

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6317342号
(P6317342)

(45) 発行日 平成30年4月25日(2018.4.25)

(24) 登録日 平成30年4月6日(2018.4.6)

(51) Int.Cl.

F I

GO 1 N 33/53 (2006.01)
C 1 2 Q 1/68 (2018.01)
GO 1 N 33/566 (2006.01)
CO 7 D 333/24 (2006.01)

GO 1 N 33/53 S
 C 1 2 Q 1/68
 GO 1 N 33/566
 CO 7 D 333/24

請求項の数 15 (全 34 頁)

(21) 出願番号 特願2015-520123 (P2015-520123)
 (86) (22) 出願日 平成25年6月27日(2013.6.27)
 (65) 公表番号 特表2015-524552 (P2015-524552A)
 (43) 公表日 平成27年8月24日(2015.8.24)
 (86) 国際出願番号 PCT/SE2013/050810
 (87) 国際公開番号 W02014/007730
 (87) 国際公開日 平成26年1月9日(2014.1.9)
 審査請求日 平成28年6月17日(2016.6.17)
 (31) 優先権主張番号 1250751-3
 (32) 優先日 平成24年7月2日(2012.7.2)
 (33) 優先権主張国 スウェーデン(SE)

(73) 特許権者 514326616
 リヒター ライフ サイエンス ディヴェ
 ロップメント アクチエボラグ
 Richter Life Scienc
 e Development AB
 スウェーデン王国 エス-132 35
 サルトヒューボー, オルヴェーゲン 6
 (74) 代理人 110001302
 特許業務法人北青山インターナショナル
 (72) 発明者 リヒター ダールフォース, アグネッタ
 スウェーデン王国 エス-132 35
 サルトヒューボー, オルヴェーゲン 6

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 炭水化物の検出

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

以下のステップ、すなわち、

a) 対象物またはサンプルを発光共役オリゴチオフエンに接触させるステップと、
 b) 前記発光共役オリゴチオフエンの少なくとも1つの検出シグナルを検出するステップと、
 c) 前記検出された検出シグナルに基づいて、前記対象物上または前記サンプル中の1種または複数種の炭水化物の存在、正体、および/または量を決定するステップと、
 を含むことを特徴とする、1種以上の炭水化物の検出、同定、および/または定量のための方法。

【請求項 2】

請求項1に記載の方法において、前記発光共役オリゴチオフエンが五量体～十五量体の発光共役オリゴチオフエンであることを特徴とする方法。

【請求項 3】

請求項1に記載の方法において、前記発光共役オリゴチオフエンが五量体または七量体の発光共役オリゴチオフエンであることを特徴とする方法。

【請求項 4】

請求項2または3に記載の方法において、前記発光共役オリゴチオフエンが1つ以上の官能性側鎖を含むことを特徴とする方法。

【請求項 5】

請求項 4 に記載の方法において、前記官能性側鎖が、アミノ酸、アミノ酸誘導体、神経伝達物質、単糖、多糖、核酸、およびそれらの誘導体さらには組合せから選択されることを特徴とする方法。

【請求項 6】

請求項 1 乃至 5 の何れか 1 項に記載の方法において、前記七量体の発光共役オリゴチオフエンが、h - F T A A または h - H T A A であり、かつ前記五量体の発光共役オリゴチオフエンが、p H T A - H i s、p H T A - L y s、p H T E A、p H T I m、p H T A - T y r、p H T A - A r g、p H T A - A s p、および p H T A - G l u の何れかであることを特徴とする方法。

【請求項 7】

請求項 1 乃至 6 の何れか 1 項に記載の方法において、前記検出シグナルが蛍光シグナルや比色シグナルなどの光シグナルまたは伝導率などの電気シグナルであることを特徴とする方法。

【請求項 8】

請求項 1 乃至 7 の何れか 1 項に記載の方法において、前記発光共役オリゴチオフエンが少なくとも 2 種の異なる炭水化物を識別可能であることを特徴とする方法。

【請求項 9】

請求項 1 乃至 8 の何れか 1 項に記載の方法において、前記炭水化物の少なくとも 1 種が不溶性炭水化物であることを特徴とする方法。

【請求項 10】

請求項 9 に記載の方法において、前記不溶性炭水化物が、セルロース、キチン、 α -グルカン、アルギネート、アミロース、およびグリコーゲン、またはそれらの組合せの何れかであることを特徴とする方法。

【請求項 11】

請求項 1 乃至 9 の何れか 1 項に記載の方法において、前記炭水化物の少なくとも 1 種が可溶性炭水化物であることを特徴とする方法。

【請求項 12】

請求項 11 に記載の方法において、前記可溶性炭水化物が、グルコース、セルロビオース、ヘパリン、コンドロイチン硫酸 A、またはそれらの組合せの何れかであることを特徴とする方法。

【請求項 13】

請求項 1 乃至 12 の何れか 1 項に記載の方法において、前記炭水化物の少なくとも 1 種が、構造炭水化物、貯蔵炭水化物、グリコアミノグリカン、炭水化物変換の中間生成物、および / または代謝基質であることを特徴とする方法。

【請求項 14】

請求項 1 乃至 13 の何れか 1 項に記載の方法において、少なくともステップ a) および / またはステップ b) が、in vivo、in vitro、または in situ で行われることを特徴とする方法。

【請求項 15】

1 種以上の炭水化物の検出、同定、および / または定量のためであることを特徴とする発光共役オリゴチオフエンの使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、炭水化物の検出および炭水化物形成または炭水化物変換のモニタリングのための発光共役オリゴチオフエン (L C O) の使用に関する。

【背景技術】

【0002】

炭水化物は、多くの場合、高分子であり、構成単糖の正体、単量体ユニットの数、および各単糖に結合する共有結合の炭素位置に従って、命名、グループ分け、およびクラス分

10

20

30

40

50

けされる。

【0003】

現在、炭水化物の検出、同定、および定量のための広範にわたる方法が知られており、すべての工業にわたり適用されている。しかしながら、これらの方法のうち、正確な分子を同定するのに十分な分解能を有するものはほとんどない。これは、同一のサブユニットの小さなグループで構成された大きな高分子である多糖の化学構造の固有の性質に起因する。この繰返し性の結果として、炭水化物は、通常、プローブによる容易な検出のための特異なエピトープや結合表面を提示しない。特異なエピトープの欠如および検出の難しさは、一次アミノ酸配列に加えて複数のレベルの構造コンフォメーションおよび特異な品質を有するタンパク質とは対照的である。タンパク質とは対照的に、抗体ベースの検出系は、炭水化物に使用した場合、ほとんど有効でない。

10

【0004】

炭水化物の同定は、通常、間接的手段により行われ、可溶性炭水化物に偏っている。たとえば、初期単量体化ステップにより、炭水化物の正体が露出されうる。続いて、同定ステップで、各単量体および存在する各単量体のパーセントが同定される。次いで、得られた単量体情報が決定ステップにフィードバックされ、元の炭水化物の正体が決定される。

【0005】

炭水化物の分析のための他の一般的な技術では、クロマトグラフィー（たとえば、薄層クロマトグラフィー、ガスクロマトグラフィー、高性能液体クロマトグラフィー）と、多量体または単量体の電気泳動または質量分析による詳細な化学分析と、の組合せが使用される。多くの場合、質量分析は、分析前に混合物を精製する先行分離ステップとの組合せで使用される。それに加えて、多糖鎖の単量体化は、多くの場合、より大きな炭水化物の分析の要件である。きわめて正確ではあるが、以上の方法の単独使用および/または逐次使用は、低速で厄介でありうるうえに、かなりの専門技術を必要とする（Zidkova JおよびChmelik J, J. Mass Spectrom. (2001), 36 (4): 417-21）。

20

【0006】

天然では、炭水化物は、タンパク質と同程度にユビキタスである。それらは両方とも、接着、シグナリング、および多くの生物学的相互作用で、代謝の基質として、構造高分子として、およびリガンド/標的として、機能する。医薬品産業さらには他の産業環境では、炭水化物は、市場にいくつかの高収益の製品をもたらす。これらの製品は、薬剤から食品および栄養補助剤さらには「グリーン」材料用の新しい多量体に至るまで多岐にわたる。炭水化物の同定および定量のための簡単で感度の高い方法は、これらの環境で高い有用性が予想される。

30

【0007】

国際公開第2010/044744A1号パンフレットには、アミロイドまたは凝集形態のタンパク質のin vivoイメージングに使用するための新規なチオフエン化合物が開示されている。この文書には、そのようなタンパク質に結合してその検出を可能にするランダム重合ポリチオフエンさらには規定の長さのオリゴチオフエンが開示されている。開示されたオリゴチオフエン化合物は、たとえば、アルツハイマー病および凝集タンパク質またはミスフォールドタンパク質が関与する他の疾患の診断に有用である。

40

【0008】

Aslund, A et al (ACS Chem. Biol. (2009), 4 (8): 673-684) には、タンパク質凝集体の選択的同定のための五量体発光共役オリゴチオフエンが開示されている。開示されたLCOは、プリオン病やアルツハイマー病などのタンパク質凝集疾患の研究のための研究ツールとして利用可能である。

【0009】

Klingstedt, T et al (Org. Biomol. Chem. (2011), 9: 8356-8370) には、異なる長さの発光共役オリゴチオフエンのライブラリーさらにはそれらの合成方法が開示されている。開示された発光共役オリゴチオフ

50

ンは、タンパク質凝集体の選択的同定に有用である。それらは、タンパク質凝集疾患の研究を促進し、そのような疾患の新規な診断ツールの開発にも利用可能であった。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

本発明の一般的な目的は、炭水化物の検出および分析に使用可能な分子プローブならびにそのような分子プローブの利用方法を提供することである。本発明の他の目的は、異なる炭水化物を識別可能なプローブおよび方法を提供することである。分析の範囲は、定量、純度決定、ならびに合成の速度および効率の追跡を含む。これに対する包括的な目的は、生体関連炭水化物の *in vitro*、*in vivo*、および *in situ* 検出ならびに分析のためのプローブを提供することである。本発明のさらに他の目的は、炭水化物の合成、最終生成物 / 基質の正体の検証および分析、ならびに純度の分析を追跡するプローブおよび方法を提供することである。

10

【課題を解決するための手段】

【0011】

これらの目的は、添付の特許請求の範囲に記載の分子プローブおよび方法により達成される。

【0012】

本発明は、1種以上の炭水化物の検出、同定、および / または定量のための発光共役オリゴチオフエンの使用に関する。

20

【0013】

本発明の一態様では、以下のステップ、すなわち、

- 対象物またはサンプルを発光共役オリゴチオフエンに接触させるステップと、
 - 発光共役オリゴチオフエンの少なくとも1つの検出シグナルを検出するステップと、
 - 前記検出された検出シグナルに基づいて、前記対象物上または前記サンプル中の1種または複数種の炭水化物の存在、正体、および / または量を決定するステップと、
- を含む、1種以上の炭水化物の検出、同定、および / または定量のための方法が提供される。

【0014】

30

発光共役オリゴチオフエン (L C O) は、五量体 ~ 十五量体の発光共役オリゴチオフエンでありうる。好ましくは、発光共役オリゴチオフエンは、五量体または七量体の発光共役オリゴチオフエンである。一実施形態では、発光共役オリゴチオフエンは、1種以上の官能性側鎖、たとえば、アミノ酸、アミノ酸誘導体、神経伝達物質、単糖、多糖、核酸、ならびにそれらの誘導体さらには組合せを含む。本明細書に開示されているのは、例示的な七量体発光共役オリゴチオフエンの *h* - F T A A および *h* - H T A A、ならびに例示的な五量体発光共役オリゴチオフエンの *p* - H T A - L y s、*p* - H T E A、*p* - H T I m、*p* - H T A - T y r、*p* - H T A - A r g、*p* - H T A - A s p、および *p* - H T A - G l u である。

【0015】

40

一実施形態では、検出シグナルは、蛍光シグナルや比色シグナルなどの光シグナルまたは伝導率などの電気シグナルである。

【0016】

有利な実施形態では、発光共役オリゴチオフエンは、少なくとも2種の異なる炭水化物を識別可能であり、対象物上またはサンプル中の異なる炭水化物の同定および / または量を可能にする。

【0017】

発光共役オリゴチオフエンは、少なくとも1種の不溶性炭水化物、たとえば、セルロース、キチン、 α -グルカン、アルギネート、アミロース、およびグリコーゲン、またはそれらの組合せを標的としうる。

50

【0018】

他の選択肢としてまたは追加として、発光共役オリゴチオフエンは、少なくとも1種の可溶性炭水化物、たとえば、グルコース、セルロピオース、ヘパリン、コンドロイチン硫酸A、またはそれらの組合せを標的としうる。

【0019】

接触および/または検出のステップは、*in vivo*または*in situ*で行われる。

【0020】

本発明の一態様では、pHTA-Tyr、pHTA-Arg、pHTA-Asp、pHTA-Glu、およびpHTA-Lysから選択される新規な発光共役オリゴチオフエン化合物が提供される。これらの化合物はすべて、本開示に係る方法に有用である。

【0021】

次に、例として、添付の図面を参照しながら、本発明を説明する。

【図面の簡単な説明】

【0022】

【図1】図1は、A)本開示に係る五量体発光共役オリゴチオフエン(LCO)の例示的な実施形態、およびB)本開示に係る七量体発光共役オリゴチオフエン(LCO)の例示的な実施形態を示している。

【図2】図2は、A)6ウェルプレートのウェル内に設置された傾斜ガラスカバースリップを用いて空気-液体界面で行われるバイオフィーム形成のための装置の概略図、B)サルモネラ・エンテリティディス(*Salmonella enteritidis*)(S.エンテリティディス(*S. enteritidis*))3934wtおよび既知の表現型のアイソジェニック突然変異株(bscA、cs gA、およびcs gD)のバイオフィームプロファイルの検証のためのコンゴレッドアッセイ、C~D)C)h-FTAA染色およびD)h-HTAA染色により示される空気-液体界面に位置するS.エンテリティディス(*S. enteritidis*)3934wtおよびアイソジェニック突然変異株のバイオフィームモルフォロジーを示している。同一のスライドの蛍光共焦点分析(左側)および位相差分析(右側)が並置して示されている。

【図3】図3は、A~B)S.エンテリティディス(*S. enteritidis*)3934wtおよびアイソジェニック突然変異株の未処理バイオフィーム培養物(洗浄ステップ未実施)のスペクトル研究を示している。発光を545nmで読み取ったときのwt()、bscA()、cs gA()およびcs gD()の24時間未処理培養物中のA)h-HTAAおよびB)h-FTAAの励起スペクトル、C~D)未処理(洗浄ステップ未実施)S.エンテリティディス(*S. enteritidis*)3934wtおよびアイソジェニック突然変異株のスペクトル研究。C)405nmおよびD)500nmで励起したときのwt()、bscA()、cs gA()およびcs gD()の24時間培養物中のh-FTAAの発光スペクトル。

【図4】図4は、3μg/mlのh-FTAAと混合したときの6.25mg/ml()、3.125mg/ml()、1.56mg/ml()、および0.78mg/ml()の純粋不溶性微結晶セルロース懸濁液の励起スペクトルのスペクトル研究を示している。

【図5】図5は、96ウェルプレート中のS.エンテリティディス(*S. enteritidis*)3934wtならびにアイソジェニック突然変異株bscA、cs gA、およびcs gDの細菌増殖およびバイオフィーム形成のリアルタイム追跡を示している。A)48時間にわたるwtバイオフィーム培養のOD₆₀₀()とGFPシグナル()との比較、B)OD₆₀₀とGFPシグナルとの相関、C~F)GFPと比較したh-FTAAの使用によるC)S.エンテリティディス(*S. enteritidis*)3934wt、D)cs gD、E)cs gA、およびF)bscAのバイオフィーム形成のリアルタイム追跡。GFP()カーリー()およびセルロース

10

20

30

40

50

- L y s に対するキチン。[キチン]によるシグナルの平均増加()および当てはめ回帰直線()が示されている。

【図12】図12は、ナトリウムアルギネートの純粋不溶性粉末炭水化物懸濁液に対する五量体 L C O の分光蛍光測定スクリーンを示している。3 μ M の各プローブを不溶性炭水化物の二倍段階希釈液に適用した。ここに示される希釈液の濃度は、5 mg / ml ()、2.5 mg / ml ()、1.25 mg / ml ()、および 0 mg / ml () である。発光を 545 nm で読み取ったときの 300 ~ 500 nm の波長に対するプローブの励起スペクトルを分析した。組合せは次のとおりである。A) p H T A - T y r、B) p H T A - A s p、C) p H T A - A r g、D) p H T A - H i s、E) p H T E A、F) p H T I m、G) p H T A - G l u、および H) p H T A - L y s に対するナトリウムアルギネート。

10

【図13】図13は、五量体 L C O の蛍光強度と、アッセイ時に存在するナトリウムアルギネートの純粋不溶性粉末炭水化物懸濁液の濃度と、の相関分析を示している。3 μ M の各プローブを不溶性炭水化物の二倍段階希釈液に適用した。それぞれのプローブを各プローブに特異な波長(図に明記)で励起し、発光を 545 nm で読み取った。組合せは次のように示される。A) p H T A - T y r、B) p H T A - A s p、C) p H T A - A r g、D) p H T A - H i s、E) p H T E A、F) p H T I m、G) p H T A - G l u、および H) p H T A - L y s に対するナトリウムアルギネート。[ナトリウムアルギネート]によるシグナルの平均増加()および当てはめ回帰直線()が示されている。

【図14】図14は、グルコースの純粋炭水化物溶液に対する五量体 L C O の分光蛍光測定スクリーンを示している。3 μ M の各プローブを炭水化物の二倍段階希釈液に適用した。ここに示される希釈液の濃度は、5 mg / ml ()、2.5 mg / ml ()、1.25 mg / ml ()、および 0 mg / ml () である。発光を 545 nm で読み取ったときの 300 ~ 500 nm の波長に対するプローブの励起スペクトルを分析した。組合せは次のとおりである。A) p H T A - T y r、B) p H T A - A s p、C) p H T A - A r g、D) p H T A - H i s、E) p H T E A、F) p H T I m、G) p H T A - G l u、および H) p H T A - L y s に対するグルコース。

20

【図15】図15は、五量体 L C O の蛍光強度と、アッセイ時に存在するグルコースの純粋炭水化物溶液の濃度と、の相関分析を示している。3 μ M の各プローブを炭水化物の二倍段階希釈液に適用した。それぞれのプローブを各プローブに特異な波長(図に明記)で励起し、発光を 545 nm で読み取った。組合せは次のように示される。A) p H T A - T y r、B) p H T A - A s p、C) p H T A - A r g、D) p H T A - H i s、E) p H T E A、F) p H T I m、G) p H T A - G l u、および H) p H T A - L y s に対するグルコース。[グルコース]によるシグナルの平均増加()および当てはめ回帰直線()が示されている。

30

【図16】図16は、アミロースの純粋炭水化物懸濁液に対する五量体 L C O の分光蛍光測定スクリーンを示している。3 μ M の各プローブを炭水化物の二倍段階希釈液に適用した。ここに示される希釈液の濃度は、5 mg / ml ()、2.5 mg / ml ()、1.25 mg / ml ()、および 0 mg / ml () である。発光を 545 nm で読み取ったときの 300 ~ 500 nm の波長に対するプローブの励起スペクトルを分析した。組合せは次のとおりである。A) p H T A - T y r、B) p H T A - A s p、C) p H T A - A r g、D) p H T A - H i s、E) p H T E A、F) p H T I m、G) p H T A - G l u、および H) p H T A - L y s に対するアミロース。

40

【図17】図17は、五量体 L C O の蛍光強度と、アッセイ時に存在するアミロースの純粋炭水化物懸濁液の濃度と、の相関分析を示している。3 μ M の各プローブを炭水化物の二倍段階希釈液に適用した。それぞれのプローブを各プローブに特異な波長(図に明記)で励起し、発光を 545 nm で読み取った。組合せは次のように示される。A) p H T A - T y r、B) p H T A - A s p、C) p H T A - A r g、D) p H T A - H i s、E) p H T E A、F) p H T I m、G) p H T A - G l u、および H) p H T A - L y s に対するアミロース。[アミロース]によるシグナルの平均増加()および当てはめ回帰直

50

線(__ __)が示されている。

【図18】図18は、グリコーゲンの純粋炭水化物懸濁液に対する五量体LCOの分光蛍光測定スクリーンを示している。3 μ Mの各プローブを炭水化物の二倍段階希釈液に適用した。ここに示される希釈液の濃度は、5 mg/ml (__ .)、2.5 mg/ml (.)、1.25 mg/ml (__ __)、および0 mg/ml (__)である。発光を545 nmで読み取ったときの300 ~ 500 nmの波長に対するプローブの励起スペクトルを分析した。組合せは次のとおりである。A) pHTA - Tyr、B) pHTA - Asp、C) pHTA - Arg、D) pHTA - His、E) pHTEA、F) pHTIm、G) pHTA - Glu、およびH) pHTA - Lysに対するグリコーゲン。

【図19】図19は、五量体LCOの蛍光強度と、アッセイ時に存在するグリコーゲンの純粋炭水化物懸濁液の濃度と、の相関分析を示している。3 μ Mの各プローブを炭水化物の二倍段階希釈液に適用した。それぞれのプローブを各プローブに特異な波長(図に明記)で励起し、発光を545 nmで読み取った。組合せは次のように示される。A) pHTA - Tyr、B) pHTA - Asp、C) pHTA - Arg、D) pHTA - His、E) pHTEA、F) pHTIm、G) pHTA - Glu、およびH) pHTA - Lysに対するグリコーゲン。[グリコーゲン]によるシグナルの平均増加(__)および当てはめ回帰直線(__ __)が示されている。

【図20】図20は、セルロビオースの純粋炭水化物溶液に対する五量体LCOの分光蛍光測定スクリーンを示している。3 μ Mの各プローブを炭水化物の二倍段階希釈液に適用した。ここに示される希釈液の濃度は、5 mg/ml (__ .)、2.5 mg/ml (.)、1.25 mg/ml (__ __)、および0 mg/ml (__)である。発光を545 nmで読み取ったときの300 ~ 500 nmの波長に対するプローブの励起スペクトルを分析した。組合せは次のとおりである。A) pHTA - Tyr、B) pHTA - Asp、C) pHTA - Arg、D) pHTA - His、E) pHTEA、F) pHTIm、G) pHTA - Glu、およびH) pHTA - Lysに対するセルロビオース。

【図21】図21は、五量体LCOの蛍光強度と、アッセイ時に存在するセルロビオースの純粋炭水化物溶液の濃度と、の相関分析を示している。3 μ Mの各プローブを炭水化物の二倍段階希釈液に適用した。それぞれのプローブを各プローブに特異な波長(図に明記)で励起し、発光を545 nmで読み取った。組合せは次のように示される。A) pHTA - Tyr、B) pHTA - Asp、C) pHTA - Arg、D) pHTA - His、E) pHTEA、F) pHTIm、G) pHTA - Glu、およびH) pHTA - Lysに対するセルロビオース。[セルロビオース]によるシグナルの平均増加(__)および当てはめ回帰直線(__ __)が示されている。

【図22】図22は、ヘパリンの純粋炭水化物溶液に対する五量体LCOの分光蛍光測定スクリーンを示している。3 μ Mの各プローブを炭水化物の二倍段階希釈液に適用した。ここに示される希釈液の濃度は、5 mg/ml (__ .)、2.5 mg/ml (.)、1.25 mg/ml (__ __)、および0 mg/ml (__)である。発光を545 nmで読み取ったときの300 ~ 500 nmの波長に対するプローブの励起スペクトルを分析した。組合せは次のとおりである。A) pHTA - Tyr、B) pHTA - Asp、C) pHTA - Arg、D) pHTA - His、E) pHTEA、F) pHTIm、G) pHTA - Glu、およびH) pHTA - Lysに対するヘパリン。

【図23】図23は、五量体LCOの蛍光強度と、アッセイ時に存在するヘパリンの純粋炭水化物溶液の濃度と、の相関分析を示している。3 μ Mの各プローブを炭水化物の二倍段階希釈液に適用した。それぞれのプローブを各プローブに特異な波長(図に明記)で励起し、発光を545 nmで読み取った。組合せは次のように示される。A) pHTA - Tyr、B) pHTA - Asp、C) pHTA - Arg、D) pHTA - His、E) pHTEA、F) pHTIm、G) pHTA - Glu、およびH) pHTA - Lysに対するヘパリン。[ヘパリン]によるシグナルの平均増加(__)および当てはめ回帰直線(__ __)が示されている。

【図24】図24は、コンドロイチン硫酸A(CS(A))の純粋炭水化物溶液に対する

五量体 L C O の分光蛍光測定スクリーンを示している。3 μ M の各プローブを炭水化物の二倍段階希釈液に適用した。ここに示される希釈液の濃度は、0.5 mg / ml (_ .)、0.25 mg / ml (.)、0.125 mg / ml (_ _)、および 0 mg / ml (_) である。発光を 545 nm で読み取ったときの 300 ~ 500 nm の波長に対するプローブの励起スペクトルを分析した。組合せは次のとおりである。A) p H T A - T y r、B) p H T A - A s p、C) p H T A - A r g、D) p H T A - H i s、E) p H T E A、F) p H T I m、G) p H T A - G l u、および H) p H T A - L y s に対する C S (A)。

【図 25】図 25 は、五量体 L C O の蛍光強度と、アッセイ時に存在する C S (A) の純粋炭水化物溶液の濃度と、の相関分析を示している。3 μ M の各プローブを炭水化物の二倍段階希釈液に適用した。それぞれのプローブを各プローブに特異な波長 (図に明記) で励起し、発光を 545 nm で読み取った。組合せは次のように示される。A) p H T A - T y r、B) p H T A - A s p、C) p H T A - A r g、D) p H T A - H i s、E) p H T E A、F) p H T I m、G) p H T A - G l u、および H) p H T A - L y s に対する C S (A)。[クロンドロイチン硫酸 A] によるシグナルの平均増加 (_) および当てはめ回帰直線 (_ _) が示されている。

【発明を実施するための形態】

【0023】

本発明は、炭水化物の検出、同定、および分析に使用するための分子プローブいわゆる発光共役オリゴチオフェン (L C O) に関する。

【0024】

特定の L C O プローブは、本開示でプロトタイププローブにより例示されるように、1 種または複数種の異なる炭水化物を標的としてそれに結合する。L C O が標的炭水化物に暴露されてそれと相互作用した場合、L C O 分子は、特異な幾何学的変化を受け、その変化は、検出シグナルとして検出可能な標的特異的出力シグナルにより反映される。出力シグナルは、たとえば、分光蛍光測定シグナル、比色シグナル、電気伝導性変化、または異なるシグナルの組合せとして検出されうる。幾何学的変化は、たとえば、放出蛍光シグナルの増加もしくは減少および / またはピーク発光の励起波長 (m a x) のシフトをもたらさう。一選択肢では、幾何学的変化は、L C O またはそれに結合された伝導性ポリマーの伝導率の測定可能な変化をもたらさう。

【0025】

各結合標的により生成される L C O の個別の標的特異的検出シグナルのプロファイリングにより、特異的炭水化物の同定および定量が可能である。本開示のプロトタイプ L C O の多くは、異なる炭水化物に対する二重または多重の感受性を有し、各標的炭水化物に特異的な検出シグナルを生成することによりそれらを識別可能である。

【0026】

本開示の L C O 検出シグナルの分析は、主に、分光蛍光測定読取りで構成され、これに関しては、ピーク発光の励起波長 (m a x) さらには放出蛍光の強度がとくに興味深い。標的結合 L C O の励起スペクトルおよび発光スペクトルが含まれる。励起スペクトルでは、ある波長範囲内のレーザーによりサンプル中の L C O を励起したときの特異的波長で放出される蛍光の強度の検出が必要とされる。発光スペクトルでは、規定の波長でサンプル中の L C O を励起したときの特定の範囲内の異なる波長の発光の強度の検出が必要とされる。

【0027】

本開示のプロトタイプ L C O は、生体関連検出範囲内で炭水化物に対する感受性を示す。これは、構造炭水化物 (たとえば、 - 1, 3 - グルカン、セルロース、キチン、およびナトリウムアルギネート)、代謝基質および代謝中間体 (- D - グルコースおよびセルロピオース)、貯蔵炭水化物 (アミロースおよびグリコーゲン)、ならびにグリコアミノグリカン (ヘパリンおよびコンドロイチン硫酸 A) を含む。

【0028】

発光共役オリゴチオフエン

共役オリゴチオフエンは、硫黄ヘテロ環チオフエンのオリゴ体化から生じる。電子は、その共役骨格に沿って非局在化され、このオリゴ体に伝導性および/または光学的性質を付与する。共役オリゴチオフエンは、ドーピングにより電子を共役軌道に追加したりまたはそれから除去したりしたときに伝導性になりうる。標的へのＬＣＯプローブの結合は、静電相互作用により駆動される。また、このオリゴ体と標的分子との相互作用は、その骨格構造の捩れを引き起こして、電子歪みおよびその光学的性質の劇的変化をもたらさう。したがって、オリゴチオフエンは、対応する特異なオリゴ体骨格関連シグナルにより個別に同定可能な広範にわたる結合標的を有する。

【００２９】

本発明に係るＬＣＯは、コア成分の固有機能を改善するために側基を追加可能なコアオリゴチオフエンで構成される。コア成分は、五量体、六量体、七量体、八量体、九量体、十量体、または十一量体、十二量体、十三量体、十四量体、もしくは十五量体のオリゴチオフエン、すなわち、５～１５個の単量体チオフエンからなる多量体チオフエンからなる。好ましくは、成分は、より多くの側基を保持可能であることから奇数の単量体からなる。偶数のＬＣＯもまた、炭水化物を標的として検出シグナルを生成するが、追加しうる側基の数が制限される。

【００３０】

異なる性質を有する多種多様な側基をコア成分に結合することが可能である。たとえば、側基は、陰イオン性、陽イオン性、または双性イオン性の官能基を有しうる。側基は、たとえば、アミノ酸、アミノ酸誘導体、神経伝達物質、単糖、多糖、核酸、またはそれらの組合せおよび誘導体から誘導されうる。側基は、その標的化合物に対するその親和性を増加させる、かつＬＣＯをその標的化合物に結合させて複合体の形成を可能にする、分子性を有するＬＣＯを提供する。たとえば、負荷電または正荷電の側基は、ＬＣＯと標的とのイオン結合を可能にする。イオン性官能基または他の側基官能基は、追加としてまたは他の選択肢として、ＬＣＯとその標的化合物との水素結合または他の形態の非共有結合を可能にしうる。

【００３１】

本発明で使用されるプロトタイプＬＣＯは、図１Ａおよび１Ｂにそれぞれ示される五量体（すなわち、五量体オリゴチオフエンコア成分を有する）および七量体（すなわち、七量体オリゴチオフエンコア成分を有する）の形態である。五量体の形態の例としては、pHTEA（ペンタ水素チオフエンエタノールアミン）、pHTIm（ペンタ水素チオフエンイミダゾール）、pHTA-Lys（ペンタ水素チオフエン酢酸リシン）、pHTA-Tyr（ペンタ水素チオフエン酢酸チロシン）pHTA-Arg（ペンタ水素チオフエン酢酸アルギニン）、pHTA-Asp（ペンタ水素チオフエン酢酸アスパラギン酸）、pHTA-His（ペンタ水素チオフエン酢酸ヒスチジン）、およびpHTA-Glu（ペンタ水素チオフエン酢酸グルタミン酸）が挙げられる。七量体の形態の例としては、hHTAA（ヘプタ水素チオフエン酢酸）およびhFTAA（ヘプタギ酸チオフエン酢酸）が挙げられる。

【００３２】

一態様では、発明は、pHTA-Tyr、pHTA-Arg、pHTA-Asp、pHTA-Glu、およびpHTA-Lysから選択される新規な化合物を含む。

【００３３】

本開示に係るＬＣＯは、非細胞傷害性の状態で炭水化物を標的とするように設計される。プロトタイプＬＣＯプローブのそれぞれは、炭水化物のカテゴリーに関連付けられる高分子に対する広範な親和性を有する。それらは、電荷、疎水性、ジオメトリー、構造、ならびに/または水素供与体および水素受容体の性質により関連付け可能である。異なるプローブ-炭水化物ペアは、特異な分光蛍光測定シグネチャーを有するので、それを介して、ペアをまたはＬＣＯが既知の場合には炭水化物を同定することが可能である。

【００３４】

10

20

30

40

50

本発明に係るＬＣＯのいくつかは、１種の特異的炭水化物を標的として検出シグナルを生成するが、他の炭水化物に対しては生成しない。そのようなＬＣＯは、単一の特異的炭水化物の検出および同定を可能にする。本発明に係る他のＬＣＯは、いくつかの異なる炭水化物を標的として、特異的検出シグナル、たとえば、各標的に特異的な励起／発光スペクトルを生成する。後者の場合、それぞれの炭水化物標的に対するＬＣＯの特異なスペクトルシグネチャーは、結合成分の同定を可能にする。したがって、そのようなＬＣＯは、単一のＬＣＯを用いて、いくつかの異なる炭水化物の二重または多重の検出および識別を可能にする。さらに他のＬＣＯは、複数の炭水化物を標的として、すべての標的炭水化物に対して同一または類似の検出シグナルを生成する。そのようなＬＣＯは、炭水化物の存在の検出および決定を可能にするが、異なる炭水化物の識別も同定も可能にしない。

10

【００３５】

選択された側基をコアＬＣＯに追加して、特定の標的に対するその感受性を向上させたりまたは異なる標的を識別するその能力を向上させたりすることが可能である。側基さらにはコア成分の他の修飾もまた、他の官能基を追加するために使用可能である。

【００３６】

一実施形態では、ＬＣＯは、プローブがその標的炭水化物に結合したときに電子シグナルが直接的または間接的に誘起されるように設計される。電子シグナルは、ＬＣＯ多量体自体に由来しうるか、またはＬＣＯの幾何学的変化を電気シグナルに変換する結合された伝導性の有機材料または無機材料でありうる。前記実施形態では、炭水化物に結合するプローブは、たとえば、電気検出器またはハンドヘルドデバイスにより、電子読取り情報に変換される。それに加えて、そのような検出器またはデバイスは、たとえば、炭水化物の量が規定の閾値に達したときに、炭水化物の存在をユーザーに警告するように構成される。特定例として、そのような警告システムは、たとえば、バイオフィルム中の炭水化物成分の検出によりバイオフィルムの存在に注意を払うように使用される。血中グルコース検出器とほぼ同様に、そのような検出器デバイスもまた、炭水化物の不在、存在、または圧倒的存在を示唆するように使用される。用途としては、適正製造規範（ＧＭＰ）のためにまたは品質保証のために、血液、食品、患者の健康、または製造パイプラインをモニターすることが挙げられる。

20

【００３７】

本明細書に開示されるＬＣＯは、さまざまな媒体、センサー、デバイス、または製品で使用するために提供されうる。たとえば、本開示に係るＬＣＯは、液状添加剤として含まれうる。プローブはまた、表面上に印刷可能であるか、または液体もしくはエアロゾルのスプレー中に構成可能である。

30

【００３８】

ＬＣＯの合成手順は、Klingstedt, T. et al. (Org. Biomol. Chem. (2011), 9: 8356 - 8370、Aslund, A. et al. (ACS Chem. Biol. (2009), 4: 673 - 684、Aslund, A. et al. (Bioconjugate Chem. (2007), 18: 1860 - 1868)、および国際公開第2010/044744号パンフレットに記載されている。それらの教示を考慮して、当業者であれば、本発明に従って使用しうるさまざまなＬＣＯを調製しうる。

40

【００３９】

１種以上の炭水化物を検出、同定、および／または定量する方法

本発明は、以下のステップ、すなわち、

- 対象物またはサンプルを発光共役オリゴチオフエンに接触させるステップと、
- 発光共役オリゴチオフエンの少なくとも１つの検出シグナルを検出するステップと、

、

- 前記検出された検出シグナルに基づいて、前記対象物上または前記サンプル中の１種または複数種の炭水化物の存在、正体、および／または量を決定するステップと、

を含む、１種以上の炭水化物の検出、同定、および／または定量のための方法を提供する

50

。

【0040】

本明細書では、「炭水化物の検出、同定、および／または定量」という表現は、1種以上の炭水化物の存在、正体、および／または量を分析する任意のタイプの行為を含む。そのような行為としては、サンプル中の未知の炭水化物の同定、サンプル中の1種または複数種の炭水化物の存在または不在の決定、調製物中の既知の炭水化物の定量、炭水化物の製造時の基質から生成物への炭水化物変換の追跡、エンドタイム研究またはリアルタイム研究を用いた生物学的サンプル中または生物学的もしくは非生物学的表面上の炭水化物の位置および正体の決定が挙げられるが、これらに限定されるものではない。たとえば、細胞表面上の糖タンパク質または炭水化物の存在を同定または定量することが可能である。新しい「グリーン」炭水化物系材料の製造時、そのような材料中に存在する炭水化物の正体および純度を評価または検証することが可能である。また、炭水化物系材料の半減期または分解時間を評価することも可能である。同様に、分子薬剤または生物薬剤または医薬品の製造時、そのような薬剤または医薬調製物中に存在する炭水化物の正体および純度を評価または検証することが可能である。

10

【0041】

接触される対象物またはサンプルは、表面上または内部の炭水化物の存在、正体、または量を評価することが望ましい任意の種類の対象物またはサンプルでありうる。サンプルは、たとえば、炭水化物製造プロセスまたは炭水化物抽出プロセスからのサンプルなどの化学的または生物学的なサンプルでありうる。サンプルはまた、ヒトもしくは動物の患者中もしくはそれら由来の組織もしくは血液のサンプル、または天然由来のもしくは廃水処理プラントなどの産業由来の水サンプルでありうる。患者由来の組織サンプル中／上の炭水化物のモニタリングまたは検出は、患者から入手した単離されたサンプル中／上の炭水化物のモニタリングまたは検出さらには *in vivo* または *in situ* での組織サンプルのモニタリングまたは検出を含む。対象物は、たとえば、ベンチ、テーブル、流し台、壁、床、配管、または病院、家庭環境、もしくは工場の調度品もしくは任意の他の内装備品の表面などの環境表面でありうる。それはまた、医療デバイスなどのデバイス、設備、装置、工具、スポーツ用品もしくは他のタイプの用品、または任意の他のデバイスでありうる。したがって、LCOのその標的への結合は、溶液中または表面上で検出可能である。すなわち、本方法は、固体アッセイおよび液体アッセイの両方で使用可能である。本発明の特定の利点は、洗浄ステップが必要とされないことであり、炭水化物は、*in vitro*、*in vivo*、または *in situ* で未処理の生物学的な培養物中またはサンプル中で直接検出されうる。これは、たとえば、対象物上または *in vitro*、*in vivo*、もしくは *in situ* サンプル中での炭水化物の挙動および／または形成のリアルタイム研究を可能にする。1種の炭水化物に特異な特定のシグナルを追跡することにより、上記の用途を時間発展研究に拡張すれば、その生成の時間動態を決定することが可能である。

20

30

【0042】

炭水化物は、純粋形態もしくは比較的純粋形態で、すなわち、主に炭水化物を含むサンプル中で、分析されうるか、またはより複雑な形態で、すなわち、組織サンプル中や生物学的サンプル中などのより複雑な混合物中に炭水化物が存在する場合に、検出されうる。

40

【0043】

本発明に係る方法は、可溶性および不溶性の炭水化物の検出、同定、および／または定量に同等に適用可能である。それは、他の使いやすい方法が今まで利用できなかった不溶性炭水化物の分析にとくに有用である。分析されうる炭水化物としては、任意のサイズの炭水化物、すなわち、単糖さらにはオリゴ糖およびより大きな多糖が挙げられる。炭水化物は、他の化合物から単離されうるか、または他の化合物との混合物の状態で存在しうるか、または他の分子もしくは構造に分子間結合もしくは共有結合されうる。分析されうる炭水化物の例としては、本明細書に示される炭水化物、すなわち、 α -1,3-グルカン、セルロース、キチン、ナトリウムアルギネート、 α -D-グルコース、セルロビオース

50

、アミロース、グリコーゲン、ヘパリン、およびコンドロイチン硫酸 A が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【0044】

本発明に係る方法の発光共役オリゴチオフエン (L C O) は、チオフエンのホモオリゴ体を含む本明細書に定義される任意の L C O である。共役オリゴチオフエンは、五量体 ~ 十五量体の共役オリゴチオフエン、好ましくは五量体 ~ 七量体の共役オリゴチオフエンでありうる。L C O はまた、1 個以上の官能性側基、たとえば、アミノ酸、アミノ酸誘導体、神経伝達物質、単糖、多糖、核酸、もしくは他の陰イオン性側基、陽イオン性側基、または双性イオン性側基から誘導される側基を含みうる。本発明に係る方法で使用可能な七量体共役オリゴチオフエンの例としては、h - F T A A または h - H T A A が挙げられる。本発明に係る方法で使用可能な五量体共役オリゴチオフエンの実施例としては、p H T A - H i s、p H T A - L y s、p H T E A、p H T I m、p H T A - T y r、p H T A - A r g、p H T A - A s p、および p H T A - G l u が挙げられる。

10

【0045】

炭水化物への L C O の結合は、L C O 骨格のコンフォメーション変化をもたらし、結果的に L C O の鎖内および鎖間のプロセスを変化させる。このコンフォメーション変化は、L C O の検出シグナルとして、たとえば、蛍光測定シグナルなどの光シグナルまたは伝導率などの電気シグナルとして検出可能である。蛍光測定シグナルは、蛍光イメージングにより、たとえば、蛍光共焦点顕微鏡法を用いて、検出可能である。他の選択肢として、蛍光測定シグナルは、蛍光分光法により、励起および発光スペクトルを介して、ならびに / または続いて、使用される L C O および / もしくは決定される炭水化物に依存する所定の単一の励起・発光セットを介して、検出されうる。

20

【0046】

本開示は、概念実証として、蛍光分光法により検出される分光蛍光測定シグナルを提示する。励起および発光スペクトルならびに / または続いて所定の単一の励起および発光を用いて、炭水化物への L C O の検出感度を実証する。典型的には、励起波長は、300 ~ 500 nm の範囲内にあり、発光波長は、500 ~ 700 nm の範囲内にある。次いで、励起および発光スペクトルの分析結果は、関連する単一の励起・発光セットの選択に供給される。各結合炭水化物は、L C O 骨格の異なる振れを誘起して、各結合炭水化物に特異なスペクトルシグネチャーをもたらす。これらの特異なスペクトルシグネチャーおよびシグナル強度を用いて化合物を識別することが可能であり、したがって、所与のサンプル中、液体中、または表面上のそれらの正体および量を決定することが可能である。

30

【0047】

プローブの蛍光性は、それが呈する視覚色に直接影響を及ぼす。これは、結果的に、検出パラメーターでありうる。検出シグナル (任意の性質の) が擬似色により表される間接比色法もまた、L C O - 標的結合を表す手段として機能しうる。

【0048】

他の選択肢の実施形態では、L C O のコンフォメーション変化つまり L C O のその標的への結合は、物理的パラメーターのモニタリング偏差を対象とする方法により検出可能である。これは、非排他的に、光学的性質 (F R E T、蛍光クエンチング、吸収、測色、屈折率)、材料の性質 (量、粘弾性、厚さ、または他の性質)、および電子的性質 (材料の伝導率、イオンの放出または取込み、電子の放出または取込み、抵抗) を含みうる。

40

【0049】

実験室環境では、L C O のその炭水化物標的への結合は、蛍光測定シグナリングを介して好適に検出される。蛍光測定検出のための方法およびデバイスは、当技術分野で周知であり、蛍光に基づく顕微鏡法、たとえば、蛍光共焦点顕微鏡法、蛍光測定プレートリーダーを含む。そのような方法およびデバイスは、溶液中、培養物中、または組織サンプル中の炭水化物の検出に好適である。

【0050】

他の環境では、たとえば、産業環境または病院環境では、蛍光検出のために当技術分野

50

で公知のハンドヘルド装置がより好適でありうる。そのような小型デバイスはまた、重量を最小限に抑えることが好ましい環境、たとえば、航空輸送産業または環境調和型車両に有用でありうる。

【0051】

他の実施形態では、ＬＣＯまたはＬＣＯとの組合せは、たとえば、バイオセンサーセルの基材上にＬＣＯを固定することにより、バイオセンサーデバイスおよび／またはチップベースセンサーの能動部材として好適に実現される。ＬＣＯのコア成分に修飾可能な側基は、バイオセンサーで使用するためのＬＣＯプローブの機能適合化さらには基材へのプローブの固定を可能にする。基材の表面上にＬＣＯと標的炭水化物との複合体が形成され、複合体の形成により、検出シグナルに変換可能な物理的変化が誘起される。好適には、バイオセンサーデバイスは、前記基材の容器さらには検出手手段を含む。一般的なバイオセンサーデバイスを説明すると、蛍光検出バイオセンサーは、たとえば、標的に結合されたＬＣＯを励起すべく励起エネルギーを生成するための内部または外部の光源と、励起時にＬＣＯにより発生された蛍光エネルギーを検出するための内部または外部の検出器と、を含む。

10

【0052】

検出された検出シグナルに基づいて、炭水化物に関するいくつかタイプの情報を決定しうる。

【0053】

本方法の一実施形態では、炭水化物が対象物上またはサンプル中に存在するか不在であるかが決定される。炭水化物の不在または存在の結論は、たとえば、分析される対象物またはサンプルから取得されるＬＣＯからの蛍光シグナル（たとえば、蛍光共焦点イメージングによりまたは蛍光分光法により決定される）と、炭水化物が欠如していることが分かっている陰性対照サンプルと、を比較することにより導かれる。陰性対照は、非結合ＬＣＯプローブのシグナル品質を規定する。これにより、前記非結合プローブのベースラインのピーク励起／発光波長およびシグナル強度が設定される。ピーク励起／発光波長のレッドシフトおよび／またはシグナル強度の同時増加または同時減少が検出された場合、分析されたサンプルは炭水化物を含むという結論が導かれる。ベースラインからのシグナルの性質の変化は、プローブ分子骨格の幾何学的変化に依存し、炭水化物へのＬＣＯの正の結合から生じる。この結合は、一般的には、ピーク励起／発光波長のレッドシフトおよび／またはシグナル強度の増加をもたらす。しかしながら、いくつかの場合、炭水化物へのＬＣＯの結合は、ＬＣＯからの蛍光シグナルのクエンチングをもたらさう。

20

30

【0054】

一実施形態では、対象物上またはサンプル中に存在する炭水化物の量が決定される。この目的では、既知量の特異的炭水化物を用いて波長を横切って選択されたＬＣＯの励起および発光の性質の校正曲線が作成される。次いで、炭水化物に特異的な単一の励起／発光セットを規定し、これに対して校正曲線を構築する。この校正曲線は、励起／発光検出シグナルと炭水化物量との関係を規定する。分析された対象物またはサンプルから取得された検出シグナルの強度を校正曲線と比較し、分析された対象物上または分析されたサンプル中の炭水化物の量に関する結論を導く。

40

【0055】

他の実施形態では、対象物上またはサンプル中に存在する１種または複数種の炭水化物の正体が決定される。そのような実施形態では、異なる炭水化物を識別可能なＬＣＯを用いて対象物またはサンプルに接触させる。使用されるＬＣＯは、たとえば、１種の特異的炭水化物には結合するが他の炭水化物には結合しないことを知ることにより、選択されうる。サンプル中に存在する１種または複数種の炭水化物を同定するために、関連するＬＣＯのライブラリーから生成される一群のＬＣＯを適用しうる。他の選択肢として、使用されるＬＣＯは、複数のタイプの炭水化物に結合し、特異的検出シグナル、たとえば、各標的に特異的な励起／発光スペクトルを生成しうる。それぞれの炭水化物標的に対するＬＣＯの特異的なシグネチャーは、結合成分の同定を可能にする。この実施形態でも、陰性対照

50

を用いて非結合プローブのシグナルのベースライン品質を規定する。

【 0 0 5 6 】

既知の炭水化物（陽性対照）のスペクトルシグネチャーのライブラリーの作成に基づいて、未知サンプルをこのライブラリーと比較したときに特性ピークの不在が検出されれば、炭水化物の不在が示唆されるであろう。特定の炭水化物に対する単一の励起／発光セットの規定および後続の標準曲線の構築もまた、前記成分が不在であることを結論付けるように機能するであろう。高分子物質のより大きなプールを同定するために、構造／電荷に基づいてきわめて異なる炭水化物に感受性である一群の異なる L C O を使用することも可能である。

【 0 0 5 7 】

他の選択肢として、同定される炭水化物の検出は、L C O プロトタイプの漸進的改変により向上させることが可能である。この実施形態は、ピーク励起／発光およびシグナル強度が他の L C O - 標的ペアに対して際立つように、特異的分子への結合を向上させるかおよび／または結合 L C O の蛍光性を向上させるかのいずれかのために、プローブの官能性化学基の追加および／または除去を包含するであろう。

【 0 0 5 8 】

使用

炭水化物は、多くの領域内で有用であり、たとえば、薬剤、栄養補助剤、調味剤、および甘味剤、さらには材料として、種々の用途で利用される。したがって、L C O は、そのような用途の炭水化物化合物の製造および品質評価のためのインジケータとして有用である。炭水化物の検出、同定、および定量における L C O の使用は、主に、医薬品産業内および食品産業内で、さらには研究で、行われるであろう。

【 0 0 5 9 】

医薬品産業では、炭水化物は、製品の膨大なライブラリーを形成する。代表例のグループまたは製品は、炭水化物栄養補助剤、バイオ医薬製品、医療用生分解性材料、薬剤、さらにはフィルター、ポリマー、および表面である。重要な抗凝固剤であるヘパリンは、医薬用の周知の炭水化物である。同様に、ヘパリンに密接に関連する炭水化物であるコンドロイチン硫酸 A は、健康補助食品として市販されている。G M P 規制では、製品の正体および純度を示す重要性が規定されている。本発明に係る L C O 法は、安価で迅速な方法としてそのような目的に適用されうる。L C O はまた、重要な炭水化物の製造に対する合成効率を示すインジケータとして使用されうる。

【 0 0 6 0 】

食品・飲料産業では、人工甘味剤は、砂糖代替品として、およびある程度、コスト削減手段として、一般に使用される。炭水化物系の調味剤および添加剤もまた、食品・飲料産業内でますます使用されるようになってきている。食品への添加およびその改変に関連する炭水化物の分析は、そのような分子が健康に及ぼす長期的影響が完全には理解されていないので、ますます重要になりうる。したがって、L C O は、特異的天然炭水化物の存在または本質的に炭水化物である置換分子の存在および正体の指標として有用でありうる。グルコース、アミロース、グリコーゲンなどの代謝的に重要な炭水化物の検出を本開示に示す。

【 0 0 6 1 】

既製食品およびパッケージ食品では、L C O は、前記食品にごく近接して配置されたとき、食品品質の変化を感知するインジケータとして使用されうる。食品は、最初に製造されたときの元の品質から逸脱するので、この変化は、徐々に出現して／検出される状態になる炭水化物の存在の検出でありうる。

【 0 0 6 2 】

本明細書に開示される L C O および方法は、炭水化物の形成、分解、および炭水化物の特性を研究して理解を深めるための基礎研究で使用可能である。バイオ燃料へのセルロースの変換は、広範な研究の課題となっていた。セルロースは、プロセス時にセルロビオースおよびグルコースに変換される。これは、炭水化物の品質および量が関連する多種多様

10

20

30

40

50

な状況を包含しうる。炭水化物基質が生成物に変換されるときに得られるＬＣＯ光学プロファイルの蛍光測定シフトは、先と同様に、合成方法の効率および形成された生成物の品質を分析するための安価で迅速な方法を提供可能である。ＬＣＯは、任意の検出可能な炭水化物の変換を追跡するために適用可能である。

【００６３】

ＬＣＯはさらに、細胞や糖タンパク質などの炭水化物含有生体物質の形成および／または挙動を分析するための生物学的研究で使用されうる。本発明に係るＬＣＯを用いて、そのような研究は、*in vitro*、*in vivo*、または生存組織サンプル中 *in situ*で行われうる。

【００６４】

本開示のプローブは、微生物バイオフィルムの細胞外マトリックス（ＥＣＭ）中の構造炭水化物に感受性である。さまざまな微生物が、それらのＥＣＭ中のさまざまな存在可能な構造炭水化物を利用することが知られており、最もよく知られた炭水化物は、セルロース、 α -１，３-グルカン、キチン、およびアルギネートである。バイオフィルムのモルフォロジーおよび量の炭水化物ベースの同定は、新規できわめて正確なバイオフィルム検出法でありうる。バイオフィルムのＥＣＭは、不溶性構造の不均一組織であるので、一群の異なるＬＣＯは、そのような不溶性構造の同定を可能にするであろう。さらに、異なる種の細菌から形成されるバイオフィルムの組成は、特異であると考えられるので、一群の異なるＬＣＯはまた、異なる細菌種の同定を可能にする。

【００６５】

植物産業および森林産業では、材料および製品（木材、パルプ、および紙）は、主に、炭水化物（不溶性構造炭水化物）である。異なる起源（たとえば、異なる樹木）に由来する木材、パルプ、および紙は、構成炭水化物のタイプ、量、および品質のプロファイリングにより検出されうる。炭水化物検出能を有するＬＣＯは、この目的にかなり役に立ちうる。同様に、木材、パルプおよび紙の品質は、ＬＣＯを用いて同定されうる。これは、ＬＣＯを適用して存在する炭水化物の純度を決定することを含みうる。

【実施例】

【００６６】

以下に実証されるように、驚くべきことに、バイオフィルムの研究中、アミロイドタンパク質だけでなく炭水化物をも標的とする本発明に係るＬＣＯの能力を見いだした。バイオフィルムは、細胞外マトリックス（ＥＣＭ）内に埋め込まれた微生物細胞の集団を含む不均一で複雑な３Ｄマトリックスである。ＥＣＭの十分に特徴付けられた２つの成分は、セルロースなどの構造多糖およびアミロイドタンパク質カーリーである。以下の実施例では、エンドポイント研究およびリアルタイム研究の両方で、バイオフィルムの炭水化物成分、哺乳動物の貯蔵炭水化物、炭水化物の代謝中間体、およびグリコソアミノグリカンを標的とし同定するＬＣＯの能力、さらにはバイオフィルムなどの複合構造およびより純粋な形態の炭水化物を検出、同定、および定量するＬＣＯの能力を実証する。

【００６７】

実施例１ - バイオフィルム中の炭水化物成分の検出

研究目標：

共焦点分析を用いてプロトタイプＬＣＯ h -FTAAがバイオフィルム中の炭水化物成分すなわちセルロースを検出可能であることを実証すること。

【００６８】

研究設計：

I．伝統的コンゴレッドプレートアッセイを用いた既知のバイオフィルムモルフォロジーの確認

カーリーおよび／またはセルロースの産生に関連付けられるバイオフィルムモルフォロジーを検証するために、コンゴレッド（ $40 \mu\text{g} / \text{mL}$ ）およびクーマシーブリアントブルー-G-250（ $20 \mu\text{g} / \text{mL}$ ）が追加されたLB寒天プレート（塩を用いない）上で、*S. enteritidis*（*S. enteritidis*）wt株3934ならびに

10

20

30

40

50

アイソジェニック突然変異株 *b s c A* (カーリー+、セルロース-)、*c s g A* (カーリー-、セルロース+)、および *c s g D* (カーリー-、セルロース-)を培養した。プレートを28℃で48時間培養した。

【0069】

II. バイオフィームおよびバイオフィームモルフォロジーの蛍光分析のためのLCOアッセイ

ガラスカバースリップを6ウェルプレートのウェルに導入し(図2Aに示される構成による)、バイオフィーム形成のための表面を提供した。これは、実験の終了時、顕微鏡分析のために容易に取出し可能であった。バイオフィーム実験の準備をするために、*S. Enteritidis* (*S. enteritidis*) wt株3934ならびにアイソジェニック突然変異株 *b s c A*、*c s g A*、および *c s g D*の個別の培養物をフラスコ内のLB培地中で一晩増殖させた。各培養物を新しいLB中に100倍希釈し、 $OD_{600} = 0.6$ になるまで振盪インキュベーター(230 rpm)中37℃で培養した。塩を用いないLB中に培養物を 10^5 CFU/mlの培養密度に希釈し、8mlのアリコートでカバースリップ含有6ウェルプレート中に分配した。プレートを28℃で48時間培養した後、ガラスカバースリップを取り出し、PBSで2回洗浄し、その後、4mlの4%ホルムアルデヒド中で1時間固定した。固定サンプルを2回洗浄し、次いで、それぞれ *h - F T A A* ($2 \mu g / ml$)、*h - H T A A* ($2 \mu g / ml$)、およびPBSの溶液中に暗所で30分間浸漬した。PBSは、陰性対照として機能し、自己蛍光レベルの評価に使用された。次いで、処理されたスライドをPBSで2回洗浄し、蛍光に基づく共焦点レーザー走査型顕微鏡法分析のために*Vectashield*(登録商標)を用いて封入した。特定的には、液体空気界面に形成されたバイオフィームのエッジを適切な蛍光フィルターを用いて可視化した。図2C~Dでは、各スライドは、励起されたときにバイオフィーム結合LCOにより生成された蛍光を示す画像により表される(左側)。右側は、LCO蛍光との位相差による細菌存在の光学検査のオーバーレイである。位相差は、表面上へのバイオフィーム付着の目視確認のための伝統的方法である。

【0070】

結果:

株はすべて、コンゴレッドアッセイで予想された形態型を示した(図2B)。各株の形態型の特性は、カーリーおよびセルロースの産生に関してそれらのバイオフィーム形成能に関連付けられ、この関係は、これまでに他のものにより報告されてきた。

【0071】

LCOアッセイは、カーリー/セルロースのモルフォロジーを識別することが可能である(図2C~D、図2Cは*h - F T A A*に対する結果、図2Dは*h - H T A A*に対する結果を示している)。LCO(*h - H T A A*さらには*h - F T A A*)からの蛍光シグナルは、位相差顕微鏡法により検証された可視細菌凝集体に一致する。カーリーが存在する場合(*w t*および *b s c A*)、形成されたバイオフィームは大きく、離間したクラスターの形態をとる。セルロースのみが発現された場合(*c s g A*)、カバースリップ付着バイオフィームの量は大幅に低減され、蛍光細胞の薄層のように見えた。*h - F T A A*は、セルロース+およびカーリー- *c s g A*により生成された可視細菌凝集体に一致する蛍光シグナルを与えた。*c s g D*は、カーリーおよびセルロースの発現の両方が欠如しており、検出可能なバイオフィームを生成しなかった。

【0072】

位相差顕微鏡法は、バイオフィームモルフォロジーの表面特性を示す。バイオフィームモルフォロジーに関して行われた光学観測は、バイオフィーム結合LCOの蛍光共焦点分析のものと一致した。

【0073】

結論:

LCOプローブは、バイオフィームに結合し、蛍光分析下でその可視化を可能にした。それに加えて、それらは、異なる細菌表現型に由来するバイオフィームモルフォロジーの

10

20

30

40

50

識別を可能にした。LCOプローブh-FTAAは、セルロースを発現するがカーリーを発現しない株 csgAの蛍光検出シグナルを生成することが示されたことから、h-FTAAは、カーリー以外の他の成分おそらくセルロースを検出可能であることが示唆される。

【0074】

実施例2-LCOは、未洗浄培養物でさえも、バイオフィーム中のカーリー含有量およびセルロース含有量に基づいて、特異な「個別化」スペクトルシグネチャーを生成する。

【0075】

研究目標：

各バイオフィームでLCOが有する特異なスペクトルシグネチャーを示すことにより、異なるカーリー含有量およびセルロース含有量を含むバイオフィームモルフォロジーを識別するLCOの能力を示すこと。

【0076】

研究設計：

I. 96ウェルプレート中でのバイオフィーム増殖

臨床由来S.エンテリティディス(S. enteritidis) wt株3934ならびにアイソジェニック突然変異株(bscA、csgA、およびcsgD)の新しい晩培養物を新しいLB中に接種し、OD₆₀₀ = 0.6になるまで37℃で培養した。それぞれの各培養物をLB(塩を用いない)で10⁵ CFU/mlの細胞密度に希釈した後、3つの個別のフラスコ内に分注した。h-FTAA(2 μg/ml)およびh-HTAA(2 μg/ml)をそれぞれフラスコの2つに添加し、一方、対照として使用されたPBSを第3のフラスコに添加した。次いで、50 μlの各培養物を96ウェルプレートの個別のウェル内にトリプリケート方式で接種し、28℃で48時間インキュベートした。

【0077】

II. 分光分析

インキュベーターからバイオフィーム培養物を取り出した後、処理ステップを実施せずにLCOシグナルの検出を行った。Synergy Mxモノクロメーター式マルチモードマイクロプレートリーダーを用いてプレートを読み取った。300~500 nmでサンプルを励起して545 nmで発光を検出することにより、LCOの励起スペクトルを収集した。サンプルを405 nmで励起したとき、500~700 nmで発光シグナルを読み取ることにより、カーリー結合LCOに対する発光スペクトルを収集した。サンプルを500 nmで励起したとき、520~700 nmで発光シグナルを読み取ることにより、セルロース結合LCOに対する発光スペクトルを収集した。

【0078】

結果：

h-HTAAのスペクトルプロファイルは、異なるアイソジェニック突然変異株により形成されたバイオフィームモルフォロジーを識別しなかった(図3A)。h-HTAAの励起スペクトルパターンは、すべてのアイソジェニック株にわたり同一であった。一方、h-FTAAは、各株で励起ピークおよびショルダーの識別可能なスペクトルパターンを生成した(図3B)。h-FTAAをカーリーの存在下で380 nmで励起したとき(wtおよびbscA)、特異な発光スパイク(励起ショルダー)が検出される。h-FTAAをカーリーの不在下で380 nmで励起したとき(csgA csgD)、その代わりに約355 nmの発光スパイク(励起ショルダー)が検出される。最後に、h-FTAAをセルロースの存在下で480 nmで励起したとき(wtおよびcsgA)、特異なピーク発光が検出される。

【0079】

全体として、カーリー陽性株(wtおよびbscA)中のh-FTAAは、360 nm~425 nmで励起したとき、より強い発光を有していた。425 nm未満でバイオフィーム結合h-FTAAを励起すると、h-FTAA結合カーリーに対してより特異的な

10

20

30

40

50

シグナル与え、一方、480nm超で励起すると、h-F T A A結合セルロースに対してより特異的なシグナル与えることが、データから示唆される。

【0080】

カーリーに対して405nmおよびセルロースに対して500nmの励起波長をそれぞれ使用して、S.エンテリティディス(S. enteritidis)wt株およびアイソジェニック株の発光スペクトルを分析した。

【0081】

405nmで励起したとき(図3C)、カーリー陽性株(wtおよびbscA)中のh-F T A Aは、カーリー陰性csgAおよびcsgDに対して約556nmでより強い発光シグナル強度を有していた。wt、bscA、およびcsgAとcsgDとの比較から、バイオフィームが発現されたとき、525nmから550~560nmへの発光ピークのレッドシフトが存在することが示唆される。

10

【0082】

500nmの励起波長を用いると(図3D)、h-F T A Aの発光は、セルロース陽性株ですべての波長にわたりより強く、560および600nmに発光の2つの顕著なピークを有する。600nmの特異な発光ピークは、セルロース陰性バイオフィームからその存在を識別するセルロース特異的シグナルを形成した。

【0083】

結論：

LCO h-F T A Aは、各バイオフィームモルフォロジーに特異なスペクトルシグネチャーを生成する。h-F T A Aは、ECM成分のカーリーおよびセルロースとの相互作用を介して生成される特異なスペクトルプロファイルに基づいてバイオフィームを識別する。本方法は、生の培養物からのバイオフィームの物理的分離を必要としない。LCO h-H T A Aは、洗浄ステップを用いることなく異なる細菌表現型により形成された異なるバイオフィーム量を識別することができなかった。h-H T A Aは、クリスタルバイオレットと類似の洗浄ステップを用いてバイオフィーム検出のための一般的なプローブとしてより良好に適用されうる。しかしながら、h-H T A Aは、実験全体を通じて増殖培地中に存在しうる非殺細菌プローブであるという利点を有する。

20

【0084】

実施例3：セルロース特異的スペクトルシグネチャーの検証

30

研究目標：

セルロースを標的としてスペクトルシグネチャーを与えるLCO h-F T A Aの能力を検証すること、およびセルロースの定量におけるその有用性を検証すること。

【0085】

研究設計：

6.25mg/mlから0.0488までの純粋不溶性微結晶セルロース懸濁液の二倍段階希釈液を調製し、これにh-F T A Aを3μMの濃度になるように添加した。100μlアリコートを経96ウェルプレート内に分配した。Synergy Mxモノクロメーター式マルチモードマイクロプレートリーダーを用いてプレートを読み取った。300~500nmでサンプルを励起して545nmで発光を検出することにより、LCOの励起スペクトルを収集した。ここに示されるセルロース濃度は、6.25mg/ml、3.125mg/ml、1.5625mg/ml、および0.78125mg/mlである。

40

【0086】

結果：

純粋セルロースの存在下で、約480nmでh-F T A Aを励起すると、545nmで検出される発光ピークを与える(図4)。このシグナル強度は、セルロース濃度と比例して増加したことから、h-F T A Aが実際にセルロースに結合することが検証される。

【0087】

結論：

七量体LCO h-F T A Aは、炭水化物セルロースの検出および定量に使用可能であ

50

る。

【0088】

実施例4 - バイオフィルム形成のリアルタイム追跡

研究目標：

バイオフィルム形成のリアルタイム追跡でh - F T A Aの使用を実証して、培養物増殖との関連で時間に対するバイオフィルム相関R F U (相対蛍光単位) の変化を示すこと。

【0089】

研究設計：

OD₆₀₀での吸光度により測定される細菌培養物の濁度を用いて、培養物密度を規定する。GFPの発現は、細菌増殖および培養密度の直接表現を提供する。蛍光検出による培養密度のより直接的表現のためにgfp遺伝子を有するプラスミドP2777を用いて、S. エンテリティディス (S . e n t e r i t i d i s) 3934wtならびにアイソジェニック突然変異株 bscA、 csgA、および csgDをトランスフォームした。各株の新しい一晚培養物を新しいLB中に接種して、OD₆₀₀ = 0.6になるように37℃で培養した。培養物をLB (塩を用いない) で10⁵ CFU / mlの細胞密度に希釈した後、2つの個別のフラスコ内に分注した。h - F T A A (2 μg / mL) を1つのフラスコに添加し、一方、対照として使用されたPBSを第2のフラスコに添加した。50 μlの各培養物混合物を4つの96ウェルプレート上にトリプリケート方式で接種して28℃で培養した。フルオロフォアの漂白を回避すべく4時間間隔で各プレートのスキャンを行うようにして、GFP発現さらにはカーリー結合h - F T A Aシグナル (励起405 nm、発光556 nm) およびセルロース結合h - F T A Aシグナル (励起500 nm、発光600 nm) に関して、48時間にわたり1時間ごとにタンデムにプレートを読み取った。4つのプレートからのGFPおよびh - F T A AのRFUデータを単一のプロットで組み合わせて、時間に対してシグナルの1時間ごとの変化を可視化した。

【0090】

結果：

バイオフィルム培養でOD₆₀₀の吸光度に対してプロットされたGFPシグナルの増加傾向の比較は、密接な相関を示した (図5A) 。GFPシグナルに対する吸光度のプロットが0.9423のR²値を与えたことから、2つのシグナルの密接な相関が示唆される (図5B) 。このことから、GFP発現は、細菌増殖をモニターする手段として使用可能であることが示唆された。

【0091】

GFP蛍光と平行してh - F T A Aシグナルを追跡することにより、バイオフィルム形成と培養増殖期と時間的關係が示される (図5C ~ F) 。S. エンテリティディス (S . e n t e r i t i d i s) wt株3934 (図5C) では、GFPシグナルは、最初の6時間は一定に保持され (遅滞期) 、その後、指数関数的に増加し (対数増殖期) 、その後、15時間でプラトーに達する (定常期) 。これに関連して、カーリーおよびセルロースのシグナルは両方とも、最初の16時間は一定保持され、次いで、22時間後、プラトーまで増加する。バイオフィルム形成は、培養増殖の対数期後期の近傍で開始され、かつセルロースおよびカーリーの産生は、同時であることが、データから示唆される。

【0092】

検出されたh - F T A Aシグナルは、GFPからの有意なブリードスルー蛍光を含有していない。平行アッセイで csgDの蛍光プロファイルを48時間にわたり1時間ごとに観測したところ、GFPシグナルの増加は、カーリーおよびセルロースのシグナルの増加を引き起こさなかった (図5D) 。したがって、カーリーおよびセルロースの追跡で励起・発光セットで観測された傾向は、GFPの存在からのシグナルオーバーフローの結果ではなかった。

【0093】

csgA (図5E) の分析は、カーリー発現の不在下でバイオフィルム形成速度が変化することを示している。ピークセルロース発現の開始は、より早い段階で13時間で行

10

20

30

40

50

われ、より速い速度で18時間でプラトーに達する。また、同一のバイオフィルム増殖期では、プラトーのRFU強度はwtよりも強い。このことから、セルロース発現は、カーリー不在に反応して増加しうることが示唆される。セルロース結合h-F-T-A-Aの広い発光プロファイルが原因で、実質的量のスピルオーバーがカーリー蛍光チャネル中で検出される。

【0094】

b-s-c-A (図5F)の分析は、セルロース発現の不在下でカーリー発現が図6Cに見られるS字状傾向にもはや従わないことを示している。カーリー産生は、全体を通じて漸増するようと思われる。この場合もまた、カーリー結合L-C-Oの広い発光スペクトルに起因して、ある程度のスピルオーバーがセルロース蛍光チャネル中で検出される。

10

【0095】

セルロースがECM中に存在しない場合、b-s-c-A (図5F)の場合と同様に、ECM形成の動態が変化する。wt (図5C)およびc-s-g-A (図5E)の培養物とは対照的に、培養増殖の対数期とECM形成の誘導との間に明確な「時間差」は存在しなかった。カーリー産生は、全体を通じて漸増するよう思われた。

【0096】

結論：

L-C-Oプローブh-F-T-A-Aは、バイオフィルム形成のリアルタイム分析を可能にする。セルロースおよびカーリーに特異的なシグナルは、培養進行中、1時間おきに検出可能であった。経時的なシグナルの増加は、形成されるバイオフィルム量の増加を反映する。培養増殖(G-F-Pシグナルにより表される)とh-F-T-A-Aからのバイオフィルムシグナルとの比較から、バイオフィルム形成は、培養物が定常期に達したときに行われることが示唆され、これまでの研究と一致する。カーリーおよびセルロースの検出のために選択されるチャネルは、G-F-P蛍光からの有意なノイズを受けない。カーリー/セルロース結合h-F-T-A-Aの広い発光スペクトルは、G-F-Pチャネル中にブリードする。しかしながら、これは、分析に影響を及ぼさない。

20

【0097】

実施例5 - 構造炭水化物(たとえば、-1,3-グルカン、セルロース、キチン、ナトリウムアルギネート)、代謝基質および代謝中間体(たとえば、-D-グルコース、セルロピオース)、貯蔵炭水化物(たとえば、アミロース、グリコーゲン)、およびグリコアミノグリカン(たとえば、ヘパリン、コンドロイチン硫酸A)に結合して識別するL-C-Oの能力の評価。

30

【0098】

研究目標：

最大発光の励起波長(max)の変化およびシグナル強度と炭水化物濃度との相関を研究することにより、-1,3-グルカン、セルロース、キチン、ナトリウムアルギネート、-D-グルコース、セルロピオース、アミロース、グリコーゲン、ヘパリン、およびコンドロイチン硫酸Aを識別する際の五量体L-C-Oの使用を実証すること。

【0099】

研究設計：

40

炭水化物懸濁液の段階希釈液をdH₂O中に調製した。-1,3-グルカン、セルロース、およびキチンに対しては、10~0.039mg/mlの範囲内の濃度を使用し、一方、ナトリウムアルギネート、グルコース、アミロース、グリコーゲン、セルロピオース、ヘパリン、コンドロイチン硫酸Aに対しては、5~0.019mg/mlを使用した。3μMの各L-C-Oプローブを各濃度の炭水化物の1mlアリコートに添加し、その後、100μlを96ウェルプレート中にトリプリケート方式で分配した。300~500nmでサンプルを励起して545nmで発光を検出することにより、励起スペクトルを収集した。陰性対照に対してmaxおよび/またはRFU強度の再現性のある変化が存在する場合、炭水化物の検出が結論付けられる。それぞれの図に明記されるように、3つの濃度さらには陰性対照からのデータが各炭水化物に対して示される。

50

【 0 1 0 0 】

炭水化物結合 L C O の対応する蛍光シグナルに対して炭水化物の濃度をプロットすることにより、シグナル強度と炭水化物濃度との間の相関および傾向を示した。各 L C O に対して選択される励起波長 (5 4 5 n m で発光を検出) は、 (1) m a x または (2) 最小バックグラウンドの影響を受ける励起波長のいずれかである。線形回帰分析を行って炭水化物濃度と R F U との関係を決する。

【 0 1 0 1 】

結果は、図 6 ~ 2 5 に示され、以下の表 1 ~ 1 0 にまとめられている。

表1:β-1,3-グルカン (10 - 0.039 mg/ml)																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																															
分光分析 (励起 300-500、発光 545)																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																															
[炭水化物物の増加に伴うシグナル値]																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																															
プローブ	図	RFU変化		Amax - 未結合 (nm)		Amax - 結合 (nm)		相関分析																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																							
		RFU変化	Amax変化	未結合 (nm)	結合 (nm)	図	励起λ (nm)	RFU変化	スルからの 偏位 (P-値)	回帰直線の傾き	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質	傾きの品質

表4:ナトリウムアルギネート (5 - 0.019 mg/ml)									
プロープ	分光分析 (励起 300-500 発光 545)				相関分析				
	[脱水化物の増加に伴うシグナル偏位]				回帰直線の傾き				
	図	RFU変化	Amax - 未結合 (nm)	Amax - 結合 (nm)	図	励起A (nm)	RFU変化	スルからの偏位 (P-値)	傾きパラメーター 傾きの品質 直線関係
pHTA-Tyr	図 A	増加	変化なし	402	図 A	402	不明確	0.8611 ± 0.0001	30.9 ± 173.5 有意 有意
pHTA-Asp	図 B	増加	変化なし	390	図 B	390	不明確	0.4928 ± 0.0001	414 ± 59.6 有意 有意
pHTA-Arg	図 C	増加	変化なし	375	図 C	375	増加	0.0002 ± 0.0001	78.6 ± 10.6 有意 有意
pHTA-His	図 D	増加	変化なし	366	図 D	444	増加	-0.0001 ± 0.0001	199.9 ± 36.3 有意 有意
pHTEA	図 E	増加	レッドシフト	366	図 E	405	増加	0.8324 ± 0.0001	832.4 ± 174.5 有意 有意
pHTIm	図 F	増加	レッドシフト	369	図 F	381	増加	-0.0001 ± 0.0001	266 ± 29.2 有意 有意
pHTA-Glu	図 G	増加	変化なし	391	図 G	390	増加	0.4336 ± 0.0001	68.7 ± 69.0 有意 有意
pHTA-Lys	図 H	増加	変化なし	390	図 H	396	増加	-0.0001 ± 0.0001	55.4 ± 5.3 有意 有意
表5:グルコース (5 - 0.019 mg/ml)									
分光分析 (励起 300-500 発光 545)									
プロープ	[脱水化物の増加に伴うシグナル偏位]				相関分析				
					回帰直線の傾き				
	図	RFU変化	Amax - 未結合 (nm)	Amax - 結合 (nm)	図	励起A (nm)	RFU変化	スルからの偏位 (P-値)	傾きパラメーター 傾きの品質 直線関係
pHTA-Tyr	図 A	増加	変化なし	402	図 A	402	増加	-0.0001 ± 0.0001	799.4 ± 95.1 有意 有意
pHTA-Asp	図 B	増加	変化なし	390	図 B	393	増加	0.6251 ± 0.0001	625.1 ± 130.2 有意 有意
pHTA-Arg	図 C	増加	変化なし	387	図 C	393	不明確	0.648 ± 0.0001	17.9 ± 38.1 有意 有意
pHTA-His	図 D	増加	変化なし	399	図 D	390	不明確	0.188 ± 0.0001	33.2 ± 25.2 有意 有意
pHTEA	図 E	増加	変化なし	387	図 E	399	不明確	0.0807 ± 0.0001	-57.4 ± 37.2 有意 有意
pHTIm	図 F	不明確	変化なし	390	図 F	387	不明確	0.6705 ± 0.0001	10.9 ± 25.5 有意 有意
pHTA-Glu	図 G	減少	変化なし	390	図 G	396	減少	0.0085 ± 0.0001	-116.0 ± 410 有意 有意
pHTA-Lys	図 H	不明確	変化なし	389	図 H	396	不明確	0.0857 ± 0.0001	23.6 ± 13.7 有意 有意
表6:アミノ酸 (5 - 0.019 mg/ml)									
分光分析 (励起 300-500 発光 545)									
プロープ	[脱水化物の増加に伴うシグナル偏位]				相関分析				
					回帰直線の傾き				
	図	RFU変化	Amax - 未結合 (nm)	Amax - 結合 (nm)	図	励起A (nm)	RFU変化	スルからの偏位 (P-値)	傾きパラメーター 傾きの品質 直線関係
pHTA-Tyr	図 A	不明確	変化なし	402	図 A	402	不明確	0.3081 ± 0.0001	-53.1 ± 128.5 有意 有意
pHTA-Asp	図 B	増加	変化なし	390	図 B	390	増加	0.9659 ± 0.0001	-7.6 ± 208.9 有意 有意
pHTA-Arg	図 C	不明確	変化なし	386	図 C	387	不明確	0.897 ± 0.0001	-28.4 ± 216 有意 有意
pHTA-His	図 D	減少	ブルーシフト	401	図 D	402	減少	-0.0001 ± 0.0001	-3415 ± 47.3 有意 有意
pHTEA	図 E	減少	変化なし	388	図 E	387	減少	-0.0001 ± 0.0001	-8680 ± 1421 有意 有意
pHTIm	図 F	減少	ブルーシフト	382	図 F	386	減少	-0.0001 ± 0.0001	-655 ± 110 有意 有意
pHTA-Glu	図 G	増加	ブルーシフト	395	図 G	393	増加	0.9559 ± 0.0001	493.6 ± 345.9 有意 有意
pHTA-Lys	図 H	増加	変化なし	395	図 H	396	増加	0.058 ± 0.0001	477 ± 10.5 有意 有意

10

20

30

表7:グリコゲン (5 - 0.019 mg/ml)

プロープ	分光分析 (励起 300-500, 発光 545)					相関分析			
	[脱水化物の増加に伴うシグナル値]					回帰直線の傾き			
	図	RFU変化	Amax - 未結合 (nm)	Amax - 結合 (nm)	図	RFU変化	ズルからの 傾き (P-値)	傾きの品質	感変性
pHTA-Tyr	図 8: A	減少	401	405	図 9: A	減少	<0.0001	-2092 ± 216.6	有意
pHTA-Asp	図 8: B	減少	391	400	図 9: B	減少	<0.0001	-655.8 ± 88.9	有意
pHTA-Arg	図 8: C	増加	376	391	図 9: C	増加	<0.0001	72.8 ± 13.4	有意
pHTA-His	図 8: D	増加	393	414	図 9: D	増加	0.0252	130.6 ± 55.6	有意
pHTEA	図 8: E	減少	389	411	図 9: E	減少	0.1804	-451 ± 328	有意
pHTIm	図 8: F	増加	389	411	図 9: F	増加	<0.0001	835.8 ± 26.6	有意
pHTA-Glu	図 8: G	減少	390	403	図 9: G	減少	0.0012	-349.2 ± 96.7	有意
pHTA-Lys	図 8: H	増加	390	384	図 9: H	増加	<0.0001	43.6 ± 7.9	有意

表8:セルロビオース (5 - 0.019 mg/ml)

プロープ	分光分析 (励起 300-500, 発光 545)					相関分析			
	[脱水化物の増加に伴うシグナル値]					回帰直線の傾き			
	図	RFU変化	Amax - 未結合 (nm)	Amax - 結合 (nm)	図	RFU変化	ズルからの 傾き (P-値)	傾きの品質	感変性
pHTA-Tyr	図 20: A	増加	402	402	図 21: A	増加	0.0015	56.7 ± 16	有意
pHTA-Asp	図 20: B	増加	402	402	図 21: B	増加	0.0278	912 ± 39.3	有意
pHTA-Arg	図 20: C	不明確	360	360	図 21: C	不明確	0.9204	-130 ± 12.9	有意
pHTA-His	図 20: D	不明確	357	357	図 21: D	不明確	0.2898	-526 ± 4.87	有意
pHTEA	図 20: E	不明確	387	387	図 21: E	不明確	0.5571	39.5 ± 66.5	有意
pHTIm	図 20: F	増加	390	390	図 21: F	不明確	0.2321	75.1 ± 61.5	有意
pHTA-Glu	図 20: G	増加	393	393	図 21: G	増加	<0.0001	178.6 ± 35.1	有意
pHTA-Lys	図 20: H	不明確	369	369	図 21: H	不明確	0.125	6.45 ± 3.93	有意

表9:ヘパリン (5 - 0.019 mg/ml)

プロープ	分光分析 (励起 300-500, 発光 545)					相関分析			
	[脱水化物の増加に伴うシグナル値]					回帰直線の傾き			
	図	RFU変化	Amax - 未結合 (nm)	Amax - 結合 (nm)	図	RFU変化	ズルからの 傾き (P-値)	傾きの品質	感変性
pHTA-Tyr	図 22: A	増加	399	399	図 23: A	増加	0.3541	74.5 ± 80.7	有意
pHTA-Asp	図 22: B	不明確	390	390	図 23: B	不明確	0.9487	-3.2 ± 49.3	有意
pHTA-Arg	図 22: C	増加	374	374	図 23: C	増加	0.0022	29.3 ± 8.6	有意
pHTA-His	図 22: D	減少	414	414	図 23: D	不明確	0.1559	26.3 ± 18.5	有意
pHTEA	図 22: E	減少	395	403	図 23: E	不明確	0.653	109.3 ± 248	有意
pHTIm	図 22: F	不明確	392	392	図 23: F	増加	0.0141	96.3 ± 36.8	有意
pHTA-Glu	図 22: G	不明確	390	390	図 23: G	不明確	0.901	-12.4 ± 108	有意
pHTA-Lys	図 22: H	増加	393	393	図 23: H	増加	0.013	48.4 ± 18.2	有意

10

20

30

表10:コンドロイチン硫酸A (5 - 0.019 mg/ml)													
分光分析 (励起 300-500, 発光 545)													
プローブ	[炭水化物]の増加に伴うシグナル偏位				相関分析								
	図	RFU変化	λmax変化	λmax - 未結合 (nm)	λmax - 結合 (nm)	図	励起λ (nm)	RFU変化	ヌルからの 偏位 (P-値)	回帰直線の傾き			
										傾きパラメーター	傾きの品質	直線関係	
感受性													
pHTA-Tyr	24 A	増加	変化なし	399	399	25 A	399	増加	0.013	163.3 ± 61.5	正	有意	あり
pHTA-Asp	24 B	不明確	変化なし	390	390	25 B	393	不明確	0.7757	67.88 ± 90.0	水平	非有意	なし
pHTA-Arg	24 C	増加	変化なし	372	372	25 C	372	増加	<0.0001	143.4 ± 10.01	正	有意	あり
pHTA-His	24 D	増加	フルーシフト	402	390	25 D	402	増加	<0.0001	163.8 ± 20.77	正	有意	あり
pHTEA	24 E	増加	レッドシフト	408	438	25 E	435	増加	<0.0001	598.9 ± 72.7	正	有意	あり
pHTIm	24 F	増加	レッドシフト	408	424	25 F	426	増加	<0.0001	117.7 ± 203.6	正	有意	あり
pHTA-Glu	24 G	減少	変化なし	391	391	25 G	390	不明確	0.4301	125.3 ± 156.5	水平	非有意	なし
pHTA-Lys	24 H	減少	変化なし	395	395	25 H	396	増加	<0.0001	194.8 ± 19.2	正	有意	あり

【 0 1 0 2 】

結論：

炭水化物への L C O の結合時の検出シグナル強度の変化（正もしくは負）および / または max のシフトに基づいて、以下に示されるように、炭水化物を特異的 L C O により検出および / または識別することが可能であるという結論が導かれる。

10

20

30

40

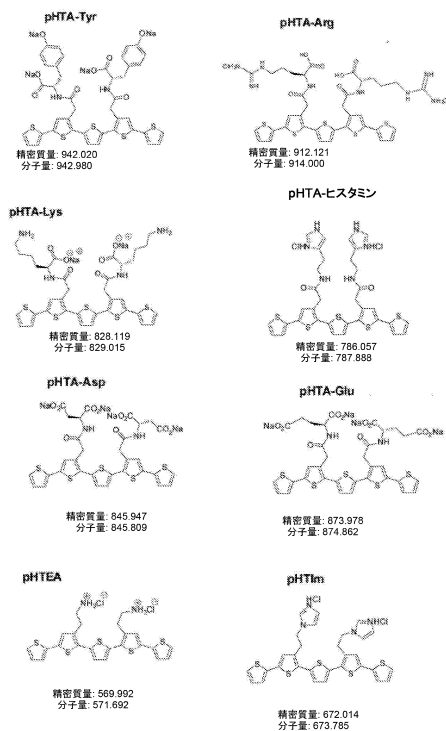
50

β -1,3-グルカン	pHTA-Asp, pHTA-Arg, pHTEA, pHTA-Glu, pHTA-Lys
セルロース	pHTA-Arg, pHTA-His, pHTEA, pHTIm, pHTA-Lys
キチン	pHTA-Tyr, pHTA-Asp, pHTA-Arg, pHTA-His, pHTEA, pHTIm, pHTA-Glu, pHTA-Lys
ナトリウムアルギネート	pHTA-Arg, pHTA-His, pHTEA, pHTIm, pHTA-Lys
グルコース	pHTA-Tyr, pHTA-Asp, pHTA-Glu
アミロース	pHTA-Asp, pHTA-His, pHTEA, pHTIm, pHTA-Glu, pHTA-Lys
グリコーゲン	pHTA-Tyr, pHTA-Asp, pHTA-Arg, pHTA-His, pHTEA, pHTIm pHTA-Glu, pHTA-Lys
セルロビオース	pHTA-Tyr, pHTA-Asp, pHTA-Glu
ヘパリン	pHTA-Arg, pHTIm, pHTA-Glu
コンドロイチン硫酸A:	pHTA-Tyr, pHTA-Arg, pHTA-His, pHTEA, pHTIm, pHTA-Lys

10

20

【図 1 A】



【図 1 B】

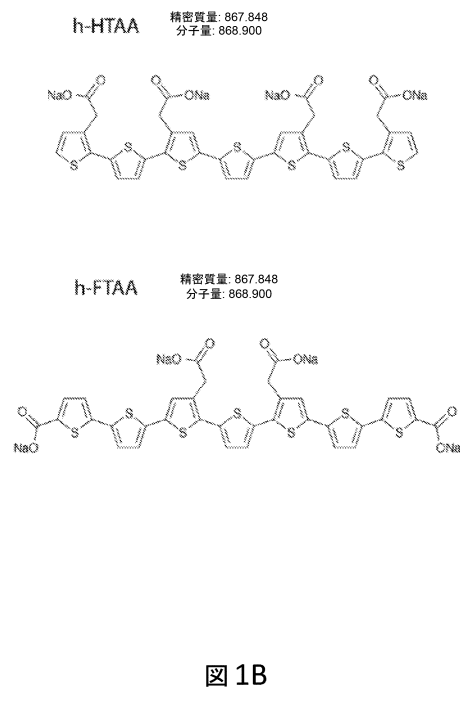


図 1B

図 1A

【図 2】

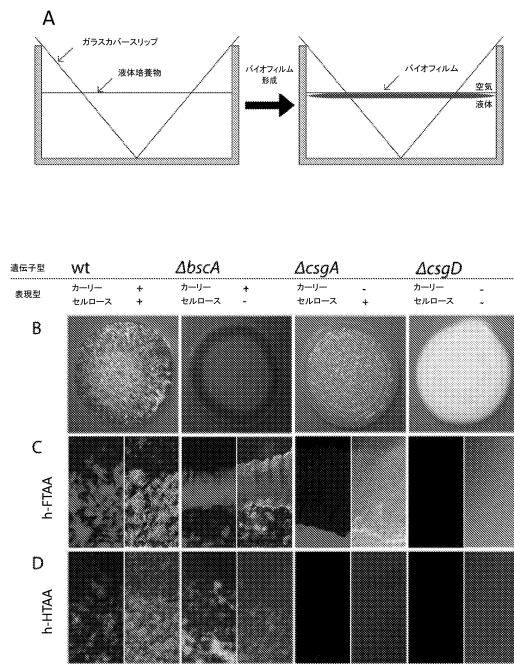


図 2

【図 3 - 1】

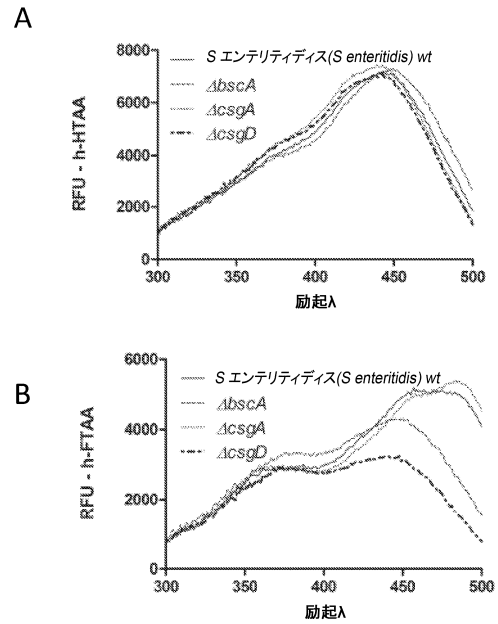


図 3

【図 3 - 2】

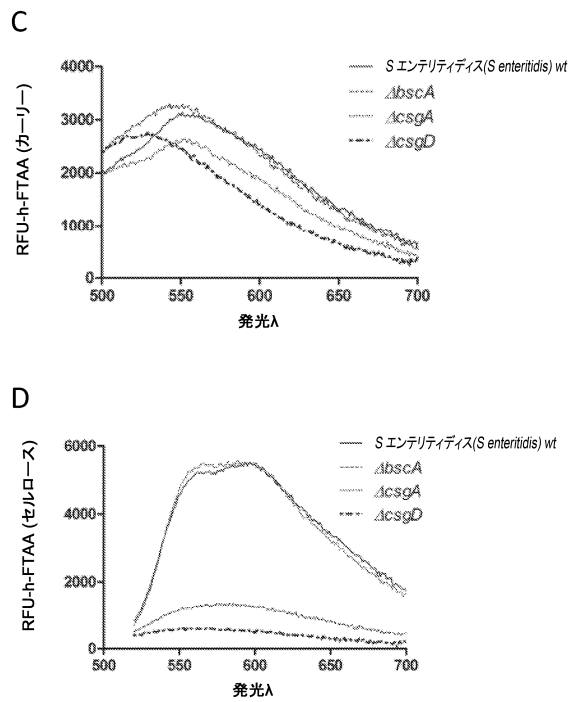


図 3 続き

【図 4】

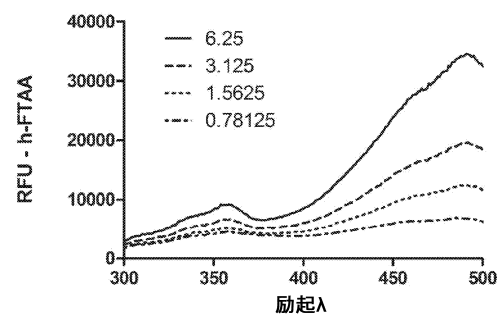


図 4

【図 5 - 1】

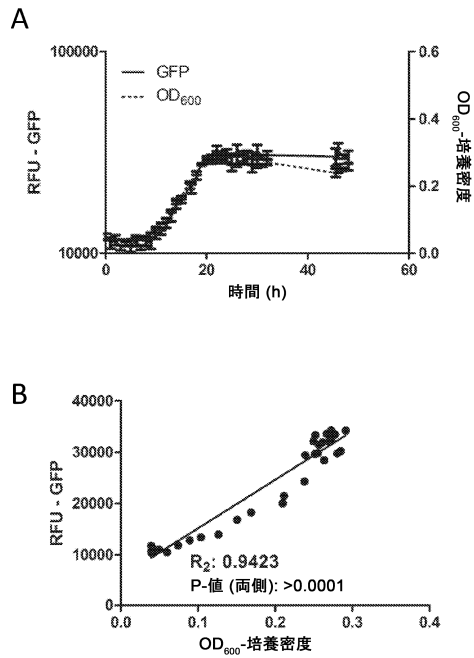


図5

【図 5 - 2】

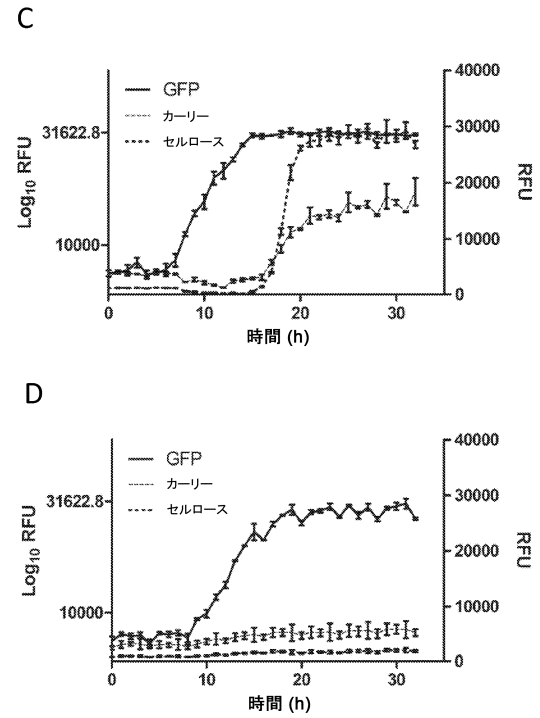


図5 続き

【図 5 - 3】

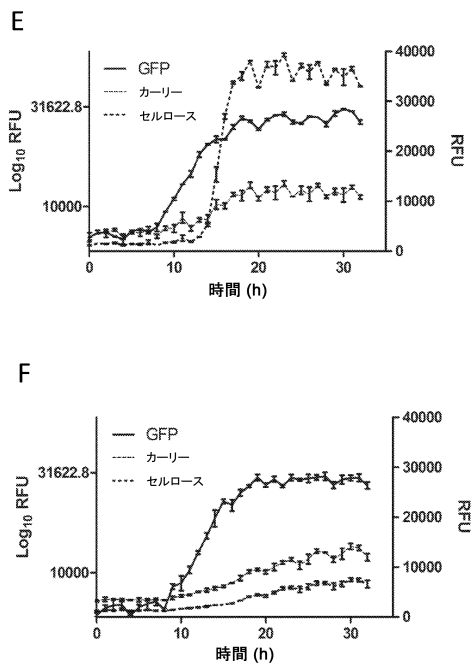


図5 続き

【図 6】

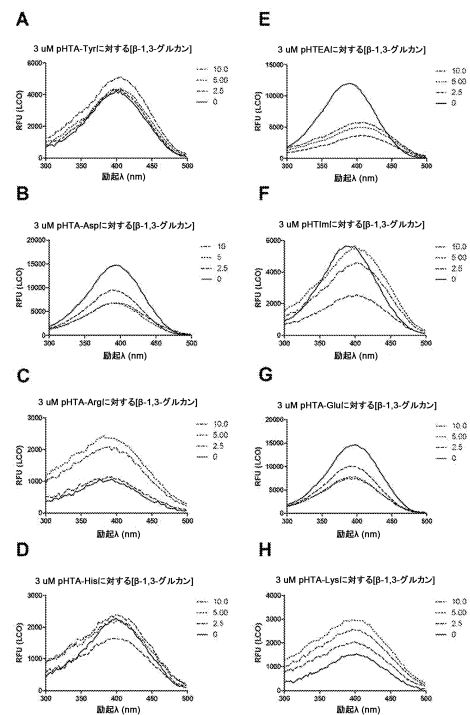


図6

【図 7】

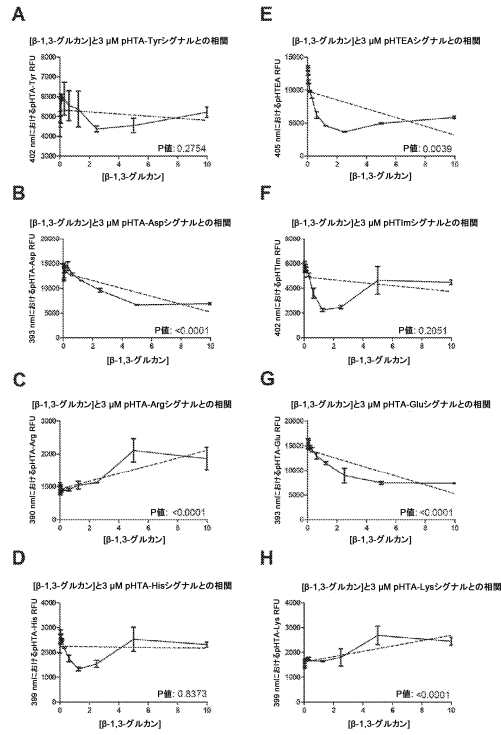


図 7

【図 8】

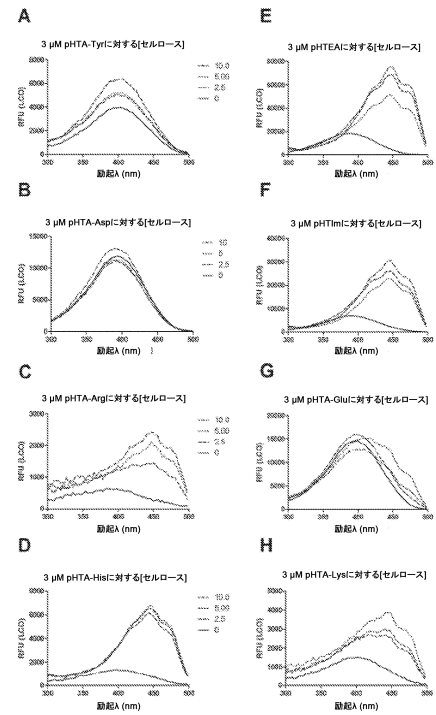


図 8

【図 9】

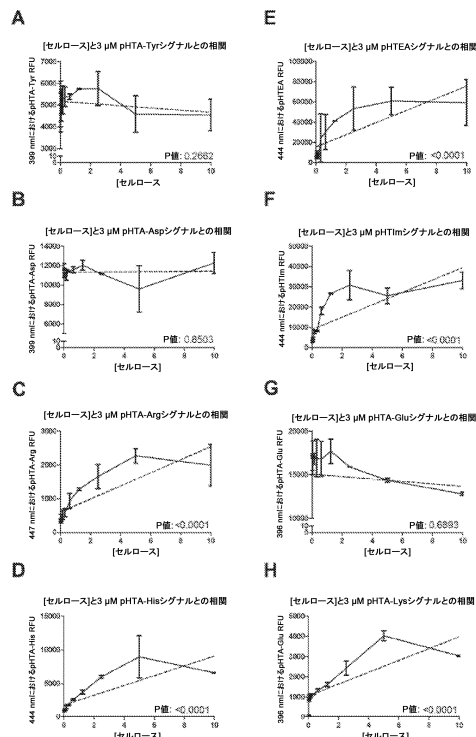


図 9

【図 10】

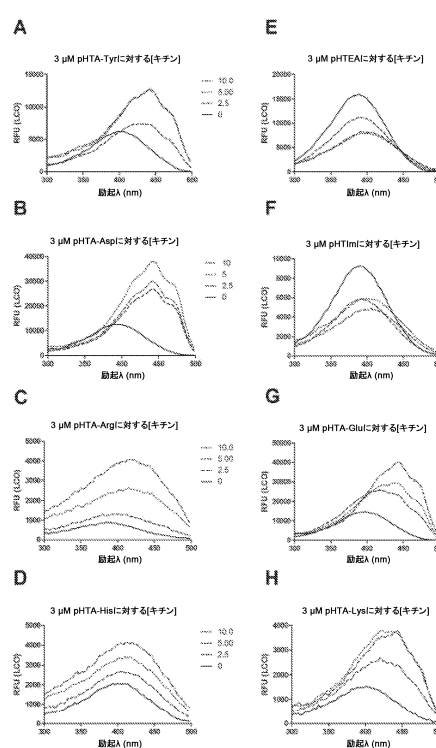


図 10

【図 1 1】

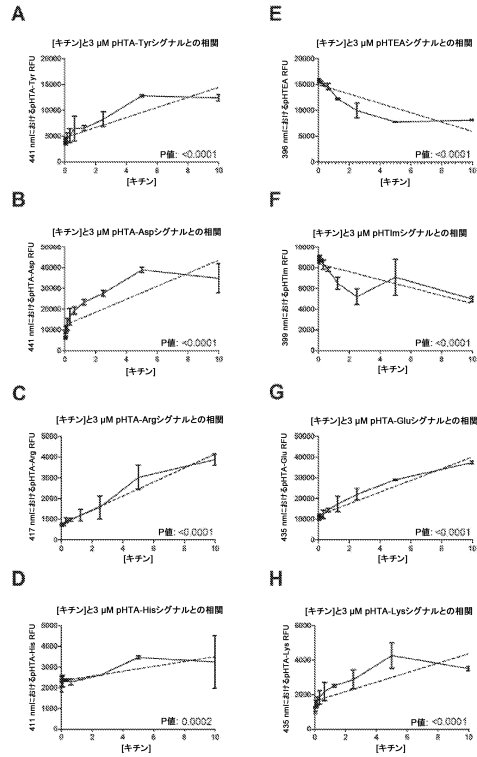


図 11

【図 1 2】

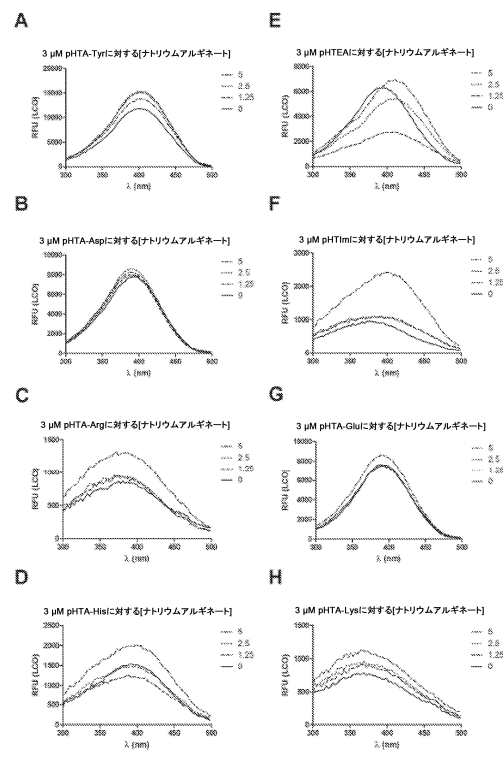


図 12

【図 1 3】

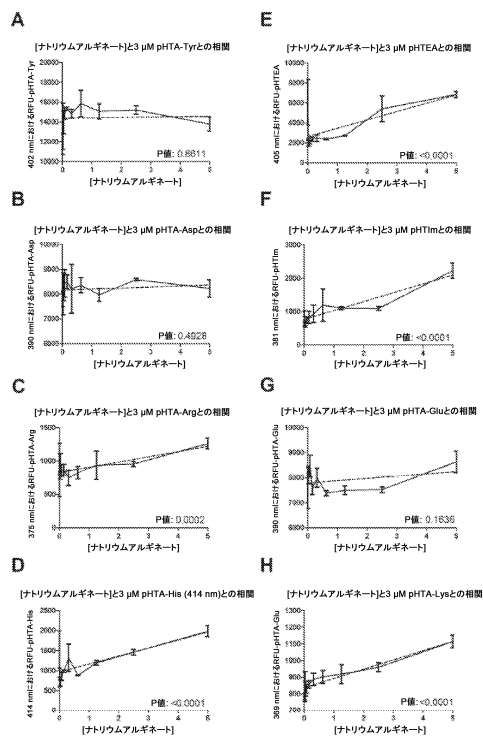


図 13

【図 1 4】

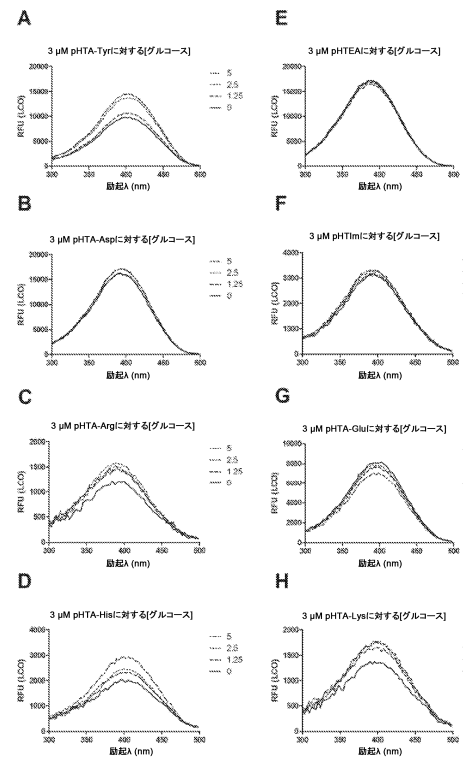


図 14

【図 15】

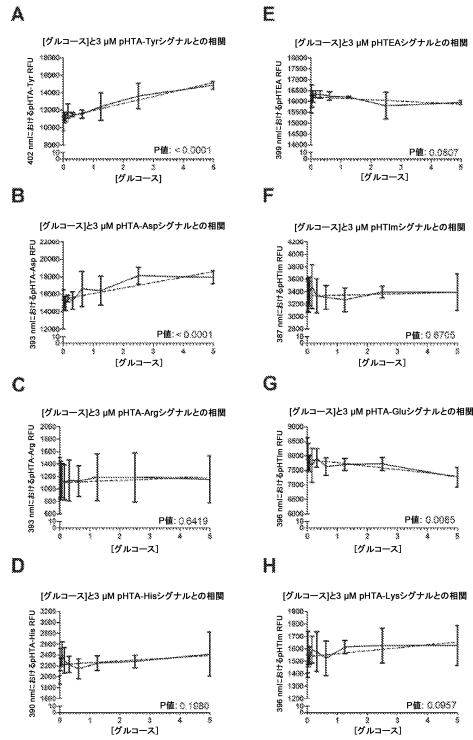


図 15

【図 16】

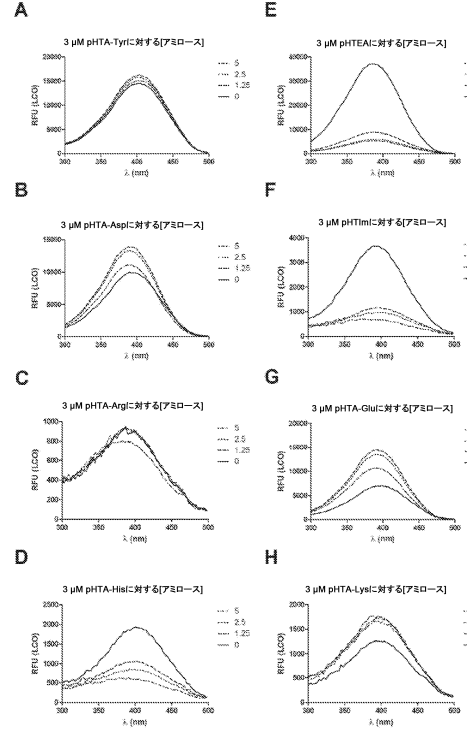


図 16

【図 17】

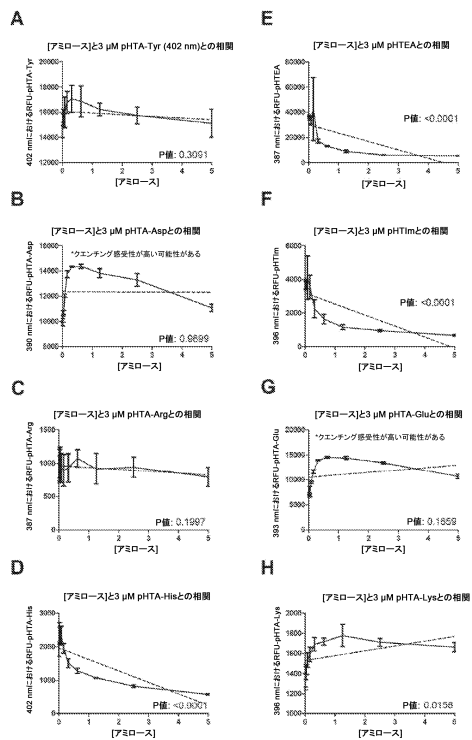


図 17

【図 18】

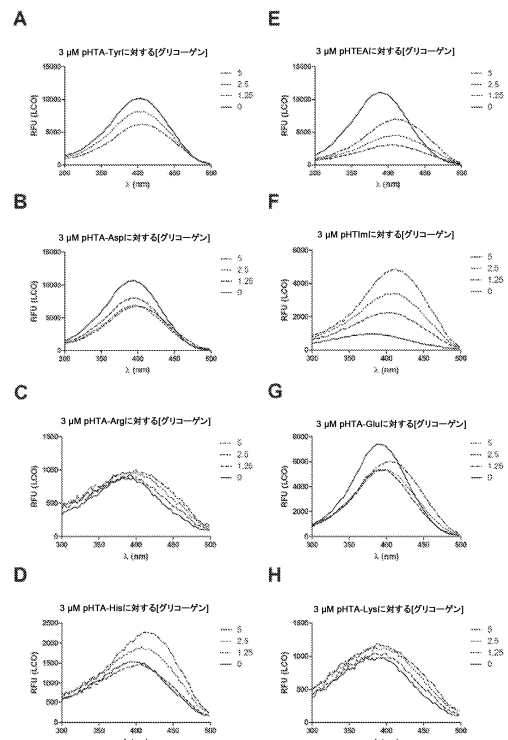


図 18

【図 19】

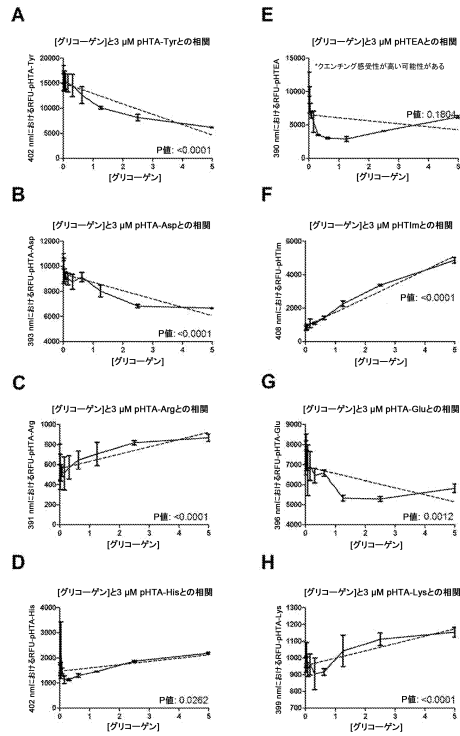


図 19

【図 20】

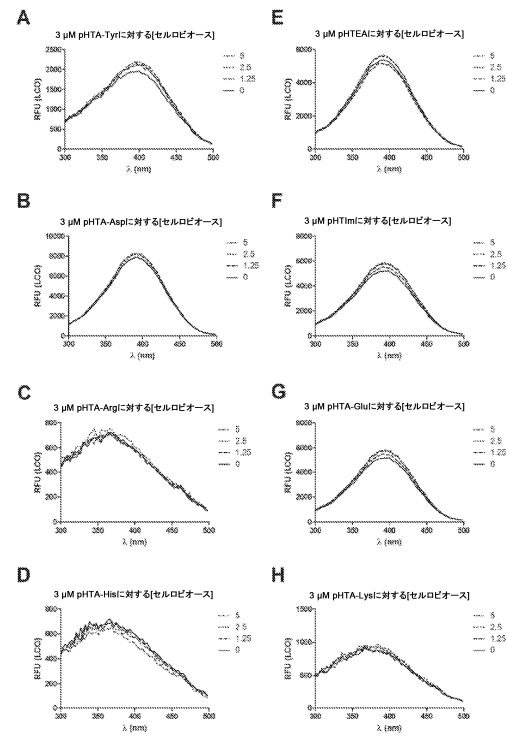


図 20

【図 21】

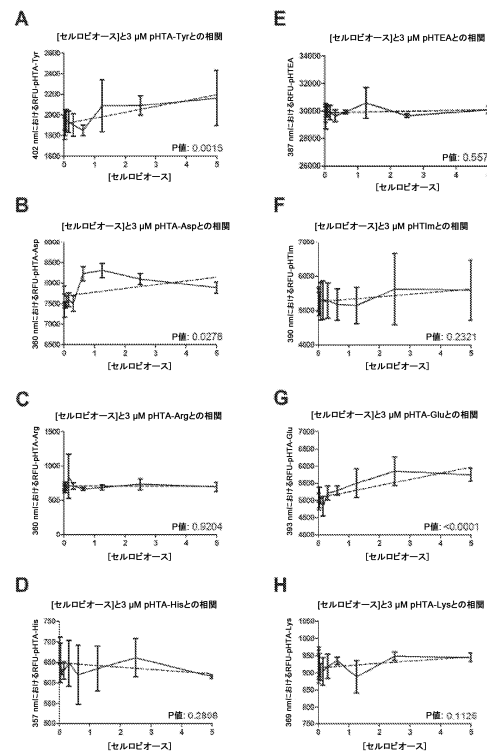


図 21

【図 22】

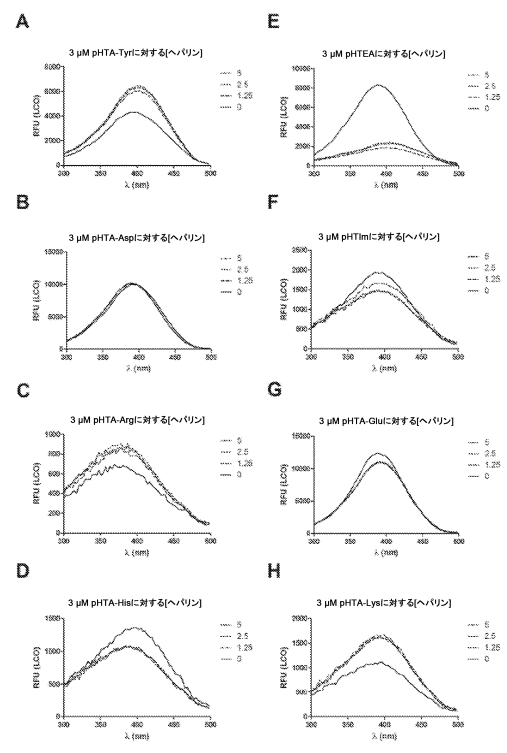


図 22

【図 23】

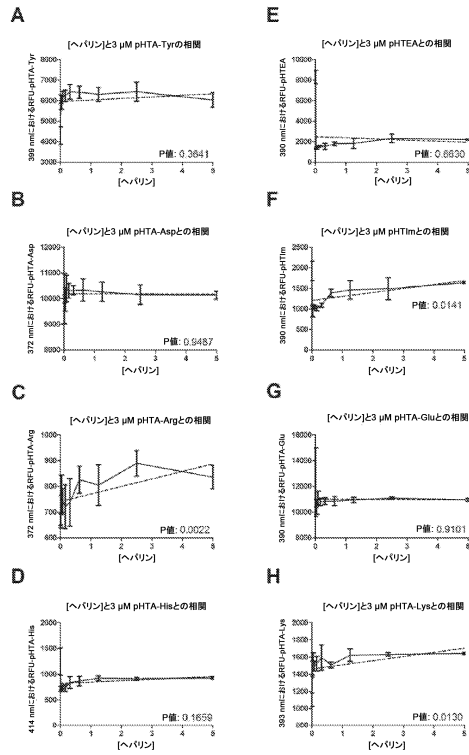


図 23

【図 24】

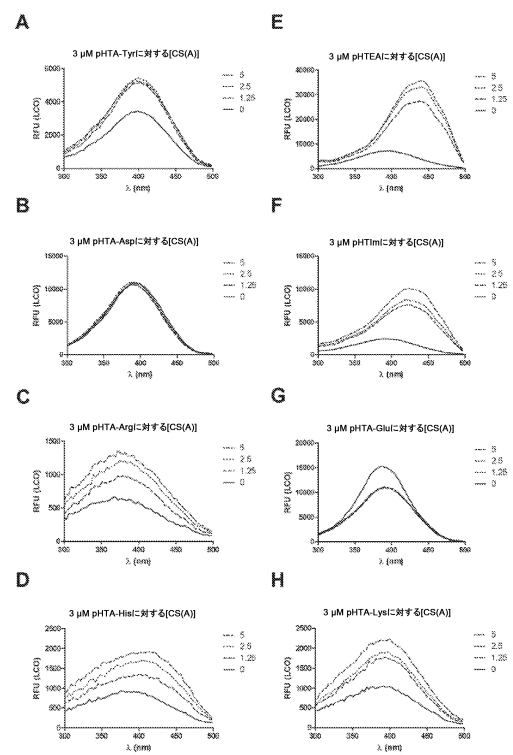


図 24

【図 25】

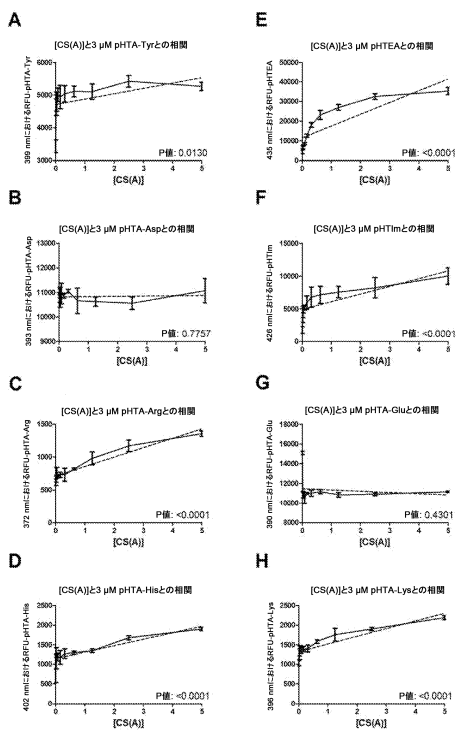


図 25

フロントページの続き

(72)発明者 チュン, シャンケン
スウェーデン王国 エス - 1 2 6 3 1 ヘーゲルステン, カルーセルヴェーゲン 3 3 , 2 テー
アール

審査官 西浦 昌哉

(56)参考文献 国際公開第 2 0 1 1 / 1 0 2 7 8 9 (WO , A 1)
特表 2 0 1 2 - 5 0 5 8 7 9 (JP , A)
KLINGSTEDT, T. et al. , Synthesis of a library of oligothiophenes and their utilization
as fluorescent ligands for spectral assignment of protein aggregates , ORGANIC & BIOMOL
ECULAR CHEMISTRY , 2 0 1 1 年 1 2 月 2 1 日 , Vol.9/No.24 , pp.8356-8370
ASLUND, A. et al. , Novel Pentameric Thiophene Derivatives for in Vitro and in Vivo Opt
ical Imaging of a Plethora of Protein Aggregates in Cerebral Amyloidoses , ACS CHEMICAL
BIOLOGY , 米国 , American Chemical Society , 2 0 0 9 年 8 月 2 1 日 , Vol.4/No.8 , pp.673-
684

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)
G 0 1 N 3 3 / 4 8 - 3 3 / 9 8
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)