

(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 1

GO 1 N 33/53	(2006.01)	GO 1 N 33/53	S
C 12 Q 1/68	(2018.01)	C 12 Q 1/68	
GO 1 N 33/566	(2006.01)	GO 1 N 33/566	
CO 7 D 333/24	(2006.01)	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) 國際出願番号	PCT/SE2013/050810
(87) 國際公開番号	W02014/007730
(87) 國際公開日	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) 優先権主張國	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 ディヴィエ ロップメント アクチエボラグ R i c h t e r L i f e S c i e n c e D e v e l o p m e n t A B スウェーデン王国 エスー132 35 サルトヒエーボー, 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 エスー132 35 サルトヒエーボー, 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ェ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ェンの少なくとも 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。

10

【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ェンが五量体 ~ 十五量体の
発光共役オリゴチオフェ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ェンが五量体または七量体
の発光共役オリゴチオフェ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ェンが 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】

20

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ェンが、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ェンが、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ェンが少なくとも 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、- グルカン、アルギネット、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ェンの使用。

【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ェン (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、構成单糖の正体、单量体ユニットの数、および各单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。

【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、以上的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)。

【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。

【0007】

国際公開第2010/044744 A1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ェ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ェンさらには規定の長さのオリゴ体チオフェンが開示されている。開示されたオリゴチオフェン化合物は、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。

【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ェ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ェ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ェ

10

20

30

40

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。

【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ェンの使用に関する。

【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ェンに接触させるステップと、
- 発光共役オリゴチオフェンの少なくとも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】

発光共役オリゴチオフェン (LCO) は、五量体 ~ 十五量体の発光共役オリゴチオフェンでありうる。好ましくは、発光共役オリゴチオフェンは、五量体または七量体の発光共役オリゴチオフェンである。一実施形態では、発光共役オリゴチオフェンは、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ェンの *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ェンの *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】

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ェンは、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 / または定量を可能にする。

【0017】

発光共役オリゴチオフェンは、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、-グルカン、アルギネット、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。

10

20

30

40

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ェンは、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ェ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。 10

【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ェン(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ェン(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ル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エニック突然変異株(bscA、csgA、およびcsgD)のバイオフィルムプロファイルの検証のためのコンゴーレッドアッセイ、C~D)C)h-FTA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およびアイソジエニック突然変異株のバイオフィル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。 20

【図3】図3は、A~B)S.エンテリティディス(S. enteritidis)3934wtおよびアイソジエニック突然変異株の未処理バイオフィルム培養物(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(—)、csgA(.....)およびcsgD(—)の24時間未処理培養物中のA)h-HTAAおよびB)h-FTA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およびアイソジエ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(—)、csgA(.....)およびcsgD(—)の24時間培養物中のh-FTAの発光スペクトル。 30

【図4】図4は、3μg/mlのh-FTA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。 40

【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ならびにアイソジエニック突然変異株bscA、csgA、およびcsgDの細菌増殖およびバイオフィル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バイオフィルム培養の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-FTAの使用によるC)S.エンテリティディス(S. enteritidis)3934wt、D)csgD、E)csgA、およびF)bscAのバイオフィル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 50

(.) のシグナルが示されている。カーリーは、405 nm の励起波長および 556 の発光波長を用いて検出され、セルロースは、500 nm の励起波長および 600 nm の発光波長を用いて検出される。

【図 6】図 6 は、 -1, 3, - グルカンの純粋不溶性粉末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 μM 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、10 mg / ml (_ .)、5 mg / ml (.)、2.5 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 -1, 3, - グルカン。

【図 7】図 7 は、五量体 LCO の蛍光強度と、アッセイ時に存在する -1, 3, - グルカン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 μM 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) 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 -1, 3, - グルカン。[-1, 3 - グルカン] 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 8】図 8 は、セルロースの純粋不溶性微結晶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 μM 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、10 mg / ml (_ .)、5 mg / ml (.)、2.5 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 に対するセルロース。

【図 9】図 9 は、五量体 LCO の蛍光強度と、アッセイ時に存在するセルロースの純粋不溶性微結晶炭水化物懸濁液の濃度と、の相関分析を示している。3 μM 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) pHTA-Tyr、B) pHTA-Asp、C) pHTA-Arg、D) pHTA-His、E) pHTEA、F) pHTIm、G) pHTA-Glu、および H) pHTA-Lys に対するセルロース。[セルロース] によるシグナルの平均増加 (_) および当てはめ回帰直線 (_ _) が示されている。

【図 10】図 10 は、キチンの純粋不溶性粉末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 μM 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、10 mg / ml (_ .)、5 mg / ml (.)、2.5 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 に対するキチン。

【図 11】図 11 は、五量体 LCO の蛍光強度と、アッセイ時に存在するキチン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 μM 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) pHTA-Tyr、B) pHTA-Asp、C) pHTA-Arg、D) pHTA-His、E) pHTEA、F) pHTIm、G) pHTA-Glu、および H) pHTA-Lys

- Lys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LCOの分光蛍光測定スクリーンを示している。3 μM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) pHTA-Tyr、B) pHTA-Asp、C) pHTA-Arg、D) pHTA-His、E) pHTEA、F) pHTIm、G) pHTA-Glu、およびH) pHTA-Lysに対するナトリウムアルギネート。

【図13】図13は、五量体LCO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 μM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) 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LCOの分光蛍光測定スクリーンを示している。3 μM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に対するグルコース。

【図15】図15は、五量体LCO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 μM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。

【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LCOの分光蛍光測定スクリーンを示している。3 μM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に対するアミロース。

【図17】図17は、五量体LCO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 μM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

10

20

30

40

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。3μM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、5mg/ml(____)、2.5mg/ml(____)、1.25mg/ml(____)、および0mg/ml(____)である。発光を545nmで読み取ったときの300~500nm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。3μM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545nm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。3μM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、5mg/ml(____)、2.5mg/ml(____)、1.25mg/ml(____)、および0mg/ml(____)である。発光を545nmで読み取ったときの300~500nm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。3μM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545nm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。3μM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、5mg/ml(____)、2.5mg/ml(____)、1.25mg/ml(____)、および0mg/ml(____)である。発光を545nmで読み取ったときの300~500nm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。3μM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545nm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

10

20

30

40

50

五量体 LCO の分光蛍光測定スクリーンを示している。3 μM 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) pH TA - Tyr、B) pH TA - Asp、C) pH TA - Arg、D) pH TA - His、E) pH TEA、F) pH TIm、G) pH TA - Glu、および H) pH TA - Lys に対する CS (A)。

【図 25】図 25 は、五量体 LCO の蛍光強度と、アッセイ時に存在する CS (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 μM 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) pH TA - Tyr、B) pH TA - Asp、C) pH TA - Arg、D) pH TA - His、E) pH TEA、F) pH TIm、G) pH TA - Glu、および H) pH TA - Lys に対する CS (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 (LCO) に関する。

【0024】

特定の LCO 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。LCO が標的炭水化物に暴露されてそれと相互作用した場合、LCO 分子は、特異な幾何学的变化を受け、その变化は、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。幾何学的变化は、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 (max) のシフトをもたらしうる。一選択肢では、幾何学的变化は、LCO 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しうる。

【0025】

各結合標的により生成される LCO 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 LCO 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 LCO 検出シグナルの分析は、主に、分光蛍光測定読み取りで構成され、これに関しては、ピーク発光の励起波長 (max) さらには放出蛍光の強度がとくに興味深い。標的結合 LCO 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 LCO 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 LCO 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 LCO 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ビオース)、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】

10

20

30

40

50

発光共役オリゴチオフェン

共役オリゴチオフェンは、硫黄ヘテロ環チオフェ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。共役オリゴチオフェンは、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变化をもたらしうる。したがって、オリゴチオフェンは、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】

10

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ェンで構成される。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ェン、すなわち、5 ~ 15 個の単量体チオフェンからなる多量体チオフェンからなる。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】

20

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】

30

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ェ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ェ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 (ペント水素チオフェンエタノールアミン)、pHTIm (ペント水素チオフェンイミダゾール)、pHTA-Lys (ペント水素チオフェン酢酸リシン)、pHTA-Tyr (ペント水素チオフェン酢酸チロシン)、pHTA-Arg (ペント水素チオフェン酢酸アルギニン)、pHTA-Asp (ペント水素チオフェン酢酸アスパラギン酸)、pHTA-His (ペント水素チオフェン酢酸ヒスチジン)、および pHTA-Glu (ペント水素チオフェ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、h-HTAA (ヘプタ水素チオフェン酢酸) および hFTA (ヘプタギ酸チオフェン酢酸) が挙げられる。

【0032】

40

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】

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

【 0 0 3 5 】

選択された側基をコア LCO に追加して、特定の標的に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。

【 0 0 3 6 】

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 の幾何学的变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、電子読み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うる。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うる。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うる。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

【 0 0 3 7 】

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

【 0 0 3 8 】

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

【 0 0 3 9 】

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ェンに接触させるステップと、
 - 発光共役オリゴチオフェンの少なくとも 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。

10

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。

【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に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の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

【0042】

炭水化物は、純粹形態もしくは比較的純粹形態で、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。

30

【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、-1,3-D-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、セルロビオース

40

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ェン(LCO)は、チオフェンのホモオリゴ体を含む本明細書に定義される任意のLCOである。共役オリゴチオフェンは、五量体～十五量体の共役オリゴチオフェン、好ましくは五量体～七量体の共役オリゴチオフェンでありうる。LCO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ェンの例としては、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ェ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。

【0045】

炭水化物へのLCOの結合は、LCO骨格のコンフォメーション変化をもたらし、結果的にLCO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、LCO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LCOおよび/もしくは決定される炭水化物に依存する所定の单一の励起・発光セットを介して、検出されうる。

【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单一の励起および発光を用いて、炭水化物へのLCOの検出感度を実証する。典型的には、励起波長は、300～500nmの範囲内にあり、発光波長は、500～700nm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、関連する单一の励起・発光セットの選択に供給される。各結合炭水化物は、LCO骨格の異なる捩れを誘起して、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。

【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、LCO-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、LCOのコンフォメーション変化つまりLCO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(FRET、蛍光クエンチング、吸収、測色、屈折率)、材料の性質(量、粘弹性、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。

【0049】

実験室環境では、LCO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

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变化が誘起される。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。

【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变化に依存し、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しうる。

【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。

【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

10

20

30

40

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。

【0056】

既知の炭水化物（陽性対照）のスペクトルシグナル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か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 LCO を使用することも可能である。

【0057】

他の選択肢として、同定される炭水化物の検出は、LCO 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 LCO - 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 LCO 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。

【0058】

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、LCO 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ーとして有用である。炭水化物の検出、同定、および定量における LCO 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。

10

20

【0059】

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。GMP 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 LCO 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。LCO 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ーとして使用されうる。

30

【0060】

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、LCO 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。

40

【0061】

既製食品およびパッケージ食品では、LCO 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ー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。

【0062】

本明細書に開示される LCO 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

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、-1,3-グルカン、キチン、およびアルギメントである。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-F TAA 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. 伝統的コンゴー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產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、コンゴーレッド (40 µg / mL) およびクーマシーブリリアントブルー G - 250 (20 µg / mL) が追加された LB 寒天プレート（塩を用いない）上で、S. エンテリティディス (S. enteritidis) wt 株 3934 ならびに

10

20

30

40

50

アイソジエニック突然変異株 *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】

I I . バイオフィルムおよびバイオフィルムモルフォロジーの蛍光分析のための L C O 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 2 A に示される構成による)、バイオフィル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り出しが可能であった。バイオフィルム実験の準備をするために、*S. enteritidis* wt 株 3934 ならびにアイソジエニック突然変異株 *b s c A*、*c s g A*、および *c s g D* の個別の培養物をプラスコ内の L B 培地中で一晩増殖させた。各培養物を新しい L B 中に 100 倍希釈し、OD₆₀₀ = 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 L B 中に培養物を 10⁵ CFU / mL の培養密度に希釈し、8 mL 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、4 mL 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 µg / mL)、h - H T A A (2 µg / 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ル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 2 C ~ D では、各スライドは、励起されたときにバイオフィルム結合 L C O 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、L C O 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ル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、コンゴーレッドアッセイで予想された形態型を示した (図 2 B)。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ルム成形能に関連付けられ、この関係は、これまでに他のものにより報告してきた。

【0071】

L C O 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 2 C ~ D、図 2 C は h - F T A A に対する結果、図 2 D は h - H T A A に対する結果を示している)。L C O (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 (wt および *b s c A*)、形成されたバイオフィルムは大きく、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ル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ルムを生成しなかった。

【0072】

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

【0073】

結論 :

L C O プローブは、バイオフィルムに結合し、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ル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、バイオフィル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：

各バイオフィルムで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ル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ウェルプレート中のバイオフィルム増殖

臨床由来S.エンテリティディス(S. enteritidis)wt株3934ならびにアイソジエニック突然変異株(bscA, csgA、およびcsgD)の新しい一晩培養物を新しい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10⁵CFU/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(2μg/ml)およびh-HTAA(2μg/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、50μl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】

I I . 分光分析

インキュベーターからバイオフィル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。300~500nm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。サンプルを405nmで励起したとき、500~700nm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500nmで励起したとき、520~700nm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、異なるアイソジエニック突然変異株により形成されたバイオフィル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、すべてのアイソジエ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380nm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380nmで励起したとき(csgA csgD)、その代わりに約355nm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480nm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、360nm~425nmで励起したとき、より強い発光を有していた。425nm未満でバイオフィルム結合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、480 nm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405 nmおよびセルロースに対して500 nm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株およびアイソジエニック株の発光スペクトルを分析した。

【0081】

405 nmで励起したとき(図3C)、カーリー陽性株(wtおよびb s c A)中のh-F T A Aは、カーリー陰性c s g Aおよびc s g Dに対して約556 nmでより強い発光シグナル強度を有していた。wt、b s c A、およびc s g Aとc s g Dとの比較から、バイオフィルムが発現されたとき、525 nmから550～560 nm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】

500 nm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600 nmに発光の2つの顕著なピークを有する。600 nmの特異な発光ピークは、セルロース陰性バイオフィル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：

L C O h-F T A Aは、各バイオフィル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、E C M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ルムを識別する。本方法は、生の培養物からのバイオフィルムの物理的分離を必要としない。L C O 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ル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ル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

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L C O 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。
30

【0085】

研究設計：

6.25 mg / 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3 μMの濃度になるように添加した。100 μlアリコートを96ウェルプレート内に分配した。Synergy M x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、L C O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、6.25 mg / ml、3.125 mg / ml、1.5625 mg / ml、および0.78125 mg / mlである。
40

【0086】

結果：

純粋セルロースの存在下で、約480 nmでh-F T A Aを励起すると、545 nm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L C O 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。G F P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g f p遺伝子を有するプラスミドP 2 7 7 7を用いて、S.エンテリティディス(S. enteritidis)3 9 3 4 w tならびにアイソジエニック突然変異株b s c A、c s g A、およびc s g Dをトランスフォームした。各株の新しい一晩培養物を新しい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10⁵CFU/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P B S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、G F P発現さらにはカーリー結合h-F T A Aシグナル(励起405nm、発光556nm)およびセルロース結合h-F T A Aシグナル(励起500nm、発光600nm)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G F Pおよびh-F T A AのR F U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。

10

【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G F Pシグナルの増加傾向の比較は、密接な相関を示した(図5A)。G F P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、G F P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。

20

【0091】

G F P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関係が示される(図5C~F)。S.エンテリティディス(S. enteritidis)wt株3 9 3 4(図5C)では、G F P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、指數関数的に増加し(対数増殖期)、その後、15時間でプラトーに達する(定常期)。これに連連して、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產生は、同時であることが、データから示唆される。

30

【0092】

検出されたh-F T A Aシグナルは、G F Pからの有意なブリードスルーホルムを含有していない。平行アッセイでc s g D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、G F P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、G F P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。

40

【0093】

c s g A(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

50

われ、より速い速度で 18 時間でプラトートに達する。また、同一のバイオフィルム増殖期では、プラトートの R F U 強度は w t 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。

【 0 0 9 4 】

b s c A (図 5 F) の分析は、セルロース発現の不在下でカーリー発現が図 6 C 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。カーリー產生は、全体を通じて漸増するように思われる。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

【 0 0 9 5 】

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

【 0 0 9 6 】

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ンネルは、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

【 0 0 9 7 】

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、セルロビオース) 、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

【 0 0 9 8 】

研究目標 :

最大発光の励起波長 (m a x) 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、セルロビオース、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。

【 0 0 9 9 】

研究設計 :

炭水化物懸濁液の段階希釈液を d H 2 O 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、1 0 ~ 0 . 0 3 9 m g / m l 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、セルロビオース、ヘパリン、コンドロイチン硫酸 A に対しては、5 ~ 0 . 0 1 9 m g / m l を使用した。3 μ M の各 L C O プローブを各濃度の炭水化物の 1 m l アリコートに添加し、その後、1 0 0 μ l を 9 6 ウエルプレート中にトリプリケート方式で分配した。3 0 0 ~ 5 0 0 n m でサンプルを励起して 5 4 5 n m 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 m a x および / または R F U 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。

40

50

【0100】

炭水化物結合 LCO 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 LCO に対して選択される励起波長 (545 nm で発光を検出) は、(1) max 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 RFU との関係を決定する。

【0101】

結果は、図 6 ~ 25 に示され、以下の表 1 ~ 10 にまとめられている。

表1:β-1,3-グルカノン (10 - 0.039 mg/ml)
分光分析(励起 300-500, 発光 545)

プローブ	図	RFU変化	λmax変化	λmax-結合 (nm)	相関分析				感受性
					励起λ (nm)	RFU変化	スルから の偏位(P-値)	回帰直線の傾き	
pHTA-Ty	6.A	減少	400	7.A	402	減少	0.2754 ± 47.5	水平	なし
pHTA-Ap	6.B	減少	393	7.B	393	減少	-0.0001 ± 97.3	負	あり
pHTA-Ag	6.C	増加	380	7.C	390	増加	-0.0001 ± 16.69	正	あり
pHTA-His	6.D	不明確	399	7.D	389	不明確	0.0373 ± 34	水平	なし
pHTA-EA	6.E	減少	397	7.E	405	減少	0.0059 ± 205.2	負	あり
pHTAm	6.F	減少	402	7.F	402	減少	-0.0251 ± 17.7	負	なし
pHTA-Glu	6.G	減少	393	7.G	393	減少	-0.0001 ± 89.6	水平	あり
pHTA-Lys	6.H	減少	399	7.H	399	増加	-0.0001 ± 11.0	負	あり

表2:セルロース (10 - 0.039 mg/ml)
分光分析(励起 300-500, 発光 545)

プローブ	図	RFU変化	λmax変化	λmax-結合 (nm)	相関分析				感受性
					励起λ (nm)	RFU変化	スルから の偏位(P-値)	回帰直線の傾き	
pHTA-Ty	8.A	不明確	399	9.A	399	不明確	0.2662 ± 45.0	水平	なし
pHTA-Ap	8.B	不明確	390	9.B	399	不明確	-0.0503 ± 64.4	水平	なし
pHTA-Ag	8.C	増加	386	9.C	447	増加	-0.0001 ± 29.9	正	あり
pHTA-His	8.D	増加	399	9.D	444	増加	-0.0001 ± 124.6	正	あり
pHTA-EA	8.E	増加	386	9.E	444	増加	-0.0001 ± 187	正	あり
pHTAm	8.F	増加	390	9.F	444	増加	-0.0001 ± 187	正	あり
pHTA-Glu	8.G	不明確	396	9.G	396	減少	0.0563 ± 564.3	水平	なし
pHTA-Lys	8.H	増加	398	9.H	396	増加	-0.0893 ± 13.6	水平	あり

表3:キチン (10 - 0.039 mg/ml)
分光分析(励起 300-500, 発光 545)

プローブ	図	RFU変化	λmax変化	λmax-結合 (nm)	相関分析				感受性
					励起λ (nm)	RFU変化	スルから の偏位(P-値)	回帰直線の傾き	
pHTA-Ty	10.A	増加	404	11.A	441	増加	<0.0001 ± 109.7	正	あり
pHTA-Ap	10.B	増加	392	11.B	441	増加	-0.0001 ± 491.2	正	あり
pHTA-Ag	10.C	増加	387	11.C	447	増加	-0.0001 ± 94	正	あり
pHTA-His	10.D	増加	399	11.D	442	増加	0.0002 ± 17.2	正	あり
pHTA-EA	10.E	減少	387	11.E	396	減少	-0.0001 ± 25.7	正	あり
pHTAm	10.F	減少	390	11.F	389	減少	-0.0001 ± 10.1	負	あり
pHTA-Glu	10.G	増加	396	11.G	435	増加	-0.0001 ± 156.6	正	あり
pHTA-Lys	10.H	増加	397	11.H	435	増加	-0.0001 ± 46.2	正	あり

表4:ナトリウムアルギネット (5 - 0.019 mg/ml)

プローブ	図	分光分析(屈屈300-500, 奥光545)		相関分析					
		RFU変化	Amax-未結合 (nm)	屈屈λ (nm)	RFU変化	スルかららの 偏位(P値)	傾きパラメータ	傾きの品質	直線関係
淡水化合物の増加に伴うシグナル偏位									
pHTA-Ty	2 A	増加	変化なし	402	402	不明確	0.8611	30.9 ± 175.5	水平
pHTA-Asp	2 B	不明確	変化なし	390	390	不明確	0.4928	414 ± 59.6	水平
pHTA-Ag	2 C	増加	変化なし	375	375	不明確	<0.0002	18.6 ± 16.6	正
pHTA-His	2 D	増加	変化なし	396	396	不明確	<0.0001	199.9 ± 36.3	正
pHTA-TEA	2 E	増加	レッドシフト	396	405	增加	<0.0001	822.4 ± 174.5	正
pHTA-Tim	2 F	増加	レッドシフト	399	409	增加	<0.0001	266 ± 29.2	正
pHTA-Glu	2 G	増加	変化なし	391	391	不明確	0.636	88.7 ± 62.0	水平
pHTA-Lys	2 H	増加	変化なし	390	396	增加	<0.0001	554 ± 53	正

表5:グルコース (5 - 0.019 mg/ml)

プローブ	図	分光分析(屈屈300-500, 奥光545)		相関分析					
		RFU変化	Amax-未結合 (nm)	屈屈λ (nm)	RFU変化	スルかららの 偏位(P値)	傾きパラメータ	傾きの品質	直線関係
淡水化合物の増加に伴うシグナル偏位									
pHTA-Ty	14 A	増加	変化なし	402	402	增加	<0.0001	789.4 ± 95.1	正
pHTA-Asp	14 B	増加	変化なし	390	390	不明確	<0.0001	625.1 ± 30.2	正
pHTA-Ag	14 C	増加	変化なし	387	387	不明確	0.6448	7.9 ± 38.1	水平
pHTA-His	14 D	増加	変化なし	399	399	不明確	0.88	3.2 ± 25.2	水平
pHTA-TEA	14 E	増加	変化なし	387	387	不明確	0.0807	67.4 ± 37.2	水平
pHTA-Tim	14 F	不明確	変化なし	390	390	不明確	0.6705	0.9 ± 25.5	水平
pHTA-Glu	14 G	減少	変化なし	390	396	減少	0.0807	410 ± 14.0	正
pHTA-Lys	14 H	不明確	変化なし	399	396	不明確	0.0957	23.6 ± 13.7	水平

表6:アミロース (5 - 0.019 mg/ml)

プローブ	図	分光分析(屈屈300-500, 奥光545)		相関分析					
		RFU変化	Amax-未結合 (nm)	屈屈λ (nm)	RFU変化	スルかららの 偏位(P値)	傾きパラメータ	傾きの品質	直線関係
淡水化合物の増加に伴うシグナル偏位									
pHTA-Ty	6 A	不明確	変化なし	402	402	不明確	0.3091	133.1 ± 228.5	水平
pHTA-Asp	6 B	増加	変化なし	390	390	增加	0.9659	7.6 ± 205.9	水平
pHTA-Ag	6 C	不明確	変化なし	386	386	不明確	0.1897	28.4 ± 216	水平
pHTA-His	6 D	減少	ブルーシフト	401	385	減少	<0.0001	341.5 ± 47.3	正
pHTA-TEA	6 E	減少	ブルーシフト	388	388	減少	<0.0001	686.0 ± 141	正
pHTA-Tim	6 F	減少	ブルーシフト	392	392	減少	<0.0001	165.5 ± 10	正
pHTA-Glu	6 G	増加	ブルーシフト	395	393	增加	0.3659	493.6 ± 346.9	水平
pHTA-Lys	6 H	増加	変化なし	395	396	增加	0.0768	47.7 ± 18.5	正

表7:グリコーデン (5 - 0.019 mg/ml)

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				
プローブ	図	RFU変化	Δmax 変化	Δmax - 未結合 (nm)	図	励起 (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	感受性
pHTA-Tyr	8-A	減少	レッドシフト	401	405	9-A	402	<0.0001	-2062 ± 216	負	有意	あり
pHTA-Asp	8-B	減少	レッドシフト	391	400	9-B	393	<0.0001	-6058 ± 85	負	有意	あり
pHTA-Arg	8-C	増加	レッドシフト	376	371	9-C	391	<0.0001	-75.8 ± 13.4	正	有意	あり
pHTA-His	8-D	増加	レッドシフト	393	414	9-D	402	0.0282	10.6 ± 0.6	正	有意	あり
pHTEA	8-E	減少	レッドシフト	389	411	9-E	390	0.1604	-451 ± 328	負	非有意	あり
pHTAm	8-F	増加	レッドシフト	389	411	9-F	408	<0.0001	-59.8 ± 20.6	正	有意	あり
pHTA-Glu	8-G	減少	レッドシフト	390	403	9-G	396	0.0012	-349.2 ± 96.7	負	有意	あり
pHTA-Lys	8-H	増加	ブルーブラント	390	384	9-H	399	<0.0001	-43.6 ± 7.9	正	有意	あり

表8:セルロビオース (5 - 0.019 mg/ml)

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				
プローブ	図	RFU変化	Δmax 変化	Δmax - 未結合 (nm)	図	励起 (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	感受性
pHTA-Tyr	20-A	増加	変化なし	402	402	21-A	402	增加	0.0015	56.7 ± 16	正	有意
pHTA-Asp	20-B	増加	変化なし	402	402	21-B	402	增加	0.0278	912 ± 39.3	正	有意
pHTA-Arg	20-C	不明確	変化なし	360	371	21-C	360	不明確	0.9204	-130 ± 12.9	水平	あり
pHTA-His	20-D	不明確	変化なし	357	357	21-D	357	不明確	0.2898	5.26 ± 4.87	水平	あり
pHTEA	20-E	不明確	変化なし	387	387	21-E	387	不明確	0.5571	39.5 ± 66.5	水平	あり
pHTAm	20-F	増加	変化なし	390	390	21-F	390	不明確	<0.0001	75.1 ± 35.1	水平	あり
pHTA-Glu	20-G	増加	変化なし	393	393	21-G	393	增加	0.786	0.786 ± 3.51	水平	あり
pHTA-Lys	20-H	不明確	変化なし	369	369	21-H	369	不明確	0.125	6.45 ± 3.93	水平	あり

表9:ヘパリン (5 - 0.019 mg/ml)

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				
プローブ	図	RFU変化	Δmax 変化	Δmax - 未結合 (nm)	図	励起 (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	感受性
pHTA-Tyr	22-A	増加	変化なし	399	399	23-A	399	增加	0.3841	74.5 ± 80.7	水平	あり
pHTA-Asp	22-B	不明確	変化なし	390	390	23-B	372	不明確	0.9487	-3.2 ± 49.3	水平	あり
pHTA-Arg	22-C	増加	変化なし	374	374	23-C	372	增加	0.0022	29.3 ± 8.6	正	有意
pHTA-His	22-D	減少	変化なし	444	444	23-D	414	不明確	0.1659	26.3 ± 18.5	水平	あり
pHTEA	22-E	減少	レッドシフト	395	403	23-E	390	不明確	0.063	-0.9 ± 24.8	水平	あり
pHTAm	22-F	不明確	変化なし	392	392	23-F	390	增加	0.0141	96.3 ± 36.8	正	有意
pHTA-Glu	22-G	不明確	変化なし	390	390	23-G	390	不明確	0.9101	-24.4 ± 10.8	水平	あり
pHTA-Lys	22-H	増加	変化なし	393	393	23-H	393	增加	0.03	43.4 ± 18.2	正	有意

プローブ	図	RFU変化	λ_{max} 変化	λ_{max} -結合 (nm)	λ_{max} -未結合 (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		直線関係	感受性
										回帰直線の傾き	回帰直線の傾き		
[炭水化物]の増加に伴うシグナル偏位													
PHTA-Tyr	24_A	増加	変化なし	399	399	25_A	399	増加	0.013	163.3	± 61.5	正	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	なし
PHTA-Arg	24_C	増加	変化なし	372	372	25_C	372	増加	<0.0001	143.4	± 0.01	正	あり
PHTA-His	24_D	増加	ブルーシフト	402	390	25_D	402	増加	<0.0001	163.8	± 20.77	正	あり
PHTEA	24_E	増加	レッドシフト	408	438	25_E	435	増加	<0.0001	5989	± 727	正	あり
PHTIm	24_F	増加	レッドシフト	408	424	25_F	426	増加	<0.0001	1777	± 203.6	正	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	なし
PHTA-Lys	24_H	減少	変化なし	395	395	25_H	396	増加	<0.0001	194.8	± 13.2	正	あり

【 0 1 0 2 】

結論 :

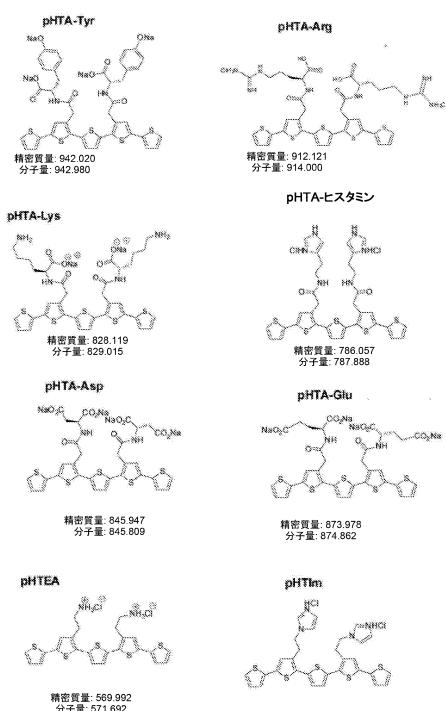
炭水化物への LCO の結合時の検出シグナル強度の変化 (正もしくは負) および / または λ_{max} のシフトに基づいて、以下に示されるように、炭水化物を特異的 LCO により検出および / または識別することが可能であるという結論が導かれる。

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1A】



【図1B】

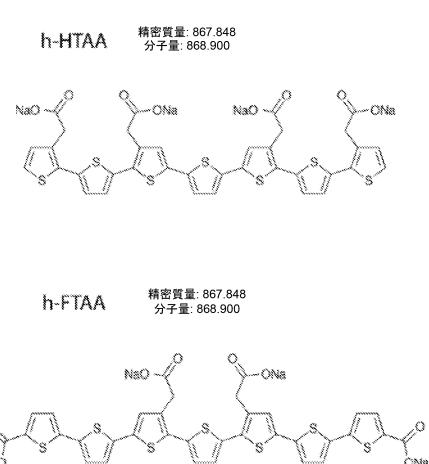


図1B

図1A

【図2】

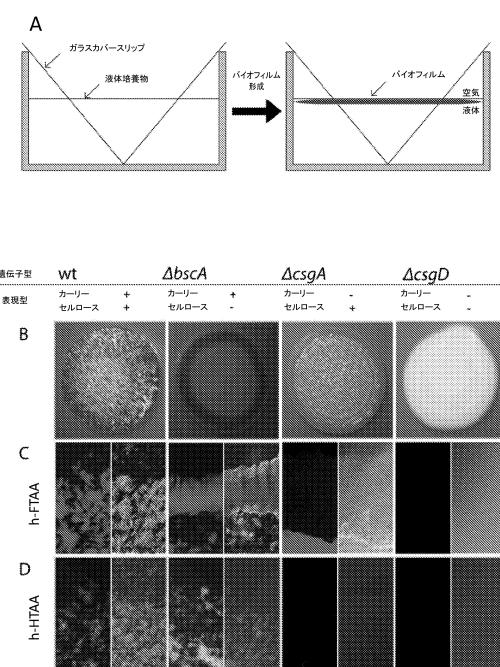


図2

【図3-1】

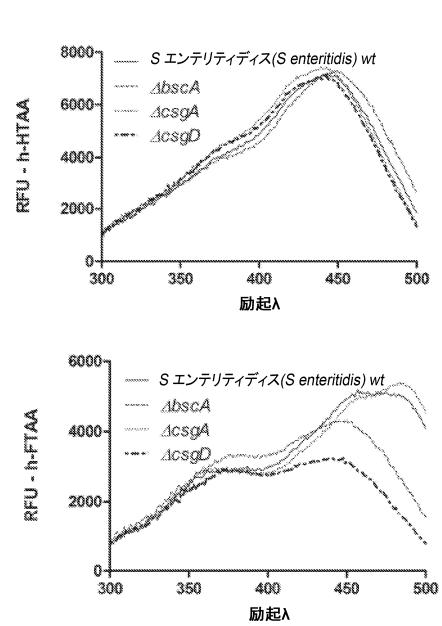
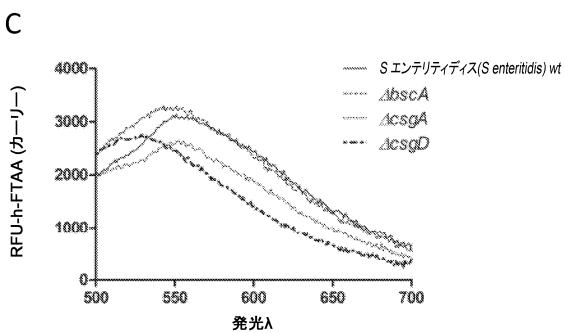


図3

【図3-2】



【図4】

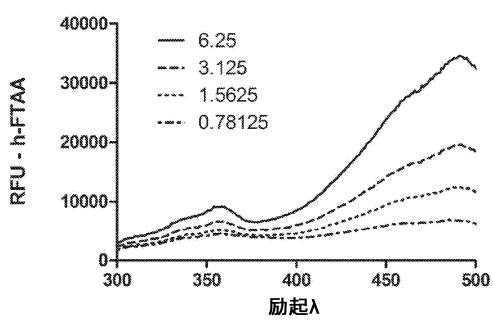


図4

図3 続き

【図5-1】

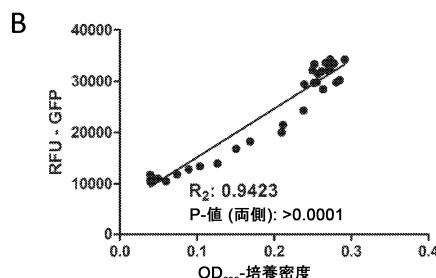
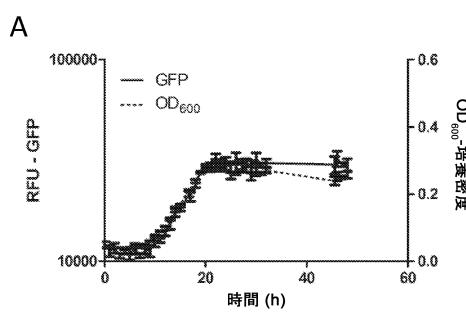


図5

【図5-2】

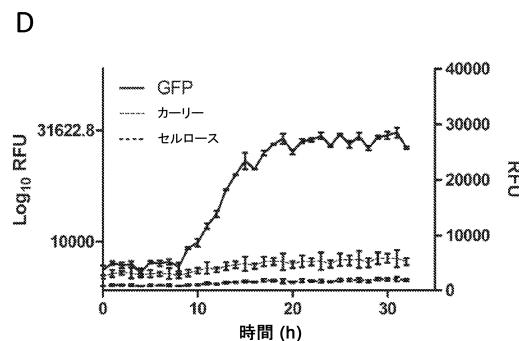
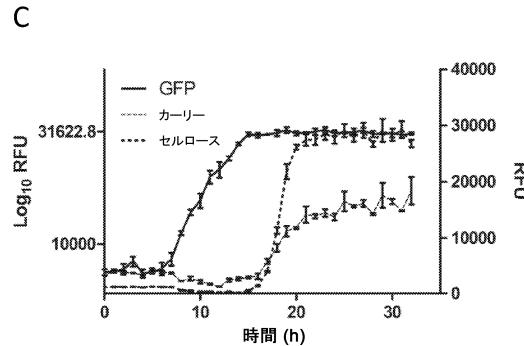


図5 続き

【図5-3】

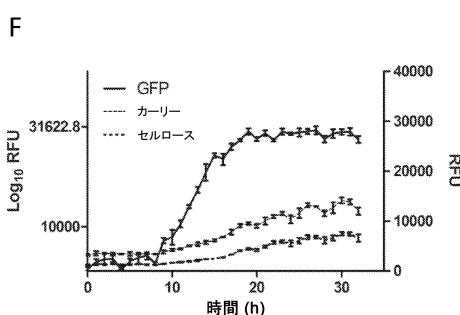
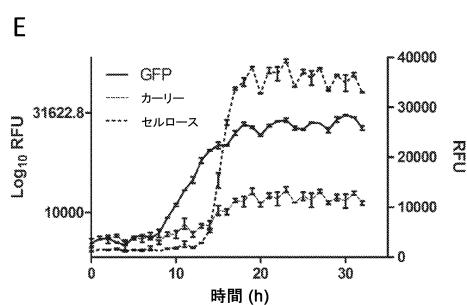


図5 続き

【図6】

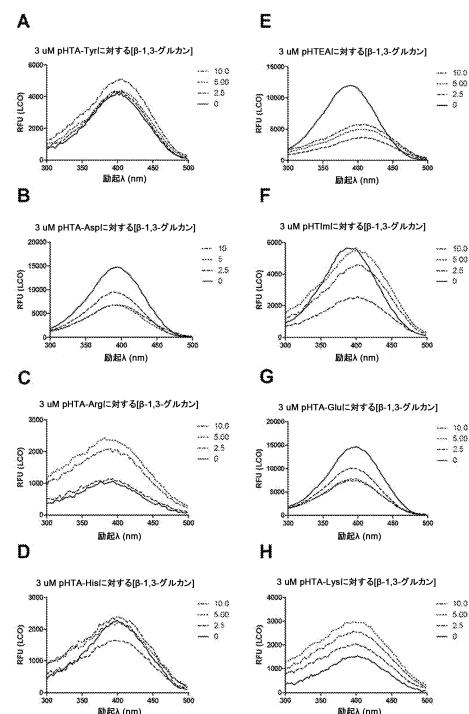


図6

【図7】

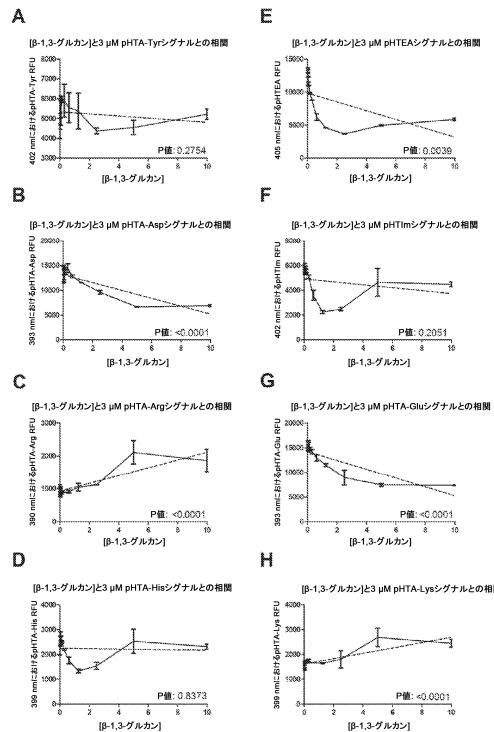


図7

【図8】

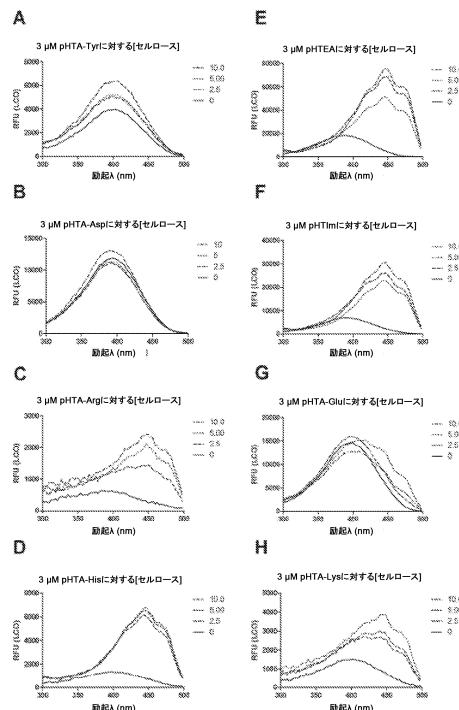


図8

【図9】

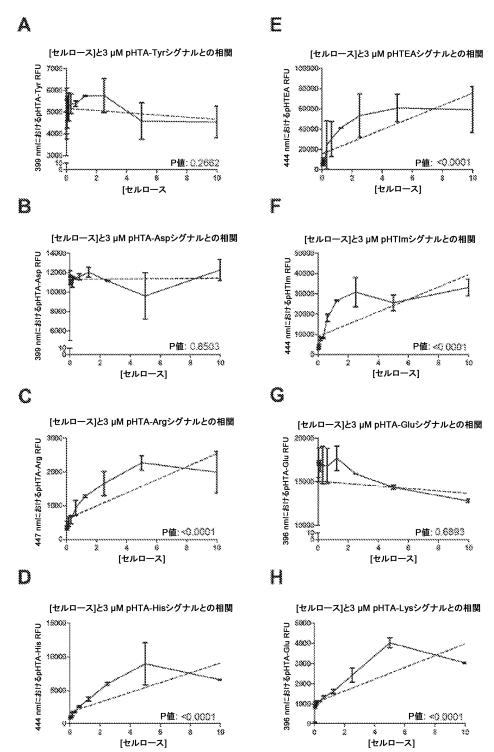


図9

【図10】

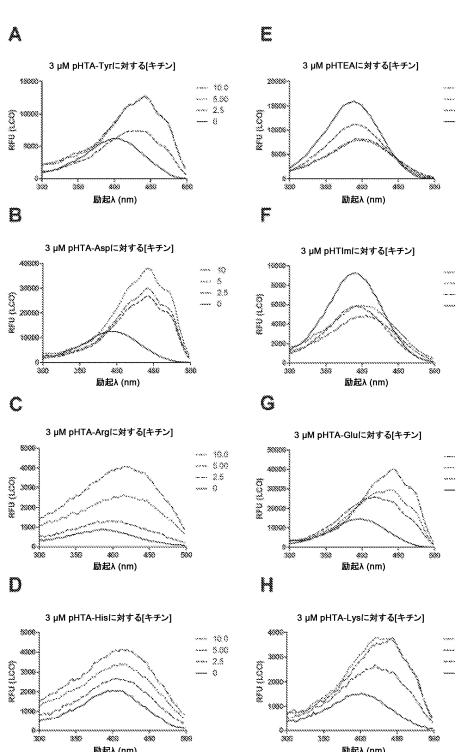


図10

【図11】

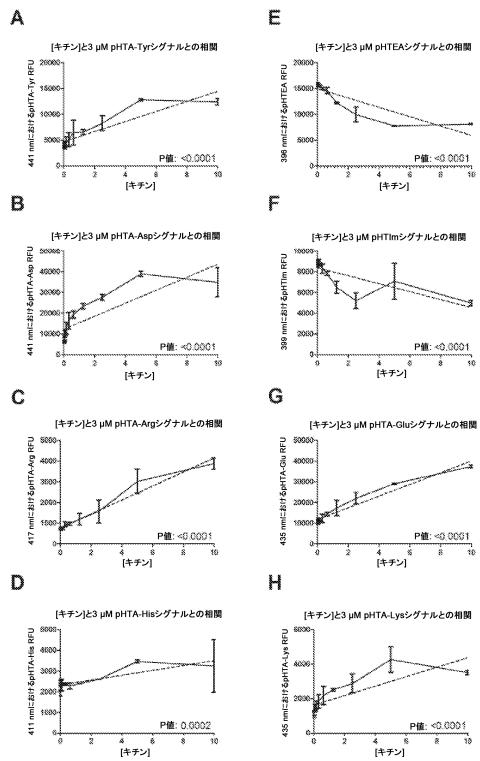


図11

【図12】

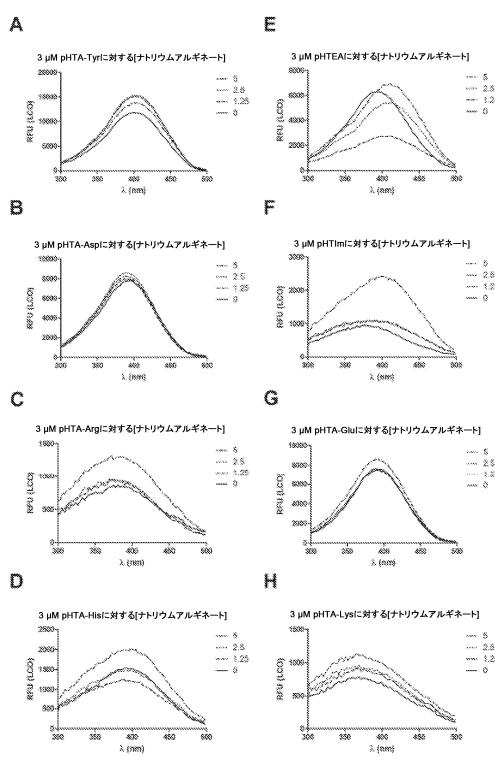


図12

【図13】

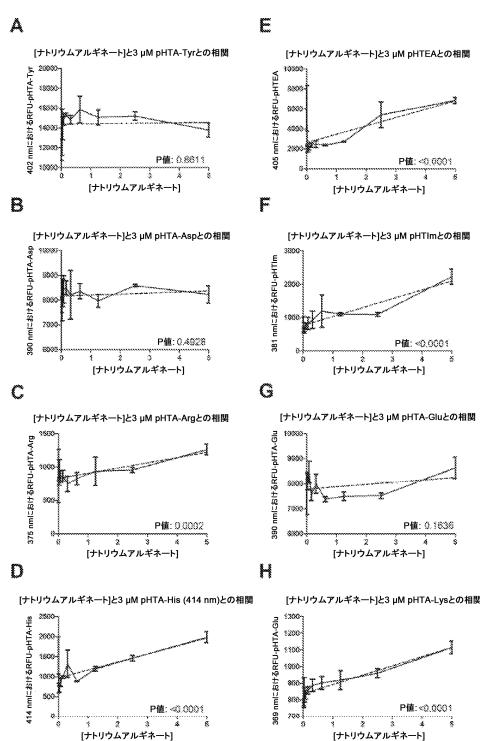


図13

【図14】

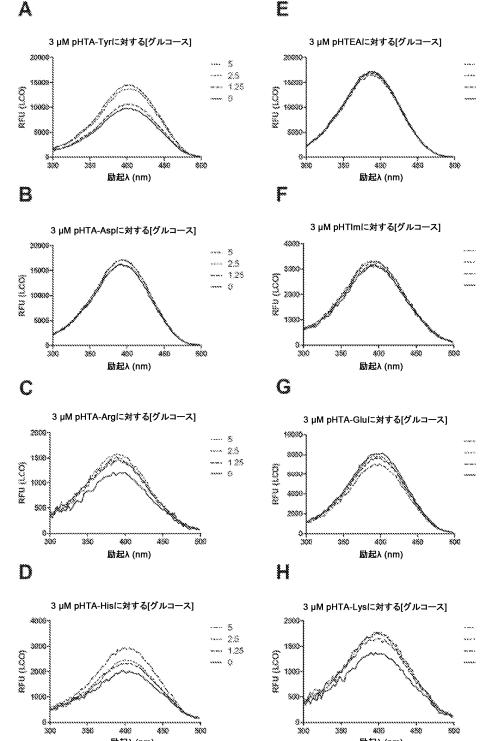


図14

【図15】

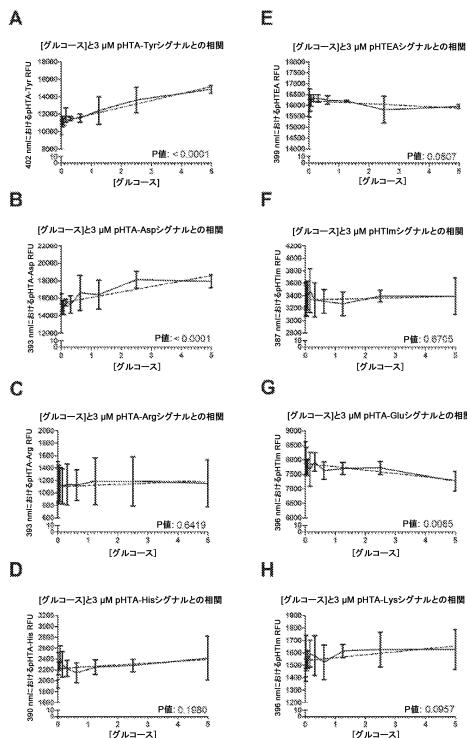


図15

【図16】

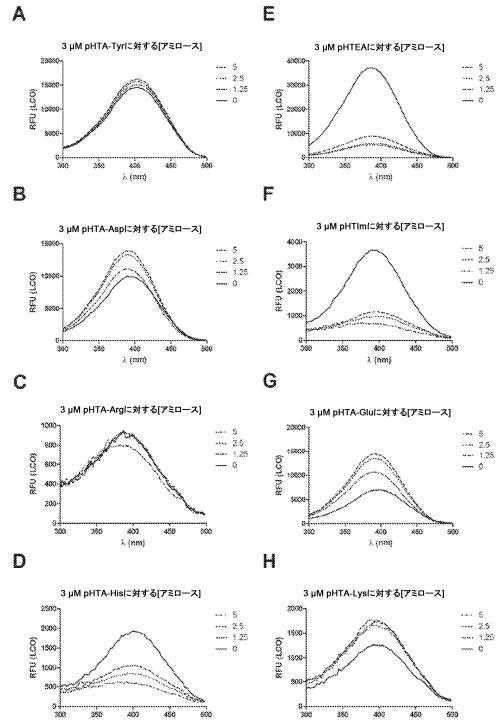


図16

【図17】

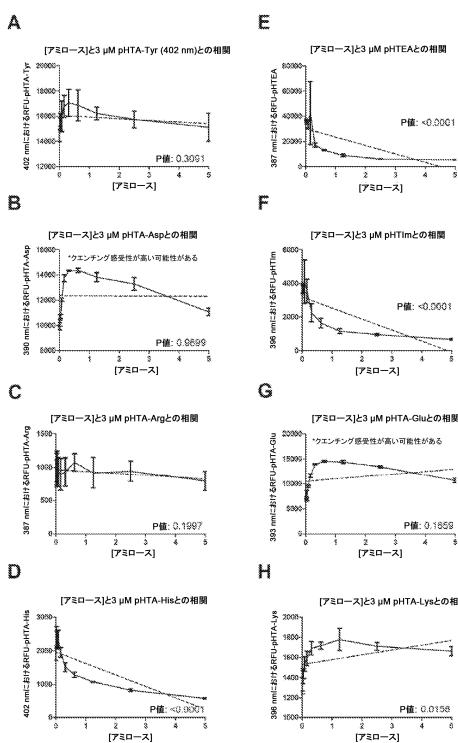


図17

【図18】

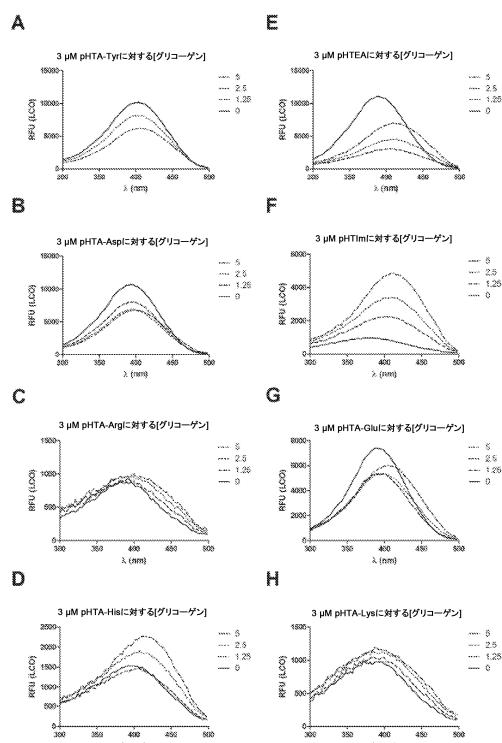


図18

【図19】

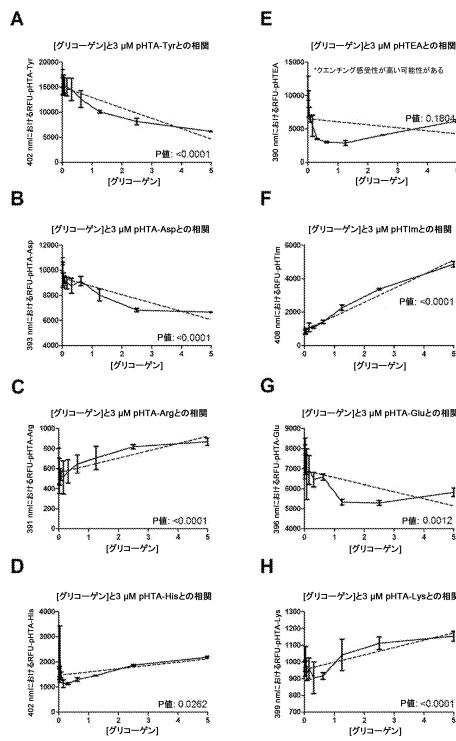


図19

【図20】

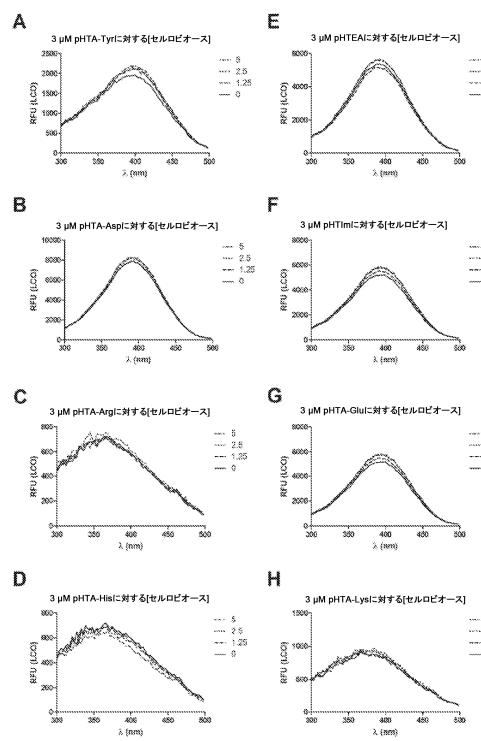


図20

【図21】

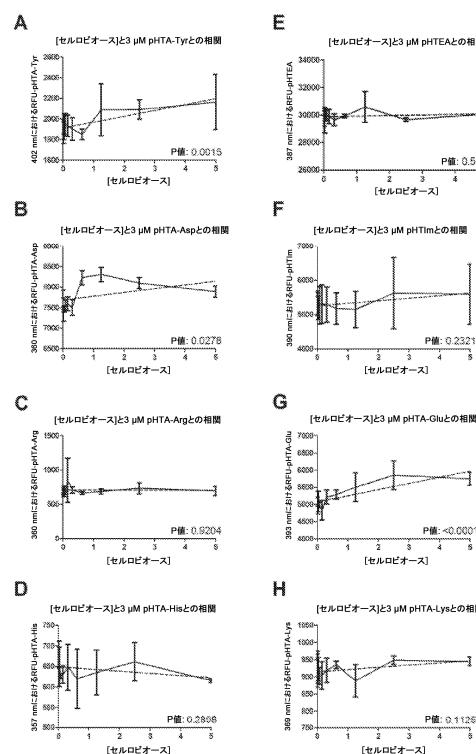


図21

【図22】

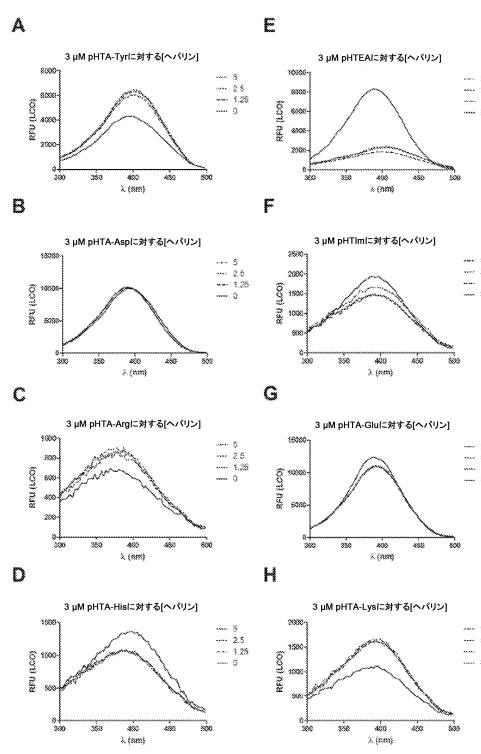


図22

【図23】

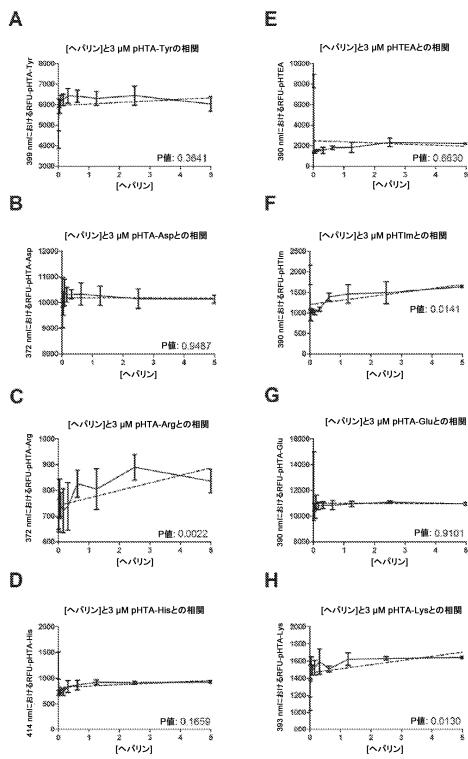


図23

【図24】

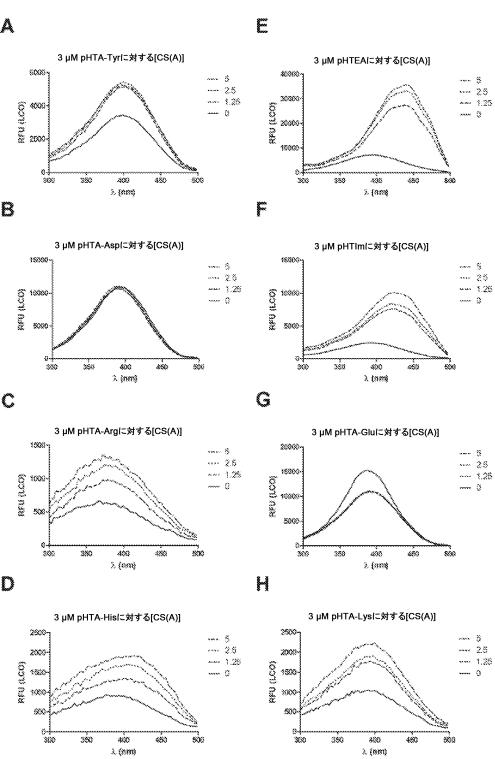


図24

【図25】

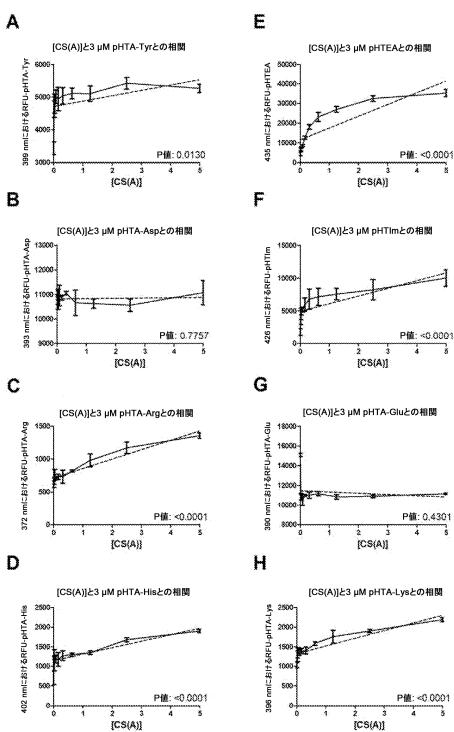


図25

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-126 31 ヘーゲルステン, カルーセルヴェーゲン 33, 2テー
アール

審査官 西浦 昌哉

(56)参考文献 国際公開第2011/102789 (WO, A1)

特表2012-505879 (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 & BIOMOLECULAR CHEMISTRY, 2011年12月21日, Vol.9/No.24, pp.8356-8370

ASLUND, A. et al., Novel Pentameric Thiophene Derivatives for in Vitro and in Vivo Optical Imaging of a Plethora of Protein Aggregates in Cerebral Amyloidoses, ACS CHEMICAL BIOLOGY, 米国, American Chemical Society, 2009年 8月21日, Vol.4/No.8, pp.673-684

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 33/48 - 33/98

JST Plus / JMEDPlus / JST7580 (JDreamIII)