



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105263936 B

(45)授权公告日 2018.06.05

(21)申请号 201480015522.7

G01N 21/64(2006.01)

(22)申请日 2014.03.13

(56)对比文件

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 105263936 A

US 6362175 B1,2002.03.26,
US 20070110672 A1,2007.05.17,
US 20120265034 A1,2012.10.18,
US 20130004785 A1,2013.01.03,
US 20120165435 A1,2012.06.28,

(43)申请公布日 2016.01.20

(30)优先权数据
61/784,925 2013.03.14 US

Michela Quaranta等.Indicators for optical oxygen sensors.《Bioanal Rev》.2012,第4卷(第2-4期),第129页第2栏第2段,第130页第1栏第2段-第2栏第1段,第132页第1栏第5段-第133页第1栏第1段,第134页第1栏第2段,第134页第2栏最后一段-第136页第2栏第1段,图8-10,第148页第1栏第4段.

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2015.09.14

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2014/026183 2014.03.13

(87)PCT国际申请的公布数据
W02014/160258 EN 2014.10.02

Yanqing Tian等.A New Cross-Linkable Oxygen Sensor Covalently Bonded into Poly(2-hydroxyethyl methacrylate)-co-Polyacrylamide Thin Film for Dissolved Oxygen Sensing.《Chem. Mater.》.2010,第22卷(第6期),摘要,scheme1,figure1;第2070页第2栏第1段、表1,第2071页第2栏第2段-第2072页第2栏第1段、图3;第2073页第1栏第2段.

(73)专利权人 普罗菲尤萨股份有限公司
地址 美国加利福尼亚

(72)发明人 S·盖姆西 N·维希涅夫斯基
K·埃尔顿 W·麦克米兰

(74)专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专
利商标事务所 11038

代理人 汪宇伟

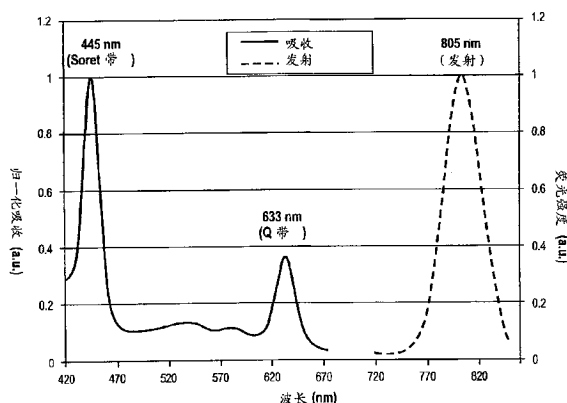
审查员 黄凯

(51)Int.Cl.
C07D 487/22(2006.01)

权利要求书2页 说明书18页 附图12页

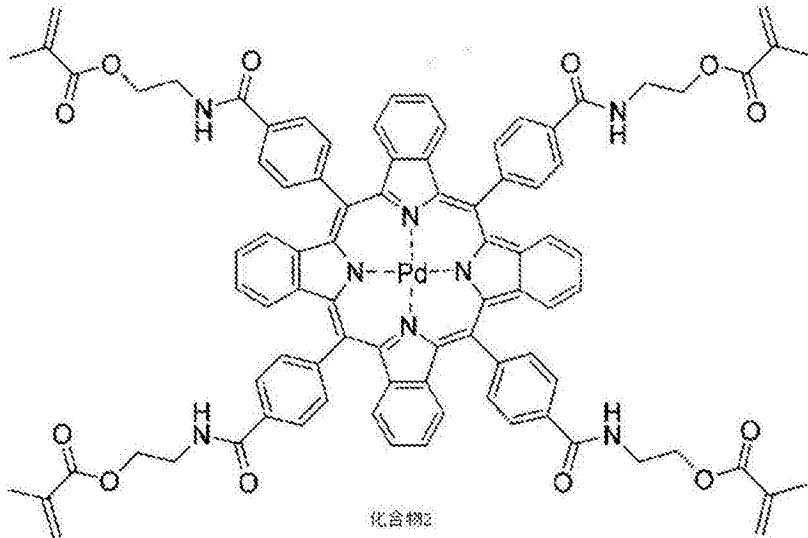
(54)发明名称
氧传感器

(57)摘要
提供氧敏感性发光染料、聚合物和传感器,包括这些传感器的系统以及使用这些传感器的方法。



1. 一种用于检测分析物的传感器,包括聚合物,其中所述聚合物包括一种或多种发光染料的残基,且其中发光染料是光稳定卟啉染料并且在哺乳动物皮肤的近红外光学窗口中具有激发和发射光谱,

其中发光染料为是具有下式的化合物:



式2。

2. 权利要求1所述的传感器,其中发光染料具有500纳米至900纳米之间的最大吸收,以及600纳米至1000纳米之间的最大发射。

3. 权利要求1所述的传感器,其中所述发光染料的残基以0.01mM至5mM的浓度存在。

4. 权利要求3所述的传感器,其中所述发光染料的残基以1mM的浓度的存在。

5. 权利要求1所述的传感器,其中所述聚合物进一步包括HEMA的残基。

6. 权利要求1所述的传感器,其中所述聚合物是水凝胶。

7. 权利要求1所述的传感器,其中所述分析物为氧。

8. 权利要求1所述的传感器,其中所述传感器为组织整合性的。

9. 权利要求8所述的传感器,其中当所述传感器放置于哺乳动物受试者的皮肤下时产生可检测的发光信号。

10. 权利要求9所述的传感器,其中当所述传感器放置于哺乳动物受试者的皮肤下最多约5mm深时产生可检测的发光信号。

11. 权利要求9所述的传感器,其中当所述传感器放置于哺乳动物受试者的皮肤下超过1mm深时产生可检测的发光信号。

12. 权利要求9-11任一项所述的传感器,其中所述哺乳动物受试者是人。

13. 权利要求9-11任一项所述的传感器,其中所述传感器在哺乳动物组织中稳定超过1周。

14. 权利要求1所述的传感器,进一步包括氧化酶。

15. 权利要求14所述的传感器,其中所述氧化酶为葡萄糖氧化酶、乙醇氧化酶、乳酸氧化酶、丙酮酸氧化酶、胆红素氧化酶或组胺氧化酶。

16. 权利要求14所述的传感器,其中分析物是由氧化酶消耗的氧。

17. 权利要求16所述的传感器,其中氧化酶为葡萄糖氧化酶、乙醇氧化酶、乳酸氧化酶、丙酮酸氧化酶、胆红素氧化酶或组胺氧化酶。

18. 权利要求17所述的传感器,其中所述传感器为组织整合性的。

氧传感器

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求美国临时专利申请61/784,925,申请日为2013年3月14日,名称为“Oxygen Sensors (氧传感器)”的权益,该专利申请的全部内容以参考的方式并入本申请中。

技术领域

[0003] 本公开涉及发光染料,聚合物和生物传感器领域。

背景技术

[0004] 某些医疗情况中的诊断、治疗和处理需要监测疾病器官或组织中的氧浓度。例如,外周动脉疾病(PAD),其特征在于在向四肢、头部或器官输送血液的动脉中形成斑块,如果不进行治疗,可能导致下肢动脉完全堵塞,而需要进行开放分流手术或是血管内介入。每年,仅在美国有至少140,000个这样的血管再生术进行,用以恢复缺血组织的血流量。因此,确保血管再生技术期间和之后的血氧流充分恢复和维持是高度合意的。目前的监测方法是昂贵的、繁琐的、耗时的,并不能提供准确的,连续的组织氧合信息。因此,明显需要更好的长期氧组织监测系统。为了达到该目的,非侵入性和最少的使用者维护是必须的,并且在实际使用者环境中具有几天到几个月的传感器寿命是至关重要的。

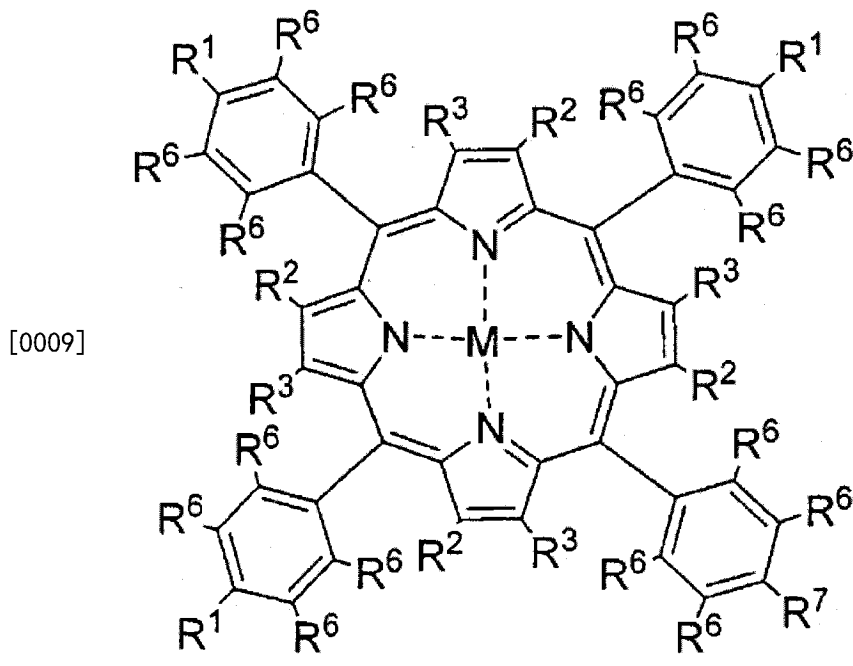
[0005] 这种组织中氧浓度(分压)的实时、连续测量,可以通过使用插入或植入到组织中的传感器,以及通过位于体外的装置测量由传感器所产生的信号来实现。发光为这种传感器的设计提供了一种有用的手段。发光氧传感器是基于氧对于各种化学化合物的分子发光具有猝灭效应,而这种效应能够用来测量体内的氧浓度(分压)的现象的。这种透过皮肤的视觉监测的传感器,需要具有在皮肤的近红外(NIR)光学窗口中激发和发射光谱的高度稳定的染料。这些染料的性能是能够深度植入组织的发光氧传感器的成功设计的关键。透过皮肤非侵入性的监测要求使用具有皮肤光学窗口中的激发和发射波长(大约550至1000nm)的染料来使光的散射和吸收最小化,并实现高信噪比。然而,市售的NIR染料易于光漂白。钯卟啉,例如四羧基苯基卟啉(Pd-TCPP),在NIR中具有一个非常大的斯托克斯位移和发射。然而,不幸的是它们需要绿色光激发(525nm),这种光大量被皮肤和皮下组织吸收。另外,目前可用的传感器,采用大大不同于所植入组织的机械性能的刚性材料制得,体积大且不方便,并且在植入时诱导一系列生物学事件,最终导致形成纤维囊将其从机体包裹出。

[0006] 因此,直到本发明,对于提供改进稳定性的近红外发光化合物和传感器,用于在组织中尤其是在体内,氧水平的直接、快速和精确测量,在本领域存在明确的需求。

发明内容

[0007] 本发明公开了一种发光染料,包括所述染料的聚合物,以及包括本发明的聚合物的传感器。

[0008] 在一个实施方式中,本发明涉及式1的化合物:



[0010] 其中：

[0011] M为H、Pd、Zn、Pt、Gd或Yb；

[0012] 每个R¹相同或不同，且独立地为C(O)X-(CH₂)_n-YC(O)C(R⁴)CH₂、C(O)X-(CH₂CH₂O)_mCH₂CH₂-YC(O)C(R⁴)CH₂或COOH；

[0013] R⁷为C(O)X-(CH₂)_n-YC(O)C(R⁴)CH₂或C(O)X-(CH₂CH₂O)_mCH₂CH₂-YC(O)C(R⁴)CH₂；

[0014] R²和R³为氢或在各种情况下，稠合成环烯基、芳基或杂芳基；

[0015] X为O或NR⁵；

[0016] Y为O或NH；

[0017] R⁵和R⁴独立地为H或C1-C4烷基；

[0018] 每个R⁶相同或不同，且独立地为H或F；

[0019] n是1-10；且

[0020] m是1-300。

[0021] 在另一方面，本发明涉及聚合物，其包括式1的化合物的残基作为单体重复单元。本发明所提供的聚合物可以是发光的生物相容性水凝胶。

[0022] 在进一步的实施方式中，本发明涉及各种发光传感器，其包括本发明提供的用于在体内或体外的检测分析物例如氧的聚合物。该传感器可以是粉末、织物（例如伤口敷料）、缝线、针、杆、圆盘的形式或任何其他适当的形式。

[0023] 在另一方面，本发明所提供的发光传感器是组织整合性的或包括组织整合性支架并在分析物存在时产生可检测的信号；并且进一步地其中，当传感器放入（例如植入）受试者的组织中时提供分析物的检测。本发明所述的组织整合性传感器能够提供对分析物的长期检测。

附图说明

[0024] 图1示出了化合物2 (Pd-BP) 的吸收和发射光谱。得到在pHEMA水凝胶中共价结合的Pd-BP的谱图。以633nm激发，得到805nm发射，确定位移至NIR中。

[0025] 图2证明了掺入pHEMA水凝胶传感器的化合物2 (Pd-BP) 能从组织更深处得到更明亮的信号。上述影像显示了在大鼠畜体中测量的NIR Pd-BP (A) 和绿光激发Pd-TCPP (B) 的皮下水凝胶植入物的光强。由于近红外激发和发射波长允许更多的光穿透进入皮肤, Pd-BP明显比TCPP更明亮, 能使传感器放置更深。

[0026] 图3示出了植入在小鼠脑中的pHEMA O₂传感器的发光信号。

[0027] 图4示出了植入在大鼠皮肤中的氧传感器的发光 (170天)。光强变化作为植入深度 (数据归一化到基线荧光) 和组织氧浓度的函数。吸入的氧在100%到12%之间调整, 在Caliper IVIS (Ex=640nm, Em=800nm) 中收集每30s的图像。画出传感器周围的关注区域 (ROI) 并绘制数据对时间图。数据显示于图6。

[0028] 图5显示组织整合性多孔水凝胶支架的SBM图像。

[0029] 图6显示了Pd-BP光稳定性的测定。在PBS (pH 7.4, 37°C) 中的凝胶使用占空比为40%的525nm的LED照射。两者的寿命信号保持不变。

[0030] 图7, 面板 (panel) A和B, 示出了多孔组织整合性传感器 (A) 的响应是快速的 (~30秒), 而固体传感器 (B) 响应慢得多 (甚至5分钟后没有达到平台)。固体传感器具有同样的杆状和材料组成。

[0031] 图8, 面板A和B, 示出了Pd-BP水凝胶对O₂的动态响应 (A) 和O₂对Pd-BP的淬灭效应的Stern-Vomer图 (B)。该响应是线性的, 并具有良好的灵敏度和快速响应时间。

[0032] 图9, 面板A和B, 示出了GOx/Pd-BP凝胶对葡萄糖的动态响应 (A) 和归一化的葡萄糖剂量-响应曲线 (B)。

[0033] 图10, 面板A和B, 示出了从O₂传感器可检测的调制传感器信号 (A) 以及包含传感器的猪组织切片的组织学分析 (B)。

[0034] 图11, 面板A到D, 示出了固体传感器对脱氧化 (0.12 FI_{O2}) 和再氧化 (1.00 FI_{O2}) 的响应 (A), 在植入后7和28天时的固体传感器和周围组织样本的荧光显微照片, 多孔、组织整合性传感器对脱氧化 (0.12 FI_{O2}) 和再氧化 (1.00 FI_{O2}) 的响应 (C), 在植入后7和28天时多孔传感器和周围组织样本的荧光显微照片 (D)。

[0035] 详细说明

[0036] 本发明描述了用于掺入聚合物的可聚合的发光染料以及包含作为单体单元的本发明所述染料的残基的聚合物。所述染料和聚合物是有用的, 例如, 在传感和成像应用中, 例如精确和任选的长期测量体内和体外的氧。

[0037] 此外, 本发明描述的是包括本发明的聚合物的传感器。传感器可以植入受试者的组织, 并用于长期或短期的连续和半连续收集各种生化分析数据, 任选地不使用任何类型的可植入硬件和/或酶和电化学检测方法。一方面, 传感器是组织整合性的, 例如允许毛细血管在紧密邻近 (close proximity) 传感器的所有区域中 (例如, 在表面和内部) 生长, 这导致了包括超长期的精确的分析物测量。另一方面, 除了本发明的发光染料和/或聚合物之外, 传感器包括氧化酶, 例如, 但不限于, 葡萄糖氧化酶, 并且作为单体单元掺入聚合物中的发光染料和/或它们的残基测量由氧化酶的耗氧量, 因此, 该传感器可以提供除氧以外的许多分析物的检测, 例如, 但不限于, 葡萄糖。

[0038] 本发明所提供的染料和发光聚合物的优势包括但不限于: (1) 在皮肤的光学窗口的激发和发射波长 (约550nm至1000nm) 允许检测在组织或器官深处的分析物; (2) 高信噪

比；(3) 大的斯托克斯位移和发射；(4) 光稳定性，例如，染料和/或聚合物不发生快速光致漂白。

[0039] 本发明所述的传感器的优点包括但不限于：(1) 提供长期产生稳定信号的装置（例如，超过一个星期，超过一个月，超过6个月）；(2) 提供放入或植入并整合入受试者组织的装置（例如，通过向内生长的（in-growth）组织和/或毛细血管）；(3) 提供能够通过注射器注射或套针注射植入的装置，指不需要手术将传感介质置入体内适当位置；(4) 提供在体内不包含传感器电子设备的装置；(5) 提供长期（例如大于一周、通常是数周、数月或数年）精确评估分析物（如氧）浓度的装置和/或 (6) 提供小尺寸的装置，该装置导致提升的介入治疗舒适度以及更好的身体接受度。

[0040] 必须注意，除非上下文另外明确说明，本说明书和所附的权利要求书中使用的单数形式“一个”、“一种”和“所述”包括复数指代物。因此，例如，关于包含“一个传感部分”的传感器包括含有两个或更多个传感部分的装置。同样，关于“一个分析物”是指两个或更多个分析物。

[0041] 定义

[0042] 术语“组织整合性”是指物质（例如，支架）当整合入活组织时保持与组织的血管（例如毛细血管）紧密邻近。

[0043] “长期”是指植入物传感分析物大于约7天，例如数周、数月或数年。

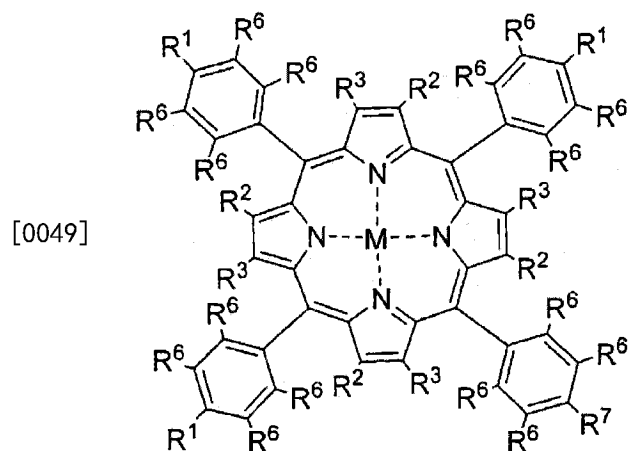
[0044] “可生物降解的”或者“可生物吸收的”是指能被受试者身体在一段时期（从数天至数周至数月或数年）后分解的材料。

[0045] “水凝胶”是指吸收溶剂（例如水）的物质，该物质在无可识别溶解的情况下发生快速膨胀，并保持能可逆变形的三维网络结构。

[0046] 术语“刺激响应”是指物质，例如聚合物，当暴露于外部刺激时或是根据它们所在的环境，改变它们的物理状态，例如进行相变。这种聚合物的非限制性的例子是“智能聚合物”（Kumar A. 等, Smart polymers: Physical forms and bioengineering applications. Prog. Polym. Sci. 32 (2007) 1205-1237）。

[0047] A. 发光NIR染料

[0048] 一方面，本发明提供式1化合物：



[0050] 其中

[0051] 其中M是H、Pd、Zn、Pt、Gd或Yb；

[0052] 每个 R^1 相同或不同且独立地为, $C(O)X-(CH_2)_n-YC(O)C(R^4)CH_2$ 、 $C(O)X-(CH_2CH_2O)_mCH_2CH_2-YC(O)C(R^4)CH_2$ 或 $COOH$;

[0053] R^7 为 $C(O)X-(CH_2)_n-YC(O)C(R^4)CH_2$ 或 $C(O)X-(CH_2CH_2O)_mCH_2CH_2-YC(O)C(R^4)CH_2$;

[0054] R^2 和 R^3 为氢或在各种情况下, 稠合成环烯基、芳基或杂芳基;

[0055] X 为 O 或 NR^5 ;

[0056] Y 为 O 或 NH ;

[0057] R^5 和 R^4 独立地为 H 或 $C1-C4$ 烷基;

[0058] 每个 R^6 相同或不同且独立地为 H 或 F ;

[0059] n 是 $1-10$; 且

[0060] m 是 $1-300$ 。

[0061] 一个实施方式中, M 为 Pd 。另一个实施方式中, R^1 和 R^7 都是 $C(O)NH(CH_2)_2OC(O)C(CH_3)CH_2$ 。另一个实施方式中, R^1 是 $C(O)NH(CH_2)_2OC(O)C(CH_3)CH_2$ 和 R^7 是 $COOH$ 。再一个实施方式中, 两个 R^1 是 $C(O)NH(CH_2)_2OC(O)C(CH_3)CH_2$, 一个 R^1 是 $COOH$ 并且 R^7 是 $COOH$ 。另一个实施方式中, 一个 R^1 是 $C(O)NH(CH_2)_2OC(O)C(CH_3)CH_2$, 两个 R^1 是 $COOH$, 并且 R^7 是 $COOH$ 。一个实施方式中, 所有的 R^1 和 R^7 都是 $COOH$ 。

[0062] 另一个实施方式中, R^1 和 R^7 都是 $C(O)X-(CH_2CH_2O)_mCH_2CH_2-YC(O)C(R^4)CH_2$ 。另一个实施方式中, R^1 是 $C(O)X-(CH_2CH_2O)_mCH_2CH_2-YC(O)C(R^4)CH_2$ 和 R^7 是 $COOH$ 。再一个实施方式中, 两个 R^1 是 $C(O)X-(CH_2CH_2O)_mCH_2CH_2-YC(O)C(R^4)CH_2$, 一个 R^1 是 $COOH$ 以及 R^7 是 $COOH$ 。另一个实施方式中, 一个 R^1 是 $C(O)X-(CH_2CH_2O)_mCH_2CH_2-YC(O)C(R^4)CH_2$, 两个 R^1 是 $COOH$ 以及 R^7 是 $COOH$ 。一个实施方式中, 所有的 R^1 和 R^7 都是 $COOH$ 。

[0063] 另一个实施方式中, R^1 和 R^7 都是 $C(O)X-(CH_2)_n-YC(O)C(R^4)CH_2$ 。另一个实施方式中, R^1 是 $C(O)X-(CH_2)_n-YC(O)C(R^4)CH_2$ 和 R^7 是 $COOH$ 。再一个实施方式中, 两个 R^1 是 $C(O)X-(CH_2)_n-YC(O)C(R^4)CH_2$, 一个 R^1 是 $COOH$ 以及 R^7 是 $COOH$ 。另一个实施方式中, 一个 R^1 是 $C(O)X-(CH_2)_n-YC(O)C(R^4)CH_2$, 两个 R^1 是 $COOH$ 以及 R^7 是 $COOH$ 。一个实施方式中, 所有的 R^1 和 R^7 都是 $COOH$ 。

[0064] 一个实施方式中, R^2 和 R^3 稠合形成杂芳基。一个实施方式中, R^2 和 R^3 稠合形成环烯基。一个实施方式中 R^2 和 R^3 稠合形成四环己烯并(tetracyclohexeno)基团。一个实施方式中, R^2 和 R^3 稠合形成芳基。一个实施方式中, 所述芳基是全氟取代的。一个实施方式中, R^2 和 R^3 稠合形成苯并基团。另一个实施方式中, R^2 和 R^3 稠合形成萘并基团。

[0065] 一个实施方式中, R^1 包括具有 $2-300$ 个乙烯单元的低聚乙二醇连接链(linker)。另一个实施方式中, R^7 包括具有 $2-300$ 个乙烯单元的低聚乙二醇连接链(linker)。

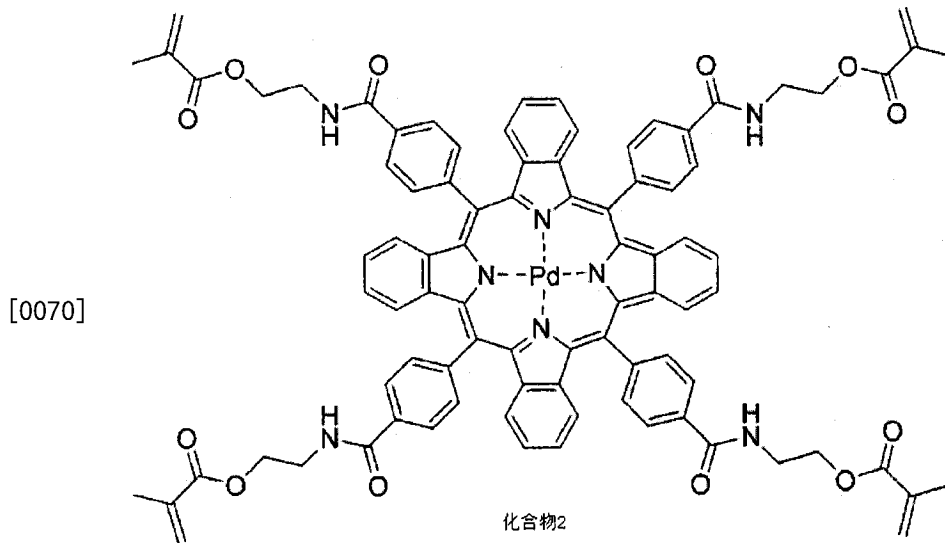
[0066] 一个具体的实施方式中, M 为 Pd , R^1 和 R^7 均是 $C(O)NH(CH_2)_2OC(O)C(CH_3)CH_2$, R^2 和 R^3 是 H 。

[0067] 一个具体实施方式中, M 为 Pd , R^1 和 R^7 均是 $C(O)NH(CH_2)_2OC(O)C(CH_3)CH_2$, R^2 和 R^3 稠合形成苯环。

[0068] 一个实施方式中, 式1化合物是一种近红外发光染料。一个实施方式中, 式1化合物在 $500nm$ 和 $800nm$ 之间具有最大吸收。一个具体实施方式中, 式1化合物在 $500nm$ 和 $700nm$ 之间具有最大吸收。一个实施方式中, 式1的化合物在 500 和 $1000nm$ 之间具有最大发射。一个实施方式中, 式1的化合物在 650 和 $900nm$ 之间具有最大发射。一个具体实施方式中, 式1的化合物在 800 和 $900nm$ 之间具有最大发射。一个实施方式中, 本发明式1化合物是光稳定的并具有在

皮肤的NIR光学窗口的激发和发射光谱。

[0069] 例如,一个优选的实施方式中,如图1所示,当式2的化合物2与HEMA共聚成水凝胶时,在633nm处具有最大吸收,并在805nm处具有最大发射。



[0071] 一些实施方式中,本发明的染料封装入固体的、不透氧的纳米球中。这些纳米球可用于发光、非氧敏感的应用中。

[0072] B. 聚合物

[0073] 本发明的荧光染料包含有可聚合的基团,例如丙烯酸或甲基丙烯酸残基,并且能够与其他单体共聚以提供包括近红外发光基团的聚合物。当化合物具有2个或更多个可聚合基团时,它们与其他单体共聚所得到的聚合物可以是经交联的。可选的,另一个交联单体可以加入到聚合混合物中,以得到更高交联度的聚合物产物。

[0074] 本发明所述聚合物可以以任意合适的方法制备。本发明所提供的用于生产聚合物的合适的合成方法包括,非限制性示例,阳离子、阴离子和自由基聚合。在某些实施方式中,聚合物的合成是在无水(neat)或在任意合适的溶剂中进行的。合适的溶剂包括但不限于戊烷、己烷、二氯甲烷、氯仿、水、乙二醇、丙二醇、DMSO或二甲基甲酰胺(DMF)。在某些实施方式中,聚合物的合成是在任何合适的反应温度下进行,包括例如从约-50°C至约100°C,或从约0°C至约70°C。

[0075] 优选聚合物是通过自由基聚合制备的。当使用自由基聚合过程时,(i) 单体,(ii) 任选地,共聚单体,和(iii) 提供任选的自由基源以引发自由基聚合过程。在一些实施方式中,自由基源是任选的,这是因为一些单体在高温下加热时可以自引发。在某些情况中,形成聚合混合物之后,混合物经受聚合条件。这些条件任选地不同至任何何时的水平和包括,非限制性示例,温度、压力、光、空气、在聚合混合物中使用的起始组分的比例以及反应时间。聚合以任何合适的方式进行,包括例如在溶液、分散液、悬浮液、乳液或本体中进行。

[0076] 在一些实施方式中,反应混合物中存在引发剂。如果任何合适的引发剂在本文所述的聚合过程中是有用的,任选地使用任何合适的引发剂。这些引发剂包括,非限制性示例,一个或多个烷基过氧化物、取代的烷基过氧化物、芳基过氧化物、取代的芳基过氧化物、酰基过氧化物、烷基氢过氧化物、取代的烷基氢过氧化物、芳基氢过氧化物、取代的芳基氢

过氧化物、杂烷基过氧化物、取代的杂烷基过氧化物、杂烷基氢过氧化物、取代的杂烷基氢过氧化物、杂芳基过氧化物、取代的杂芳基过氧化物、杂芳基氢过氧化物、取代的杂芳基氢过氧化物、烷基过酸酯、取代的烷基过酸酯、芳基过酸酯、取代的芳基过酸酯、或偶氮化合物。在具体的实施方式中,过氧化苯甲酰(BPO)和/或AIBN用作引发剂。

[0077] 在一些实施方式中,聚合过程是在受控(living(活性))模式下进行。优选的受控(活性)聚合过程包括可逆加成断裂链转移(RAFT)聚合过程和原子转移自由基聚合(ATRP)。

[0078] 在某些实施方案中,本发明的聚合物是水凝胶。例如,水凝胶可以通过甲基丙烯酸羟乙酯(HEMA)反应形成聚(甲基丙烯酸羟乙酯)(pHEMA)来制备。此外,使用不同的共聚单体组合可用于改变水凝胶的亲水性、机械性能和溶胀性能(如PEG、NVP、MAA)。聚合物的非限制性示例包括2-甲基丙烯酸羟乙酯、聚丙烯酰胺、N-乙基吡咯烷酮、N,N-二甲基丙烯酰胺、(各分子量的)聚(乙二醇)单甲基丙烯酸酯、二乙二醇甲基丙烯酸酯、N-(2-羟丙基)甲基丙烯酰胺、甘油单甲基丙烯酸酯、2,3-二羟丙基甲基丙烯酸酯及其组合。交联剂的非限制性示例包括四乙二醇二甲基丙烯酸酯、(各分子量的)聚(乙二醇)(n)二丙烯酸酯、乙氧基化的三羟甲基丙烷三丙烯酸酯、双丙烯酰胺及其组合。引发剂的非限制性示例包括Irgacure系列(UV)、偶氮二异丁腈(AIBN)(热)、过硫酸铵(APS)(热)。

[0079] 一个具体实施方式中,聚合物是由HEMA和式1化合物共聚得到的发光水凝胶。在一个优选实施方式中,该水凝胶通过不同摩尔量的式2化合物与甲基丙烯酸2-羟乙酯(HEMA)单体、四乙二醇二甲基丙烯酸酯(TEGDMA)交联剂、Irgacure 651引发剂、水和助溶剂混合后,接着经UV引发聚合,而共聚制备而成。另一个实施方式中,聚合物含有1mM最终浓度的式1化合物。在一个具体实施方式中,聚合物是氧传感的聚(甲基丙烯酸2-羟乙酯)(pHEMA)支架,该支架是由HEMA(甲基丙烯酸2-羟乙酯)(50wt%)、TEGDMA(三乙二醇二甲基丙烯酸酯)(1wt%)、乙二醇(20wt%)、水(25.5wt%)、光引发剂Irgacure 651(0.5%体积/体积)和3%化合物2共聚制备而成的。

[0080] 本发明聚合物可以是可降解的,可以通过身体(可生物降解)或是通过使用额外的引发剂来启动或加速降解过程(例如用UV、超声、射频、温度或其他外部来源来引发降解)。例如,聚合物可以是可生物降解的或是可生物吸收的,或者可以包括任何可生物降解的或可生物吸收的片段,包括但不限于藻酸盐的可降解形式、聚(乳酸)、聚(乙醇醇)、聚酸酐、聚(羟基乙酸)、微孔聚酯、微孔聚醚和交联胶原。一个具体的示例是聚(乙二醇)-二丙烯酸酯和丙烯酸酯化的蛋白酶-可降解肽以及VEGF的UV光聚合,如Phe1ps,等(2010)Proc.Nat'l.Acad.Sci.USA 107(8):3323-3328所述。

[0081] 一个实施方式中,本发明提供的聚合物是生物相容的。在本发明的另一方面,聚合物是可生物降解的。可降解的水凝胶可以使用原子转移自由基聚合(ATRP)通过HEMA与本发明中可聚合的发光染料共聚合成。基于非可降解和可降解的氧传感水凝胶的多孔传感器支架,可以使用球状-模板制造技术生成。可降解和非可降解的HEMA试剂以及可聚合染料在模板微球上聚合,随后用溶剂溶解掉以生成所需的非可降解和可降解的支架。简言之,使用受控的ATRP,HEMA在双官能的可降解的基于PCL的ATRP引发剂和交联剂的存在下发生聚合。在此合成流程中,从可降解引发剂两侧pHEMA链以相同的速率生长,这导致降解产物的MW是母体聚合物的一半。通过控制母体聚合物的MW以及引发剂和/或交联剂中的PEG和PCL单元,可以调整聚合物的降解速率。限制母体聚合物的MW为10kDa导致降解产物能够被身体清除,并

且在保留水凝胶机械强度的同时导致提升的降解速率。

[0082] 在某些实施方式中,本文提供的聚合物是刺激响应性的,例如温度或pH敏感的聚合物。这种刺激响应性聚合物的一个非限制性实施例是衍生自NIPAM共聚的温度敏感性聚合物。通过首先将这种聚合物溶解在低于体温的适合注射的介质中,然后将所得溶液注入组织和/或身体的所需位置,这种聚合物用于将包含所述聚合物的传感器植入组织内的目标位置。当聚合物受到更高的温度(例如体温)时,其在需要监测氧的注射位点里或附近沉淀。

[0083] C. 传感器

[0084] 在一些实施方式中,本发明的聚合物掺入用于检测分析物的传感器中。分析物的检测可以是体内或体外的。这一段的剩余句子描述了“聚合物”一词是如何在题为“C. 传感器”这一节中使用的。该聚合物可具有式1和/或式2的分子共价结合到聚合物主链上。式1和/或式2的分子可以附着至(例如通过共价键或其他方式)聚合物中,或包含于纳米粒载体或微粒载体或其他载体中,所述载体附着至或包含在聚合物中。这些载体可共价结合至聚合物主链。聚合物一词和传感器一词可互换使用。

[0085] 一个非限制性的实施例中,该聚合物掺入氧传感的伤口敷料,该敷料可用于监测伤口愈合的进程,例如连续和非侵入性评估愈合的关键因素之一(即氧)。

[0086] 另一个实施方式中,聚合物掺入粉末中,该粉末作为伤口愈合监测的传感器直接作用于伤口中。本发明所述传感器也可以以可注射、植入、网或缝线的形式在得益于监测皮肤或基础组织的氧化的应用中使用,这些应用包括但不限于伤口愈合监测、皮肤闭合、疝气修复、瓣片转移手术、整形外科、和其他整形手术。本发明的传感器也可用于微循环障碍和外周动脉疾病的测量。特别是在血管再造术或在服用药物时,可直接监测组织氧。本发明的传感器也可以在肿瘤学中应用,以确定组织或器官中缺氧的程度。一个实施方式中,所述传感器用于监测动物中的肿瘤生长,包括但不限于,在肿瘤药物和诊断研究和发现,例如,癌症治疗定量给药或肿瘤代谢监测中使用的小鼠或大鼠模型。本发明的传感器也可用于监测肺功能状态,例如COPD和哮喘疾病状态。再一个实施方式中,该传感器用于运动或训练优化,例如,士兵和运动员的表演或个人训练计划。所述传感器还可以是氧传感纹身的形式。

[0087] 再一个实施方式中,本发明的传感器用于神经科学监测中,目前在该领域还没有可用于连续监测氧的工具,例如,在蛛网膜下腔出血监测。

[0088] 一个实施方式中,本发明的传感器是固体材料,可以是板、杆、圆柱、颗粒或粉末的形式。在一个具体实施方式中,传感器是杆的形式。在另一个实施方式中,传感器是圆柱的形式。

[0089] 另一实施方式中,本发明的聚合物掺入组织整合性支架中,以提供组织整合性传感器(如美国专利申请2012/0265034所述,该专利全部内容以参考的方式并入本申请)。本文所述传感器典型地包括组织整合性支架(也称为基质)材料。优选地,本发明的组织整合性支架可使用材料和/或微结构构建,以致使所述支架促进组织整合和/或血管化。例如,多孔支架提供组织生物物质锚定和促进通过孔的向内生长。由此产生的组织生长的“走廊”或“通道”模式是健康的空间填充物,其长时间存在并促进宿主细胞整合。本发明所述的生物材料中大部分或全部孔洞,优选地是相互连接的(共连续的)。这些生物材料的共连续的孔状结构促进细胞在植入物中空间填充性向内生长,这进而限制了异物响应以及导致植入物

用作传感器的长期(大于一周并高至数年)持续性。提供组织整合性支架的替代性结构包括纤维(例如,直径为1至10微米或更大,如5,6,7,8,9,10或更大微米),该纤维可设置为非随机或随机构型。组织整合性支架(任何构型)也可通过多光子聚合技术形成。Kaehr等,(2008) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 105(26):8850-8854; Nielson等,(2009) Small 1:120-125; Kasprzak, 博士论文, 乔治亚理工学院 (Georgia Institute of Technology), 2009年5月。

[0090] 本发明的聚合物, 优选地以组织整合性支架的形式, 可以包含与式1或式2化合物组合的任何物质, 包括但不限于合成的聚合物、天然产生的物质或是其混合物。示例性合成聚合物包括但不限于聚乙二醇(PEG)、甲基丙烯酸2-羟乙酯(HEMA)、硅橡胶、聚(ϵ -己内酯)二甲基丙烯酸酯、聚砜、(聚)甲基丙烯酸甲酯(PMMA)、可溶性特氟隆(Teflon)-AF、(聚)对苯二甲酸乙二醇酯(PET、达可纶(Dacron))、尼龙、聚乙烯醇、聚丙烯酰胺、聚氨酯及其混合物。示例性天然产生的物质包括但不限于纤维或球蛋白、复合糖、糖胺聚糖、胞外基质或其混合物。因此, 该聚合物支架可包括所有类型的胶原蛋白、弹性蛋白、透明质酸、海藻酸、结蛋白、多能聚糖、基质细胞(matricellular)蛋白例如SPARC(骨粘连蛋白)、骨桥蛋白、凝血酶敏感蛋白-1和2、纤维蛋白、纤连蛋白、玻连蛋白、白蛋白、壳聚糖等。天然聚合物可用作支架或添加物。

[0091] 在一些实施方式中, 本发明的聚合物, 优选地以组织整合性支架的形式, 包括水凝胶。例如, 该聚合物可以包括水凝胶, 例如, 通过甲基丙烯酸羟乙酯(HEMA)、聚(甲基丙烯酸羟乙酯)、pHEMA的反应。另外, 可联用各种共聚单体来以改变水凝胶的亲水性、机械和溶胀性能(例如PEG、NVP、MAA)。聚合物的非限制性示例包括甲基丙烯酸2-羟乙酯、聚丙烯酰胺、N-乙烯吡咯烷酮、N,N-二甲基丙烯酰胺、(各分子量的)聚(乙二醇)单甲基丙烯酸酯、二乙二醇甲基丙烯酸酯、N-(2-羟丙基)甲基丙烯酰胺、单甲基丙烯酸甘油酯、2,3-二羟丙基甲基丙烯酸酯及其组合。交联剂的非限制性示例包括四乙二醇二甲基丙烯酸酯、(各分子量的)聚(乙二醇)(n)二丙烯酸酯、乙氧基化的三羟甲基丙烷三丙烯酸酯、双丙烯酰胺及其组合。引发剂的非限制性示例包括Irgacure系列(UV)、偶氮二异丁腈(AIBN)(热)、过硫酸铵(APS)(热)。

[0092] 本发明的聚合物, 优选地以组织整合性支架的形式, 可以是球状-模板的水凝胶, 例如反向胶体晶体(inverse colloid crystal), 如Ratner等的美国专利公开号No.2008/0075752中描述的或其它组织整合性材料。

[0093] 本发明的聚合物, 优选地以组织整合性支架的形式, 可以是可降解的, 通过身体(可生物降解)或是通过使用外部引发剂来启动或加速降解过程(例如UV、超声、射频、或其他外部来源来引发降解)。例如, 聚合物可以包括任何可生物降解或可生物吸收的聚合物, 包括但不限于藻酸盐的可降解形式、聚(乳酸)、聚(乙烯醇)、聚酸酐、聚(羟基乙酸)、微孔聚酯、微孔聚醚和交联胶原。一个具体的示例是聚(乙二醇)-二丙烯酸酯和丙烯酸酯化的蛋白酶-可降解肽以及VEGF的UV光聚合, 如Phelps, 等(2010) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 107(8):3323-3328所述。

[0094] 其它具体示例是记载于以下文献的聚合物: Kloxin等(2009) Science 324:59-63和美国专利No.6,013,122, 其中通过暴露于外源性能量形式来控制降解, 以及Alexeev等,(2003) Anal. Chem. 75:2316-2323; Badylak等(2008) Seminars in Immunology 20:109-

116; Bridges等, (2010) 94 (1) : 252-258; Isenhath等, (2007) Research83A: 915-922; Marshall等, (2004) Polymer Preprints, American Chemical Society, Division of Polymer Chemistry 45: 100-101; Phelps等 (2010) Proc Nat'l Acad Sci USA. 107 (8) : 3323-8; Ostendorf和Chichkov (2006) Two Photon Polymerization: A New Approach to MicroMachining, Photonics Spectra; Ozdemir等 (2005) Experimental and Clinical Research, Plast. Reconstr. Surg. 115: 183; 公开号为No. 20080075752的美国专利; Sanders等 (2003) Journal of Biomedical Materials Research Part A 67A (4) : 1181-1187; Sanders等 (2002) Journal of Biomedical Materials Research 62 (2) : 222-227; Sanders等 (2003) Journal of Biomedical Materials Research 65 (4) : 462-467; Sanders等, (2005) Biomaterials 26: 813-818; Sanders等 (2005) Journal of Biomedical Materials Research Part A 72 (3) : 335-342; Sanders (2003) Journal of Biomedical Materials Research 67 (4) : 1412-1416; Sanders等, (2000) Journal of Biomedical Materials Research 52 (1) : 231-237; 和Young Min Ju等, (2008) J Biomed Mater Res 87A: 136-146.

[0095] 在一些实施方式中, 本发明的聚合物, 优选地以组织整合性支架的形式, 被构建成从该支架材料中释放组织响应性调节剂以促进或增强组织整合和血管化。

[0096] 此外, 本发明的聚合物, 优选地以组织整合性支架的形式, 可以被构建成具有中空的或填充有可降解、血管生成或其它物质 (例如干细胞) 的管道、孔或囊。如上所述, 一旦在体内, 填充管道、孔或囊的物质的生物降解产生了针对组织, 包括与该物质整合的毛细血管, 的空间。起初填充管道、孔或囊的可降解物质可增强支架中的血管生长或组织生长。该结构在植入物中和周围促进新血管形成并维持健康有活力的组织。

[0097] 本发明的聚合物, 优选地以组织整合性支架的形式, 可被构建成其对于所关注的分析物是可渗透的 (例如, 氧可以扩散到组织整合性水凝胶支架中, 并到达嵌入在水凝胶基质中的传感部分)。

[0098] 本发明的聚合物, 优选地以组织整合性支架的形式, 可以是任意合适的形式, 包括但不限于块状 (或任何厚度)、立方体状、盘状、圆柱形、椭圆形、圆形、随机或非随机的纤维结构等。在一些实施方式中, 该传感器包括一种或多种纤维, 其可以以非随机的方式 (例如网格、分层网格等) 或以随机方式构建。

[0099] 本文描述的本发明的聚合物, 优选地以组织整合性支架的形式, 典型地与测定一种或多种分析物的传感部分结合 (或由测定一种或多种分析物的传感部分组成)。在一个实施方式中, 传感部分是掺入组织整合性支架中的式1和/或2的化合物的残基。

[0100] 另一个实施方式中, 本发明的聚合物, 优选地以组织整合性支架的形式, 包含, 除了式1和/或2化合物的残基之外, 产生或消耗氧的第二传感部分, 例如氧化酶, 并且式1和/或式2的化合物的残基被用于检测由第二传感部分产生的氧浓度的改变。第二传感部分可包含酶, 例如葡萄糖氧化酶 (GOx), 其特异性作用于底物葡萄糖。葡萄糖与葡萄糖氧化酶通过酶相互作用的反应导致氧按比例消耗并转化为 H_2O_2 。可以通过使用 O_2 敏感的荧光染料, 例如式1和式2的分子, 来测量在酶附近 O_2 的还原。这些染料分子在 O_2 的存在下是淬灭的, 因此, 由于GOx的作用 O_2 的减少导致了荧光的增强。因此, 自 O_2 校准部分发出的荧光量与传感器中的葡萄糖浓度成比例。用于检测除了葡萄糖的其他分析物的除了葡萄糖氧化酶的氧化酶可包括胆红素氧化酶、乙醇氧化酶、乳酸氧化酶、丙酮酸氧化酶、组胺氧化酶或对其他所关注

的分析物具有特异性的其他氧化酶。

[0101] 组织中 O_2 浓度也会生理性变化,因而改变或限制传感部分中的氧化物酶的反应。因此,可不依赖于氧化酶靶标物浓度测量传感器中 O_2 浓度。这可通过将一些纳米、微米或毫米级大小的 O_2 参照部分与酶- O_2 检测部分物理隔离,以避免相互干扰(cross talk)而实现。这种 O_2 的参照测量将允许校正来自氧化酶传感部分葡萄糖特异信号。

[0102] 另一个实施方式中,本发明的聚合物,优选地以组织整合性支架的形式,可以是多分析物传感器,其中氧是两个或更多个被检测和报告的分析物中的一个。在这个实施方式中,聚合物包括用于检测氧的式1和/或式2的化合物的残基,以及检测另一种底物的第二传感部分。可由传感部分检测的分析物的非限制性实施例包括氧、反应性氧物种(reactive oxygen species)、葡萄糖、乳酸、丙酮酸、皮质醇、肌酐、尿素、钠、镁、钙、钾、抗利尿素、激素(例如,促黄体生成激素)、pH、细胞因子、趋化因子、类花生酸、胰岛素、瘦素、小分子药物、乙醇、肌红蛋白、核酸(RNAs、DNAs)、片段、多肽、单一氨基酸等。

[0103] 另一个实施方式中,本发明的聚合物,优选地以组织整合性支架的形式,可以是其中由式1和/或式2检测到的氧信号用作参考以校正或校准用于一种或多种其他分析物的信号的传感器。氧信号可以被或可以不被报告。其可仅在内部算法中使用来校准或校正其他分析物的信号。在该实施方式中使用氧作为参照有助于克服生理波动,所述生理波动可以改变在该传感器位点的分析物有效性(如血流量变化)。

[0104] 进一步的实施方式中,传感部分,除了式1和/或式2的化合物的残基之外,包括第二发光分析物传感部分,且式1和/或式2的化合物的残基被用作参照分子。非氧传感部分可以利用分析物特异性部分,例如竞争结合实验(如配体受体部分和分析物模拟部分如刀豆球蛋白A和葡聚糖)、可逆发光结合分子(如基于硼酸的用于葡萄糖检测的传感化学物)、结合蛋白如糖结合蛋白。为了测量组织中的分析物例如葡萄糖,聚合物在植物的长期寿命期间以预期间隔从在植入物上部的皮肤顶部的贴片读取器(patch reader)用650nm的光照射(例如,为期90天或更长时期内每5-60分钟一次)。被测发光信号的量(例如来自分子如AlexaFluor 647)与组织中的分析物(如葡萄糖)的浓度成比例。被测发光信号的量(例如来自式1或式2分子)与组织中的 O_2 浓度成比例。组织中的 O_2 浓度揭示了传感器周围的急性和/或慢性生理变化,并可通过比例性(proporportionality)算法用于校正或调整葡萄糖信号或其他分析物信号。

[0105] 另一个实施方式中,可以使用促进组织光学变化的校正的内部参照控制材料。植入的组织整合性生物传感器通常位于扫描表面以下3-4毫米。众所周知,在近红外范围内的皮肤激光光和发射荧光当光贯穿读取器贴片和植入物之间的组织时是高度分散的。吸收和散射的程度受到物理特性如温度或组织组成(包括但不限于血液灌注、水合和黑色素浓度的变化)的影响。在使用者之间或单一病人的不同时间点之间可以发生皮肤变化,并且这些变化可以影响荧光激发和发射信号,导致针对分析物特异性信号的精确信号。因此,具有区别于分析物特异荧光的发射光谱的单独荧光分子可以固定到支架中。来自该分子的荧光可以从分析物特异性的荧光中单独测量,以测量提示组织组成变化的信号。所选择的染料是基于作为分析物特异性染料对组织变化具有相似的响应。式1或式2可以大幅降低或消除氧传感能力,例如通过掺入非氧扩散的环境,例如嵌入高交联的PAN或硅胶壳中。在这种形式中,本发明的染料分子可作为上述的稳定的内部参照控制材料。

[0106] 包括一个或多个柱状元件(例如纤维)的组织整合性传感器,与目前可得的植入物相比消除或大大减少了异物反应。此外,不像其他已知的传感器,毛细血管供给与传感介质的所有部分的平均扩散距离与本地组织是可比的。

[0107] 很明显,传感介质(可植入传感器)的整体尺寸根据待测量的受试者和/或分析物而不同。通常,植入物应具有约0.001mm至2mm的厚度(或其间任何值)和1mm至1cm之间的直径(或非圆形形状的当量横截面积,例如长度/宽度)以及15mm或更少的长度,例如圆盘状传感器,厚度为2mm或更少,直径为10mm或更少。在一些实施方式中,类似的传感器的尺寸为直径约100-1000微米以及长度为0.25mm至10mm之间。圆盘形式的组织整合性传感介质的尺寸通常厚度是2mm或更少和直径是10毫米或更少。

[0108] 本发明的另一方面涉及用于在哺乳动物体内半连续、连续和/或长期使用的组织整合性生物传感器系统。

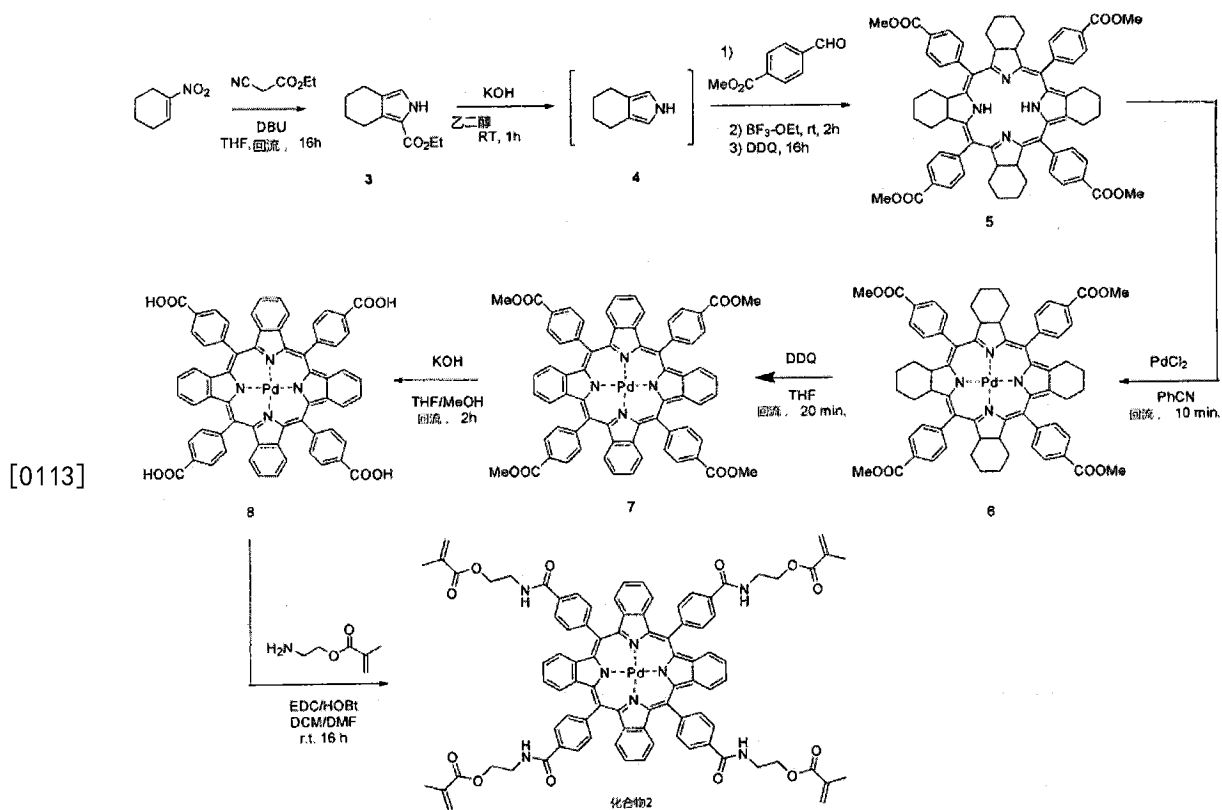
[0109] 本发明的聚合物的一个有益性质是它们的稳定性。本发明的一个方面,在哺乳动物组织中所述传感器对于长期时间是稳定的,例如长于一周、长于一个月、长于6个月。在一个示例性实施方式中,如图2所示,该传感器是稳定的,并且当植入大鼠皮肤达170天时产生稳定信号。

实施例

[0110] 在室温下在300MHz设备上记录NMR光谱数据。NMP谱校准至氘代的DMSO-d₆或CDCl₃的溶剂信号。以下缩写用于表示信号的多样性:s(单)、d(双)、t(三重)、q(四重)、br(宽)、m(多重)。在具有偶联至电喷雾电离(electrospray ionization)(ESI)光谱仪的C₁₈反相柱的HPLC系统上记录分析性的HPLC-MS数据。甲基丙烯酸2-氨基乙基酯盐酸盐和四乙二醇二甲基丙烯酸酯均购至Polysciences, Inc.其他所有化学品均购至Sigma Aldrich。

[0111] 实施例1:可聚合的近红外荧光染料的合成

[0112] 流程1描述了一个示例性近红外发光染料,化合物2(也称为Pd-BP)的合成:



流程 1

[0114] 化合物3按照Niedermair等, *J. Inorg. Chem.*, 2010, 49, p. 9333中的记载制备。简而言之,向90mL无水THF中加入1-硝基环己烯(2.66mL)、乙基异氰基乙腈(2.6mL)和DBU(3.53mL)。在氩气氛下反应物在70℃回流18小时。加热开始后就形成棕色沉淀物。蒸出THF,残渣溶解于二氯甲烷中,产品通过二氯甲烷中的硅胶上快速色谱法纯化。包含产品的部分在真空下蒸发除去大部分溶剂,并向残留溶液中加入己烷以促进产品结晶。在4℃下48小时后,过滤收集沉淀,得到2g细黄色针状产物。母液分部蒸发得到另外的1.4g产物,总产率75%。

[0115] 化合物5:化合物3(1.40g, 7.2mmol)悬浮于30mL无水乙二醇中,并在该溶液中加入KOH颗粒(0.73g, 13.0mmol)。此混合物在氩气氛下回流1hr。所得棕色澄清溶液冷却至0℃,然后向溶液中加入100mL二氯甲烷。分离二氯甲烷层,用水(2X100mL)和盐水(2X100mL)洗涤并用无水硫酸钠干燥。产物用二氯甲烷中的硅胶上的快速色谱法纯化。收集包含快速流出成分的部分,并用二氯甲烷稀释至1000ml。向所得溶液中加入甲基-4-甲酰苯甲酸酯,氩气氛下,溶液在室温搅拌10min,并加入 $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ (0.19mL, 1.3mmol)。混合物搅拌2hr,然后加入1.73g(7.6mmol)的DDQ,将混合物搅拌过夜。混合物依次用10% aq. Na_2CO_3 、1M HCl和盐水洗涤,然后用无水硫酸钠干燥。使用二氯甲烷中的MeOH(0-2%)的台阶梯度的硅胶色谱纯化后,得430mg(24%)作为绿色粉末的产物。

[0116] 化合物6:作为游离碱的化合物5(0.43g, 0.40mmol)溶解于50mL苯甲腈中。 PdCl_2 在氩气氛下加入溶液中,此混合物回流10min。溶液的颜色从绿色变为红色。混合物冷却至室温,用200mL二氯甲烷稀释,然后通过硅藻土(Celite)过滤。真空下蒸发二氯甲烷,蒸出苯甲

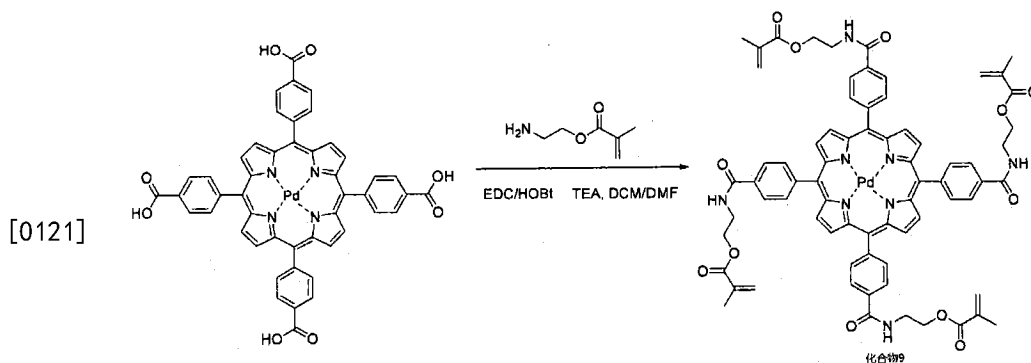
睛。产物使用二氯甲烷中的硅胶上的快速色谱法纯化,使用己烷:乙酸乙酯(1:1)中的硅胶上的快速色谱法实现最终纯化,以获得0.109mg (60%)作为红色粉末的产物。

[0117] 化合物7:化合物6 (0.105g, 0.09mmol) 溶于20mL无水THF中,并向该溶液中加入DDQ (0.327g, 1.44mmol)。混合物回流20分钟,当通过TLC检测混合物中没有起始材料时停止反应。真空除去THF,使用二氯甲烷稀释残余物并依次使用10%Na₂SO₄、水和盐水洗涤。

[0118] 化合物8:酯7如Finikova等, J. Phys. Chem., 2007, 111, p. 6977记载的方法水解。简言之, 0.074g (0.064mmol) 化合物7溶于110mL THF中。向溶液中加入MeOH (10mL), 然后加入0.573g KOH在2mL MeOH的溶液。在溶液中形成绿色沉淀, 溶液变为几乎无色。离心收集沉淀并溶于10mL水中。溶液使用0.2mL浓缩的HCl酸化, 离心收集所生成的沉淀。产率: 0.070g (86%)。

[0119] 化合物2: 化合物8, 30 (70mg, 63.9μmol) 在DMF (10mL) 和CH₂Cl₂ (10mL) 中在0℃下加入1-羟基苯并三唑水合物 (43.17mg, 0.32mmol)、N-(3-二甲氨基丙基)-N'-乙基碳二亚胺盐酸盐 (61.25mg, 0.32mmol) 和三乙胺 (90μL, 0.64mmol)。20min后, 加入甲基丙烯酸2-氨基乙基酯盐酸盐 (53.23mg, 0.3195mmol), 然后反应在室温下搅拌16h。减压蒸发CH₂Cl₂, 加入乙酸乙酯/己烷混合物从残留的DMF中沉淀粗产物。倾析溶剂, 沉淀的残余物溶于CH₂Cl₂, 依次使用饱和NaHCO₃和盐水洗涤, 使用Na₂SO₄干燥, 过滤, 并在真空中浓缩。粗产品通过硅胶上的快速色谱法(CH₂Cl₂中0-4%甲醇梯度) 纯化生成作为绿色粉末的化合物2 (16mg, 16%的产率)。¹H NMR (300MHz, CDCl₃) δ 8.40 (d, J=8.1Hz, 8H), 8.32 (d, J=8.1Hz, 8H), 7.22 (br s, 8H), 7.10 (br s, 8H), 6.28 (s, 4H), 5.71 (s, 4H), 4.61 (t, J=5.4Hz, 8H), 4.03 (q, J=5.1Hz, 8H), 2.06 (s, 12H)。LC-MS (ESI): 计算为C₈₈H₇₃N₈O₁₂Pd: 1539.4403 [M⁺H]⁺, 测得1539.4405 [M⁺H]⁺, R_t = 11.8min。

[0120] 化合物9通过市售的四羧基苯基卟啉与甲基丙烯酸氨基乙基酯在HOBt和EDC的存在下与化合物2类似的方法合成, 如流程2所示:



流程 2

[0122] 实施例2: 固定在组织整合性水凝胶支架中的具有氧敏感发光染料的氧传感介质的生产

[0123] 下面描述了一种用于制备本发明所述组织整合性传感器的方法。该方法涉及使用非交联的PMMA模板微球以及pHEMA作为支架材料。使用单分散的PMMA球体 (20-100um, 优选80um) 并且将该模板珠置于带有Teflon隔片的两个玻璃片之间来制备PMMA微球模板。烧结过程包括超声处理至少10分钟 (一次或多次) 以紧密堆积珠子。超声后, 将该模板加热至足

够的温度达足够的时间以熔化这些珠子(一般至140–180°C达20–32小时,例如加热到约177°C达24小时)。对每一批珠子,优化温度以及加热时间。

[0124] 氧传感的聚(甲基丙烯酸2-羟乙酯)(pHEMA)支架的通用制备方法展示如下:将HEMA(甲基丙烯酸2-羟乙酯)(50wt%)、TEGDMA(三乙二醇二甲基丙烯酸酯)(1wt%1)、乙二醇(20wt%)、水(25.5wt%)、光引发剂Irgacure 651(0.5%体积/体积)和3%的钨-四甲基丙烯酸酯-苯并卟啉(化合物2,可聚合的O₂敏染料)混合,产生在聚合物前体溶液中1mM化合物2的终浓度。聚合物、溶剂和传感试剂混合达到足够高的传感化学浓度以可测地检测通过组织的信号中的变化。

[0125] 预混合的单体溶液填充入PMMA模具。将该溶液置于真空中以去除任何气泡并使PMMA模具完全浸润。通过将模具暴露在UV光(280–320nm,10–300mW/cm²)下达5–10分钟而引发聚合。之后,通过手动体积调节使用索氏提取器,通过频繁改变二氯甲烷或其他溶剂体系达24–48小时,PMMA微球溶出所得聚合物。

[0126] 下面描述了杆状水凝胶传感器的制备。100μL的10mM化合物2的DMSO溶液加入聚合物前体溶液[甲基丙烯酸2-羟乙酯(0.5mL,4.1mmol)、四乙二醇二甲基丙烯酸酯(10μL,34mmol)、乙二醇(0.2mL)、水(185μL)和2,2-二甲氧基-2-苯基苯乙酮(5mg,2mmol)],产生终浓度为1mM的化合物2。将所述染料和聚合物前体混合物注射入含聚(甲基丙烯酸甲酯)(PMMA)珠的玻璃模具,按Marshall,A.J.等人已经记载的方法进行(Biomaterials with Tightly Controlled Pore Size that Promote Vascular In-Growth.ACS Polymer Preprints 45,100–101(2004))。将模具置于真空下以去除任何气泡并确保完全填充。使用装备有400瓦的水银灯泡的Dymax 2000-EC Flood Curing System,在约6"距离处将所述模具暴露于UV光达每侧2分钟,以引发聚合。移除玻璃片并将水凝胶浸入50mL CH₂Cl₂中(替换2次),并振摇24小时以提取出PMMA珠。所述水凝胶转移入水中并置于真空下达5分钟,使多孔支架完全水合。为了植入,水凝胶被切成杆状(长度10mm具有750μmX750μm的横截面),暴露于70%乙醇消毒,然后在使用前存放于4°C下无菌pH 7.4的PBS中。非多孔性(即固体)水凝胶传感器以类似方法制备,但并不使用模板珠。

[0127] 包含葡萄糖氧化酶(GOx)的水凝胶也按照前述方法制备,除了GOx也包括在用于制备支架的聚合混合物中(图5)。

[0128] 实施例3:掺入水凝胶的化合物2的激发和发射波长的测定

[0129] 在pH 7.4的PBS中在环境气压下使用荧光贴片读取器测量实施例2中产生的包含染料的水凝胶的吸收和发射光谱(图1)。所述吸收光谱包括在445nm的Soret带和633nm的Q带。在633nm的激发产生了在805nm的发射峰,从而证实了Pd-BP(化合物2)在NIR中均显示吸收和发射。

[0130] 实施例4:水凝胶中最佳染料浓度的测定

[0131] 为了测定达到最大信号强度所需的最小的染料浓度,制备了一系列含有不同浓度Pd-BP(化合物2)的pHEMA水凝胶。制备了染料浓度为0.01、0.1、1、2和3mM的固体和多孔的含有共价结合的Pd-BP(化合物2)的pHEMA水凝胶。所有凝胶均厚~1毫米;多孔凝胶含有~70μm大小的平均孔径。当在pH 7.4的PBS中在环境空气中,使用荧光贴片读取器在805nm(633nm激发)处测定各凝胶的荧光发射。根据这些数据,最佳的染料浓度确定为1mM,因为在更高浓度下观察到信号饱和。

[0132] 实施例5: NIR苯并卟啉的光致漂白特性。

[0133] 在光致漂白研究中使用含有共价结合的化合物2的水凝胶,以确定化合物2和9的光稳定性。当被LED照射时,在一个定制的流程体系中测试水凝胶,以模拟生理条件(pH 7.4的PBS, 37°C, 21% O₂)。经由1毫米直径的光纤电缆,激发光直接传递至凝胶样品底部表面。含有化合物9的水凝胶由525nm LED源(功率=127mW/cm²)激发,该LED源具有2秒的脉冲持续时间(LED的“发光时间”)和5秒脉冲周期以实现整体占空比为40%,同时,含有化合物2的水凝胶由具有相同的占空比的630nm的LED源(功率=143mW/cm²)激发。实验在这些条件下连续运行15个小时。然而,观察到化合物2的寿命信号变化不到5%。由此实验产生的数据用于估计长期体内使用期间可能发生的光致漂白的预期程度和比例。

[0134] 当在模拟使用条件下测试时,含有染料的凝胶是极其光稳定的(图6)。这些数据表明,寿命信号的测量是获得体内长期(5个月)稳定性的优选策略。Pd-BP化合物的光稳定性可以使用在其他地方所披露的技术进一步改进,如改变金属核心,或将基础化合物氟化或全氟化。

[0135] 实施例6: 植入

[0136] 将制备的直径300-500um、长5mm的杆状组织整合性传感器置于19-23规格的插入针、套管针、改装的活检装置或其他设计用于皮下注射的装置中。所述传感器任选在插入前脱水或压缩以便于使用更小的插入针。

[0137] 插入时,捏起皮肤以使插入针置于与皮肤表面平行且至多在表面以下4毫米的位置。使用流体或反向位移柱塞(或套管)在抽出注射器时将传感器留在组织内。插入位点可包括任何皮下或真皮区域,通常是腹部、手臂和大腿(图4)。在研究模型中,对背部皮肤、腹部、下肢和脑部(图3)均进行了研究。下面描述了水凝胶植入的实施例,体内荧光成像,以及在大鼠模型中的数据分析。

[0138] 水凝胶植入与体内荧光成像。水凝胶传感器(n=3至4多孔和n=3至4固体),分别注入12只成年雄性CD大鼠(Charles River Labs, 150-250g)的皮下组织中达1周、4周或170天。大鼠在传感器注射期间使用2-3%的异氟烷(氧中v/v)麻醉。多孔和固体水凝胶杆(10mm长, 750μm×750μm的横截面)载入18规格的针中,然后插入到垂直于中位线的背侧皮下空间中。通过套管插入不锈钢柱塞从针中喷出传感器。水凝胶传感器植入相距约1.5厘米。大鼠正常生长,并在传感器注射之后的几周期间未表现出不适感。

[0139] 使用IVIS谱或动态成像系统(Perkin Elmer, Waltham, MA, USA)在体内每30秒荧光成像氧气传感器一次。在成像前大鼠在2%异氟烷下在1.00 FIO₂中麻醉达30分钟。在体内成像期间,FIO₂至少两次下调到0.12(v/v平衡N₂)达5-10分钟,然后调回至1.00达10-15分钟。通过确定围绕传感器的关注区域(ROI)和使用包括IVIS系统的现场成像软件在ROI中测量平均辐射效率,以量化每个传感器的相对响应(强度)。

[0140] 一旦植入,Oxford Optronics OxyLite系统用作组织氧合作用的参照。在传感器注射的当天(D0),一个针端包裹的OxyLite探针皮下插入到大鼠的背部中,并且在数据收集之前允许经过10-15分钟使信号达到稳定状态,参见Braun等的描述(Comparison of tumor and normal tissue oxygen tension measurements using OxyLite or microelectrodes in rodents. Am J Physiol Heart Circ Physiol 280, H2533-2544 (2001))。

[0141] 数据分析和统计检验。每个传感器的数据,如ROI所定义,归一化至最大和最小的平均辐射效率并转换使荧光数据和组织氧合作用之间具有正相关性。这种归一化确保了每一个独立实验的每个传感器的数据落入0和1之间,这分别是传感器的最大和最小强度。

[0142] 由于动物的健康考虑必须使用短的暴露时间(5-10min),在缺氧测试期间传感器常常达不到平台期。因此,为了计算传感器的响应时间,在10min的缺氧($FI_{O_2}=0.12$)或15min的高氧($FI_{O_2}=1.00$)情况期间,测定荧光强度变化达到90%的时间($T_{90\%}$)。如果在 FI_{O_2} 改变事件在最后3分钟中的变化少于总变化的10%时,传感器被认为达到了稳定状态。使用非参数Wilcoxon秩测试($p<0.05$)针对统计显著性测试数据。

[0143] 组织学分析。处死大鼠、传感器和周围组织被取出并立即在液氮中冷冻和在 80°C 下储存。将冷冻组织样本在Leica CM1850冷冻切片机上以 $10\mu\text{m}$ 厚冷冻切片,并固定在聚L-赖氨酸涂覆的玻片上。切片对大鼠CD31(BD Biosciences, San Jose, CA)进行免疫染色。简言之,玻片在室温下在丙酮中固定20min,用 $1\times\text{PBS}$ 中漂洗,用染色缓冲液封闭(含5%正常驴血清的 $1\times\text{PBS}$)30min,用小鼠衍生的大鼠(mouse-derived rat)CD31第一抗体以1:200在染色缓冲液中孵育1h,再用抗小鼠Alexa Fluor 488(Jackson ImmunoResearch)孵育30min,用Hoechst 33342(Invitrogen)在室温下染色5min。样品在4%多聚甲醛中固定并在当天成像。样品使用配备了一个12位的CCD相机(QImaging)和由Ludl Mac5000驱动单元(Ludl)驱动的自动扫描过程(Marzhauer)的Zeiss AxioSkop II+荧光显微镜进行荧光成像。使用 $5\times$ 物镜($NA\ 0.25$, Zeiss)获得大量的显微照片然后使用Metamorph软件缝合在一起形成蒙太奇。曝光设置为低光照强度和 1×1 像素组合(binching)(像素大小 $1.36\mu\text{m}\times 1.36\mu\text{m}$)以及100ms的常用的采集周期。实验结果如图11所示。

[0144] 实施例7:测量

[0145] 来自传感器的数据由放置于传感器位置正上方的皮肤表面的荧光读取器收集,并且在智能手机、其他手持装置、计算机屏幕或其他可视形式,例如使用市售的数据显示装置,处理和显示所述数据。原始数据转换为分析物浓度或某些分析物浓度的非定量表示(例如高、低、在范围内)。提供在任意给定时间点的数值或趋势(以时间为横轴的图)或一段时期的汇总统计。任选提供数据的质量指示。由具有NIR Pd-BP的HEMA与绿光激发的Pd-TCPP共聚制备的水凝胶皮下植入大鼠的畜体中,并测定它们的发射(图2)。由于NIR的激发和发射波长允许更多的光穿透进入皮肤,Pd-BP明显比Pd-TCPP更亮,能使传感器放置更深。对于更好的免疫学响应而言更深的放置位置是合意的,但是因为最初的绿色Pd-TCPP信号被皮肤大量阻挡,例如散射和/或吸收,所以这在以前是不可能的。只有浅真皮植入物是可能的。此外,Pd-BP水凝胶传感器深度植入小鼠头骨之下(在小鼠脑内)时,产生明亮的可检测的信号。

[0146] 实施例8:植入大鼠皮肤中的传感器的稳定性

[0147] 在大鼠皮肤中植入氧传感器,并对其信号强度监测170天。图4显示植入小鼠皮肤达170天的传感器的荧光。强度变化作为植入深度的函数(数据被归一化到基线荧光)。吸入的氧在100%到12%之间调整,在Caliper IVIS(光谱, $Ex=640\text{nm}$, $Em=800\text{nm}$,带宽20nm)中收集每30s的图像。在传感器周围画出关注区域(ROI)并绘制数据对时间图(图6)。这一数据证明使用本发明染料制备的传感器在体内保持功能达许多个月。此外,比较组织整合传感器与固体传感器。组织整合性传感器对氧水平的改变产生了比固体传感器更快的动力学响

应,这证明了组织整合性传感器的另一个有益效果。

[0148] 实施例9:低氧浓度的体外氧检测

[0149] 为表征Pd-BP的氧敏感性,在不同O₂水平(0%、12%和20%O₂)下在多孔HEMA水凝胶中测量染料的强度和发光寿命(图8)。在定制的流通系统(pH 7.4PBS,37°C)中测试水凝胶同时使用TauTheta光纤仪检测。染料表现出良好的可逆性,以及由Stern-Volmer方程表示的良好的O₂敏感性。

[0150] 实施例10:葡萄糖传感器的制备与表征

[0151] 葡萄糖氧化酶(GOX)包埋在如上所述的含有共价结合的Pd-BP的pHEMA水凝胶中。利用SEM对所得到的传感器的多孔形貌进行了确证(图5)。GOx-Pd-BP传感器在流通体系中(PBS,37°C)测试葡萄糖响应。在一系列跨越生理范围的葡萄糖偏移期间,监测在凝胶中的Pd-BP的发光强度和寿命(图9)。由于在试验容器中葡萄糖被GOx消耗,强度与寿命在平台期间(其中葡萄糖浓度保持恒定)产生了小幅的下降。

[0152] 实施例11:O₂传感器植入猪皮肤

[0153] 从急性猪试验中获得了外植体样本,在此期间,在由包含化合物2的聚合物制备的O₂传感器注射进入猪中。获得了传感器信号。收集了荧光寿命和强度测量量。在获得了传感器信号测量量后,猪被处死,样本用10%福尔马林固定,并用苏木精-伊红(H&E)染色。使用40×放大的Nikon显微镜和Infinity1显微镜照相机以及软件(版本6.1.0,luminera Corp.)获得图像和深度的测量量。获得序列重叠图像以创建最终的复合图像。图10示出了传感器,发现其被植入在皮肤表面以下8mm深。图10显示传感器植入深度在皮肤表面以下8mm处,调制传感器信号仍然可被检测到。

[0154] 尽管对本发明的优选实施例进行了记载和详细说明,但是本领域技术人员应当理解,上述仅是以示例方式提供具体实施例。对于本领域技术人员而言,在不偏离本发明范围内的多种变化、改变和替换均是容易得到的。应当理解的是在实际应用本发明时可应用根据本发明描述的实施例所作的多种替换方式。本申请权利要求限定了本发明的范围,权利要求书范围内的方法和结构以及其等同实施方式均应包含在本发明的保护范围内。

[0155] 本申请所提及的所有专利、专利申请和出版物均已参考的形式全文并入本申请中。尽管出于理解清楚的目的,本发明通过说明和示例的方式提供了一些细节,但本领域技术人员可以理解在不偏离本发明的精神或范围的情况下和实施各种改变和改进。因此,上述说明和实施例不应理解为是限制性的。

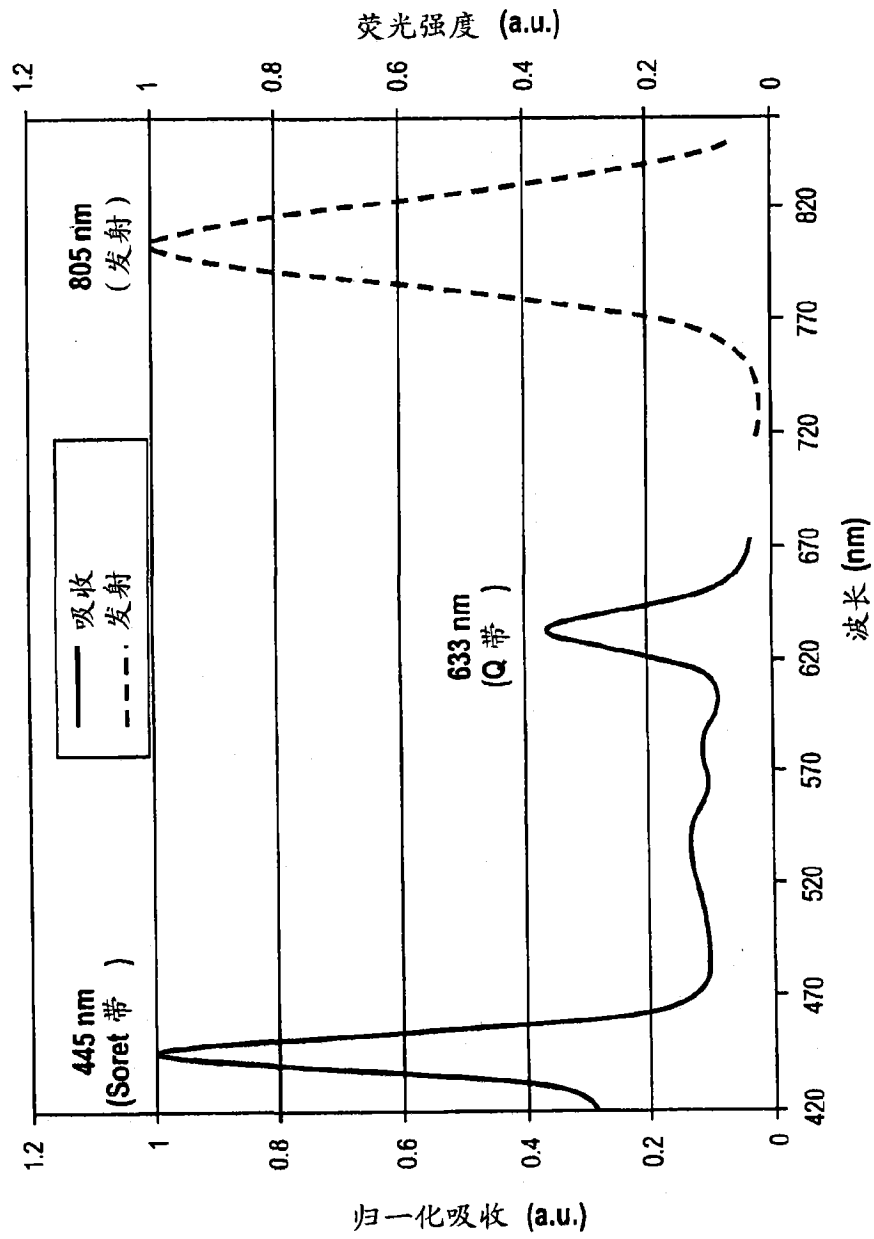


图1

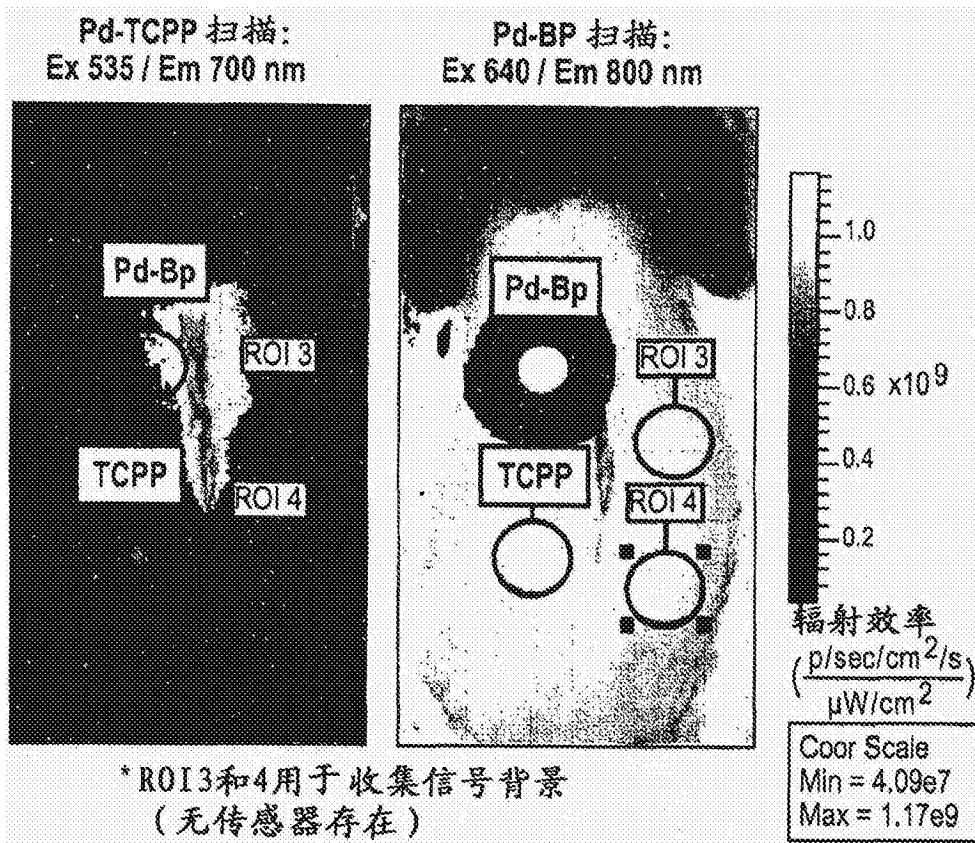


图2

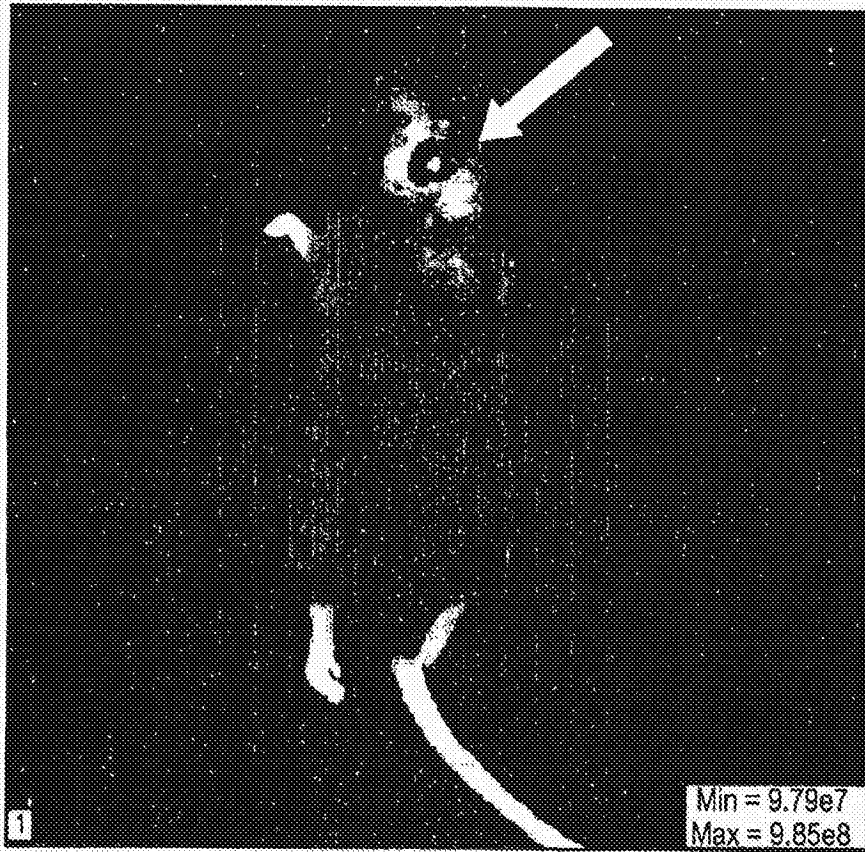


图3

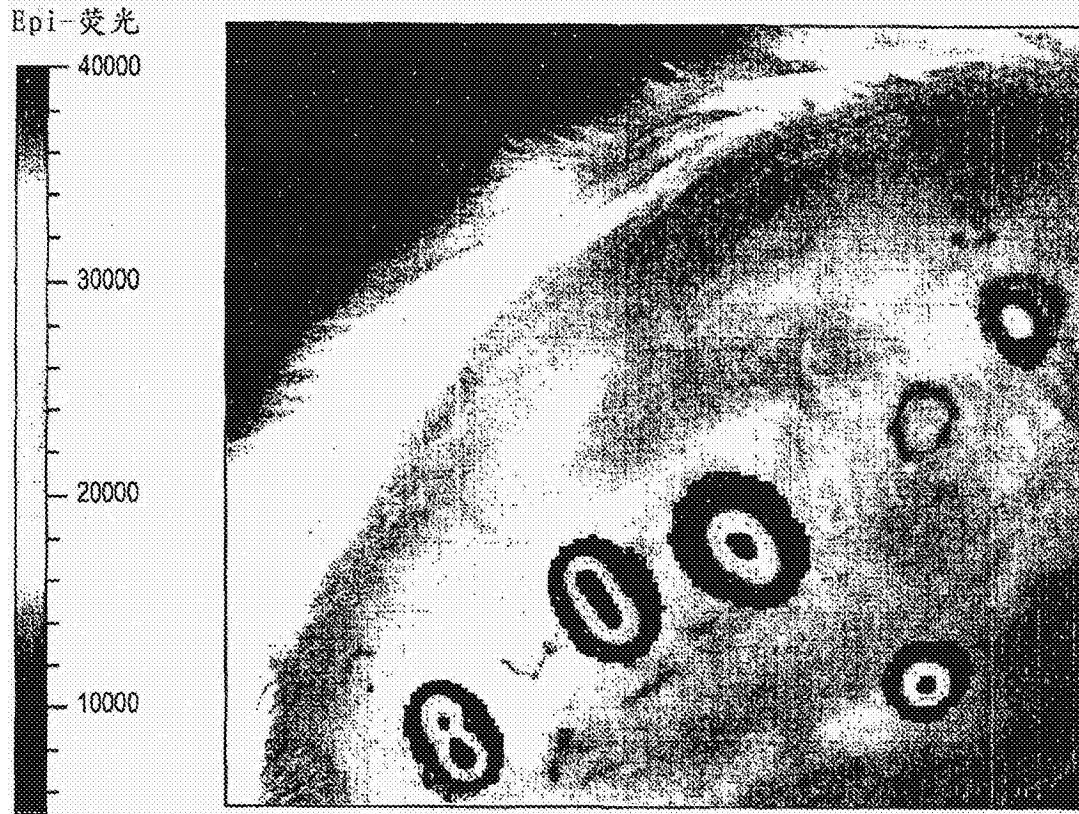


图4

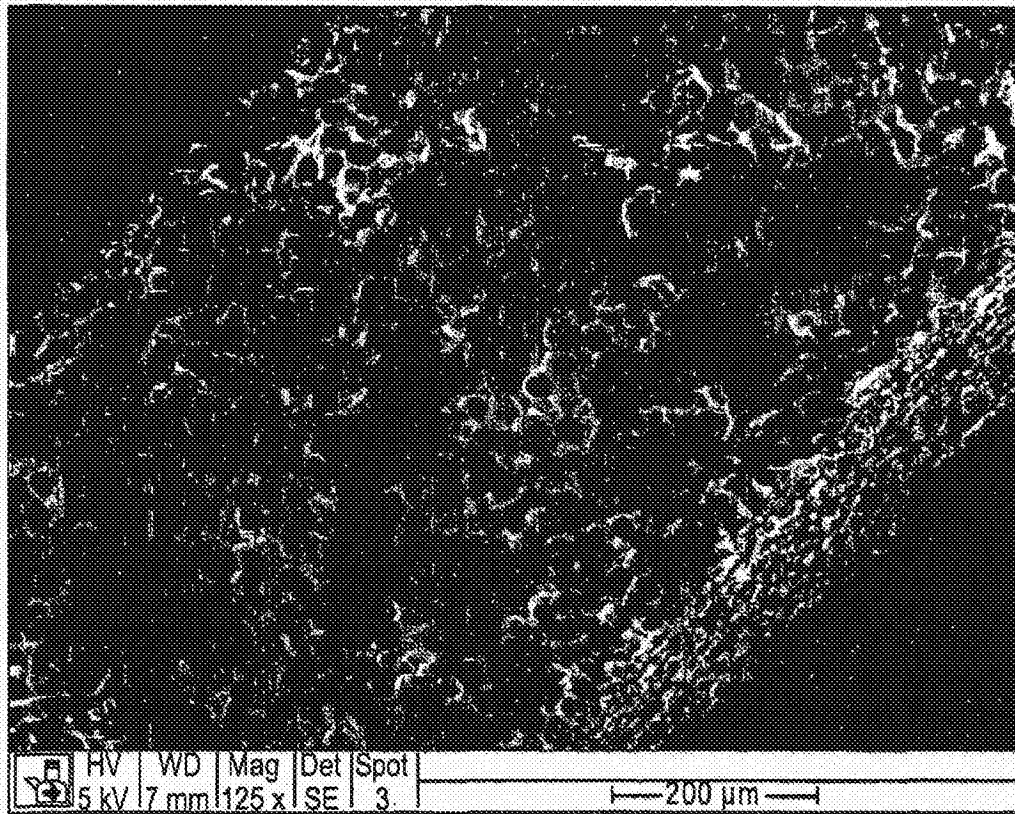


图5

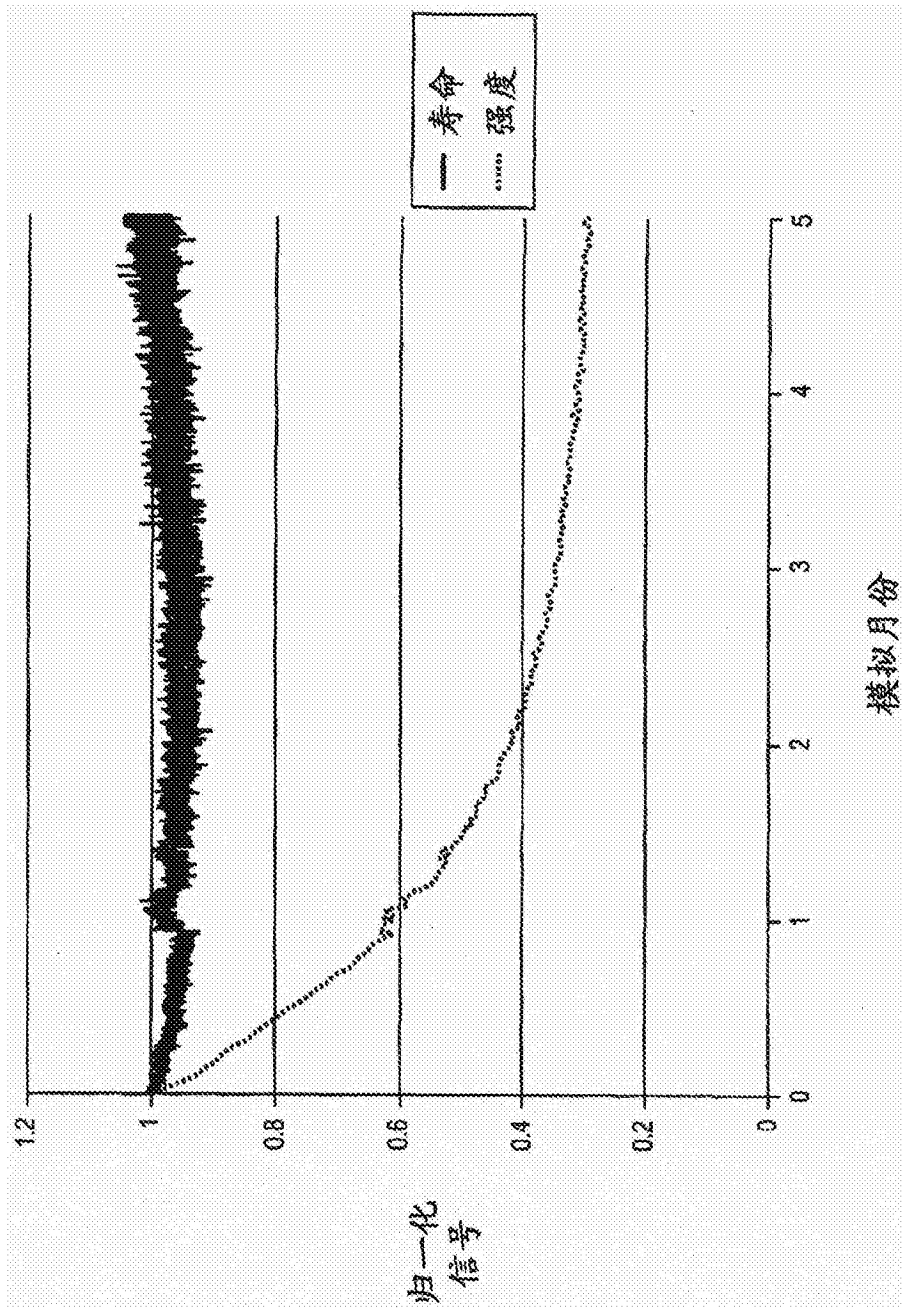


图6

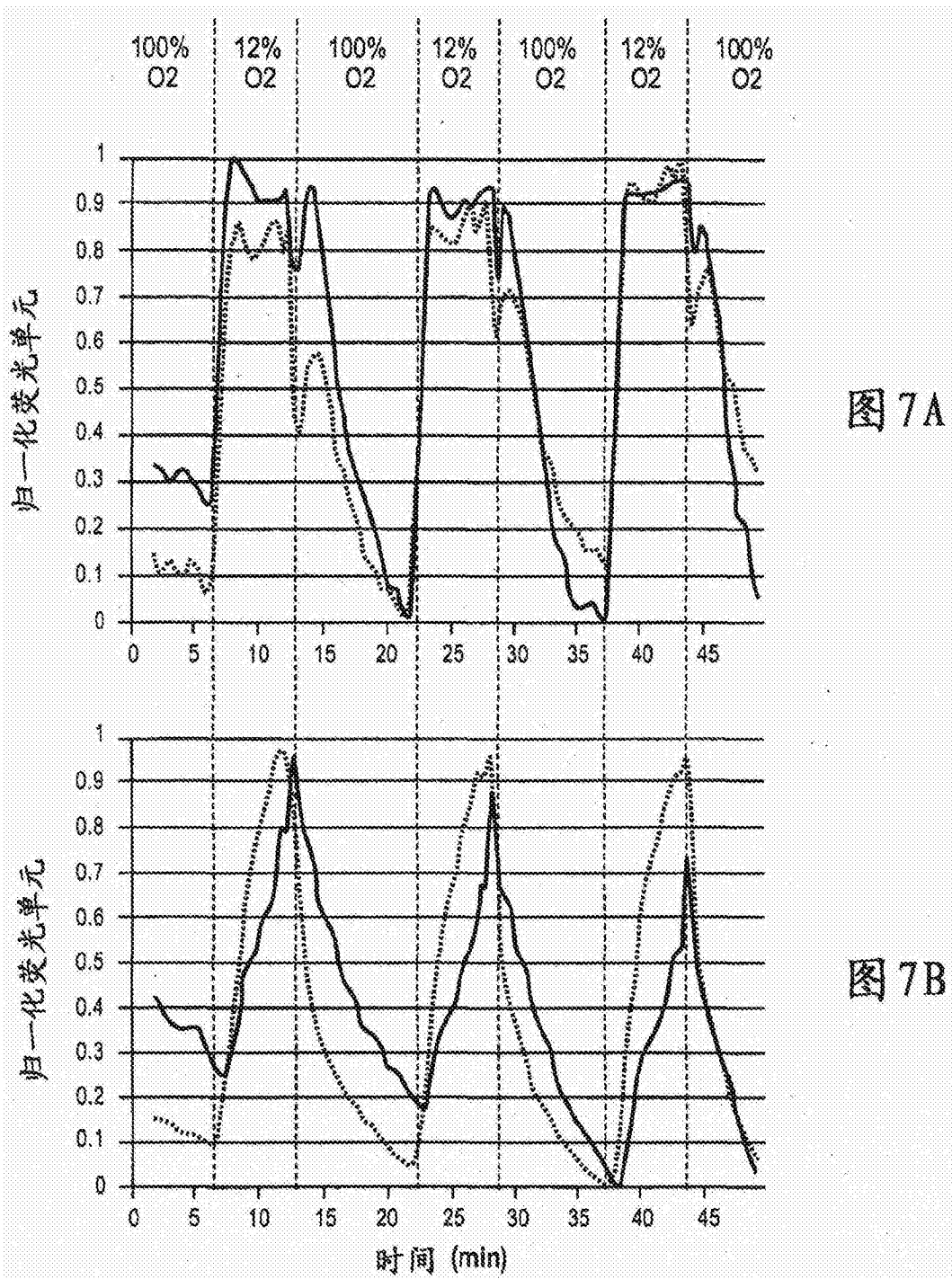


图 7A

图 7B

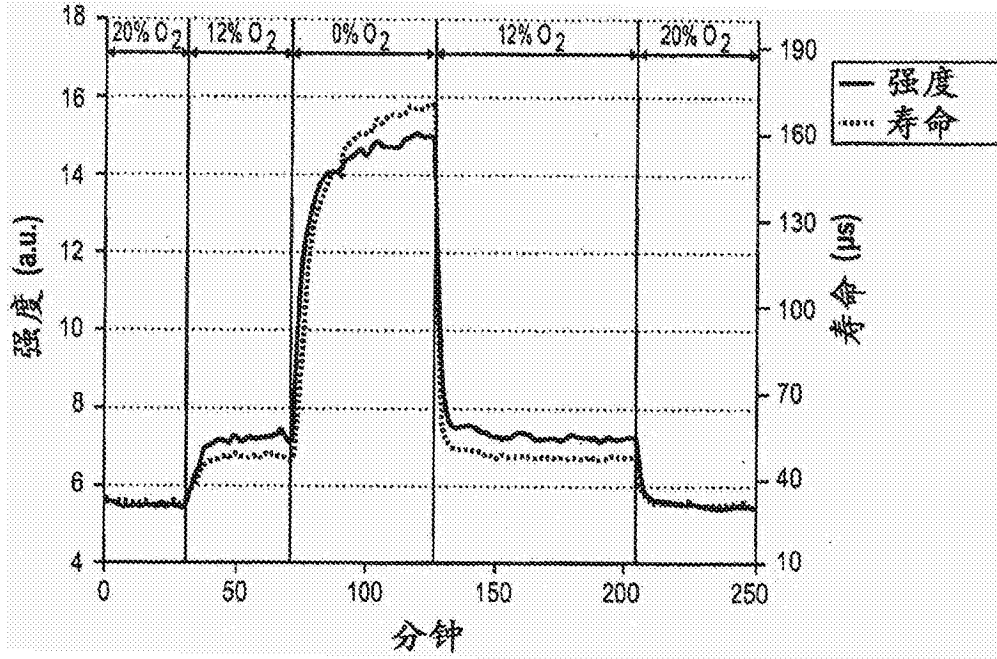


图8A

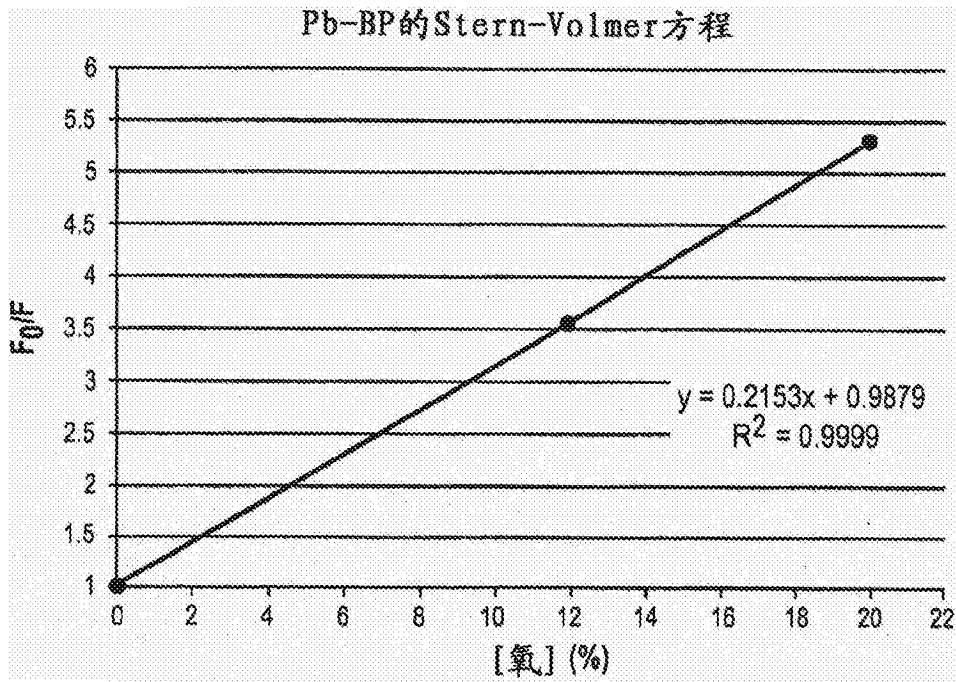


图8B

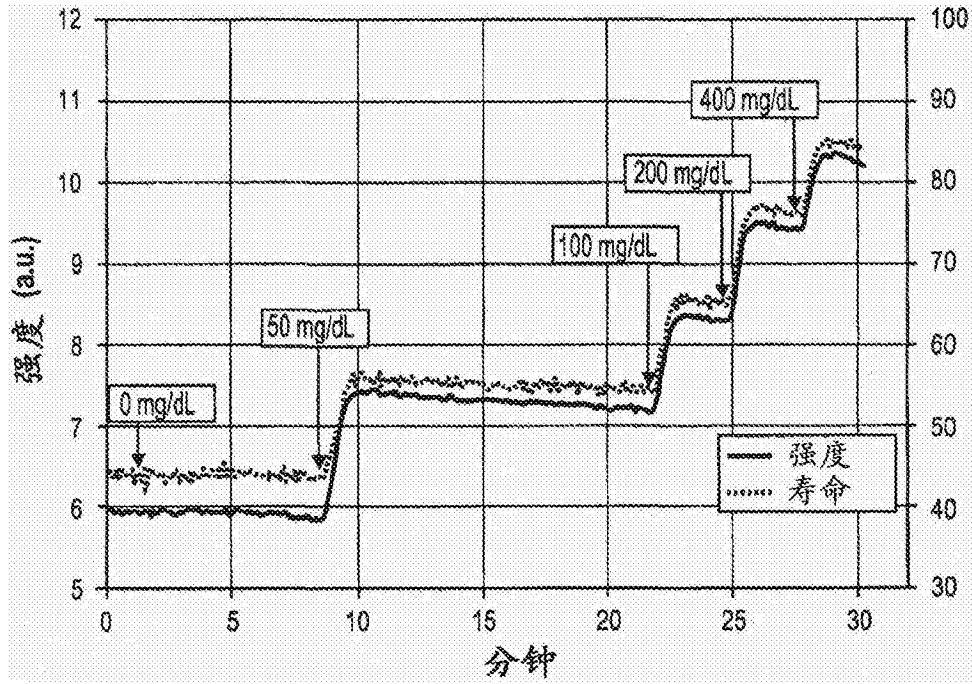


图9A

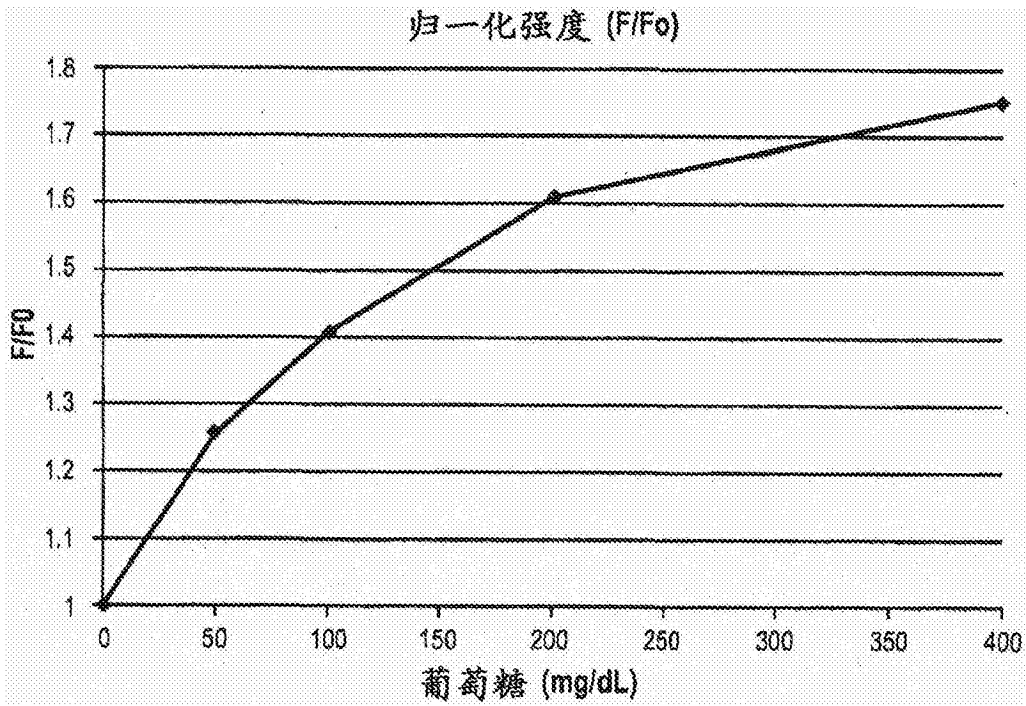


图9B

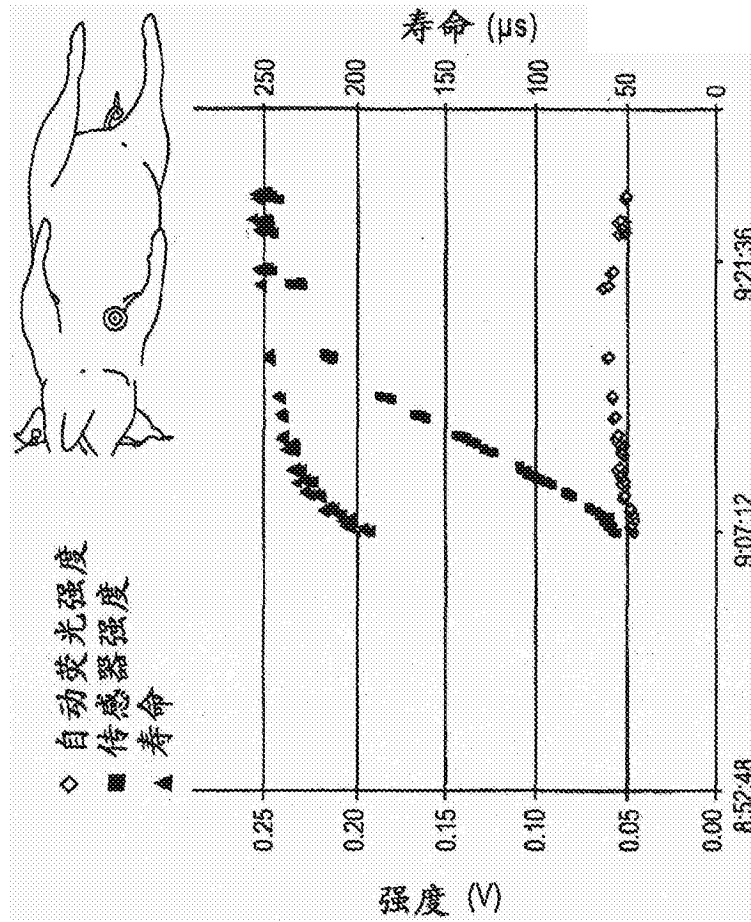


图10A

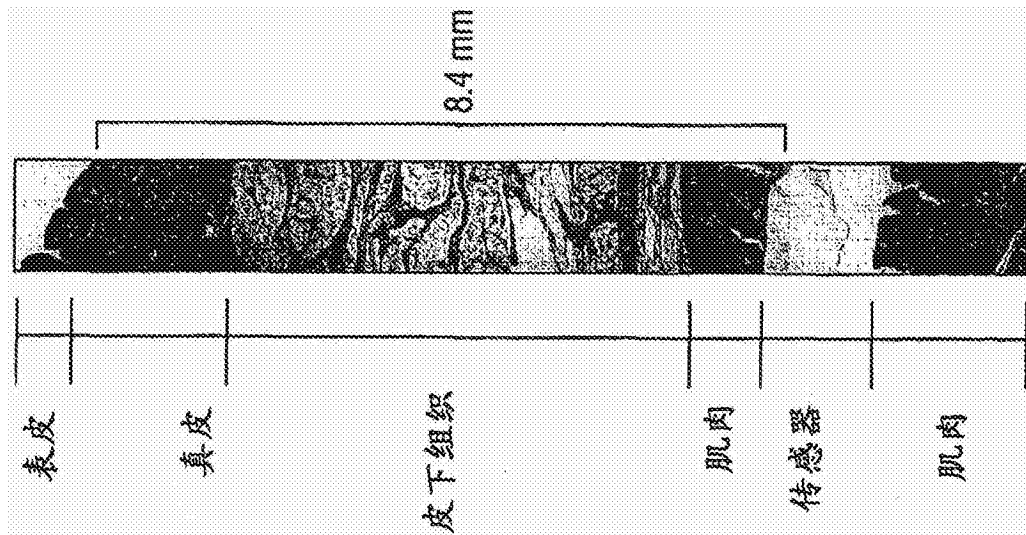


图10B

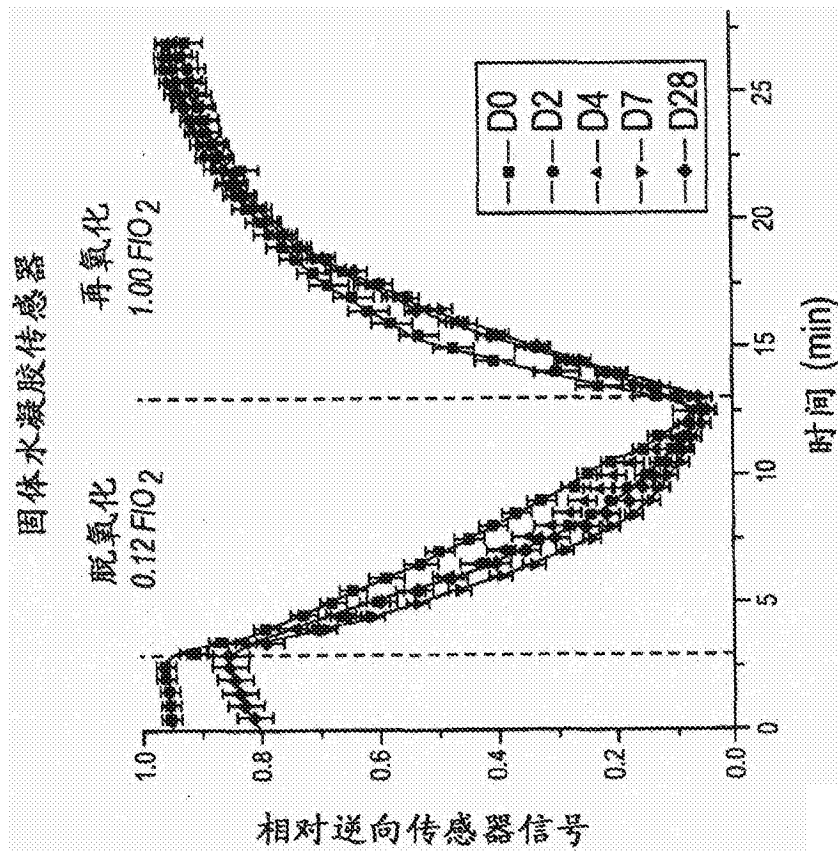


图11A

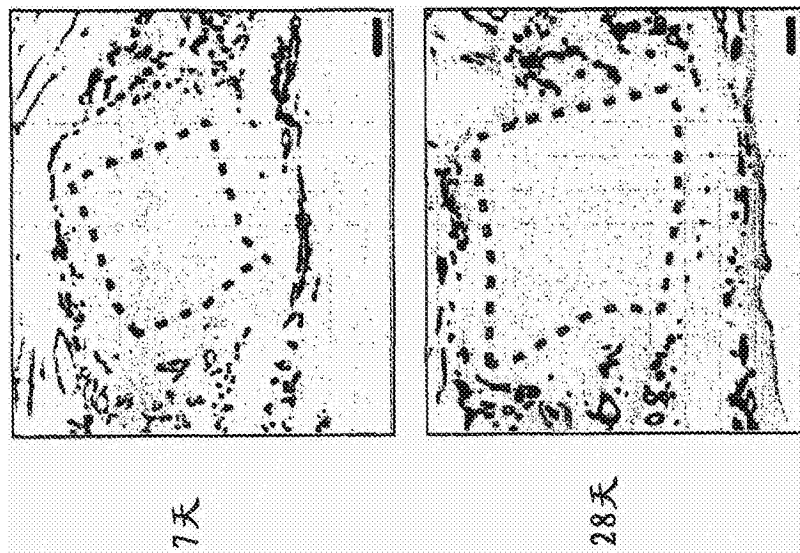


图11B

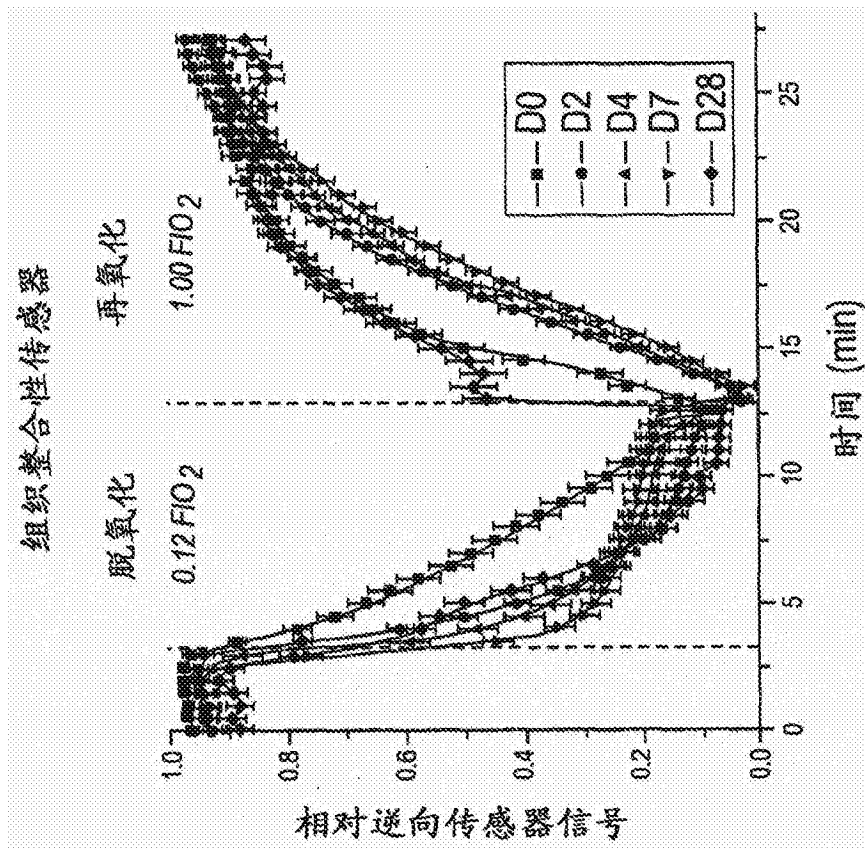


图11C

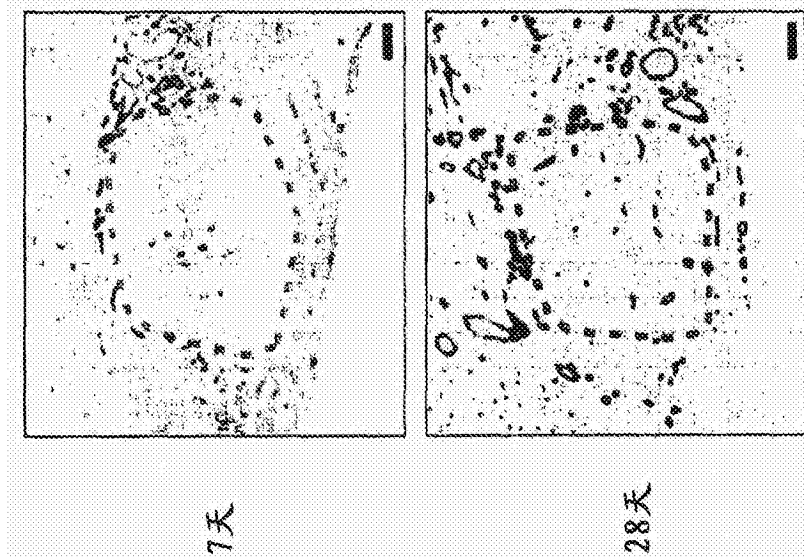


图11D