

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6522003号
(P6522003)

(45) 発行日 令和1年5月29日(2019.5.29)

(24) 登録日 令和1年5月10日(2019.5.10)

(51) Int.Cl.	F I
CO7D 241/46 (2006.01)	CO7D 241/46 CSP
GO1N 33/66 (2006.01)	GO1N 33/66 A
GO1N 33/483 (2006.01)	GO1N 33/66 B
	GO1N 33/483 C
	GO1N 33/483 F

請求項の数 15 (全 28 頁)

(21) 出願番号	特願2016-559436 (P2016-559436)	(73) 特許権者	591003013
(86) (22) 出願日	平成27年4月13日 (2015.4.13)		エフ. ホフマン-ラ ロシュ アーゲー
(65) 公表番号	特表2017-517480 (P2017-517480A)		F. HOFFMANN-LA ROCH
(43) 公表日	平成29年6月29日 (2017.6.29)		E AKTIENGESELLSCHAFT
(86) 国際出願番号	PCT/EP2015/057933		T
(87) 国際公開番号	W02015/158645		スイス・シーエイチ-4070バーゼル・
(87) 国際公開日	平成27年10月22日 (2015.10.22)		グレンツァーヘルストラッセ124
審査請求日	平成30年3月28日 (2018.3.28)	(74) 代理人	100140109
(31) 優先権主張番号	14164571.3		弁理士 小野 新次郎
(32) 優先日	平成26年4月14日 (2014.4.14)	(74) 代理人	100075270
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		弁理士 小林 泰
		(74) 代理人	100101373
			弁理士 竹内 茂雄
		(74) 代理人	100118902
			弁理士 山本 修

最終頁に続く

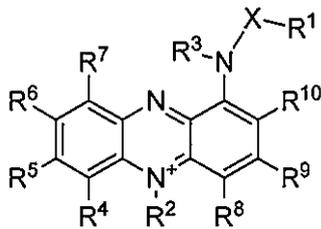
(54) 【発明の名称】 フェナジニウムメディエーター

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

構造 (I I)

【化1】



(II)

を含む化合物あるいはその塩または溶媒和物であって、
式中、

Xは、 $-C(=O)-$ 、 $-C(=S)-$ 、または $-S(=O)_2-$ であり、

R¹は、XがC(=O)である場合、少なくとも2つのC原子を含み、そしてXがC(=S)またはS(=O)₂である場合、少なくとも1つのC原子を含む有機側鎖であり、

R²は、少なくとも2つのC原子を含む有機側鎖であり、

R³は、Hまたは有機側鎖であり、

R¹、R²およびR³の少なくとも1つが、親水性側鎖であり、
 該親水性側鎖が、-C(=Y¹)-OH、-C(OH)R¹¹R¹²、-C(=Y¹)-
 R¹¹、-C(=Y¹)-Y²-R¹¹、-Y¹-R¹¹、-NH₂、-NHR¹¹、-
 NMe³⁺、-NH-C(=Y¹)-R¹¹、-S(O)R¹¹、-SO₂R¹¹、-S
 O₂-OH、-、-P(O)(OR¹¹)(OR¹²)-O-P(O)(OR¹¹)(OR¹²)、および-C(=O)-からなる群より選択される少なくとも1つの親水性官能基
 を含む側鎖であり；Y¹およびY²が独立にOまたはSより選択され、そしてR¹¹およ
 びR¹²が互いに独立に、Hおよび未置換または置換アルキルおよびアリールからなる群
 より選択され、そして
R⁴、R⁵、R⁶、R⁷、R⁸、R⁹およびR¹⁰は、互いに独立に、H；置換または未
 置換アルキル、シクロアルキル、アルケニル、シクロアルケニル、アルキニル、アリール
 、ヘテロシクロアルキル、ヘテロアリール、ハロゲン；-NO₂、-SO₃⁻-CN、-
 CH=CH-COOH、および-Y³-R¹³であり、Y³が-O-、-C(=O)-
 または-N(R¹⁴)-であり、R¹³およびR¹⁴が互いに独立に、未置換または置換
 アルキルおよびアリールからなる群より選択される、
 前記化合物。

10

【請求項2】

少なくとも1つの親水性官能基が、-C(=O)-または-C(=O)-OHである、
 請求項1記載の化合物。

【請求項3】

R¹が、X基のCまたはS原子に共有結合した、3～8のC原子の連続鎖を持つアルキ
 ルであり、OH、OPO₃²⁻、PO₃²⁻、SO₃⁻、およびCOO⁻より独立に選択
 される少なくとも1つの置換基を含む、請求項1または2記載の化合物。

20

【請求項4】

R²が構造-(CH₂)_n-CH₃を有し、

nは0～6の範囲である、請求項1～3のいずれか一項記載の化合物。

【請求項5】

前記nは、0、1、または2である、請求項1～4のいずれか一項記載の化合物。

【請求項6】

前記R²がエチルである、請求項1～5のいずれか一項記載の化合物。

30

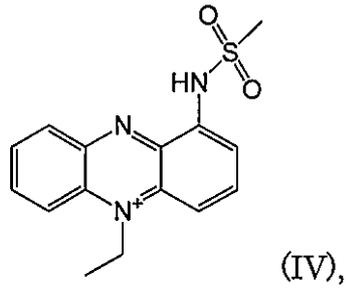
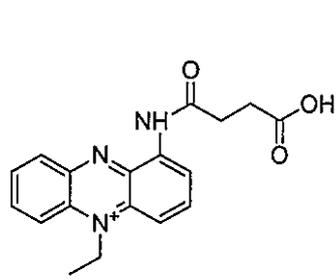
【請求項7】

R³、R⁴、R⁶、R⁷、R⁸、R⁹およびR¹⁰が-Hである、請求項1～6のい
 ずれか1項記載の化合物。

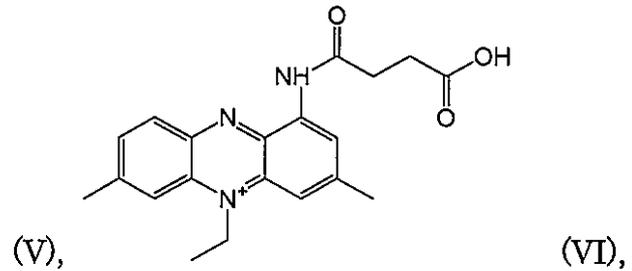
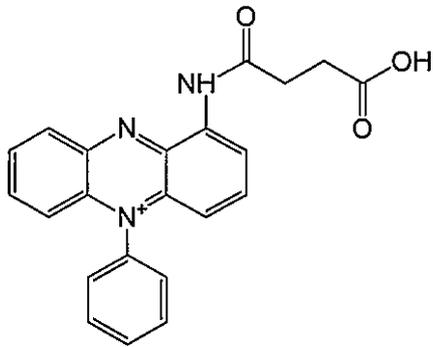
【請求項8】

以下の構造：

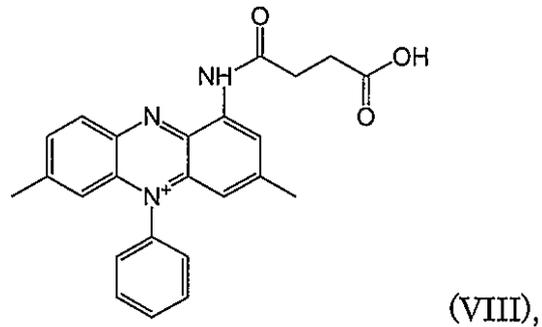
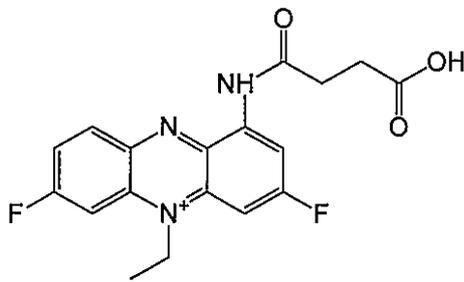
【化2】



10

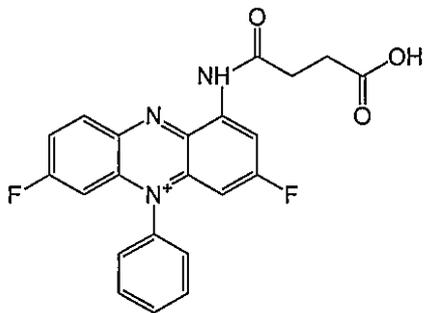


20



30

および



40

の1つを含む、またはこれらの1つからなる、化合物。

【請求項9】

請求項1～8のいずれか一項の化合物を含む、化学マトリックス。

【請求項10】

請求項1～8のいずれか一項の化合物および/または請求項9の化学マトリックスを含む、試験要素。

50

【請求項 1 1】

分析試験または診断試験における、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項記載の化合物の使用。

【請求項 1 2】

前記分析試験または診断試験が、試験試料中のグルコース濃度を決定することを含む、請求項 1 1 の使用。

【請求項 1 3】

請求項 9 記載の化学マトリックスを産生するため、請求項 1 0 記載の試験要素を産生するため、または試料中の分析物の量を決定するための、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項記載の化合物あるいはその塩または溶媒和物の使用。

【請求項 1 4】

試料中の分析物の量を決定するための方法であって、
 a) 試料と、請求項 9 記載の化学マトリックスを接触させ、
 b) 前記液体試料の存在下で、化学マトリックスから遊離するまたは化学マトリックスによって消費されるレドックス当量の量を概算し、そして
 c) それによって液体試料中の分析物の量を決定することを含む、前記方法。

10

【請求項 1 5】

前記工程 b) において、化学マトリックスから遊離するまたは化学マトリックスによって消費されるレドックス当量の量を、光学的または電気化学的センサーによって概算する、請求項 1 4 の方法。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、1 - アミノ - フェナジン誘導体である化合物あるいはその塩または溶媒和物、およびその使用に関する。本発明はさらに、前述の化合物を含む化学マトリックスおよび試験要素に関する。さらに、本発明は、試料中の分析物の量を決定するための方法であって、前記試料を、本発明記載の化学マトリックスに接触させ、前記液体試料の存在下で、化学マトリックスから遊離するまたは化学マトリックスによって消費される電子の量を概算し、そしてそれによって液体試料中の分析物の量を決定する工程を含む、前記方法に関する。

30

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0002】

医学的診断分野において、多くの場合、1 またはそれより多い分析物が、体液、例えば血液、間質液、尿、唾液または他のタイプの体液の試料において検出されなければならない。検出されるべき分析物の例は、グルコース、トリグリセリド、乳酸塩、コレステロールまたはこれらの体液中に典型的に存在する他のタイプの分析物である。分析物の濃度および/または存在によって、必要であれば適切な処理を選択することも可能である。

【0003】

一般的に、当業者に知られるデバイスおよび方法は、1 またはそれより多い試験化学を含む試験要素を利用し、該要素は、検出しようとする分析物の存在下で、1 またはそれより多い検出可能な検出反応、例えば光学的または電気化学的に検出可能な検出反応を実行することが可能である。これらの試験化学およびそれに関連する方法に関しては、例えば、J. Hoenesら (The Technology Behind Glucose Meters: Test Strips, Diabetes Technology & Therapeutics, Volume 10, Supplement 1, 2008, S-10~S-26)、US 2009/0246808 A1、および Habermuellerら ((2000), Fresenius J Anal Chem 366: 560) を参照することも可能である。グルコースの電気化学的検出に関しては、例えば、Heller & Feldman (2008), Che

40

50

m. Rev. 108: 2482に、概説が提供される。

【0004】

特に、分析物の電気化学的検出において、フェナジン誘導体は、酵素アッセイにおいて (GhoshおよびQuayle (1979), Anal Biochem 99: 112; Hisadaら (1981), J Appl Biochem 3: 535; Yomora (1989) Eur J Biochem 179: 293)、そして特に、補因子としてNADに依存する酵素アッセイにおいて、レドックスメディエーターとして提唱され、そして評価されてきており、これは、アジンメディエーターが、低い過電圧で使用可能であるためである (Cooneyら (2008), Energy Environ. Sci. 1: 320)。しかし、還元フェナジン誘導体は、低い溶解度を有し、そしてしたがって、測定に用いられる電極上で沈殿物を形成する傾向があり、これは再溶解が困難である (Inzelt & Puskas (2004), Electrochimica Acta 49: 969)。さらに、当該技術分野で記載されるフェナジンのレドックス電位は、例えば入院患者にしばしば投与されるアスコルビン酸塩のような化合物による、前記フェナジンの還元を可能にする範囲内にあり、これは、こうした患者の例えば血糖測定において、システム上のエラーを導く (Heller & Feldman, 同箇所)。

10

【0005】

したがって、当該技術分野において、還元状態であっても優れた溶解度を有し、そして薬剤として用いられる還元剤、特にアスコルビン酸塩による還元に対して耐性であるが、還元された補酵素と迅速な反応が可能である、フェナジン誘導体に関する要望がある。

20

【0006】

したがって、本発明の目的は、前述の必要性にしたがい、先行技術の欠点を少なくとも部分的に回避する、手段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】

【0007】

この問題は、本明細書に開示するような構造を含む化合物あるいはその塩または溶媒和物によって、前記化合物あるいはその塩または溶媒和物を含む化学マトリックスによって、前記化合物あるいはその塩または溶媒和物を含む試験要素によって、そして本明細書に開示するような、分析物の量を決定するための方法によって、解決される。分離された方式で、または任意の組み合わせで達成可能であるような好ましい態様は、従属する請求項に列挙され、そして本明細書に記載される。

30

【図面の簡単な説明】

【0008】

【図1】1 - (3 - カルボキシ - プロピオニルアミノ) - 5 - エチル - フェナジニウム (式 (III) の化合物) のサイクリックボルタモグラム。A: 緩衝液 pH 7.0 (ブランク電流)、B: 緩衝液中の 2 mM 1 - (3 - カルボキシ - プロピオニルアミノ) - 5 - エチル - フェナジニウム、C: 緩衝液中の 2 mM 1 - (3 - カルボキシ - プロピオニルアミノ) - 5 - エチル - フェナジニウム + 1.2 mM アスコルビン酸、D: 緩衝液中の 1.2 mM アスコルビン酸。

40

【図2A】A) アスコルビン酸干渉の用量反応曲線; -100 mV、pH 7.0でのクロノアンペロメトリー; 5 mM の 1 - (3 - カルボキシ - プロピオニルアミノ) - 5 - エチル - フェナジニウム、35 mM cNAD、および 1.5 kU/g グルコースデヒドロゲナーゼ (GDH) の溶液を、示すグルコース濃度でインキュベーションした。A: 0 mg/mL アスコルビン酸、B: 30 mg/mL アスコルビン酸、C: 100 mg/mL アスコルビン酸; 線形: 線形回帰;

【図2B】B) アスコルビン酸干渉の用量反応曲線; +650 mV、pH 7.0でのクロノアンペロメトリー; 5 mM 1 - (3 - カルボキシ - プロピオニルアミノ) - 5 - エチル - フェナジニウム、35 mM cNAD、および 1.5 kU/g グルコースデヒドロゲナーゼ (GDH) の溶液を、示すグルコース濃度でインキュベーションした。A: 0 mg

50

/ mL アスコルビン酸、B : 30 mg / mL アスコルビン酸、C : 100 mg / mL アスコルビン酸 ; 線形 : 線形回帰。

【図3】メディエーター配合物のポットライフ。ポットライフ実験において、メディエーター 1 - (3 - カルボキシ - プロピオニルアミノ) - 5 - エチル - フェナジニウムおよび 1 - (3 - カルボキシプロポキシ) - 5 - エチルフェナジニウムを比較した。1 - (3 - カルボキシ - プロピオニルアミノ) - 5 - エチル - フェナジニウム (A : 0 時間、B : 4 8 時間) および 1 - (3 - カルボキシプロポキシ) - 5 - エチルフェナジニウムのポットライフ (C : 0 時間、D : 4 8 時間) を示す。線形 : 線形回帰。

【図4】A) グルコース測定片中の 1 - (3 - カルボキシ - プロピオニルアミノ) - 5 - エチル - フェナジニウム (C P E P) および 1 - (3 - カルボキシプロポキシ) - 5 - エチルフェナジニウム (C E P E S) に関する用量反応曲線。アスコルビン酸塩の非存在下 (実線) およびアスコルビン酸塩の存在下 (点線) での 5 つの繰り返しに関する線形回帰直線を示す。1 - (3 - カルボキシ - プロピオニルアミノ) - 5 - エチル - フェナジニウムに関する R^2 は、アスコルビン酸塩の非存在下では 0 . 9 9 6 2 であり、そしてアスコルビン酸塩の存在下では 0 . 9 8 3 4 であった。1 - (3 - カルボキシプロポキシ) - 5 - エチルフェナジニウムに関する R^2 は、アスコルビン酸塩の非存在下では 0 . 9 7 2 8 であり、そしてアスコルビン酸塩の存在下では 0 . 9 9 9 であった。B) 低グルコース濃度でのグルコース測定片における 1 - (3 - カルボキシプロポキシ) - 5 - エチルフェナジニウム (C E P E S) でアスコルビン酸塩によって引き起こされる電流相殺 ; (A) におけるものと同じデータ、低グルコース濃度での C E P E S で測定された値の詳細な図。

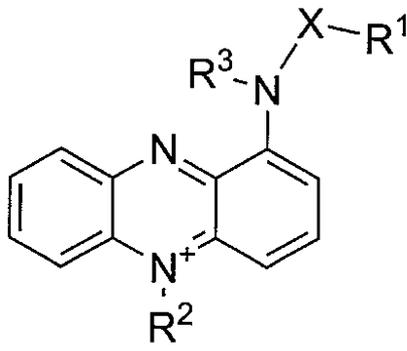
【発明を実施するための形態】

【0009】

したがって、本発明は、構造 (I)

【0010】

【化1】



【0011】

を含む化合物あるいはその塩または溶媒和物であって、式中、

X は、 $-C(=O)-$ 、 $-C(=S)-$ 、または $-S(=O)_2-$ であり、

R^1 は、X が $C(=O)$ である場合、少なくとも 2 つの C 原子を含み、そして X が $C(=S)$ または $S(=O)_2$ である場合、少なくとも 1 つの C 原子を含む有機側鎖であり、

R^2 は、少なくとも 2 つの C 原子を含む有機側鎖であり、

R^3 は、H または有機側鎖であり、そして

R^1 、 R^2 および R^3 の少なくとも 1 つが、親水性側鎖である、

前記化合物に関する。

【0012】

以下に使用する際、用語「有する」、「含む」または「含まれる」、あるいはその任意の文法的変形は、非排他的な方式で用いられる。したがって、これらの用語は、これらの用語によって導入される特徴に加えて、この背景において記載する実体において、さらなる特徴が存在しない状況、および 1 またはそれより多いさらなる特徴が存在する状況の両

方を指すことも可能である。例えば、表現「AはBを有する」、「AはBを含む」および「AにはBが含まれる」は、Bに加えて他の要素がAにまったく存在しない状況（すなわちもっぱらそして排他的にBからなる状況）、ならびにBに加えて、1またはそれより多いさらなる要素が実体A中に存在する、例えば要素C、要素CおよびDまたはさらにさらなる要素が存在する状況の両方を指すことも可能である。

【0013】

さらに、以下に使用する際、用語「好ましくは」、「より好ましくは」、「より好ましくは」、「詳細には」、「より詳細には」、「具体的には」、「より具体的には」、または類似の用語は、別の可能性を制限することなく、場合による特徴と組み合わせて用いられる。したがって、これらの用語によって導入される特徴は場合による特徴であり、そしていかなる方式でも、請求項の範囲を制限することは意図されない。本発明は、当業者が認識するであろうように、別の特徴を用いることによって、実行されることも可能である。同様に、「本発明の態様において」または類似の表現によって導入される特徴は、本発明の別の態様に関するいかなる制限も伴わず、本発明の範囲に関するいかなる制限も伴わず、そしてこうした方式で導入される特徴と本発明の他の場合によるまたは場合によらない特徴を組み合わせる可能性に関するいかなる制限も伴わず、場合による特徴であることが意図される。

10

【0014】

本明細書において、用語「化合物」、「塩」および「溶媒和物」は、化学者に知られる通常の意味で用いられる。本発明記載の化合物の正味荷電が陽性である場合、好ましい対イオンは、トリフルオロメタンスルホン酸（トリフレート）、硫酸、アルキルスルホン酸、トシル酸、リン酸、テトラフルオロホウ酸、ヘキサフルオロリン酸、トリフルオロ酢酸、過塩素酸、塩素または硝酸イオンである。本発明記載の化合物の正味荷電が陰性である場合、好ましい対イオンは、リチウム、ナトリウム、および/またはカリウムイオン、またはテトラメチルアンモニウムイオンである。好ましくは、本発明記載の化合物の正味荷電は、本明細書の別の箇所に明記するような標準的条件下での、水溶液中の化合物の正味荷電である。

20

【0015】

用語「側鎖」は、当業者によって理解され、そして本明細書に記載するような化合物のコア部分に共有結合する原子または化学基に関し、前記コア部分はまた、「主鎖」または「バックボーン」とも称される。好ましくは、側鎖は、本明細書の以下に記載するような、有機側鎖である。用語「置換」側鎖は、1またはそれより多い位、好ましくは1、2、または3つの位で置換されている側鎖に関し、ここで、置換基は、安定な化合物を生じる、任意の利用可能な原子で付着されていてもよい。当業者には、用語「場合によって置換された」側鎖は、未置換または置換側鎖に関する理解される。

30

【0016】

用語「有機側鎖」は、本明細書において、少なくとも1つの炭素原子を含む、任意の場合によって置換された、側鎖に関する。好ましくは、有機側鎖は、置換されていてもよい、アルキル、アルケニル、アルキニル、アリール、アラルキル、シクロアルキル、ヘテロシクロアルキル、またはヘテロアリール側鎖である。好ましくは、置換有機側鎖は、 $-COO^-$ 、 $=O$ 、 $-OH$ 、 $-CN$ 、ハロゲン、 $-NH_2$ 、 $-NH$ （アルキル）、 $-N$ （アルキル） $_2$ 、 $-N$ （アルキル） $_3^+$ 、 $-NH$ （アリール）、 N （アリール） $_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-O$ （アルキル）、 $-O-(CH_2)_n-OH$ 、 $-O-(CH_2)_n-O$ （アルキル）、 $-O$ （アラルキル）、 $-O$ （アリール）、 $-OPO_3^{2-}$ 、 $-PO_3^{2-}$ 、 $-OSO_3^-$ および $-SO_3^-$ より独立に選択される少なくとも1つの置換基で置換された、有機側鎖である。好ましくは、置換基のアルキル、アリールおよびアラルキル基は、アルキル、アルケニル、アルキニル、アリール、アラルキル、ヘテロシクロアルキル、またはヘテロアリール基を含む基によってさらに置換されない。より好ましくは、置換基のアルキル、アリール、およびアラルキル基は、さらに置換されない。

40

【0017】

50

用語「アルキル」は、本明細書において、少なくとも1つの炭素原子の少なくとも1つへの共有結合によって、主鎖に連結された、直鎖または分枝鎖飽和炭化水素に関する。好ましいアルキル基は、直鎖アルキル、例えば好ましくは、メチル、エチル、プロピル、ブチル、ペンチル、ヘキシル、ヘプチル、オクチル、ノニル、デシル、ウンデシル、ドデシル、または分枝鎖アルキル基、例えば好ましくは、

【0018】

【化2】

$-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$, $-\text{CH}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$, $-\text{C}(\text{CH}_3)_3$, $-\text{C}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$, $-\text{CH}(\text{CH}_3)(\text{CH}_2\text{CH}_3)$,

$-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$, $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)(\text{CH}_2\text{CH}_3)$, $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$, $-\text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$,

10

$-\text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$, $-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}(\text{CH}_3)(\text{CH}_2\text{CH}_3)$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$,

$-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)(\text{CH}_2\text{CH}_3)$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$,

$-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$, $-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$, または $-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}(\text{CH}_3)_2$

【0019】

である。したがって、アルキル基には、一級アルキル基、二級アルキル基、および三級アルキル基が含まれる。用語「シクロアルキル」は、好ましくは3～12の炭素原子を含む、閉環炭化水素基に関する。好ましいシクロアルキルは、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘプチル、およびシクロオクチルである。

20

【0020】

用語「アルケニル」側鎖は、少なくとも1つのC=C二重結合を含み、そして少なくとも2つの炭素原子の少なくとも1つへの共有結合によって、主鎖に連結されている、側鎖に関する。したがって、用語「アルキニル」側鎖は、少なくとも2つの炭素原子の少なくとも1つへの共有結合によって、主鎖に連結されている、少なくとも1つのC≡C三重結合を含む側鎖に関する。

【0021】

用語「シクロアルケニル」は、好ましくは5～12の炭素原子を含み、少なくとも1つのC=C二重結合を含み、そして少なくとも2つの炭素原子の少なくとも1つへの共有結合によって、主鎖に連結されている、閉環炭化水素基に関する。用語「シクロアルキニル」は、好ましくは8～12の炭素原子を含み、少なくとも1つのC≡C三重結合を含み、そして少なくとも2つの炭素原子の少なくとも1つへの共有結合によって、主鎖に連結されている、閉環炭化水素基に関する。

30

【0022】

本明細書において、用語「アルコキシ」側鎖は、好ましくは示す数の炭素原子を有する、-O-アルキル側鎖に関する。好ましくは、アルコキシ側鎖は、-O-メチル、-O-エチル、-O-プロピル、-O-イソプロピル、-O-ブチル、-O-sec-ブチル、-O-tert-ブチル、-O-ペンチル、-O-イソペンチル、-O-ネオペンチル、-O-ヘキシル、-O-イソヘキシル、または-O-ネオヘキシルである。

40

【0023】

用語「アリール」は、本明細書において、6～14炭素原子を有し、好ましくは1、2、または3の芳香環を含む、芳香環または環系に関する。好ましいアリール側鎖は、フェニル、ナフチル、アントラセニルおよびフェナントレニルである。用語「環」は、本発明の化合物の背景において、当業者によって理解される；したがって、用語「環系」は、少なくとも1つの共有結合を共有する少なくとも2つの環を含む化学構造に関する。したがって、好ましくは、「アリール」にはまた、シクロアルキルおよび/またはヘテロシクロアルキル環と融合した芳香族環系も含まれる。

【0024】

本明細書において、用語「アラルキル」は、少なくとも1つの水素がアリール側鎖によ

50

って置換されている、アルキル側鎖に関する。好ましくは、アラルキルはベンジルまたはフェネチルである。

【0025】

用語「ヘテロシクロアルキル」は、本明細書において、5～14環原子、好ましくは5～7環原子を有する飽和または部分的不飽和環または環系であって、少なくとも1つの環原子が、N、O、およびSからなる群より選択されるヘテロ原子であり、前記環または環系が前記環または環系のCまたはN原子への共有結合によって、主鎖に連結されている、前記環または環系に関する。好ましくは、ヘテロシクロアルキルは、アゼピニル、ジヒドロフリル、ジヒドロピラニル、イミダゾリジニル、イミダゾリニル、イソチアゾリジニル、イソキサゾリジニル、モルホリニル、オキサゾリジニル、ピペラジニル、ピペリジニル、ピラゾリジニル、ピロリジニル、テトラヒドロフリル、テトラヒドロピラニル、チアジアゾリジニル、チアゾリジニル、またはチモルホリニルである。

10

【0026】

本明細書において、用語「ヘテロアリール」は、5～14環原子、好ましくは5～7環原子を有する芳香環または環系であって、少なくとも1つの環原子が、N、O、およびSからなる群より選択されるヘテロ原子であり、前記環または環系が前記環または環系のCまたはN原子への共有結合によって、主鎖に連結されている、前記環または環系に関する。好ましくは、環あたり最大4、より好ましくは最大3、最も好ましくは最大2の環原子は、N、O、およびSからなるヘテロ原子の群から独立に選択される環原子である。好ましくは、ヘテロアリールは、ピリジニル、ピリダジニル、ピラジニル、キナオキサリル、インドリジニル、ベンゾ[b]チエニル、キナゾリニル、プリニル、インドリル、キノリニル、ピリミジニル、ピロリル、ピラゾリル、オキサゾリル、チアゾリル、チエニル、イソキサゾリル、オキサチアジアゾリル、イソチアゾリル、テトラゾリル、イミダゾリル、トリアゾリル、フラニル、ベンゾフリル、またはインドリルである。

20

【0027】

用語「親水性」は、当業者に知られ、そして極性溶媒、特に水の中に溶解するか、該溶媒と混合されるかまたは該溶媒によって湿らされる傾向を有する、化合物または化合物の部分の特性に関する。本発明の側鎖の背景において用いられる際、用語「親水性側鎖」は、好ましくは、 25 、 10^8 Pa、および $\text{pH} = 7$ の標準的条件下で、 2 、より好ましくは 1.5 、さらにより好ましくは 1 、最も好ましくは 0.8 のオクタノール/水係数 ($\log K_{ow}$) を有する、本明細書に明記されるような側鎖に関する。本明細書の背景において、側鎖 R^x (式中、 $x = 1, 2$, または 3) の $\log K_{ow}$ 値は、式 $H - R^x$ の化合物の $\log K_{ow}$ 値と同一であると仮定される。当業者は、化合物の $\log K_{ow}$ 値をどのように決定するか知っている。好ましくは、親水性側鎖は、 $-C(=Y^1)$ 、 $-OH$ 、 $-C(OH)R^{11}R^{12}$ 、 $-C(=Y^1) - R^{11}$ 、 $-C(=Y^1) - Y^2 - R^{11}$ 、 $-Y^1 - R^{11}$ 、 $-NH_2$ 、 $-NHR^{11}$ 、 $-NMe^3+$ 、 $-NH - C(=Y^1) - R^{11}$ 、 $-S(O)R^{11}$ 、 $-SO_2R^{11}$ 、 $-SO_2 - OH$ 、および $-P(O)(OR^{11})(OR^{12}) - O - P(O)(OR^{11})(OR^{12}) -$ からなる群より選択される少なくとも1つの親水性官能基を含み、 Y^1 および Y^2 は独立に、OまたはSより選択され、そして R^{11} および R^{12} は、互いに独立に、H、ならびに未置換または置換アルキルおよびアリールからなる群より選択される。より好ましくは、親水性側鎖は、 $C(=O) -$ および $-C(=O) - OH$ より選択される少なくとも1つの親水性官能基を含む。最も好ましくは、親水性側鎖は、前述の標準的条件下で、荷電、好ましくは陰性荷電を所持する、少なくとも1つの化学基を含む側鎖である。

30

40

【0028】

本明細書の構造式の背景において、側鎖 R^1 は、Xが $C(=O)$ である場合、少なくとも2つのC原子を含み、そしてXが $C(=S)$ または $S(=O)_2$ である場合、少なくとも1つのC原子を含む、有機側鎖である。好ましくは、側鎖 R^1 は、式(I)または(I')のX基のCまたはS原子に共有結合した3～20のC原子の連続鎖を含む、場合によって置換された、有機側鎖、好ましくはアルキルである。より好ましくは、側鎖 R^1 は、

50

式 (I) または (I I) の X 基の C または S 原子に共有結合した 3 ~ 8 の C 原子の連続鎖であり、OH、 OPO_3^{2-} 、 PO_3^{2-} 、 SO_3^- 、および COO^- より独立に選択される、少なくとも 1 つの置換基を含む、アルキルである。好ましくは、側鎖 R^1 は、化合物の第二の分子に、化合物の 1 つの分子を共有結合させるリンカー、好ましくはアルキルリンカー、より好ましくは未分枝アルキルリンカーであり、すなわち好ましくは、化合物は、2 つの分子がリンカーによって連結されている二量体である。本発明記載の好ましい二量体は、本明細書において、実施例に示され、特に、式 (X V I I)、(X V I I I)、(X I X)、または (X X) の 1 つに記載の構造を有する化合物である。好ましくは、前記リンカーは、少なくとも 3 つの C 原子、より好ましくは 3 ~ 20 の C 原子を有する。好ましくは、 R^1 の炭素原子の鎖は、1 またはそれより多い - N H C O - および / または - O - 実体によって中断され、ここで 2 つの - N H C O - 実体は最低限 1 つの C 原子によって分離され、そして - O - 実体は最低限 2 つの C 原子によって分離され；例えばより好ましくは、前記リンカーは、ポリグリシンおよび / またはポリエチレングリコール鎖を含む。場合によって、側鎖は、- O H 基によってさらに置換され、ここで - O H 基は、鎖の、場合による O 原子に連結している炭素原子には決して結合しない。

10

【 0 0 2 9 】

式 (I) および (I I) の背景において、X は C (= Y) であり、Y は O または S であるか、あるいは X は S (= O)₂ である。好ましくは、X は C (= O) である。したがって、式 (I) または (I I) の - X - R^1 は、好ましくは、フマリル、グルタリル、アジピル、または最も好ましくはスクシニルである。

20

【 0 0 3 0 】

本明細書の構造式の背景において、側鎖 R^2 は、少なくとも 2 つの C 原子を含む有機側鎖である。好ましくは、側鎖 R^2 は、場合によって、置換アルキル、アリール、またはアラキルであり、 R^2 の背景において、前述の有機側鎖に関する好ましい置換基は、- O H、 OPO_3^{2-} 、 PO_3^{2-} 、 SO_3^- 、そして最も好ましくは COO^- である。より好ましくは、 R^2 は、構造 - (C H₂)_n - C H₃ を有し、n は 0 ~ 6 の範囲内であり、さらにより好ましくは n は 0、1 または 2 であり；最も好ましくは、 R^2 はエチルである。好ましくは、 R^2 の炭素原子の鎖は、1 またはそれより多い - N H C O - および / または - O - 実体によって中断され、ここで 2 つの - N H C O - 実体は最低限 1 つの C 原子によって分離され、そして - O - 実体は最低限 2 つの C 原子によって分離され；例えばより好ましくは、前記リンカーは、ポリグリシンおよび / またはポリエチレングリコール鎖を含む。場合によって、側鎖は、- O H 基によってさらに置換され、ここで - O H 基は、鎖の、場合による O 原子に連結している炭素原子には決して結合しない。別の好ましい態様において、 R^2 は、場合によって置換された、アリールであり；より好ましくは R^2 はフェニルである。

30

【 0 0 3 1 】

本明細書の構造式の背景において、側鎖 R^3 は、本明細書における上述のような側鎖である。好ましくは、 R^3 は H である。

本発明の化合物において、 R^1 、 R^2 、および R^3 の少なくとも 1 つ、好ましくは R^1 および R^2 の少なくとも 1 つは、本明細書の上記に明記されるような親水性側鎖である。好ましくは、 R^1 、 R^2 、および R^3 の少なくとも 2 つが親水性側鎖であり、より好ましくは、少なくとも R^1 および R^2 が親水性側鎖であるか、または R^2 および R^3 が親水性側鎖である。好ましくは、側鎖 R^1 、 R^2 、および R^3 は、本発明記載の化合物の溶解度が、少なくとも 15 mmol / L、より好ましくは少なくとも 25 mmol / L、最も好ましくは少なくとも 50 mmol / L であるように選択され、ここで、溶解度は、好ましくは、標準的条件下で、より好ましくは、本明細書の別の箇所に明記するような標準的条件下で、水中で決定される溶解度である。

40

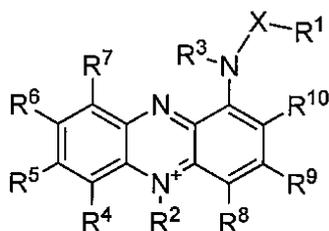
【 0 0 3 2 】

好ましくは、化合物あるいはその塩または溶媒和物は、構造 (I I)

【 0 0 3 3 】

50

【化3】



10

(II)

【0034】

式中、 R^4 、 R^5 、 R^6 、 R^7 、 R^8 、 R^9 および R^{10} は、互いに独立に、H；置換または未置換アルキル、シクロアルキル、アルケニル、シクロアルケニル、アルキニル、アリール、ヘテロシクロアルキル、ヘテロアリール、ハロゲン； $-NO_2$ 、 $-SO_3^-$ 、 $-CN$ 、 $-CH=CH-COOH$ 、および $-Y^3-R^{13}$ からなる群より選択され、 Y^3 は $-O-$ 、 $-C(=O)-$ または $-N(R^{14})-$ であり、 R^{13} および R^{14} は互いに独立に、未置換または置換アルキルおよびアリールからなる群より選択される
20
を有する。好ましくは、 R^5 および/または R^9 は、アルキルまたはシクロアルキルである。より好ましくは、 R^5 および/または R^9 は、 $-H$ 、メチル、 $-F$ 、 $-Cl$ 、 $-C(=O)-$ 、 $-NO_2$ 、 $-SO_3^-$ 、 $-CN$ 、または $-CH=CH-COOH$ である。最も好ましくは、 R^4 、 R^5 、 R^6 、 R^7 、 R^8 、 R^9 および R^{10} は $-H$ である。

【0035】

より好ましくは、化合物あるいはその塩または溶媒和物は構造(II)を有し、
 R^3 、 R^4 、 R^6 、 R^7 、 R^8 、および R^{10} がHであり；
Xが $C=O$ であり；そして
 R^1 および/または R^2 が、好ましくは陰性荷電基、より好ましくは COO^- 、 SO_3^- 、 $-OPO_3^{2-}$ 、または PO_3^{2-} を含む、親水性アルキル、アリールまたはアラルキ
30
ル側鎖である。

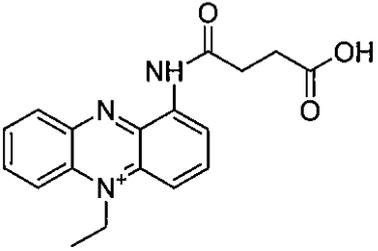
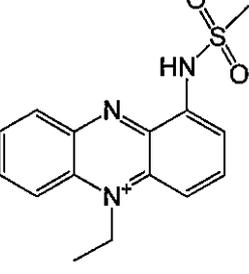
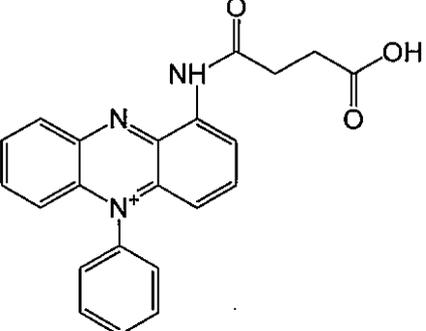
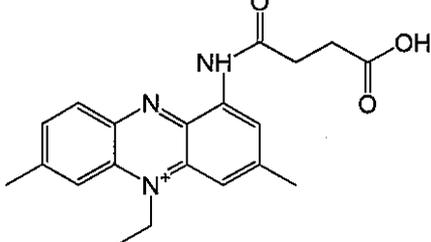
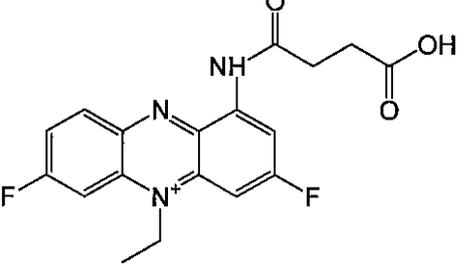
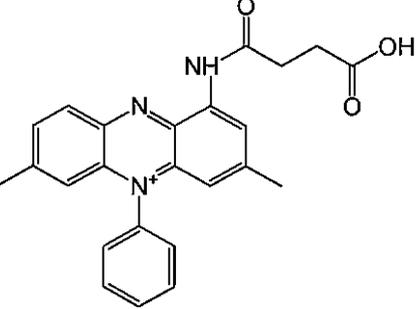
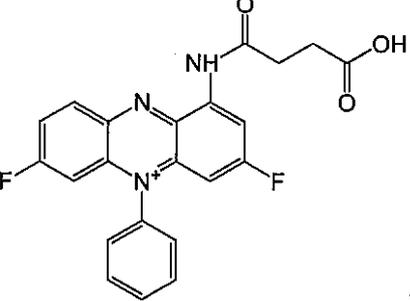
【0036】

さらにより好ましくは、化合物あるいはその塩または溶媒和物は、表1に示すような式より選択される式の構造を有する。

表1：本発明の好ましい化合物。

【0037】

【表 1】

 <p style="text-align: center;">(III)</p>	 <p style="text-align: center;">(IV)</p>	10
 <p style="text-align: center;">(V)</p>	 <p style="text-align: center;">(VI)</p>	20
 <p style="text-align: center;">(VII)</p>	 <p style="text-align: center;">(VIII)</p>	30
 <p style="text-align: center;">(IX)</p>		40

【0038】

最も好ましくは、化合物あるいはその塩または溶媒和物は、式(III)の構造を有する。

好適には、本発明の根底にある研究において、1-アミノ-フェナジン化合物に、かさばる(バルキー(bulky))側鎖を付加すると、生物学的試料中に潜在的に存在する還元剤、例えばアスコルビン酸塩とのレドックス反応を前記化合物が受ける傾向が減少し、そして前記効果は、前記のかさばる側鎖が、式(I)および(II)のR¹、R²、およびR³と示される位の少なくとも1つに導入された場合に最も顕著であることが見出された。さらに、化合物の溶解度、特に還元の際に沈殿する傾向は、式(I)および(II)のR¹、R²、およびR³と示される位の少なくとも1つに、少なくとも1つの親水

性側鎖を含めることによって改善されうることを見出された。さらに、前述の構造の1つを有する化合物は、化学マトリックス中に含まれた際、半年以上安定であることを見出された。前述の効果はすべて、かさばる、そして陰性に荷電した側鎖を用いた際に、最も顕著であった。理論によって束縛されることは望ましくないが、側鎖の陰性に荷電した基はまた、陽性に荷電したフェナジニウム環と相互作用可能であり、これは酸化型の安定を生じうる。

【0039】

上記の定義は、変更すべき所は変更して、以下にも当てはまる。以下にさらに行う、さらなる定義および説明もまた、変更すべき所は変更して、本明細書に記載するすべての態様に対して当てはまる。

【0040】

本発明はさらに、本発明の化合物を含む化学マトリックスに関する。

用語「化学マトリックス」は当業者に知られる。好ましくは、本発明の化学マトリックスは、本発明の化合物に加えて、本明細書の以下に記載するようなオキシドレダクターゼおよびレドックス補因子を含む。当業者には、組成物が、さらなる構成要素、例えば好ましくは緩衝剤構成要素（例えばリン酸緩衝生理食塩水、T r i s 緩衝液、クエン酸緩衝液、グリセリンリン酸緩衝液、またはG o o d 緩衝液のもの）または本明細書の以下に明記するような構成要素を含む、他の塩、界面活性剤等を含むことも可能であることが理解される。

【0041】

本発明記載の化学マトリックスは、好ましくは、溶媒または溶媒混合物中にまず、本発明の組成物の構成要素を溶解することによって提供されうる。より好ましくは、前記溶媒または溶媒混合物は、続いて、適切な処理によって、残りの組成物が本質的に前記溶媒または溶媒混合物を含まないように、除去される。本発明によって好ましく想定されるような適切な処理には、熱処理、蒸発技術、凍結乾燥等が含まれる。好ましくは、想定される処理は熱処理であり、そして特に、以下の条件下の熱処理：熱循環を伴う、約60 またはそれより高いおよそ20~45分間の、あるいは約95 でおよそ1~2分間の熱処理；20~200マイクロメートルまたはそれ未満の化学マトリックスの厚み；1パールまたは0.1パールの圧の条件下での熱処理である。さらに、乾燥状態で化学マトリックスを維持するため、保存は、好ましくは、除湿剤、すなわち乾燥剤（d e s i c c a n t ）の存在下で行われることが理解されるであろう。適切な除湿剤は、好ましくは、シリカゲル、ゼオライト、炭酸カルシウムまたは硫酸マグネシウムを含む。

【0042】

用語「オキシドレダクターゼ」は、本明細書において、レドックス当量としての水素化物（ H^- ）を、本明細書の別の箇所に言及するようなレドックス補因子に、または該補因子からトランスファーすることによって、好ましくは特異的な、基質の酸化または還元を触媒することが可能なポリペプチドを指す。好ましくは、オキシドレダクターゼは、デヒドロゲナーゼ、すなわちレドックス当量としての水素化物（ H^- ）を、アクセプター分子に、好ましくは本明細書の別の箇所に言及するようなレドックス補因子にトランスファーすることによって、基質の酸化を触媒することが可能なポリペプチドである。本発明によって想定されるデヒドロゲナーゼは、好ましくは、レドックス補因子（または時に補酵素とも称される）、例えばピロロキノリンキノン（P Q Q）またはその誘導体、ニコチンアミド - アデニン - ジヌクレオチド（N A D）またはその誘導体、あるいはフラビン補因子、例えばフラビン - アデニン - ジヌクレオチド（F A D）またはフラビンモノヌクレオチド（F M N）、またはその誘導体に依存するものである。好ましいデヒドロゲナーゼは、特に、乳酸デヒドロゲナーゼ（E C 番号1.1.1.27または1.1.1.28）、グルコースデヒドロゲナーゼ（以下を参照されたい）、アルコールデヒドロゲナーゼ（E C 番号1.1.1.1または1.1.1.2）、L - アミノ酸デヒドロゲナーゼ（E C 番号1.4.1.5）、グリセロールデヒドロゲナーゼ（E C 番号1.1.1.6）、リンゴ酸デヒドロゲナーゼ（E C 番号1.1.1.37）、3 - ヒドロキシ酪酸デヒドロゲナー

10

20

30

40

50

ゼ（EC番号1.1.1.30）、またはソルビトールデヒドロゲナーゼ（EC番号1.1.1.14）である。

【0043】

より好ましくは、前記オキシドレダクターゼは、グルコースデヒドロゲナーゼである。最も好ましくは、前記グルコースデヒドロゲナーゼは：グルコースデヒドロゲナーゼ（EC番号1.1.1.47）、キノプロテイングルコースデヒドロゲナーゼ（EC番号1.1.5.2）、特に、ピロロキノリンキノン（PQQ）依存性グルコースデヒドロゲナーゼ（EC番号1.1.5.2）、グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ（EC番号1.1.1.49）、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド（NAD）依存性グルコースデヒドロゲナーゼ（EC番号1.1.1.119）およびフラビンアデニンジヌクレオチド（FAD）依存性グルコースデヒドロゲナーゼ（EC番号1.1.99.10）またはその酵素的に活性である突然変異体からなる群より選択される。

10

【0044】

前述の酵素の酵素的に活性である突然変異体は、先に引用されるような先行技術における前述の野生型酵素に関して報告されるアミノ酸配列由来の1またはそれより多いアミノ酸を置換するか、該配列に付加するかまたは該配列から欠失させることによって得られる。好ましい突然変異体は、US7,132,270またはUS7,547,535に開示されるように、野生型対応物と比較して、改善された基質特異性を有するPQQ依存性グルコースデヒドロゲナーゼの突然変異体である。どちらの文書も、突然変異体に関して、本明細書に援用される。さらなる突然変異体は、Baikら（Baik 2005, Appl Environ Microbiol 71: 3285）、Vasquez-Figueraら（Vasquez-Figuera 2007, Chem BioChem 8: 2295）、およびWO2005/045016に開示されるものである。

20

【0045】

本発明にしたがって好ましいのは、本明細書に援用されるWO2009/103540 A1（p.21）またはEP1660648に開示される、少なくともアミノ酸位96、170および/または252に突然変異を有する、グルコースデヒドロゲナーゼ（EC.1.1.1.47）突然変異体である。これらのアミノ酸位で想定される好ましい突然変異は、Glu96Gly、Glu170ArgまたはLysおよび/またはLys252Leuの置換であり、組み合わせGlu170Lys/Lys252Leuがより好ましい。最も好ましくは、前記突然変異は、枯草菌（Bacillus subtilis）由来のグルコースデヒドロゲナーゼにおける突然変異Glu170ArgおよびGln252Leuである。

30

【0046】

用語「レドックス補因子」は、本明細書において、レドックス活性フラビン、ニコチンアミドまたはピロロキノリンキノン（PQQ）補酵素に関する。当業者は、選択されるオキシドレダクターゼに応じて、適切に前述の補酵素の1つを選択する方法を知っている。好ましくは、フラビン、ニコチンアミドまたはPQQ補酵素は、フラビンアデニンジヌクレオチド（FAD）、フラビンモノヌクレオチド（FMN）、またはPQQ、あるいは前記化合物の1つの誘導体である。より好ましくは、フラビン、ニコチンアミドまたはPQQ補酵素は、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド（NAD⁺）、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリリン酸（NADP⁺）、またはその誘導体である。好ましいNAD⁺またはNADP⁺誘導体は、安定化されたNAD⁺またはNADP⁺誘導体、すなわち、好ましくは炭素環式誘導体であり、これには、より好ましくは、例えば好ましくは、Slama（Biochemistry 27: 183（1988））、Hutchinsonら（Chem. Comm. 24: 2765（1996））、US5,801,006、WO98/33936、WO01/49247およびWO2007/012494に開示されるような、カルバNAD⁺またはカルバNADP⁺が含まれる。最も好ましくは、レドックス補因子は、NAD⁺、NADP⁺、カルバNAD⁺、またはカルバNADP⁺である。

40

50

【0047】

用語「レドックス当量」は、本明細書において、当業者に周知のレドックス化学において一般的に用いられる概念に関する。好ましくは、該用語は、オキシドレダクターゼの基質からレドックス補因子に、そして/または前記レドックス補因子からレドックスメディエーターに、そして/または前記レドックスメディエーターから指示剤化合物および/または電極に、トランスファーされる電子に関する。

【0048】

本発明の化学マトリックスの好ましい態様において、前記組成物はさらに、少なくとも1つの界面活性剤、膨張剤、フィルム形成剤、および/または固形粒子を含む。本発明の組成物で用いられるべき適切な安定化剤、界面活性剤、膨張剤、フィルム形成剤、酸化剤、および/または固形粒子は、当業者に知られる。好ましくは、前記の少なくとも1つの界面活性剤は：ナトリウム-N-メチル-N-オレオイルタウラット (Sodium-N-methyl-N-oleoyltaurate)、N-オクタノイル-N-グルカミド、メガ8 (N-メチル-N-オクタノイルグルカミド)、スルホコハク酸ジオクチルナトリウム (DON'S)、Rhodapex (登録商標) (好ましくはCO-433またはCO-436) からなる群より選択される。好ましくは、前記の少なくとも1つの膨張剤は：メチルビニルエーテル無水マレイン酸コポリマー、キサンタンガムおよびメチルビニルエーテルマレイン酸コポリマーからなる群より選択される。好ましくは、前記の少なくとも1つのフィルム形成剤は：ポリビニルプロピオン酸分散物、ポリビニルエステル、ポリ酢酸ビニル、ポリアクリル酸エステル、ポリメタクリル酸、ポリビニルアミド、ポリアミド、ポリスチレンからなる群より選択され、そしてまたブタジエン、スチレンまたはマレイン酸エステルなどの混合ポリメリセート (polymerisate) もまた適切である。好ましくは、前記の少なくとも1つの固形粒子は：シリカ粒子、特に二酸化ケイ素、ケイ酸ナトリウムまたはケイ酸アルミニウム、珪藻土、酸化金属、特に酸化チタンおよび/または酸化アルミニウム、合成酸化物物質、特に酸化物物質のナノ粒子、例えば二酸化ケイ素、酸化アルミニウム、または酸化チタンのナノ粒子、カオリン、粉末ガラス、アモルファスケイ素、硫酸カルシウム、および硫酸バリウムからなる群より選択される。

【0049】

さらに、本発明は、本発明の化合物および/または本発明の化学マトリックスを含む試験要素に関する。

用語「試験要素」は、本明細書において、試験化学組成物、好ましくは乾燥試験化学組成物を、固体支持体上に含む装置に関する。好ましくは、試験化学組成物は、本明細書の以下に記載するような試験野において含まれる。やはり好ましくは、試験要素は、さらに、毛細管作用によって液体を取り込みそして/または、好ましくは試験野に、輸送するように適応させた、毛細管要素をさらに含む。好ましくは、試験要素は、光学的試験要素および電気化学試験要素から選択される。穿孔 (puncture) 動作、試料採取動作、または穿刺 (lancing) 動作を行い、それによって、皮膚表面に切開を生成するために、試験要素は、場合によって、好ましくは試験野に関して移動可能であるように搭載されていてもよい、少なくとも1つの穿孔要素、例えば穿刺要素をさらに含むことも可能である。好ましくは、試験野は、穿孔、試料採取または穿刺動作中、固定された位置に留まり、ここで、例えば毛細管作用によって、そして/または穿孔、試料採取または穿刺動作の後に、穿孔要素またはその一部を試験野上に押しつけることによって、体液試料を試験野上にトランスファーする。好ましくは、試験要素は、試験片、試験テープ、または試験ディスクである。

【0050】

用語「試験野」は、好ましくは少なくとも1つのキャリアーによって、例えば少なくとも1つのキャリアーフィルムによって保持される、試験化学組成物の連続または不連続量に関する。したがって、試験化学は、試験野の1またはそれより多いフィルムまたは層を形成するかまたはこれらにおいて構成されてもよく、そして/または試験野は、1またはそれより多い層を有する層セットアップを含んでもよく、ここで、層の少なくとも1つが

10

20

30

40

50

試験化学を含む。したがって、試験野は、キャリアー上に配置された層セットアップを含むことも可能であり、ここで、少なくとも1つの適用側から、例えば試験野の縁から、そして/または試験野の適用表面から、体液試料を層セットアップに適用することも可能である。好ましくは、試験野は、多層セットアップを有し、多層セットアップは、少なくとも1つの試験物質を有する少なくとも1つの検出層を含み、そして体液中に含有される少なくとも1つの特定の構成要素を分離するように適応された少なくとも1つの分離層をさらに含み、ここで、分離層は、検出層および毛細管要素の間に位置する。当業者には、体液および試験野の間の場合によって存在するすべての層が、少なくとも分析物の通過を可能にするように選択されることが理解される。

【0051】

好ましくは、試験要素は光学的試験要素であり、すなわち分析物の存在下で、少なくとも1つの光学的特性を変化させるように適応された試験要素である。より好ましくは、試験要素中に含まれる少なくとも1つの化学マトリックスは、分析物の存在下で、少なくとも1つの光学的に検出可能な検出反応を実行する。さらにより好ましくは、検出反応はレドックス反応である。最も好ましくは、検出反応は、中間体および/または産物として、レドックス当量および/または電子を産生する。好ましくは、検出反応によって産生される光学的に検出可能なシグナルは、試料中の分析物の量および/または濃度に比例する。

【0052】

好ましくは、分析物の存在下で少なくとも1つの光学的特性を変化させるように適応された試験要素、好ましくは前記試験要素中に含まれる化学マトリックスは、上に詳述する構成要素に加えて、レドックス当量の存在下で、少なくとも1つの光学的特性を変化させる少なくとも1つの指示剤試薬を含む。用語「指示剤試薬」は、本明細書において、好ましくは、本発明の酵素の活性に依存して、好ましくは比例して、少なくとも1つの光学的特性を変化させる化合物に関する。好ましくは、指示剤試薬は、少なくとも1つの酵素または化学マトリックス中に含まれる酵素が分析物と反応した際に、少なくとも1つの光学的に検出可能な特性変化を実行する、光学的指示剤物質である。したがって、少なくとも1つの指示剤試薬は、好ましくは、少なくとも1つの酵素および分析物の酵素反応の指標となる、光学的特性の変化を実行する、1またはそれより多い色素を含む。

【0053】

用語「光学的特性」は、本明細書において、光学的装置によって検出可能な特性に関する。具体的には、光学的特性は：反射特性、透過特性、発光特性、散乱特性、蛍光特性、燐光特性、回折特性、および偏光特性からなる群より選択される少なくとも1つの特性であってもよいし、またはこうした特性を含んでもよい。好ましくは、本明細書に言及される光学的特性は、光学的に検出可能である指示剤試薬の特性、例えば光吸収、光放出、光緩和 (r e m i s s i o n)、またはそれらに関連する特性を指す。本明細書において、少なくとも1つの光学的特性のこうした変化は、以前は検出可能ではなかった特性の存在の検出、以前は検出されていた特性の非存在の検出、および特性の量的変化の検出、すなわち少なくとも1つの光学的特性の変化の度合いに関連するシグナル強度の変化の検出を含むと理解されるであろう。本発明によって想定される好ましい光学的特性は、色、蛍光、発光、または屈折率測定である。化学マトリックス中で検出されることが望ましい光学的特性に応じて、当業者は、適切な指示剤試薬を、さらなる面倒を伴わずに選択することが可能である。上に定義するような光学的特性を、測定値として読み取り可能な物理的シグナルに変換する方法は、当該技術分野に周知であり、そして例えばEP0821234、EP0974303、およびUS2005/0023152に記載される。

【0054】

本発明記載の指示剤試薬の光学的特性は、本発明の酵素の活性に応じて変化する。したがって、好ましくは、光学的特性の変化は、酵素が検出反応を触媒する場合にのみ起こる。より好ましくは、光学的特性の変化は、化学マトリックス中に存在する酵素によって起こる触媒周期の数に比例する。したがって、最も好ましくは、光学的特性の変化は、酵素によって変換される分析物分子の数に比例する。

10

20

30

40

50

【0055】

より好ましくは、試験要素は、電気化学的試験要素である。したがって、試験要素は、好ましくは、本明細書の以下に明記するような、化学マトリックスに直接または間接的に接触している少なくとも2つの電極を含む。適切な電極、電極セットアップ、および操作様式は、当業者に知られ、そして例えばWO2007/071562A1、WO2014/001382A1、US2005/0023152、およびそれらに引用される参考文献に記載される。さらに、本発明によって、化学マトリックスには、分析物と反応して、試料液中の分析物の存在を示す電気化学シグナルを生じる、1またはそれより多い化学的試薬が含まれることが想定される。好ましくは、分析物と反応して、試料液中の分析物の存在を示す電気化学シグナルを生じる、1またはそれより多い化学的試薬は、本発明の化合物を含む。より好ましくは、分析物と反応して電気化学的シグナルを生じる化学的試薬は、本発明の化合物に加えて、本明細書の上記のような少なくとも1つのオキシドレダクターゼをさらに含む。最も好ましくは、分析物と反応して電気化学的シグナルを生じる化学的試薬は、本発明の化合物および少なくとも1つのオキシドレダクターゼに加えて、本明細書の上に記載するような少なくとも1つのレドックス補因子をさらに含む。好ましくは、電気化学的特性には、分析物の濃度の指標となる、電流測定（アンペロメトリック）または電量測定（クーロメトリック）反応が含まれる。例えば、米国特許第5,108,564号、第4,919,770号および第6,054,039号を参照されたい。

10

【0056】

好ましくは、電気化学試験要素は、前記試験要素中に含まれる化学マトリックスと接触する少なくとも2つの電極、または前記試験化学に伝導的に連結された接触手段を含む。好ましくは、化学マトリックスに伝導的に連結された手段は、前記層を通じて、レドックス補因子および/またはレドックスメディエーターの拡散を可能にする化学マトリックスに連結された試験片の層である。より好ましくは、化学マトリックスに伝導的に連結された手段は、少なくとも部分的に前記化学マトリックスの上層および/または下層に置かれて、前記層を通じたレドックス補因子および/またはレドックスメディエーターの拡散を可能にする、試験片の層である。

20

【0057】

本発明記載の電気化学特性は、本発明のオキシドレダクターゼの活性に応じて変化する。したがって、好ましくは、電気化学特性の変化は、オキシドレダクターゼが検出反応を触媒する場合にのみ起こる。より好ましくは、光学的特性の変化は、化学マトリックスに存在するオキシドレダクターゼによって起こる触媒周期の数に比例する。したがって、最も好ましくは、光学的特性の変化は、オキシドレダクターゼによって変換される分析物分子の数に比例する。

30

【0058】

本発明はまた、液体試料中の分析物の量を決定するためのデバイスであって、本発明の化合物および/または本発明記載の試験要素を含む、前記デバイスにも関する。好ましくは、デバイスは、光学的小および/または電気化学的センサーをさらに含む。

【0059】

さらに、本発明は、分析試験または診断試験における、本発明記載の化合物の使用に関する。

40

好ましくは、分析試験または診断試験は、光学的または電気化学的手段によって検出可能である任意の生物学的または化学的分析物の定性および/または定量的決定を含む。好ましくは、分析物は、被験体の試験試料に、より好ましくは体液の試験試料に含まれる。より好ましくは、分析試験または診断試験は、試験試料中のグルコース濃度を決定する工程を含む。最も好ましくは、分析試験または診断試験は、糖尿病を患うかまたは糖尿病を患うと推測される被験体由来の試験試料中のグルコース濃度を決定する工程を含む。やはり好ましくは、分析試験または診断試験は、好ましくは糖尿病を患うかまたは糖尿病を患うと推測される被験体において、血中グルコース濃度を監視するための試験である。分析試験または診断試験は、好ましくは、*in vitro*試験である。

50

【0060】

用語「分析物」は、本明細書において、体液中に存在する化合物に関する。好ましくは、分析物は小分子であり、すなわち好ましくは、分析物は生物学的巨大分子ではない。より好ましくは、分析物は有機分子であり、最も好ましくは本発明記載の試験化学の存在下で、レドックス反応を経ることが可能な有機分子である。好ましくは、分析物は被験体の代謝の分子である。やはり好ましくは、分析物は、低分子量化合物、より好ましくは1000u(1000Da; 1.66×10^{-24} kg)未満の分子量を持つ化合物である。より好ましくは、分析物は、リンゴ酸塩、エタノール、アスコルビン酸、コレステロール、グリセロール、尿素、3-ヒドロキシ酪酸塩、乳酸塩、ピルビン酸塩、トリグリセリド、ケトン、肝臓パラメータ、クレアチニン、HDL等からなるリストより選択され；より好ましくは分析物は血中グルコースである。

10

【0061】

本明細書において、用語「被験体」は、脊椎動物に関する。好ましくは、被験体は、哺乳動物、より好ましくは、マウス、ラット、ネコ、イヌ、ハムスター、モルモット、ヒツジ、ヤギ、ブタ、ウシ、またはウマである。さらにより好ましくは、被験体は霊長類である。最も好ましくは、被験体はヒトである。好ましくは、被験体は、少なくとも1つの分析物の正常値からの測定可能な逸脱と関連する疾患または状態に罹患しているかまたは罹患したと推測される。より好ましくは、被験体は糖尿病に罹患している。好ましくは、被験体は、好ましくは全身性の、還元剤での治療、好ましくはアスコルビン酸塩(ビタミンC)での治療を受けている。

20

【0062】

本明細書において、用語「体液」は、本発明の分析物を含むことが知られるかまたは含むと推測される被験体のすべての体液に関し、これには、血液、血漿、血清、涙液、尿、リンパ液、脳脊髄液、胆汁、糞便、汗、間質液、および唾液が含まれる。好ましくは、体液は血液、血漿または血清である。

【0063】

用語「試験試料」は、当業者によって理解され、そして被験体の組織の、または好ましくは体液の任意の適切なサイズの部分に関する。体液試験試料は、例えば静脈または動脈穿刺、上皮穿刺等を含む、周知の技術によって得られうる。

【0064】

用語「糖尿病」または「真性糖尿病」は、本明細書において、グルコース代謝が損なわれている疾患状態を指す。前記障害は高血糖を生じる。世界保健機構(WHO)によると、糖尿病は、4つのクラスに細分されうる。1型糖尿病はインスリン欠如によって引き起こされる。インスリンは、いわゆる膵島細胞によって産生される。前記細胞は、1型糖尿病において、自己免疫反応によって破壊されうる(1a型)。さらに、1型糖尿病はまた、特発性変形も含む(1b型)。2型糖尿病は、インスリン耐性によって引き起こされる。3型糖尿病は、現在の分類によれば、真性糖尿病のすべての他の特定のタイプを含む。例えば、ベータ細胞が、インスリン産生に影響を及ぼす遺伝的欠陥を有する可能性もあるし、インスリン耐性が遺伝的に引き起こされる可能性もあるし、あるいはこうしたものとして膵臓が破壊されるかまたは損なわれる可能性もある。さらに、ホルモン制御解除または薬剤もまた、3型糖尿病を引き起こしうる。4型糖尿病は妊娠中に起こりうる。好ましくは、本明細書において、糖尿病は、1型糖尿病、またはより好ましくは2型糖尿病を指す。ドイツ糖尿病協会によれば、糖尿病は、絶食状態での 110mg/dl より高い血漿グルコースレベル、または食後、 220mg/dl より高い血漿グルコースレベルのいずれかによって診断される。本発明の分析試験または診断試験と組み合わせて、またはこれらに加えて使用可能である、糖尿病を診断するためにさらに好ましい診断技術は、当該技術分野に周知であり、そしてStedmanまたはPschyremblなどの医学の標準的教科書に記載される。

30

40

【0065】

糖尿病において、例えば食事後の高血糖を回避し、そして/またはこれに対して対策を

50

取るか、あるいは例えばインスリン投与後の、低血糖を回避し、そして/またはこれに対して対策を取るため、血中グルコースレベルを定期的にチェックしなければならないことが、当業者には理解される。したがって、本発明はまた、血中グルコースレベルを決定するため、より好ましくは高血糖、低血糖、または正常グルコースレベルを診断するために使用するための、本発明の化合物にも関する。

【0066】

本発明はまた、本発明記載の化学マトリックスの製造のための、または本発明記載のデバイスの製造のための、本発明記載の化合物の使用にも関する。

さらに、本発明は、試料中の分析物の量を決定するための方法であって、

- a) 前記試料と、本発明記載の化学マトリックスを接触させ、
- b) 前記液体試料の存在下で、化学マトリックスから遊離するまたは化学マトリックスによって消費されるレドックス当量の量を概算し、そして
- c) それによって試料中の分析物の量を決定する

ことを含む、前記方法に関する。

【0067】

分析物の量を決定するための方法は、好ましくは、*in vitro*法である。さらに、上に明らかに言及するものに加えて、工程が含まれてもよい。例えば、さらなる工程は、例えば工程 a) のための試料のプロセッシングおよび/またはコンディショニング、あるいは工程 b) における前記化学マトリックス内の電圧の適用および/または電流の測定に関することも可能である。さらに、前記工程の1またはそれより多くを、自動化装置によって行ってもよい。当業者には、方法の1またはそれより多い工程、例えば化学マトリックスから遊離するまたは化学マトリックスによって消費される電子の量を概算する工程を反復してもよいこともまた理解される。

【0068】

用語「決定すること」は、試料において、分析物の量を、好ましくは半定量的にまたはより好ましくは定量的に、測定する工程に関する。

化学マトリックスから遊離するまたは化学マトリックスによって消費されるレドックス当量、好ましくは電子の量を概算する方法が、先行技術から知られる。好ましくは、遊離するまたは消費されるレドックス当量の量は、光学的手段によってまたは電気化学的試験要素によって概算される。好ましくは、遊離するまたは消費されるレドックス当量の量の概算は、少なくとも2つの電極を、化学マトリックスと、または前記試験化学に伝導的に連結された手段と接触させ、前記電極に電圧を適用し、そして化学マトリックスと接触する前記電極を通じて流れる電流を測定する工程を含む。

【0069】

本発明は、試料中の分析物の量を決定するためのキットであって、

- a) 本発明記載の試験要素、および
 - b) 被験体の体表面上に切開を生成するための手段
- を含む、前記キットにさらに関する。

【0070】

体表面上に切開を生成するための手段は、当業者に知られ、そしてこれには、好ましくはメス、ナイフ、または針が含まれる。体表面上に切開を生成するためのより好ましい手段は、ランセットである。

【0071】

本明細書に引用するすべての参考文献は、全開示の内容および本明細書に特に言及する開示内容に関して、本明細書に援用される。

以下の実施例は、本発明を単に例示するものとする。これらは、いかなる意味でも、本発明を限定すると見なされてはならない。

【0072】

本発明のさらなる場合による特徴および態様は、好ましい態様の続く説明において、好ましくは従属請求項と組み合わせて、より詳細に開示されるであろう。ここで、それぞれ

10

20

30

40

50

の場合による特徴は、当業者が理解するであろう、分離された方式でならびに任意の実現可能な組み合わせで達成可能である。本発明の範囲は、好ましい態様によっては限定されない。

【実施例】

【0073】

本発明記載の化合物合成の重要な中間体は、1-アミノフェナジンであり、これは多様な方法によって合成可能である (Urleb, U. および Gobec, S., Science of Synthesis, 2004, 16, 913-943)。次いで、1-アミノフェナジンを、アシル-またはスルホニルクロリド基と反応させ、そして場合によって保護基除去後に、アルキル化する。フェナジニウム窒素上にアリール基を有するフェナジニウム塩に関して、異なる合成法を用いてもよく、Kehrmann および Masslenikow; Chemische Berichte, 1911, 44, 2629 を参照されたい。

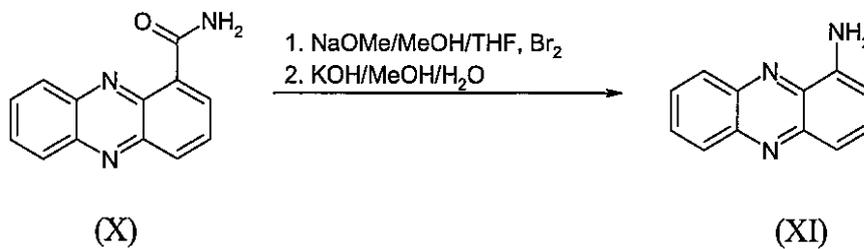
10

【0074】

実施例 1：1-アミノ-フェナジンの合成

【0075】

【化 4】



20

【0076】

100 ml MeOH 中のナトリウムメタノラートの溶液 (MeOH 中、25%、24.6 ml、107 mmol) を、-78 に冷却し、そして 10.0 ml MeOH 中の臭素の溶液 (2.10 ml、40.9 mmol) を、2 分間に渡って添加した。さらなる冷却下で、溶液をまず 5 分間攪拌し、その後、200 ml 乾燥メタノールおよび 400 ml 乾燥 THF 中のフェナジン-1-カルボキサミド (4.00 g、17.9 mmol) を、滴下漏斗を通じて 1 時間に渡って添加した。完全に添加した後、透明な橙色溶液を得て、これを室温に温め、そして 55 でさらに 2 時間攪拌した。混合物を室温に冷却した後、さらに 72 時間攪拌した。減圧下で蒸発させた後、残渣をメタノール (300 ml) および水性 NaOH (40%、150 ml) 中に溶解し、そして 90 で 4 時間還流した。続いて、溶液を 0 に冷却し、そして濃 HCl で pH 8.5 にセットし、暗赤色の懸濁物を得た。減圧下で、約 200 ml まで濃縮した後、500 ml の水を添加した。混合物を CHCl₃ で 3 回抽出した。合わせた有機層を Na₂SO₄ 上で乾燥させ、そして減圧下で濃縮した。シリカゲルクロマトグラフィ (n-ヘキサン/酢酸エチル、80:20 75:25) によって未精製産物を精製して、暗赤色固体として、2.86 g (82%) の表題化合物を得た。

30

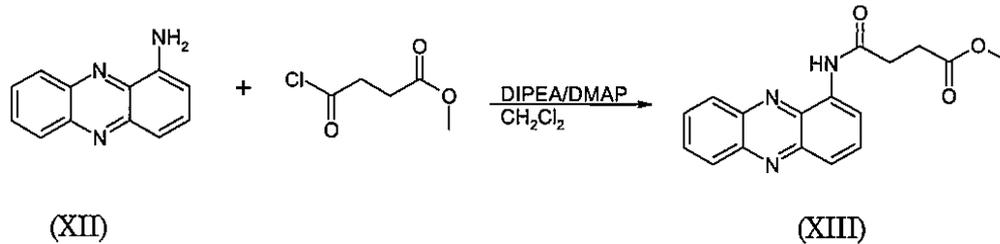
40

【0077】

実施例 2：N-フェナジン-1-イル-スクシンアミド酸メチルエステルの合成

【0078】

【化5】



【0079】

1-アミノフェナジン(1.00g、5.12mmol)を40.0ml CH_2Cl_2 およびN,N-ジイソプロピルエチルアミン(957 μl 、5.63mmol)に溶解した。4-N,N-ジメチルアミノピリジン(313mg、0.256mmol)を添加した後、混合物を0℃に冷却し、その後、5分間に渡って、メチル4-クロロ-4-オキソプロチレート(693 μl 、5.63mmol)を添加した。生じた溶液を室温でさらに16時間攪拌した。50.0ml CH_2Cl_2 で希釈した後、混合物を50ml水性NaOH(0.5%)で1回洗浄した。有機層を Na_2SO_4 上で乾燥させ、そして減圧下で濃縮した。シリカゲルクロマトグラフィ(n-ヘキサン/アセトン、80:20)によって未精製産物を精製して、黄色固体として、1.45g(92%)の表題化合物を得た。

10

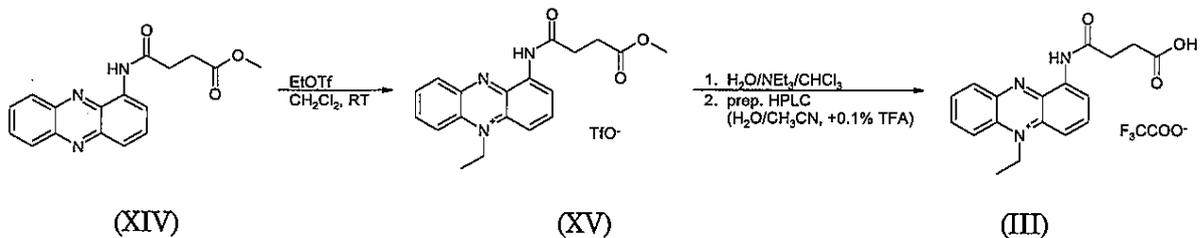
【0080】

実施例3：1-(3-カルボキシ-プロピオニルアミノ)-5-エチル-フェナジニウムトリフルオロアセテートの合成

20

【0081】

【化6】



30

【0082】

トリフルオロメタンスルホン酸エチル(542 μl 、4.18mmol)を、2.00ml CH_2Cl_2 中のN-フェナジン-1-イル-スクシニアミド酸メチルエステル(64.6mg、0.208mmol)の溶液に、一滴ずつ添加した。続いて、混合物を50℃で3.5時間還流し、そして室温で16時間攪拌した。次いで、50.0ml CH_2Cl_2 および2.00ml NEt_3 を添加し、そして生じた溶液を水で2回抽出した。合わせた水性層を CHCl_3 で1回洗浄し、そして凍結乾燥して、42.0mgの未精製産物を得た。これを調製用HPLC(Chromolith、 $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$ 勾配+0.1%TFA)によって精製し、暗紫色結晶として、28.9mg(43%)の表題化合物を生じた。

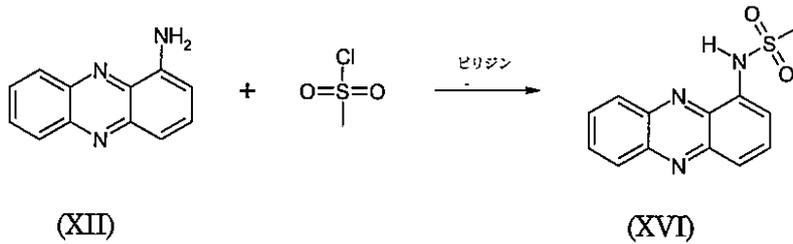
40

【0083】

実施例4：N-フェナジン-1-イル-メタンスルホンアミドの合成

【0084】

【化7】



【0085】

1-アミノ-フェナジン(50.0mg、0.256mmol)をピリジン(1.00ml)中で希釈し、そして0℃に冷却した。さらに冷却しながら、塩化メタンシルホニル(23.8μl、0.307mmol)を添加した。混合物を0℃で5分間攪拌し、そして続いて室温で16時間攪拌した。減圧下で濃縮した後、シリカゲルクロマトグラフィ(n-ヘキサン/アセトン、80:20)によって未精製産物を精製して、黄色固体として、66.0mg(94%)の表題化合物を得た。

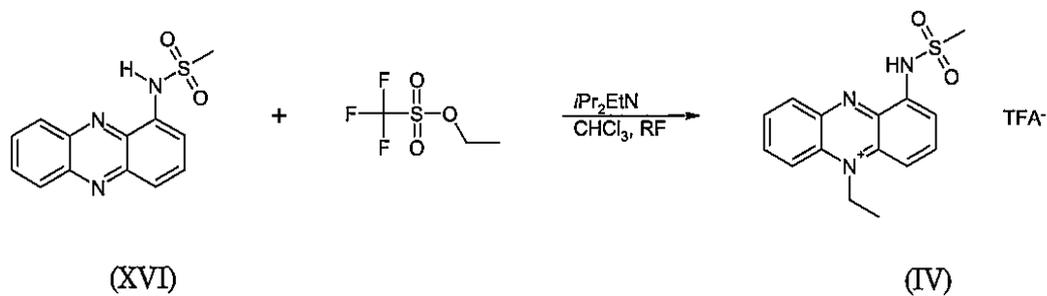
10

【0086】

実施例5: 5-エチル-1-メタンシルホニルアミノ-フェナジニウムトリフルオロアセテートの合成

【0087】

【化8】



20

【0088】

N-フェナジン-1-イル-メタンシルホンアミド(20.0mg、0.073mmol)を、CHCl₃(2.00ml)中で希釈し、そしてトリフルオロメタンシルホン酸エチル(1.00ml、7.70mmol)を添加すると、混合物は、直ちに赤色に変色した。混合物を70℃で7時間還流し、そして室温で16時間攪拌した。次いで、N-エチルジイソプロピルアミン(250μl、1.46mmol)を添加すると、色は暗赤色から褐色に変化した。この混合物をさらに8時間還流し、そして室温で16時間攪拌した。減圧下で濃縮した後に得た未精製産物を、10.0ml CHCl₃および10.0mlの水で希釈した。有機層を水で4回抽出した。合わせた水性層を乾燥するまで減少させ、そして調製用HPLC(Chromolith; H₂O/TFA勾配+0.1%TFA)上で精製し、暗青色固体として、2.2mg(7%)の表題化合物を生じた。

30

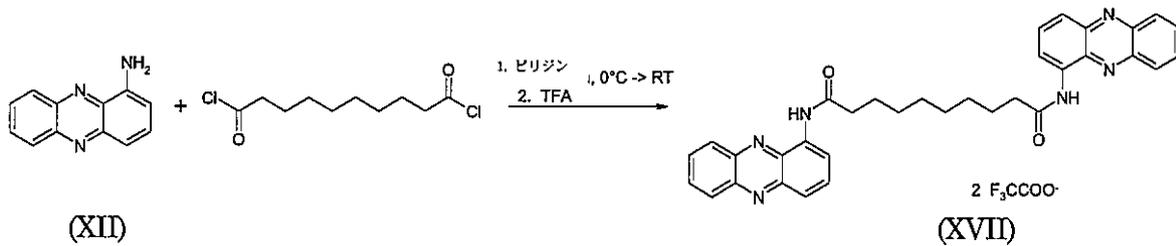
【0089】

実施例6: デカン二酸ビス-フェナジン-1-イルアミドビストリフルオロ酢酸塩の合成

【0090】

40

【化9】



【0091】

1-アミノ-フェナジン(25.0mg、0.128mmol)を、ピリジン(1.30ml)中に溶解し、そして0℃に冷却した。この溶液に、0.50ml CH₂Cl₂中の塩化セバコイル(13.7μl、0.064mmol)を、30分間の期間に渡ってゆっくりと添加した。生じた懸濁物を室温でさらに48時間攪拌した。その後、混合物を酢酸トリエチルアンモニウム緩衝液(pH7、1M、5.00ml)で希釈し、そしてCH₂Cl₂で3回抽出した。合わせた有機層をNa₂SO₄上で乾燥させ、そして減圧下で濃縮した。得た未精製産物を3.00ml H₂O/CH₃CN(1:1+0.1%TFA)中に懸濁し、そして濾過した。主に表題化合物を含有する残渣を、さらなる精製なしに用いた。収量：黄色固体として12.3mg(34%)。

10

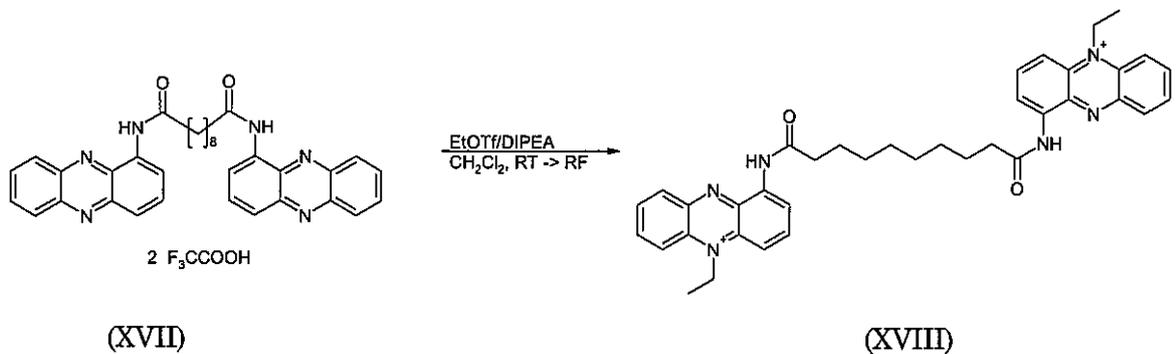
【0092】

実施例7：デカン二酸ビス-[(5-エチル-フェナジン-1-イル)-アミド]の合成

20

【0093】

【化10】



30

【0094】

CH₂Cl₂(3.00ml)中のデカン二酸ビス-フェナジン-1-イルアミドジトリフルオロ酢酸塩(12.3mg、0.016mmol)の懸濁物に、ジイソプロピルエチルアミン(37.4μl、0.22mmol)およびトリフルオロメタンスルホン酸エチル(300μl、2.31mmol)を添加した。生じた褐色溶液を55℃で3時間還流し、そして室温で16時間さらに攪拌した。減圧下で蒸発させた後、得た未精製産物を、調製用HPLC(X Terra、H₂O/CH₃CN勾配+0.1%TFA)によって精製し、暗紫色結晶として、0.9mg(9%)の表題化合物を生じた。

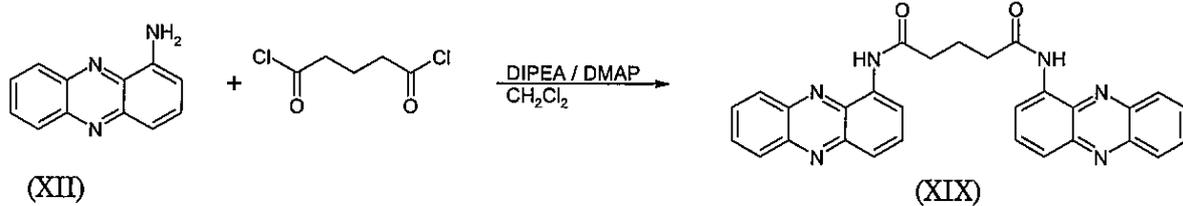
40

【0095】

実施例8：ペンタン二酸ビス-フェナジン-1-イルアミドの合成

【0096】

【化11】



【0097】

1-アミノフェナジン(50.0 mg、0.256 mmol)の溶液に、ジイソプロピルエチルアミン(87.0 μ l、0.512 mmol)および触媒量のジメチルアミノピリジンを添加した。生じた赤色溶液に、塩化グルタリル(16.3 μ l、0.128 mmol)を添加し、そして室温で16時間攪拌した。得た橙色懸濁物を水で希釈し、そして CH_2Cl_2 で2回抽出した。合わせた有機層を Na_2SO_4 上で乾燥させ、そして減圧下で濃縮した。生じた未精製産物を酸中に懸濁し、そして濾過した。得た残渣をさらにシリカゲルクロマトグラフィ(CHCl_3 /アセトン、9:1)によって精製し、黄色固体として、15.8 mg(13%)の表題化合物を得た。

10

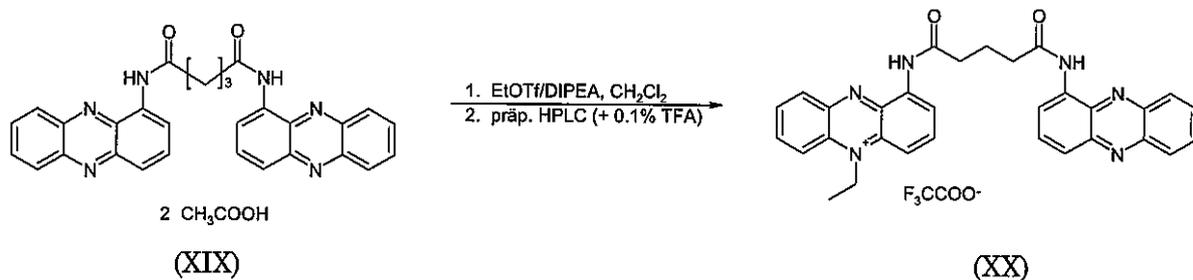
【0098】

実施例9: 5-エチル-1-[4-(フェナジン-1-イルカルバモイル)-ブチリルアミノ]-フェナジニウムトリフルオロアセートの合成

20

【0099】

【化12】



30

【0100】

ペンタン二酸ビス-フェナジン-1-イルアミド二酢酸塩(15.8 mg、0.032 mmol)を CH_2Cl_2 (3.00 ml)中に懸濁し、そしてエチルトリフレート(500 μ l、3.86 mmol)を添加した。ジイソプロピルエチルアミン(48.9 μ l、0.288 mmol)を生じた赤褐色懸濁物に添加し、その後、50 で1.5時間還流した。室温で16時間攪拌した後、混合物を再び7時間還流し、その後、室温で16時間、さらに攪拌した。生じた透明紫色溶液を減圧下で濃縮した。得た未精製産物を3.00 ml H_2O / CH_3CN (1:1+0.1% TFA)中に懸濁し、そして濾過した。残渣を調製用HPLC(X Terra、 H_2O / CH_3CN 勾配+0.1% TFA)によってさらに精製し、赤褐色固体として、1.0 mg(6%)の表題化合物を生じた。

40

【0101】

実施例10: 1-(3-カルボキシ-プロピオニルアミノ)-5-エチル-フェナジニウムのレドックス電位

典型的な1-アシル化アミノフェナジニウムエトサルフェート、1-(3-カルボキシ-プロピオニルアミノ)-5-エチル-フェナジニウム(式(III)の化合物)の標準レドックス電位(formal redox potential)を、試験片中の金作用電極での Ag/AgCl に対して測定した。本発明者らは、生理学的条件下(0.9% NaCl)で、図1に示すようなサイクリックボルタメトリーによって、 Ag/AgCl に対して-236 mVを得た。サイクリックボルタモグラムは、 Ag/AgCl に対して-100 mVの比較的低い電位が、物質を酸化するために十分であることを示す。

50

【0102】

メディエーター1-(3-カルボキシ-プロピオニルアミノ)-5-エチル-フェナジニウムの準可逆的酸化および還元は、2つの電子移動を通じて、 $Ag/AgCl$ に対して、 $0\text{ mV} \sim -500\text{ mV}$ の間の電位範囲で生じる。アスコルビン酸は、この電位ウィンドウで酸化され得ず、そして電流は、純粋な緩衝溶液のブランク電流と類似である。メディエーター1-(3-カルボキシ-プロピオニルアミノ)-5-エチル-フェナジニウムにアスコルビン酸を添加しても、陽極および陰極電流は有意に変化せず、そしてレドックス電位は、 $Ag/AgCl$ に対して、 -231 mV にシフトするだけである。したがって、アスコルビン酸の添加は、レドックスメディエーターを有意に還元しない。

【0103】

実施例11: 1-(3-カルボキシ-プロピオニルアミノ)-5-エチル-フェナジニウムでのアスコルビン酸干渉

図2は、 $+650\text{ mV}$ での $cNADH$ の直接酸化と比較した、レドックスメディエーター1-(3-カルボキシ-プロピオニルアミノ)-5-エチル-フェナジニウムを用いた -100 mV の低い酸化電位の利点を示す。後者の電位では、アスコルビン酸もまた酸化され、そしてブランク電流は、アスコルビン酸の濃度に応じて迅速に増加する。したがって、 -100 mV の比較的低い電位は、干渉物質の直接酸化を回避するために非常に有用であり、そしてブランク電流は、試料が高濃度のアスコルビン酸を含有する場合であっても、ゼロに非常に近いままである。多様な濃度のアスコルビン酸塩およびグルコースで、 $cNAD(35\text{ mM})$ 、グルコースデヒドロゲナーゼ(1.5 kU/g)の存在下、慣用的な条件下($pH7.0$)で、電流を測定した。

【0104】

実施例12: 1-(3-カルボキシ-プロピオニルアミノ)-5-エチル-フェナジニウムおよび1-(3-カルボキシプロポキシ)-5-エチルフェナジニウムのポットライフ

メディエーター1-(3-カルボキシ-プロピオニルアミノ)-5-エチル-フェナジニウムおよび1-(3-カルボキシプロポキシ)-5-エチルフェナジニウムを、ポットライフ実験において比較した。メディエーターの性能を、反応混合物を調製した直後($t=0$)および48時間後に測定した。図3に示すように、両方のレドックスメディエーターは、ポットライフの48時間後、電流の有意な減少を示さない。したがって、両方のメディエーターは、配合物において非常に安定であるようである。メディエーター1-(3-カルボキシ-プロピオニルアミノ)-5-エチル-フェナジニウムは、グルコース濃度の全範囲に渡って、メディエーター1-(3-カルボキシプロポキシ)-5-エチルフェナジニウムよりもより高い電流を示す。

【0105】

実施例13: 他の1-アミノ-フェナジン誘導体でのアスコルビン酸干渉

1-アセチルアミノ-5-メチル-フェナジニウムトリフルオロメタンスルホネート、1-アセチルアミノ-5-エチル-フェナジニウムトリフルオロアセテート、および1-(3-カルボキシ-プロピオニルアミノ)-5-エチル-フェナジニウム(式III)を、アスコルビン酸塩に対する反応性に関して比較した。この目的に向けて、それぞれの化合物の各 0.23 mM を、5倍モル過剰のアスコルビン酸塩の存在下で、 0.1 M 酢酸トリエチルアンモニウム緩衝液($pH7$)中、室温でインキュベーションした。 517 nm (1-(3-カルボキシ-プロピオニルアミノ)-5-エチル-フェナジニウム)または 512 nm (他の2つの化合物)での吸収の減少を長期に渡って記録した。1-アセチルアミノ-5-メチル-フェナジニウムでは、吸収は1分間に12%減少した一方、1-アセチルアミノ-5-エチル-フェナジニウムに関しては、減少は、1分間に7%、そして1-(3-カルボキシ-プロピオニルアミノ)-5-エチル-フェナジニウムに関しては5%未満であることが示された。

【0106】

実施例14: 1-ヒドロキシ-フェナジン誘導体の性能およびアスコルビン酸干渉

アスコルビン酸塩の非存在下および存在下で、グルコース試験片中のレドックスメディエーターとしての性能に関して、1 - (3 - カルボキシプロポキシ) - 5 - エチルフェナジニウムおよび1 - (3 - カルボキシ - プロピオニルアミノ) - 5 - エチル - フェナジニウムを比較した。この目的に向けて、0 mg / d L、10 mg / d L (0.5 mM)、30 mg / d L (1.5 mM)、および80 mg / d L (4.0 mM)のグルコース濃度、そしていずれかのレドックスメディエーター1.48 mMの存在下で、用量反応曲線を記録した。アスコルビン酸が存在する場合、15 mg / d L (0.85 mM)の濃度で用いた。図4 A)に示すように、所定のグルコース濃度での用量反応は、1 - (3 - カルボキシプロポキシ) - 5 - エチルフェナジニウム (CEPES) に比較して、1 - (3 - カルボキシ - プロピオニルアミノ) - 5 - エチル - フェナジニウム (CPEP) を用いると、

より高い。また、傾斜用量反応は、1 - (3 - カルボキシプロポキシ) - 5 - エチルフェナジニウムに比較して、1 - (3 - カルボキシ - プロピオニルアミノ) - 5 - エチル - フェナジニウムに関してはおよそ2倍である (34 nA * dL / mg 対 16.7 nA * dL / mg)。さらに、アスコルビン酸塩は、1 - (3 - カルボキシ - プロピオニルアミノ) - 5 - エチル - フェナジニウムの存在下で測定した電流に対しては、小さい影響しか持たない。対照的に、アスコルビン酸塩は、1 - (3 - カルボキシプロポキシ) - 5 - エチルフェナジニウムをレドックスメディエーターとして用いた際、低グルコース濃度、特に30 mg / d L未満では、電流相殺を引き起こす (図4 B)。

10

【図1】

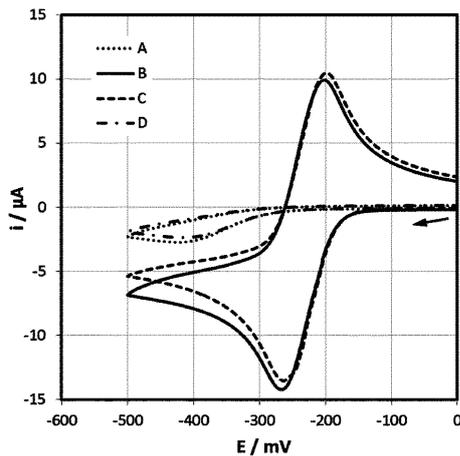
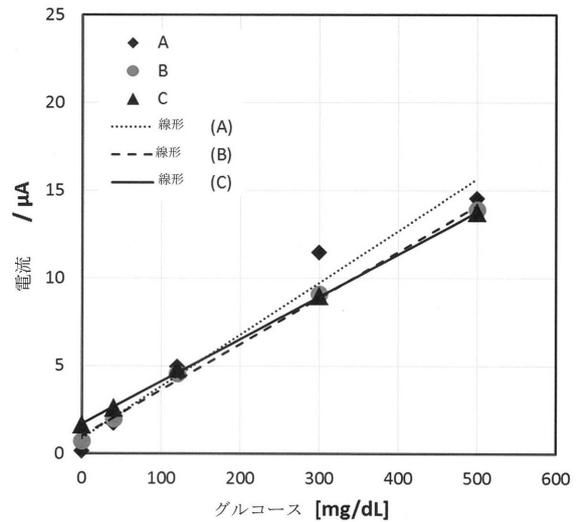
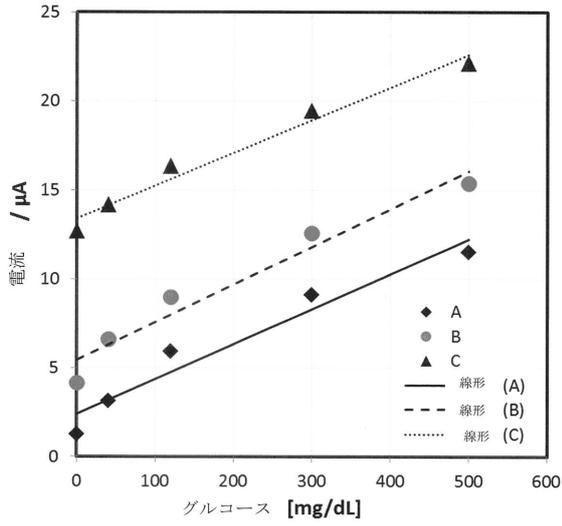


Fig. 1

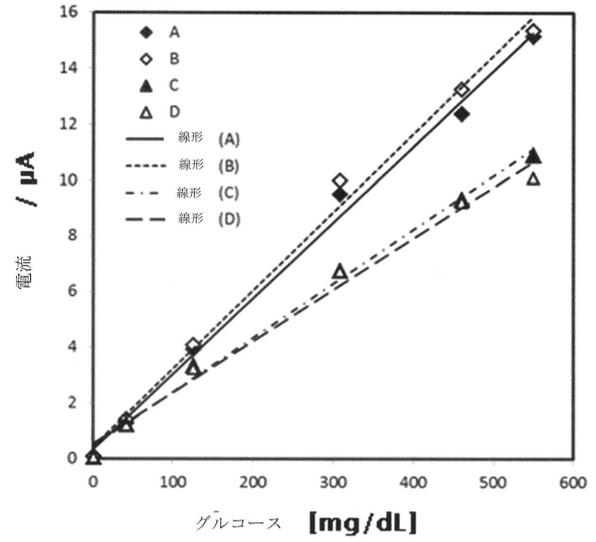
【図2 A】



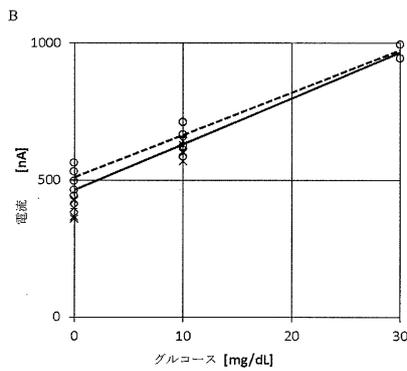
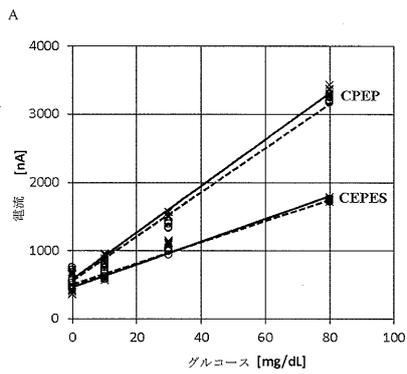
【 図 2 B 】



【 図 3 】



【 図 4 】



フロントページの続き

- (74)代理人 100157923
弁理士 鶴喰 寿孝
- (72)発明者 ハインドル, ディーター
ドイツ国 8 1 3 7 7 ミュンヘン, マグノーリエンヴェーク 7
- (72)発明者 ノルトマイヤー, クリスティン
ドイツ国 6 8 3 0 5 マンハイム, ケッテラーヴェーク 6
- (72)発明者 ゲバウアー, ペーター
ドイツ国 8 2 3 7 7 ペンツベルク, ロスヴァイデ 1 5
- (72)発明者 ハント デュ ヴァル, ステイシー
アメリカ合衆国インディアナ州4 6 2 5 6, インディアナポリス, マッド・クリーク・ロード 8
8 5 1
- (72)発明者 バウアー - エスピンドラ, クラウス・アンドレアス
ドイツ国 6 8 3 0 5 マンハイム, ランガー・シュラゲ 1 2 9

審査官 東 裕子

- (56)参考文献 特開昭6 0 - 1 1 4 1 9 3 (J P , A)
特表2 0 1 1 - 5 1 5 6 8 6 (J P , A)
国際公開第2 0 1 6 / 0 2 6 9 5 9 (W O , A 1)
特開2 0 1 4 - 1 9 4 4 1 1 (J P , A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 0 7 D

C A p l u s / R E G I S T R Y (S T N)