nr 3 996 345 beskriver immunoanalyser som anvender antistoffer og fluorescensresonansenergioverføring mellom et fluorescer-demperkromoforisk par. Meadows og Schultz (Anal. Chim. Acta (1996 **280**: side 21-30) beskriver en homogen

analysefremgangsmåte for måling av glukose basert på fluorescensresonansenergi-overføring mellom en merket glukoseanalog (FITC merket dekstran) og et merket glukosebindingsmiddel (rhodaminmerket konkanavalin A). I alle disse konfigurasjonene kan mottaker og donorkromoforer/dempere bindes til enten
5 bindemiddelet eller analyttanalogen.

De forskjellige FRET-kjemier beskrevet ifølge bakgrunnsteknikken i introduksjonen til dette dokumentet kan anvendes.

10 Fluorescenslevetid eller fluorescensintensitetsmålinger kan gjøres. Beskrevet i Lakowitz et al kan fluorescenslevetid måles med fasemodulasjonsteknikker.

Et alternativ til fluorescensresonansenergioverføringen er fluorescensdempningsteknikken. I dette tilfellet anvendes i stedet en forbindelse med fluorescensdempningsegenskaper fremfor den spesifikke mottakerkromoforen og det optiske signalet i en kompetitiv bindingsanalyse vil øke med øket analytt. Et eksempel på en kraftig og ikke-spesifikk fluorescensdemper er gitt av Tyagi et al. Nature Biotechnology (1998) 15 **18**: s 49.

20 Sensoren ifølge oppfinnelsen kan tilpasses for påvisning eller kvantitativ måling av en hvilken som helst slags analytt som er til stede i kroppsvæsken. Foretrukne analyter innbefatter glukose (i forbindelse med langtidsmåling av diabetikere), urea (i forbindelse med nyresykdom eller dysfunksjon), laktat (i forbindelse med vurdering av muskellidelse i sportsmedisin), ioner slik som natrium, kalsium eller kalium og
25 terapeutiske medikamenter hvis konsentrasjon i blodet må måles og overvåkes nøye, slik som for eksempel digoksin, teofyllin eller immunosuppressive legemidler. Analyttene ovenfor er opplistet kun som eksempler og det skal forstås at den presise naturen til analytten som måles ikke er materiell for oppfinnelsen.

30 Sensoren utspørres/utsendes transkutant ved anvendelse av optiske innretninger, det vil si ingen fysisk forbindelse er påkrevet mellom sensoren og den optiske innretningen. Når sensoren inkorporerer et kompetitivt reagens, begrenset bindingsanalyse som anvender teknikken for fluorescentenergioverføring, bør den optiske innretningen sende inn den første stråle av innfallende stråling med en bølgelengde innenfor absorpsjonsspekteret til donorkromoforen og fortrinnsvis en andre stråle av innfallende stråling ved
35 en bølgelengde innenfor absorpsjonsspekteret til mottakerkromoforen. I tillegg bør den optiske innretningen fortrinnsvis være i stand til å måle optiske signaler generert i

sensoren ved to forskjellige bølgelengder; bølgelengde 1 innenfor emisjonsspekteret til donorkromoforen (signalet generert i forbindelse med målingen av analytt) og bølgelengde 2 emisjonsspekteret til mottakerkromoforen (som kan være analyttsignalet eller den indre referansen eller kalibreringssignalet).

5

Optiske innretninger regnet for anvendelse i fjernutspørring/utsendelse av innretningen ifølge oppfinnelsen innbefatter et enkelt høy-”throughput” fluormeter omfattende en eksitasjonskilde slik som for eksempel en lysemitterende diode (blå, grønn eller rød), et eksitasjonslysfilter (dikroisk eller fargefilter) og en fluorescentlysdetektor (PIN-diode-
10 konfigurasjon). Et fluorescensmåler med disse karakteristikkene kan fremvise en følsomhet på mellom en pikomolar til femtomolarfluoroforkonsentrasjon.

Et egnet fluorescensmåleroppsett er vist i den medfølgende figur 1 og beskrevet i eksemplene som her er innbefattet. Fluorescensmåleren måler separat følgende
15 parametere:

Ved bølgelengde 1 (donorkromofor)

Eksitasjonslysintensitet, I (1,0)

Omgivende lysintensitet, I (1,1)

20 Intensitet av kombinert fluorescent og omgivende lys, I (1,2)

Ved bølgelengde 2 (mottakerkromofor)

Eksitasjonslysintensitet, I (2,0)

25 Omgivende lysintensitet, I (2,1)

Intensitet av kombinert fluorescent og omgivende lys, I (2,2)

Målinger tas ved å holde fluorescensmåleret nær huden og innrettet med sensoren. Når det gjøres transkutane målinger av fluorescenssignalene generert i sensoren er det
30 nødvendig å ta med i betraktning absorpsjonen av signal av huden, absorptiviteten til menneskehud er funnet ved eksperiment å være lavest i området fra 400 nm til 900 nm. Den endelige outputen frembragt er det normaliserte forholdet mellom fluorescent-intensiteten fra de to fluoroferer, definert ved følgende forhold (ligning 1):

35 Endelig output = $(I(1,2) - I(1,1)) * I(2,0) / (I(2,2) - I(2,1)) * I(1,0)$

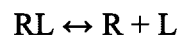
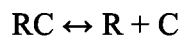
(1)

Den endelige outputen fra den optiske innretningen (for eksempel fluorescensmåler) som minket ved ligning 1 ovenfor konverteres til analyttkonsentrasjon fortrinnsvis ved hjelp av en datamaskin som anvender kalibreringsdata som kan frembringes basert på prinsippene nedenfor.

5

En kalibreringskurve kan etableres empirisk ved målerespons versus analyttkonsentrasjon for et fysiologisk relevant område av analyttkonsentrasjoner. Fortrinnsvis finner dette sted in vitro som en del av produksjonen av sensorinnretningen. Kalibreringsprosedyren kan forenkles betydelig ved å anvende det matematiske forholdet mellom respons og analyttkonsentrasjon i en kompetitiv affinitetssensor som utledes som følger; responsen til en kompetitiv affinitetssensor styres ved reaksjonene:

15



Dissosiasjonen av kompleksene RC og RL, formet ved kombinasjon av analyttbinde- middel (R) med analytt (L) eller analyttanalog (C).

20

De tilsvarende disosiasjonslikevektskonstantene er:

25

$$K_1 = \frac{C_f C_e}{C_{RC}}$$

Og;

30

$$K_2 = \frac{C_f C_e}{C_{RL}}$$

der C betegner antall mål av stoffene i sensoren delt på sensorvolumet. Ved anvendelse av dette målet for konsentrasjon blir både immobiliserte stoffer og stoffer i løsning behandlet likt.

35

Massebalanseligningene er:

$$T_C = C_C + C_{RC}$$

for total analyttanalogkonsentrasjon og,

5

$$T_R = C_R + C_{RC} + C_{RL}$$

for total analyttbindingsmiddelkonsentrasjon.

10 Ved anvendelse av uttrykket ovenfor, utledes forholdet mellom respons og analyttkonsentrasjon:

$$15 \quad \frac{T_C - C_C}{C_C} \quad K_1 = \quad \frac{T_R - (T_C - C_C)}{1 + (C_L/K_2)} \quad (2)$$

Ved anvendelse av dette forholdet kan mengden data som er nødvendig for kalibrering reduseres med to nøkkelparametere: Total analyttbindemiddelkonsentrasjon og total analyttanalogkonsentrasjon. Kalibreringskurven bestemmes så av to punkter på kurven.

20

Den foreliggende oppfinnelsen skal videre forstås med henvisning til de følgende ikke-begrensede eksemplene, sammen med de medfølgende tegningene der:

25 Figur 1 er et skjematisk diagram av den optiske delen av den fiberoptiske fluorescensmåleren; og

figur 2 er et skjematisk diagram av en driver/forsterkerkrets brukt i forbindelse med den optiske delen av den fiberoptiske fluorescensmåleren.

30

Eksempel 1

En glukoseanalyse ifølge Meadows og Schultz (Talanta, 35, 145-150, 1988) ble utviklet ved anvendelse av konkanavalin A-rhodamin og dekstran-FITC (begge fra Molecular
35 Probes Inc., Oregon, USA). Prinsippet for analysen er fluorescensresonansenergi-overføring mellom de to fluoroforer når de er nær hverandre; ved tilstedeværelse av glukose inhiberes resonansenergi-overføringen og fluorescenssignalet fra FITC

(fluorescein) øker. Således korrelerer økende fluorescens med økende glukose. Glukoseanalysen ble funnet å respondere på glukose, som rapportert av Schultz, med omtrent 50 % gjenvinning av fluoresceinfluorescenssignalet ved 20 mg/dl glukose. Fluorescens ble målt i en Perkin Elmer-fluorescensmåler, tilpasset for gjennom-
5 strømningsmåling ved anvendelse av en "sipping"-innretning.

Eksempel 2

Sensorpartiklene produseres ved å kombinere konkanavalin A-rhodamin og dekstran-
10 FITC med polymer og løsningsmiddel for å danne smådråper. Løsningsmiddelet fjernes, og smådråpene samles opp, tørkes og filtreres for å gi et tørt, frittstrømmende pulver.

Sensorpartiklene kombineres med biologisk nedbrytbart materiale i en injiserbar formulering for å danne sensoren.

15

Eksempel 3

Malachite Green (MG)-dekstran fremstilles ved anvendelse av metoden beskrevet i Joseph R. Lakowicz et al., *Analytica Chimica Acta*, 271 (1993) 155-164.
20 Aminodekstran (10 000 MW) oppløses i pH 9,0 bikarbonatbuffer og reagerer med et 10-ganger overskudd av MG-isotiocyanat i 4 t ved romtemperatur. Det merkede dekstranet er fritt for overskuddsfluorofor på en Sephadex G-50 kolonne.

Cascade Blue-Concanavalin A (Cascade Blue-con A) frembringes fra Sigma.

25

Sensorpartiklene produseres ved å kombinere Cascade Blue Concanavalin A og Malachite Green-Dextran med polymer og løsningsmiddel for å danne en liten dråpe. Løsningsmiddelet fjernes, og smådråpene samles opp, tørkes og filtreres for å gi et tørt, frittstrømmende pulver.

30

Sensorpartiklene kombineres med biologisk nedbrytbart materiale i en injiserbar formulering for å danne sensoren.

Eksempel 4

35

En fiberoptisk fluorescensmåler ble satt sammen som følger:

Den optiske delen til en fiberoptisk fluorescensmåler ble laget av standardkomponenter på en mikrobenk. Oppsettet, omfattende en rød LED som lyskilde, linser, dikroisk strålesplitter og filtere og detektordioder, var som vist i fig. 1. Kort oppsummert omfatter fluorescensmåleren en lysemitterende diode 1 som frembringer en eksitasjons-
 5 lysstråle som går igjennom en kondensator 2 inneholdende et eksitasjonsfilter 3 og som så faller inn på en strålesplitter 4. En del av eksitasjonsstrålen avbøyes derfor inn i "utskytingsoptikken" (launching optics) 5 og går inn i en optisk fiber 6. Når fluorescensmåleren anvendes ved kommunikasjon med den kutant lokaliserte sensoren i enden av huden, innrettet med den kutane sensoren, slik at strålen av eksitasjonslys
 10 faller inn på sensoren vil en del av det optiske signalet sendt ut fra sensoren etter eksitasjonen gå inn i den optiske fiberen 6 og vil derved overføres til fluorescensmåleren hvor den går igjennom en blokkeringsdiode 7. Fluorescensmåleren inneholder også en referansedetektordiode 9 som frembringer en referansemåling av det eksikatoriske lyset sendt ut fra LED 1. Endene av 1 m lang Ensign Beckford optisk
 15 fiber, 0,5 mm i diameter, numerisk aperture på 0,65, ble slipt til speilfinish ved anvendelse av diamantpasta på glasspasta. Den ene enden av fiberen ble montert i en XYZ-holder foran et 20 x minroskopobjektiv. Diodene (LED 1 og detektordiodene 7 og 9) ble tilkoblet til en skreddersydd driver/forsterkerkrets som vist i fig. 2. Kretsen omfatter en sender 10, strømforsterkere 11 og 12, multipleksere 13 og 14, integratorer
 20 15 og 16 og analogdivider 17. Driverkretsen ble satt til å drive LED 1 ved 238 Hz og signalene fra detektordiodene 7 og 9 ble switchet mellom jord og lagringskondensatorene (integrator med en tidskonstant på 1 sekund) synkronisert med drivsignalet. De to integrerte signalene samsvarer til bakgrunnskorrigert fluorescenssignal og bakgrunnskorrigert eksitasjonslysnivå (LED-intensitet). Den førstnevnte delt
 25 med den sistnevnte ble støttet av en analogdivider som vist i fig. 2. Av testgrunner ble den distale enden til fiberen 6 dyppet i fortynnede løsninger av rhodamin og optikken ble så justert for maksimumssignal fra analogdivideren.

Fluorescensmåleren er batteridrevet (typisk strømforbruk på 50 mA ved 9 V) og kan
 30 passende konstrueres i form og dimensjon som en penn.

Eksempel 5

Sensoren fremstilt i eksempel 2 injiseres med sprøyte på baksiden av hånden til et
 35 frivillig menneske.

En fiberoptisk fluorescensmåler (se eksempel 4) rettes mot huden og et rhodamin-fluorescenslevetidssignal frembringes og korreleres med en konvensjonell blodglukosemåling som angir at transdermale målinger kan gjøres på implanterte sensorer.

P a t e n t k r a v

1.

Sensor for in vivo-måling av en analytt, k a r a k t e r i s e r t
5 v e d at den omfatter flere ikke-biologisknedbrytbare partikler som er mindre enn 5
µm i sin største dimensjon, slik at når de implanteres i kroppen til et pattedyr kan
partiklene ingesteres av makrofager og transporteres vekk fra implantasjonsstedet, hver
partikkel inneholder komponenter av en analyse som har en utsendelse som er et optisk
10 signal påvisbart eller målbart transdermalt av ekstern optisk innretning, og hver
partikkel er inneholdt inne i et biologisk nedbrytbart gel som forhindrer ingestering av
makrofagene.

2.

15 Sensor ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at analysen er
en bindingsanalyse.

3.

Sensor ifølge krav 2, k a r a k t e r i s e r t v e d at bindings-
20 analysen er en kompetitiv bindingsanalyse, komponentene av denne innbefatter et
analyttbindingsmiddel og en analyttanalog.

4.

Sensor ifølge krav 3, k a r a k t e r i s e r t v e d at
25 analyttanalogen er merket med en første kromofor og analyttbindingsmiddelet er merket
med en andre kromofor, emisjonsspekteret til den første kromoforen eller andre
kromoforen overlapper med absorpsjonsspekteret til den andre kromoforen eller første
kromoforen, respektivt.

30

5.

Sensor ifølge et hvilket som helst av kravene 3 eller 4, der bindingsmiddelet er et
antistoff, et Fab-fragment, et lektin, en hormonreseptor, en medikamentreseptor, en
aptamer eller en molekylpreget polymer.

35

6.

18

Sensor ifølge et hvilket som helst av de foregående krav, k a r a k t e r i -
s e r t v e d at det påvisbare eller målbare optiske signalet er generert av
fluorescensresonnansenergioverføring, fluorescenspolarisasjon, fluorescensdempning,
fosforescens, luminescensfremming, luminescensdemping, diffraksjon eller plasmon-
5 resonans.

7.

Sensor ifølge et hvilket som helst av de foregående krav, k a r a k t e r i -
s e r t v e d at analytten er glukose.

10

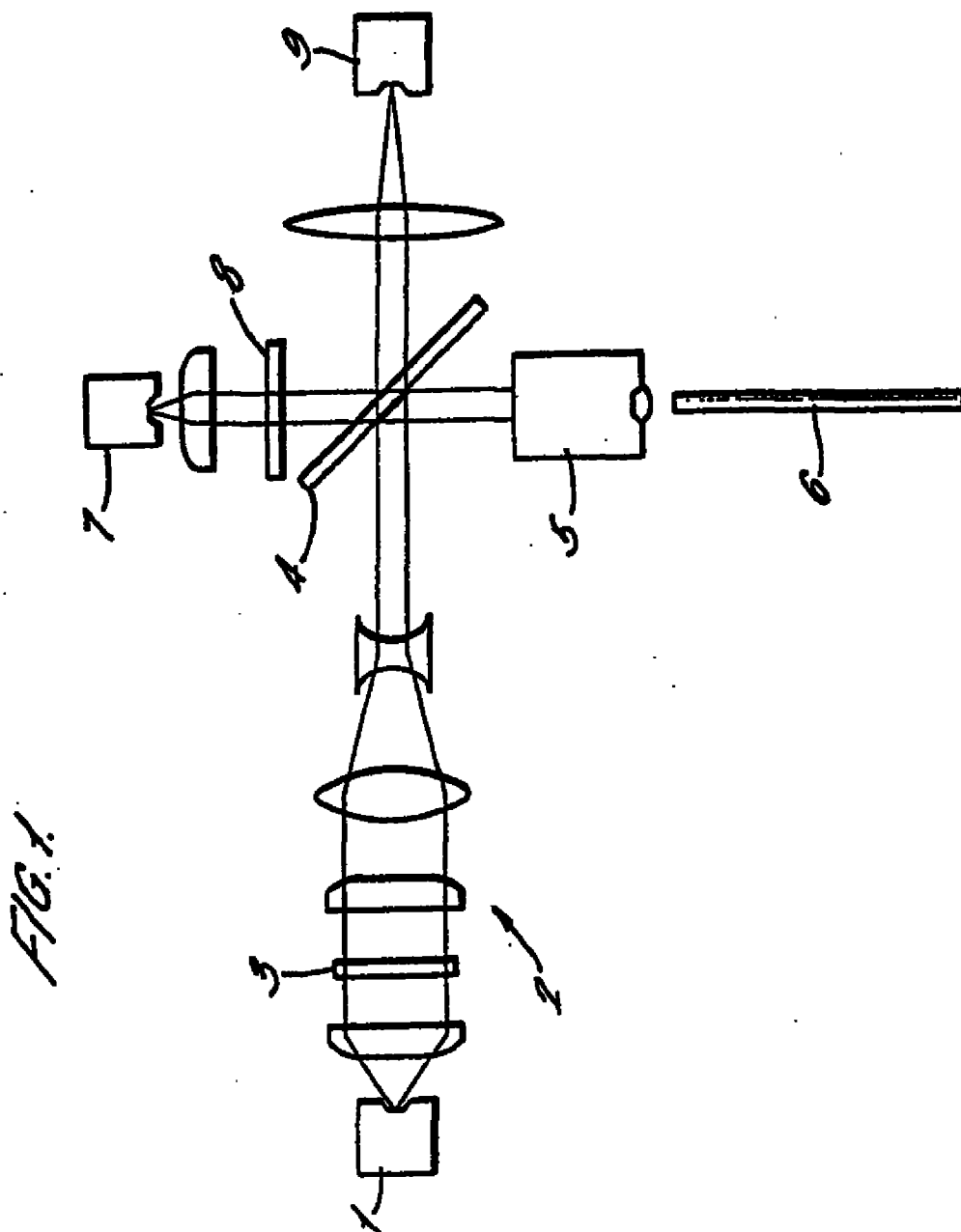


FIG. 2.

