
Kompetitiver Biosensor mit erhöhter Sensitivität

5

Die vorliegende Erfindung betrifft Maßnahmen zur Bestimmung von Glukose und zur Diagnose von Erkrankungen die auf einem gestörtem Glukosemetabolismus basieren. Insbesondere betrifft die vorliegende Erfindung eine Vorrichtung umfassend ein Hydrogel mit einem darin eingelagerten Glukose-bindenden Protein und einem Liganden des Glukose-bindenden Proteins, wobei das
10 Hydrogel eine erste Hydrogelmatrix aus Alginat und eine zweite Hydrogelmatrix, die innerhalb der ersten Hydrogelmatrix ein interpenetrierendes Netzwerk ausbildet, umfasst. Die Erfindung betrifft zudem die Verwendung einer solchen Vorrichtung zur Bestimmung des Glukosegehalts in einer Probe sowie die Verwendung der Vorrichtung zur Diagnose eines gestörten Glukose-
15 Metabolismus bei einem Probanden.

Die Bestimmung der Konzentration von Glukose durch effiziente und zuverlässige Messtechnik ist in vielen Bereichen der Technik von großer Bedeutung. Nicht nur in der reinen Laboranalytik, sondern auch in der Lebensmittelindustrie z.B. im Bereich der Önologie sowie im medizinischen
20 Bereich, beispielsweise bei der Diagnose von Erkrankungen, die durch einen gestörten Glukosemetabolismus verursacht werden, z.B. Diabetes mellitus oder metabolisches Syndrom, spielt die schnelle und zuverlässige Bestimmung der Glukosekonzentration in vorgegebenen Lösungen eine zentrale Rolle. Im Bereich der Diagnose von Erkrankungen, die auf gestörtem Glukosemetabolismus basieren, werden Glukosesensoren sowohl in Vorrichtungen verwendet,
25 die in den Körper implantierbar sind und den Glukosegehalt in einer innerhalb des Körpers genommenen Probe messen können, als auch in Sensoren, die ex vivo den Glukosegehalt aus einer Probanden Probe messen.

Zur Bestimmung des Glukosegehalts in einer Lösung sind Systeme aus Sensormolekül und Ligand beschrieben worden, wobei der Sensor ein Glukose-bindendes Protein und der Ligand ein
30 Kompetitor für Glukose ist, der im Sensor zunächst am Glukosesensormolekül gebunden vorliegt. Durch Konkurrenz mit Glukose während des Messvorgangs wird der Kompetitor vom Glukose-bindenden Protein verdrängt. Die Verdrängung des Kompetitors durch die Glukose vom

Glukose-bindenden Protein kann hierbei mittels einer Änderung von einer physikalischen oder chemischen Eigenschaft der Moleküle, z.B. mittels Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (FRET), nachgewiesen werden. Die zuvor genannten Systeme müssen natürlich in einem räumlich begrenzten Bereich des Sensors vorliegen.

5

Zum Einschluss der Systemkomponenten, d.h. des Glukose-bindenden Moleküls und des Liganden, der als Kompetitor dient, haben sich u.a. Hydrogele bewährt. Geeignete Hydrogele können hierbei Polyethylenglykole, aber auch Alginate sein (z.B. US2007/0105176; US 6,485,703; Russell 1999, Anal Chem 71: 3126-3132). Desweiteren wurden Sensoren beschrieben, bei denen die

10 zuvor genannten Systeme in wässrigem Milieu durch eine semipermeable Membran eingeschlossen wurden. Solche Membrane können beispielsweise aus regenerierter Zellulose, Polyethylenglykol, Polyurethan, layer-by-layer (LBL) Schichten, Polyethersulfone, Parylen-Schichten oder perforiertem Silika bestehen (z.B. US2007/0122829).

15 Die im Stand der Technik beschriebenen Glukosesensoren weisen jedoch eine relativ geringe Glukoseaktivität auf. Die Glukoseaktivität und damit die Sensorleistung wird maßgeblich durch die Bindungskonstanten für die Komplexe aus Glukose-bindendem Protein und Kompetitor sowie Glukose-bindendem Protein und Glukose bestimmt.

20 Im Fall von ex vivo Sensoren kann, um eine möglichst hohe Sensorempfindlichkeit zu erhalten, ein Analyt-Rezeptor mit nahezu beliebig hoher Bindungskonstante gewählt werden, da der Analyt nicht wieder freigegeben werden muss und man durch eine sehr hohe Bindungskonstante meist eine sehr hohe Spezifität und damit gute Sensorperformance erhalten kann.

25 Bei in vivo Sensoren sieht die Situation jedoch anders aus, da der Sensor ständig reversibel auf Konzentrationsänderungen des Analyten reagieren muss. Somit darf die Bindungskonstante nicht zu hoch sein, da der Sensor sonst schon bei niedrigen Analytkonzentrationen gesättigt wäre und Konzentrationsänderungen nicht mehr anzeigen könnte. Zudem besteht eine weitere Problematik der in vivo Sensoren darin, dass der Bereich der Analytkonzentration festliegt und nicht durch

30 Verdünnungen oder Ankonzentrierungen optimiert werden kann. Im Stand der Technik werden somit im Wesentlichen Systeme aus Ligand und Glukose-bindendem Protein beschrieben, bei denen mittlere Bindungskonstanten verwirklicht werden. Eine Anpassung der Messempfindlichkeiten durch Änderung der Konzentrationen von entweder Glukose-bindendem Protein oder Ligand oder beidem, sind regelmäßig durch die geringe Löslichkeit der entsprechenden Moleküle

begrenzt. Insofern ist bei den im zuvor genannten Stand der Technik beschriebenen Sensoren sowohl die Messempfindlichkeit als auch die Messgenauigkeit des Sensors eingeschränkt (s. Rounds 2007, J. Fluorec. 17: 57-63).

- 5 Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, eine Vorrichtung bereit zu stellen, die eine effizientere Bestimmung des Glukosespiegels auch in vivo erlaubt und bei der die zuvor genannten Nachteile im Wesentlichen ausgeräumt sind. Die Erfindung wird durch die in den Ansprüchen beschriebenen Ausführungsformen sowie die Ausführungsformen, die anschließend offenbart werden, gelöst.

10

Die Erfindung betrifft somit eine Vorrichtung umfassend ein Hydrogel mit einem darin eingelagerten Glukose-bindenden Protein und einem Liganden des Glukose-bindenden Proteins, wobei das Hydrogel eine erste Hydrogelmatrix aus Alginat und eine zweite Hydrogelmatrix, die innerhalb der ersten Hydrogelmatrix ein interpenetrierendes Netzwerk ausbildet, umfasst.

15

Bei der erfindungsgemäßen Vorrichtung handelt es sich auch um eine Zusammensetzung, bestehend aus den oben genannten Komponenten.

20

Der Begriff "Hydrogel" beschreibt ein Wasser-enthaltendes Polymer, dessen Moleküle chemisch oder physikalisch zu einem dreidimensionalen Netzwerk verknüpft sind. Die Polymermoleküle können untereinander durch kovalente oder ionische Bindungen oder durch Verschlaufen oder Verweben zu dem dreidimensionalen Netzwerk verknüpft werden. Die Polymere, die das Hydrogel bilden, enthalten vorzugsweise hydrophile Polymerkomponenten, die die Aufnahme von wässrigen Lösungen ermöglichen sowie Gruppen, die in der Lage sind, mit dem Glukose-

25 bindenden Protein zu interagieren.

30

Die erfindungsgemäßen Hydrogele bestehen aus einer ersten Hydrogelmatrix aus Alginat und einer zweiten Hydrogelmatrix, die innerhalb der durch das Alginat aufgespannten Hydrogelmatrix in der Lage ist, ein interpenetrierendes Netzwerk auszubilden. Diese zweite Hydrogelmatrix besteht vorzugsweise aus einem wasserlöslichen Polymer mit mindestens einer vernetzbaren Gruppe pro Molekül und einem Molekulargewicht von höchstens 500.000. Besonders bevorzugt ist ein Molekulargewicht von höchstens 250.000, 200.000, 150.000, 100.000 oder 50.000. Bevorzugt ist die zweite Hydrogelmatrix hierbei ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus: Polyvinylalkoholen (PVAs), Polyethylenglykolen (PEGs), Poly(2-oxazolinen), Polyacrylamiden

(z.B. Dimethylacrylamid), Polyhydroxyacrylaten (z.B. Polyhydroxymetacrylat, Polyhydroxyacrylamide, Polyvinylpyrrolinone), (2-Methyl-3-Ethyl[2-Hydroxyethyl]) Polymeren, Polyhydroxyalkanoaten (PHAs), Poly (2-Methyl-2 oxazolinen), Poly (2-Ethyl-2 oxazolinen), Poly (2-Hydroxyethyl-2 oxazolinen), Poly (2-(1-(Hydroxymethyl)-ethyl)-2 oxazolinen), Poly-
5 (hydroxyethylmetacrylat) (PHEMA), Poly-(hydroxyethylacrylat) (PHEA), Polyvinylpyrrolidonen, Poly-(dimethyl)acrylamid, Poly-(hydroxyethyl)acrylamid, Polyvinylalkoholen (einschließlich Copolymere mit Vinylacetate und/oder Ethylene), Poly(ethylene-co-vinylalkohol), Poly(vinylacetat-co-vinylalkohol), Poly(ethylene-co-vinylacetat-co-vinylalkohol), Polyethylenglycolen und Poly(ethylenglycol-co-propylenglycol).

10

Ein erfindungsgemäßes interpenetrierendes Netzwerk wird bevorzugt erhalten durch Polymerisierung der Monomere des zweiten Polymers in Gegenwart eines bereits existierenden ersten Polymers. Besonders bevorzugt kann dies durch Verfahren geschehen, die in den Ausführungsbeispielen näher beschrieben werden. Hierdurch wird erreicht, dass sich im bereits bestehenden
15 Netzwerk des ersten Polymers ein interpenetrierendes Netzwerk des zweiten Polymers ausbilden kann. Die Polymer-Netzwerke sind also ineinander verwoben und/oder verschlauft. Im Gegensatz dazu liegen verschiedene Polymere in Gemischen als nicht ineinander verwobene und/oder verschlufte separate Netzwerke nebeneinander vor.

20 Besonders bevorzugt unterscheiden sich die Vernetzungsmechanismen des ersten und des zweiten Polymers, so dass keine gemischte Vernetzung auftritt. Das zuvor genannten Alginat, das die erste Hydrogelmatrix erzeugen soll, wird durch ionische Wechselwirkungen vernetzt. Die zuvor genannten zweiten Polymere, die das interpenetrierende Netzwerk ausbilden sollen, werden alle durch radikalische oder ionische Polymerisation vernetzt.

25

Besonders bevorzugt wird die zweite Hydrogelmatrix aus Polyvinylalkohol gebildet. Besonders bevorzugt wird der Polyvinylalkohol mit einem Molekulargewicht von 10.000 bis 100.000, mehr bevorzugt 10.000 bis 50.000, mehr bevorzugt 10.000 bis 20.000, ganz besonders bevorzugt 15.000. Besonders bevorzugt weist der Polyvinylalkohol einen Vernetzergehalt von höchstens 0,5
30 mmol/g, 0,4 mmol/g, 0,35 mmol/g, oder 0,3 mmol/g und ganz besonders bevorzugt 0,35 mmol/g auf. Weiterhin weist der Polyvinylalkohol besonders bevorzugt einen Feststoffgehalt des Präpolymers von weniger als 40 Gewichtsprozent auf.

Das erfindungsgemäße Hydrogel kann neben der ersten Hydrogelmatrix und der zweiten Hydrogelmatrix Zusatzstoffe enthalten, z.B. Stabilisatoren, Emulgatoren, Antioxidantien, UV-Stabilisatoren, Detergentien, und/oder UV-Initiatoren.

- 5 Das erfindungsgemäß verwendete Hydrogel kann zudem von einem weiteren, bevorzugt semipermeablen, Hüllmaterial umschlossen sein. Durch diese Umschließung wird ein „Ausbluten“ („leaching“) der Sensorkomponenten aus dem Hydrogel verhindert. Als Hüllmaterial kommen semipermeable Membranen oder weitere Hydrogelmatrices in Frage. Semipermeable Membranen können bevorzugt aus regenerierter Zellulose, Polyethylenglykol, Polyurethan layer-by-layer
- 10 (LBL) Schichten, Polyethersulfone, Parylen-Schichten oder perforiertem Silika bestehen. Bevorzugt kann eine weitere Hydrogelmatrix aus einem Polymere gebildet werden ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Alginaten, Sepharosen, Hyaluronsäure, Chitosan, Polyvinylalkoholen (PVAs), Polyethylenglykolen (PEGs), Carrageenanen und Polyhydroxalkonoaten (PHAs), Poly(2-Methyl-2 oxazolinen), Poly(2-Ethyl-2 oxazolinen), Poly(2-Hydroxyethyl-2 oxazolinen),
- 15 Poly(2-(1-(Hydroxymethyl)-ethyl)-2 oxazolinen), Poly-(hydroxyethylmetacrylat) (PHEMA), Poly-(hydroxyethylacrylat) (PHEA), Poly-vinylpyrrolidonen, Poly-(dimethyl)acrylamid, Poly-(hydroxyethyl)acrylamid, Polyvinylalkoholen (einschließlich Copolymere mit Vinylacetat und/oder Ethylene), Poly(ethylene-co-vinylalkohol), Poly(vinylacetat-co-vinylalkohol), Poly(ethylene-co-vinylacetat-co-vinylalkohol), Polyethylenglycolen und Poly(ethylenglycol-co-
- 20 propylenglycol).

- Der Begriff „Glukose-bindendes Protein“ bezieht sich im Rahmen der Erfindung auf Proteine, die in der Lage sind, spezifisch mit Glukose zu interagieren. Ob ein Protein in der Lage ist, spezifisch mit Glukose zu interagieren, kann durch im Stand der Technik bekannte Bindungstests
- 25 vom Fachmann ohne weiteres bestimmt werden. Besonders bevorzugt ist das Glukose-bindende Protein, ausgewählt aus der Gruppe bestehende aus Lektinen, Enzymen, die Glukose als Substrat binden, und Antikörpern, die spezifisch Glukose erkennen. Der Begriff „Glukose-bindendes Protein“ schließt auch Surrogatmoleküle mit ein, die Glukose spezifisch erkennen können, bevorzugt Aptamere, die spezifisch Glukose erkennen. Ganz besonders bevorzugt ist das Glukose-
- 30 bindende Protein Concanavalin A.

Nukleinsäuresequenzen und Aminosäuresequenzen, die die zuvor genannten Glukose-bindenden Proteine codieren, sind im Stand der Technik bekannt (Yamauchi 1990, FEBS Letters 260(1): 127-130). Dementsprechend können die zuvor genannten Proteine ohne weiteres vom Fachmann

bereitgestellt werden. Die besagten Proteine können beispielsweise rekombinant hergestellt werden oder aus einer biologischen Quelle aufgereinigt werden. Darüber hinaus können die Proteine auch chemisch synthetisiert werden. Die meisten der zuvor genannten Proteine sind zudem kommerziell erhältlich. Antikörper oder Aptamere, die spezifisch Glukose erkennen, können vom Fachmann ohne weiteres durch im Stand der Technik bekannte Methoden zur Antikörper- oder Aptamer-Gewinnung bereitgestellt werden.

Die zuvor genannten Glukose-bindenden Proteine und insbesondere Concanavalin A können bevorzugt auch chemische Modifikationen aufweisen, die eine im Vergleich zu unmodifizierten Versionen der Glukose-bindenden Proteine erhöhte Wasserlöslichkeit vermitteln. Solche Modifikationen umfassen bevorzugt die Funktionalisierung mit einem wasserlöslichen Polymer und können in einer besonders bevorzugten Ausführungsform ausgewählt werden, aus der Gruppe bestehend aus: Pegylierung, Acetylierung, Polyoxazolinylisierung und Succinylierung.

Der Nachweis von Glukose in einer zu analysierenden Probe erfolgt in der erfindungsgemäßen Vorrichtung durch eine Verdrängung des an das Glukose-bindende Protein gebundenen Liganden durch die in der Probe enthaltene Glukose (Kompetition zwischen Ligand und Glukose). Bevorzugt hat der Ligand daher eine geringere Affinität zu dem Glukose-bindenden Protein als die Glukose. Die Verdrängung kann bevorzugt nachgewiesen werden durch Markierung des Liganden mit einem Farbstoff oder einem anderen nachweisbaren Markermolekül. Als besonders geeignet für den Nachweis einer Verdrängung haben sich Farbstoffe oder andere Markermoleküle erwiesen, die bei Annäherung der damit verbundenen Moleküle eine Änderung von zumindest einer messbaren physikalischen oder chemischen Eigenschaft hervorrufen. Geeignete Systeme umfassen solche, bei denen mittels Energietransfer zwischen den Farbstoffmolekülen entweder ein messbares Signal unterdrückt oder generiert wird. Solche auf Energietransfer basierte Systeme sind beispielsweise in WO2001/13783 näher beschrieben. Bevorzugt kann es sich hierbei um Systeme handeln bei denen durch Quenching Effekte ein Fluoreszenz Signal unterdrückt wird, wenn die Farbstoff- oder Markermoleküle – und damit das Glukose bindende Protein und sein Ligand - in räumlicher Nähe sind. Nach der Verdrängung des Liganden durch den Analyten wird der Quenching Effekt dann aufgehoben. Dieser Effekt ist durch eine Veränderung der Fluoreszenz nachweisbar. Zum Nachweis können beispielsweise Fluoreszenz-Photometer wie in WO2002/087429 beschrieben eingesetzt werden. Weitere geeignete System sind sogenannte Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer- (FRET) basierte Nachweissysteme. Hierbei werden zwei interagierende Komponenten, wie das Glucose-bindende Protein und sein

Ligand, mit Fluoreszenz-Farbstoffen markiert. Eine Komponente wird mit einem Akzeptor-Farbstoff, die andere mit einem Donor-Farbstoff gekoppelt. Durch die Interaktion der Komponenten kommen die Farbstoffe in räumliche Nähe wodurch der FRET Effekt vermittelt wird, bei dem Anregungsenergie vom Donor- auf den Akzeptor-Farbstoff transferiert wird und somit die Intensität des Donor-Farbstoffes messbar geringer wird. Sobald die Interaktion der Komponenten unterbrochen wird, nimmt die Fluoreszenz Intensität des Donors wieder zu. Im Fall der erfindungsgemäßen Vorrichtung kann die Glukose somit über die Zunahme der Intensität eines Signals nachgewiesen werden, das von einem Farbstoff oder Markermolekül nach Trennung des Komplexes aus Glukose-bindendem Protein und Ligand durch den Analyten generiert wird. Der Farbstoff oder das Markermolekül ist entweder an das Glukose-bindenden Protein oder den Liganden gekoppelt. Beispielsweise kann ein Donor-Farbstoff an das Glukose-bindenden Protein oder den Liganden gekoppelt sein, wobei die nicht mit dem Donor-Farbstoff gekoppelte Komponente mit einem geeigneten Akzeptor-Farbstoff gekoppelt ist. In einer derart ausgestalteten erfindungsgemäßen Vorrichtung ist vor Beaufschlagung mit einer Glukosehaltigen Probe der FRET Effekt als Resultat der Bindung des Liganden an das Glukose-bindende Protein zu beobachten. Nach Beaufschlagung verdrängt die Glukose den Liganden, so dass die messbare Intensität der Fluoreszenz des Donor-Farbstoffes zunimmt und zwar proportional zur Menge an Glukose.

Birch et. al. (Birch 2001, Spectrochimica Acta Part A 57: 2245-2254) haben die mathematische Lösung des chemischen Gleichgewichts für den Fall Concanavalin A als Glukose-bindendes Protein und Dextran als Ligand berechnet. Simulationen mit variierenden Concanavalin A und Dextran Konzentrationen haben ergeben, dass das Verhältnis (Dextran) / (ConA-Dextran-Komplex) nur unwesentlich von den Ausgangskonzentrationen abhängt und die Bindungskonstanten K_{Dex} und K_{Gluc} die Hauptfaktoren für die Sensor-Performance sind.

Überraschenderweise wirkt sich die Struktur der Farbstoffe jedoch ebenfalls auf die Glucose-Aktivität aus. So ist erfindungsgemäß eine Kombination aus einem Rhodamin- und einem Oxazin-Farbstoff der herkömmlich verwendeten Kombination aus einem Xanthen- und einem Rhodamin-Farbstoff (FITC-TMR) deutlich überlegen.

Bevorzugt ist das Glukose-bindende Protein, das im Rahmen der Erfindung eingesetzt wird, mit einem Oxazin-Farbstoff verknüpft. Wie eine solche Verknüpfung erfolgen kann, ist dem Fachmann wohl bekannt und im Stand der Technik hinreichend beschrieben. Besonders bevorzugt ist

der Oxazin-Farbstoff, ein Oxazin-Akzeptor, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus: ATTO655, ATTO680, EVOblue10, EVOblue30, EVOblue90 und EVOblue100. Ganz besonders bevorzugt wird ATTO680 eingesetzt. Die genannten Oxazin-Farbstoffe sind kommerziell erhältlich.

5

Bevorzugter Markierungsgrad (DOL, "degree of labeling") für das Glukose-bindende Protein, z.B. Concanavalin A, ist 0,1 bis 4, stärker bevorzugt 1 bis 4 und besonders bevorzugt 1 bis 3. Bei Concanavalin A entspricht ein DOL von 1 hierbei einem Mol Farbstoff pro Mol Concanavalin A Tetramer (MW = 104.000). Bei hohem DOL und Verwendung von relativ unpolaren Farbstoffen (typischerweise langwellige Fluoreszenzfarbstoffe) ist das Glukose-bindende Protein vorzugsweise mit PEG funktionalisiert. Bevorzugter Pegylierungsgrad ist 0,1 bis 5, bevorzugtes Molekulargewicht 200 bis 10.000, besonders bevorzugt 800 bis 8000, weiterhin bevorzugt 800 bis 5000.

10

Im Rahmen der der vorliegenden Erfindung zugrunde liegenden Experimente wurde festgestellt, dass chemischen Modifikationen der Glukose-bindenden Proteine, die eine im Vergleich zu unmodifizierten Varianten erhöhte Wasserlöslichkeit vermitteln, in vorteilhafter Weise eingesetzt werden können, um einen besseren Markierungsgrad an den Glukose-bindenden Proteinen zu erzielen. Für die modifizierten Glukose-bindenden Proteine gemäß der vorliegenden Erfindung können auch höhere Markierungsgrade mit einem Farbstoff erreicht werden als für unmodifizierte Varianten davon. Für solche modifizierten Concanavalin A Proteine können bevorzugt Konzentrationen größer als 0,5 mg/(g Matrix) und ganz besonders bevorzugt zwischen 2 und 60 mg/(g Matrix) erreicht werden. Überraschenderweise war die gemessene Glukoseaktivität von modifizierten Concanavalin A Proteinen hierbei auch vergleichbar mit der von nativem Concanavalin A in Hydrogel.

20

25

Die verbesserte Löslichkeit ist insbesondere relevant wenn die Glukose-bindenden Proteine mit einem Farbstoff markiert werden sollen, da mit Farbstoffen markierte Glukose-bindende Proteine, beispielsweise ein mit einem der zuvor genannten Oxazin-Farbstoffen modifiziertes Concanavalin A, eine in wässriger Lösung nochmals reduzierte Löslichkeit besitzen. Je höher hierbei der Markierungsgrad ist, desto niedriger ist die Löslichkeit in wässriger Lösung. Ein hoher Markierungsgrad wird jedoch gerade für Glukose-bindende Proteine als Sensorkomponenten in den erfindungsgemäßen Vorrichtungen benötigt.

30

Der Begriff "Ligand des Glukose-bindenden Proteins" bezeichnet ein Molekül, das in der Lage ist, eine spezifische Bindung mit dem Glukose-bindenden Protein einzugehen. Dabei interagiert das Molekül im Wesentlichen mit der selben Bindungsstelle wie Glukose, so dass das gebundene Molekül durch Glukose von der Bindungsstelle am Glukose-bindenden Protein verdrängt werden kann. Geeignete Moleküle sind daher strukturell mit Glukose verwandt. Vorzugsweise ist der Ligand des Glukose-bindenden Proteins ein Oligosaccharid, ein glykosyliertes Makromolekül, z.B. ein glykosyliertes Protein oder Peptid, oder ein glykosylierter Nanopartikel. Die zuvor genannten Moleküle, die als Liganden des Glukose-bindenden Proteins zum Einsatz kommen können, sind im Stand der Technik bekannt und können vom Fachmann ohne weiteres bereitgestellt werden. Besonders bevorzugt wird als Ligand des Glukose-bindenden Proteins ein Dextran eingesetzt.

Vorzugsweise ist der Ligand des Glukose-bindenden Proteins in der Vorrichtung der vorliegenden Erfindung mit einem Rhodamin-Farbstoff gekoppelt. Besonders bevorzugt können hierbei ATTO590, ATTO610, ROX, TMR, Rhodamin G6, Alexa Fluor Rhodamine Farbstoffe oder Dy590 und ganz besonders bevorzugt ATTO590 eingesetzt werden.

Bevorzugter Markierungsgrad (DOL) für den Liganden des Glukose-bindenden Protein, z.B. Dextran, ist 0,00003 bis 0,016 (mol Farbstoff)/(mol Untereinheit), besonders bevorzugt 0,00032 bis 0,0065 (mol Farbstoff)/(mol Untereinheit) und ganz besonders bevorzugt 0,0008 bis 0,0035 (mol Farbstoff)/(mol Untereinheit). Der Markierungsgrad des Liganden hat ebenfalls einen Einfluss auf die Glukose-Aktivität. Zu geringe Markierungsgrade führen zu einer schlechteren Glukoseaktivität genauso wie zu hohe.

Aus dem zuvor Gesagten ergibt sich, dass in einer bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Vorrichtung das Glukose-bindende Protein Concanavalin A ist. Besonders bevorzugt ist die Concanavalin A-Konzentration hierbei größer als 0,5 mg/(g Matrix) und ganz besonders bevorzugt zwischen 2 bis 60 mg/(g Matrix). Ebenso weist das Concanavalin A durch chemische Modifikationen, bevorzugt Pegylierung, Acetylierung, Polyoxazolinylisierung oder Succinylierung, eine im Vergleich zum unmodifizierten Concanavalin A erhöhte Wasserlöslichkeit auf. Das Glukose-bindende Protein ist in einer bevorzugten Ausführungsform mit einem Oxazin-Farbstoff verknüpft und der Ligand des Glukose-bindenden Proteins mit einem Rhodamin-Farbstoff. Ganz besonders bevorzugt wird ein Concanavalin A / Dextran-System in der Vorrichtung verwendet, bei dem das Dextran mit einem Rhodamin-Donor Farbstoff und das

Concanavalin A mit einem Oxazin-Akzeptor Farbstoff verknüpft ist. In dem bevorzugten Concanavalin A / Dextran System liegen die Komponenten bevorzugt in einem Massenverhältnisse (Dextran/ConA) von 1:1 bis 1:40 vor, wobei Massenverhältnisse nahe 1:10 besonders bevorzugt sind.

5

Es wurde im Rahmen der vorliegenden Erfindung festgestellt, dass die Kombination von Oxazin- und Rhodamin-Farbstoffen eine heterodimere Wechselwirkung zwischen den Farbstoffresten bewirkt, die die Glukoseaktivität verstärkt. Somit kann durch die Verwendung von Oxazin-Akzeptor und Rhodamin-Donor Farbstoffen bereits in wässriger Lösung vorzugsweise eine 2,1-
10 fache Glukoseaktivität erzielt werden. In dem im Rahmen der vorliegenden Erfindung eingesetzten Hydrogel konnte sogar eine 2,6-fach Erhöhung der Glukoseaktivität bewirkt werden.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung wurde vorteilhafterweise festgestellt, dass die Verwendung eines Hydrogels, bestehend aus einer ersten Hydrogelmatrix aus Alginat und einer zweiten
15 Hydrogelmatrix, die innerhalb der ersten ein interpenetrierendes Netzwerk ausbildet, in der Lage ist, eine Umgebung für die Sensorkomponenten, nämlich das Glukose-bindenden Protein und den kompetitiven Liganden des Glukose-bindenden Proteins, zu schaffen, die eine effiziente Bestimmung der Glukoseaktivität erlaubt. Viele Ansätze zur Glukosemessung mittels Fluoreszenz sind in Lösung erfolgreich, verlieren jedoch ihre Aktivität, wenn die Sensorkomponenten in
20 Hydrogelmatrices eingebettet werden, da die Beweglichkeit der Sensorkomponenten eingeschränkt wird (Rounds 2007, J. Fluoresc. 17: 57-63; US 2007/0105176 A1). Überraschenderweise insbesondere auch im Hinblick auf die Berechnungen von Birch et al. (Birch 2001, loc cit.) konnte jedoch im vorliegend Fall eine gegenüber wässrigen Lösungen um bis zu 2,6-fach gesteigerte Aktivität festgestellt werden. Durch die Auswahl von geeigneten Hydrogelmatrices konnte
25 eine Anreicherung des Glukose-bindenden Proteins weit über dessen Löslichkeitsgrenze in wässriger Lösung erzielt werden. Die im Rahmen der vorliegenden Erfindung gefundene verbesserte Löslichkeit in den erfindungsgemäß eingesetzten Hydrogelmatrices ist auf die besonderen Eigenschaften der Hydrogelmatrices im Zusammenspiel mit den Sensorkomponenten und insbesondere den Glukose-bindenden Proteinen, wie dem Concanavalin A, zurückzuführen. Im Falle
30 von Concanavalin A konnte beispielsweise eine mehr als 10-fache erhöhte Konzentration gegenüber einer in freier Lösung erreichbaren Konzentration erreicht werden. Üblicherweise wird die Löslichkeit der Rezeptorkomponente in freier Lösung noch negativ durch die Zugabe des Liganden beeinflusst, da der Rezeptor / Kompetitor-Komplex aufgrund seiner Größe und häufig auch aufgrund von Multivalenzen eine geringere Löslichkeit aufweist. Während beispielsweise ein

Concanavalin A / Dextran-Komplex in Lösung bei einem Massenverhältnis von 1:10 schon ab einer Concanavalin A-Konzentration von 0,5 mg/(g Lösung) beginnt auszufallen, können in einem geeigneten Hydrogel bei gleichem Massenverhältnis Concanavalin A-Konzentrationen von über 50 mg/(g Matrix) eingestellt werden. Somit kann der anwendbare Konzentrationsbereich um ein 100-faches erweitert werden. Dies ist insbesondere von Bedeutung für Anwendungen, bei denen die Analytkonzentration festliegt und nicht durch Verdünnungen oder Ankonzentrierung angepasst werden kann. Solche Schwierigkeiten treten gerade bei in vivo Anwendungen, wie der Bestimmung des Glukosespiegels in Körperflüssigkeiten, auf. Die Konzentration des Analyten Glukose ist in der in vivo Situation nicht an die spezifischen Assay-Bedingungen anzupassen, sondern muss als gegeben hingenommen werden.

Ein weiteres Löslichkeitsproblem tritt insbesondere bei in vivo Anwendungen von biologischen Sensoren auf. Aufgrund der höheren Wellenlänge nimmt die Eigenfluoreszenz des Gewebes ab, so dass bei in vivo Anwendungen langwellige Fluoreszenz-Farbstoffe eingesetzt werden. Diese Fluoreszenz-Farbstoffe sind jedoch typischerweise aufgrund ihrer molekularen Struktur und Größe (konjugierte Systeme) apolar. Wird das Glukose-bindende Protein nun mit einem solchen Farbstoff markiert, erniedrigt sich die Löslichkeit zusätzlich, so dass auch keine hohen Markierungsgrade möglich sind. Wie bereits zuvor beschrieben, kann es daher notwendig werden, das Glukose-bindende Protein mit z.B. Polyethylenglykol zu funktionalisieren, um eine gesteigerte Löslichkeit und damit verbunden höhere Markierungsgrade zu ermöglichen. Die Funktionalisierung mit Polyethylenglykol (Pegylierung) führt jedoch in Lösung regelmäßig zu einer stark reduzierten Glukoseaktivität von zum Beispiel nativem Concanavalin A (relative Glukoseaktivität von 0,4 oder weniger). Überraschenderweise wurde im Rahmen der vorliegenden Erfindung festgestellt, dass in dem Hydrogel der erfindungsgemäßen Vorrichtung diese Verschlechterung nicht auftritt. Vielmehr können Glukoseaktivitäten für mit Polyethylenglykol funktionalisiertem Concanavalin A erzielt werden, die mit denen von nativem Concanavalin A vergleichbar sind (relative Glukoseaktivität = 2,2 bzw. 2,6). Darüber hinaus wurde gefunden, dass die Glukose-Aktivität durch die Erhöhung des Markierungsgrades am Concanavalin A noch zusätzlich gesteigert werden kann in einem Hydrogel, wie es in der Vorrichtung der vorliegenden Erfindung eingesetzt wird. So wurde überraschenderweise in dem anreichenden Hydrogel durch Erhöhung des Markierungsgrads am mit Polyethylenglykol funktionalisierten Concanavalin A sogar eine Verdopplung der Glukoseaktivität erreicht. Im Vergleich zur Messung in Lösung wird die Glukoseaktivität in dem Hydrogel der erfindungsgemäßen Vorrichtung sogar um das 4,3-fache gesteigert. Die Verwendung des Hydrogels in der erfindungsgemäßen

Vorrichtung erlaubt es also, Konzentrationsverhältnisse für das Glukose-bindende Protein sowie seinen Liganden einzustellen, die bei entsprechenden Markierungsgraden Glukose-Aktivitäten erlauben, die um das 4-fache erhöht sind gegenüber von Konzentrationen, die in wässrigen Lösungen einstellbar sind. Dies ermöglicht vorteilhafter Weise auch den Einsatz der erfindungsgemäßen Vorrichtung unter Bedingungen, bei denen die Analytkonzentration nicht den Assay-Bedingungen angepasst werden kann, z.B. bei in vivo Anwendungen.

Zur Bestimmung der Glukosekonzentration unter in vivo Verhältnissen, z.B. bei Diabetikern, muss eine Analytkonzentration von 50 bis 500 mg/dl aufgelöst werden. Eine solche Auflösung kann mit den erfindungsgemäßen Vorrichtungen ohne weiteres erreicht werden. Die Vorrichtungen können hierbei als Sensor sowohl ex vivo als auch in vivo eingesetzt werden. Bei in vivo Anwendungen kann die Sensorvorrichtung beispielsweise subkutan, im Auge, z.B. subkonjunktival, oder an anderen Stellen im Körper platziert werden, die eine Auswertung der gemessenen Glukoseaktivitäten erlauben.

Die Erfindung betrifft somit auch die Verwendung einer erfindungsgemäßen Vorrichtung, wie zuvor beschrieben, zur Bestimmung des Glukosegehalts in einer Probe.

Unter dem Begriff „Probe“ ist im Rahmen der vorliegenden Erfindung eine Zusammensetzung, vorzugsweise eine wässrige Zusammensetzung, zu verstehen, die vermutlich oder tatsächlich Glukose enthält. Bevorzugt handelt es sich bei der Probe um eine biologische Probe. Ganz besonders bevorzugt handelt es sich bei der Probe um eine Körperflüssigkeit, insbesondere, Gewebsflüssigkeit (z.B. interstitielle Flüssigkeit), Blut, Plasma, Serum, Lymphe, Speichel, Tränenflüssigkeit, Schweiß oder Urin. Besonders bevorzugt handelt es sich bei der Probe um Gewebsflüssigkeit, Blut, Serum oder Plasma.

Sofern die Probe ein biologisches Material, z.B. eine Körperflüssigkeit ist, kann sie vorzugsweise aus einem Probanden gewonnen werden, der einen gestörten Glukosemetabolismus entweder tatsächlich oder vermutlich aufweist. Die erfindungsgemäße Vorrichtung kann somit zur ex vivo Diagnostik von Erkrankungen oder Störungen des Glukose-Metabolismus eingesetzt werden, insbesondere zur Diagnose von Diabetes mellitus oder dem metabolischen Syndrom. Weiterhin kann die erfindungsgemäße Vorrichtung nicht nur zur Diagnose, sondern auch zum Monitoring des Glukosespiegels eingesetzt werden. Die Vorrichtung ermöglicht somit auch die Unterstüt-

zung von Therapieentscheidungen, z.B. Insulingaben, die als Antwort auf einen geänderten Glukosespiegel verabreicht werden müssen.

Die erfindungsgemäße Vorrichtung kann für die ex vivo Anwendung beispielsweise in Mikrotiterplatten eingebracht und dort verankert werden. Zu messende Proben werden dann in die Vertiefungen der Mikrotiterplatten aufgetragen und können dann mit einer Reader-Vorrichtung gemessen werden. Ein solcher Ansatz erlaubt das simultane Vermessen einer großen Zahl von Proben und ist somit auch kostengünstig, insbesondere im klinischen Diagnostik-Betrieb.

Im Rahmen der in vitro Anwendung betrifft die Erfindung auch ein Verfahren zur Bestimmung der Menge an Glukose in einer Probe, die tatsächlich oder vermutlich Glukose enthält, umfassend die Schritte:

- (a) In-Kontakt-Bringen der erfindungsgemäßen Vorrichtung mit der Probe für einen Zeitraum und unter Bedingungen, die die Bindung von der in der Probe enthaltenen Glukose an das Glucose-bindende Proteine aus der Vorrichtung ermöglicht; und
- (b) Bestimmen der Menge an durch die Glukose verdrängten Liganden in der Vorrichtung, wodurch die Menge an Glukose ermittelt wird.

Das zuvor beschriebene erfindungsgemäße Verfahren kann noch weitere Schritte umfassen. Beispielsweise können weitere Schritte die Aufarbeitung der Probe betreffen, z.B. die Gewinnung von Serum aus Vollblut. Weitere Schritte könnten durchgeführt werden, um die ermittelte Glukose Menge in Bezug zu pathologischen Veränderungen des Glukosemetabolismus zu setzen. Hierzu könnte die ermittelte Menge mit Referenzmengen abgeglichen werden, die indikativ für bestimmte pathologische Zustände sind, z.B. Diabetes mellitus oder metabolisches Syndrom. Solche Verfahren können dann auch zur in vitro Diagnose von Diabetes mellitus oder metabolischem Syndrom eingesetzt werden. Das erfindungsgemäße Verfahren bzw. einzelne Schritte davon können automatisiert durchgeführt werden, z.B. durch Computer-Implementierung und/oder Robotersysteme.

Geeignete Proben, die mit dem zuvor beschriebenen Verfahren analysiert werden können, sind an anderer Stelle in der Beschreibung ausführlicher beschrieben.

Der Begriff "Menge" bezieht sich sowohl auf die Bestimmung absoluter Mengen als auch relativer Mengen. Die Bestimmung der absoluten Menge kann bevorzugt über eine Kalibrierungskurve erfolgen, die aus Messwerten für bekannte Glukose Mengen mit dem erfindungsgemäßen Verfahren erzeugt wird. Relative Mengen im Sinne der Erfindung sind Mengen, die in Bezug zu einem Normalisierungsparameter gesetzt werden. Es versteht sich, dass im Rahmen des erfindungsgemäßen Verfahrens auch Parameter bestimmt werden können, die durch mathematische Operationen aus den ermittelten Mengenwerten abgeleitet werden können.

Das In-Kontakt-Bringen soll im Rahmen des erfindungsgemäßen Verfahrens ein Eindringen der Probe und damit der darin enthaltenen Glukose in die Vorrichtung ermöglichen. Ferner soll das In-Kontakt-Bringen die Konkurrenz von Glukose mit dem Liganden am Glukose-bindenden Protein, das in die Vorrichtung eingebettet ist, ermöglichen.

Der Nachweis der Verdrängung des Liganden erfolgt im erfindungsgemäßen Verfahren vorzugsweise durch Messung der Zunahme der Intensität an Fluoreszenz, die von einem Donor-Farbstoff ausgeht wie andernorts hierin beschrieben. Die Zunahme resultiert von der Verdrängung des Liganden vom Glukose-bindenden Protein, da die Fluoreszenzintensität des Donor-Farbstoffes im Komplex mit dem Glukose-bindenden Protein reduziert ist. Es versteht sich aber, dass andere Nachweistekniken zur Freisetzung des Liganden ebenso eingesetzt werden können.

Neben den zuvor beschriebenen ex vivo Verwendungen und ex vivo Verfahren der erfindungsgemäßen Vorrichtung betrifft die Erfindung jedoch auch die oben beschriebene erfindungsgemäße Vorrichtung zur Verwendung der Diagnose eines gestörten Glukosemetabolismus bei einem Probanden. Vorzugsweise wird der gestörte Glukosemetabolismus hierbei durch Diabetes mellitus oder das metabolische Syndrom verursacht.

Bei der in vivo Anwendung der erfindungsgemäßen Vorrichtung wird diese in den Körper eingebracht. Hierbei ist zu beachten, dass die Messung des Glukosespiegels, die ja auch die Basis für die Diagnose ist, voraussetzt, dass die Vorrichtung in Kontakt mit einer Körperflüssigkeit kommt, die Glukose enthält, wobei die Konzentration Glukose in der Flüssigkeit repräsentativ für den zu ermittelnden Glukosespiegel ist. Geeignete Körperflüssigkeiten werden an anderer Stelle in der Beschreibung aufgezählt. Besonders bevorzugt ist die Körperflüssigkeit Gewebe-

flüssigkeit. Die in den Körper eingebrachte Vorrichtung generiert dann ein Signal, das zur Diagnosestellung ausgewertet werden kann.

Die erfindungsgemäße Vorrichtung wird bevorzugt an Stellen im Körper eingebracht, die eine optische Messung des von der Vorrichtung generierten Signals ermöglichen. Geeignet sind Stellen mit entweder einer geringen Gewebedicke zwischen Vorrichtung und Körperoberfläche oder mit transparenten Geweben, die gut von dem generierten Signal durchdrungen werden können. Besonders bevorzugt wird die Vorrichtung unter der Haut (subkutan) oder im Auge, z.B. subkonjunktival, platziert. Entsprechende Verfahren zur Implantation der Vorrichtung sind im Stand der Technik bekannt.

Alternativ kann das von der erfindungsgemäßen Vorrichtung erzeugte Signal auch mittels eines geeigneten Übertragungsmediums aus dem Körper heraus übertragen werden. Hierzu kann vorzugsweise ein Signal-leitendes Material als flexibles Kabel eingesetzt werden, z.B. ein Glasfaserkabel. Die Übertragung des Signals kann jedoch auch kontaktlos erfolgen z.B. als Infrarot-, Radio- oder Funksignal. Es versteht sich, dass in diesen Fall das von der erfindungsgemäßen Vorrichtung erzeugte Signal zunächst von einem Detektor, der ebenfalls in der Vorrichtung oder zumindest in räumlicher Nähe angebracht sein muss, ausgelesen und in ein elektromagnetisches Signal, beispielsweise ein Funksignal, umgewandelt werden muss. Dieses elektromagnetische Signal kann dann von einem außerhalb des Körpers liegenden Empfänger empfangen und ausgewertet werden.

Weiterhin betrifft die vorliegende Erfindung die erfindungsgemäße Vorrichtung, wie oben beschrieben, zur Verwendung bei der Bestimmung der Notwendigkeit für eine therapeutische Maßnahme bei einem Probanden mit gestörtem Glukosemetabolismus.

Entsprechende therapeutische Maßnahmen umfassen solche, die zur Behandlung von Diabetes mellitus oder dem metabolischen Syndrom eingesetzt werden. Hierzu gehört neben der Verabreichung von Arzneimitteln, z.B. Insulin, auch die Durchführung anderer therapeutischer Maßnahmen, über die aufgrund des ermittelten gestörten Glukose Metabolismus entschieden werden kann, wie therapeutische Eingriffe, z.B. Gastric-Bypass Operationen, oder Änderungen der Lebensgewohnheiten, z.B. die Durchführung spezieller Diäten.

Im Rahmen der zuvor beschriebenen Anwendung der Vorrichtung kann diese auch mit einer weiteren Vorrichtung gekoppelt werden, z.B. einer Vorrichtung, die die Abgabe eines Arzneimittels steuert. Bevorzugt kann die Vorrichtung der vorliegenden Erfindung hierbei mit einer Vorrichtung zur Abgabe von Insulin gekoppelt werden. Die Abgabe von Insulin kann dann basierend auf der durch die erfindungsgemäße Vorrichtung ermittelten Notwendigkeit gesteuert werden. Eine mit der erfindungsgemäßen Vorrichtung ermittelte Änderung des Glukosespiegels in einer Probe wird hierbei durch z.B. eine Datenverarbeitungseinheit in der Abgabe-Vorrichtung in eine Anweisung übersetzt, die die Notwendigkeit der Insulinabgabe bestimmt. Diese Anweisung vermittelt dann die Abgabe von Insulin ins Blut so lange oder in einer Menge wie benötigt.

Die erfindungsgemäßen Verwendungen der oben beschriebenen erfindungsgemäßen Vorrichtung erlauben somit eine effiziente ex vivo und in vivo Diagnostik des Blutzuckerspiegels und damit die Früherkennung von Erkrankungen, die mit gestörtem Glukosemetabolismus einhergehen, bzw. durch die Verwendung im Rahmen eines klinischen Monitorings auch das Management von solchen Erkrankungen. Die Vorrichtungen sind in diesem Zusammenhang auch geeignet, um Therapieentscheidungen basierend auf den ermittelten diagnostischen Resultaten zu fällen.

Die Erfindung wird durch die folgenden Ausführungsbeispiele illustriert. Die Beispiele schränken jedoch den Schutzbereich nicht ein.

BEISPIELE

Beispiel 1: Herstellung von Sensoren zur Bestimmung von Glukose

Herstellung von Hydrogelpartikeln (anreichernde Matrix)

1 g Alginsäure-Natriumsalz werden in 100 g Wasser unter Rühren gelöst. In einem 5L Becher werden 66,2 g $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ in 4931,3 g Wasser gelöst.

Die Alginat-Lösung wird über eine Pumpe in eine Zwei-Stoffdüse gefördert. Gleichzeitig wird am zweiten Eingang der Düse Druckluft angelegt, sodass die Alginat-Lösung in feine Tröpfchen zerstäubt wird. Die Tröpfchen werden durch die Luftströmung in ein Bad mit der Calciumchlorid Lösung getragen, wo sie gelieren und zu Boden sinken. Die gelierten Kugeln werden anschließend gesammelt.

Herstellung von Sensoren in anreichernder Matrix:

Alginatekugeln werden zur Beladung nacheinander in einer farbstoffmarkierten ConcanavalinA-Lösung und einer farbstoffmarkierten Dextran-Lösung inkubiert. Anschließend werden die beladenen Kugeln abzentrifugiert und die überstehende Lösung abdekantiert. Die beladenen Kugeln werden ggf. anschließend über Nacht in einer Lösung eines zweiten Polymers (z.B. PVA-, PEG-basiert) inkubiert und ggf. durch Zentrifugation abgetrennt. Anschließend werden die Kugeln in eine wässrige Lösung eines photochemisch vernetzbaren Polymers eingemischt. Diese Mischung wird anschließend mit UV-Licht vernetzt, um das Auslaugen der Sensorkomponenten aus den Alginatekugeln zu verhindern.

Die Mengen richten sich dabei nach der Konzentration des zu messenden Analyten und der Markierungsgrad wird in Abhängigkeit von der gewünschten Intensität des Fluoreszenz-Signals gewählt. Als photochemisch vernetzbares Polymer kann beispielsweise Nelfilcon Polymer, ein mit Acrylamid-Gruppen modifizierter Polyvinylalkohol, verwendet werden. Für die photochemische Vernetzung wird noch 0,1% Irgacure 2959 zugegeben. Die fertige Lösung wird in geeignete Formen dosiert und durch UV-Licht ausgehärtet.

Herstellung von Sensoren in nicht anreichernder Matrix:

Farbstoffmarkierte ConcanavalinA-Lösung und farbstoffmarkierte Dextran-Lösung werden nacheinander in eine wasserbasierende Präpolymermischung gegeben und 3 Stunden gerührt. Die Mengen richten sich dabei nach der Konzentration des zu messenden Analyten und der Markierungsgrad wird in Abhängigkeit von der gewünschten Intensität des Fluoreszenz-Signals gewählt. Als photochemisch vernetzbares Präpolymer kann beispielsweise Nelfilcon Polymer, ein mit Acrylamid-Gruppen modifizierter Polyvinylalkohol, verwendet werden. Für die photochemische Vernetzung wird noch 0,1% Irgacure 2959 zugegeben. Die fertige Lösung wird in geeignete Formen dosiert und durch UV-Licht ausgehärtet.

Beispiel 2: Bestimmung der Glukoseaktivität für die Sensoren*Bestimmung der Glucose-Aktivität in Sensoren:*

Das Fluoreszenzspektrum der Sensoren wird bei verschiedenen Glukosekonzentrationen bestimmt. Die Veränderung der Fluoreszenzintensitäten des Donors mit steigendem Glukosegehalt dient als Maß für die Güte des Glukosesensors. Da bei einem in vivo Glukose-Sensor

Glucosekonzentrationen zwischen 50 und 500 mg/dL gemessen werden müssen, wird die Glucose-Aktivität folgendermaßen berechnet:

$$GA = (\text{Intensität}_{500\text{mg/dL}} - \text{Intensität}_{50\text{mg/dL}}) / \text{Intensität}_{50\text{mg/dL}}$$

5

Alle Responsewerte werden zum besseren Vergleich auf die Response des gleichen Systems in Lösung normiert. Zur Ermittlung der relativen Glucose-Aktivität wird die Glucose-Aktivität der Sensoren (in Matrix) durch die Glucose-Aktivität in Lösung dividiert.

10

$$\text{rel GA} = \text{GA}(\text{Matrix}) / \text{GA}(\text{Lösung})$$

Bestimmung der Glucose-Aktivität in Lösung:

ConA-Lösung und Dextran-Lösung werden in Pufferlösung verdünnt und mehrere Stunden gerührt. Das Fluoreszenzspektrum der Lösung wird bei verschiedenen Glucosekonzentrationen bestimmt. Die Veränderung der Fluoreszenzintensitäten des Donors mit steigendem Glucosegehalt dient als Maß für die Güte des Systems. Da bei einem in vivo Glucose-Sensor Glucosekonzentrationen zwischen 50 und 500 mg/dL gemessen werden müssen, wird die Glucose-Aktivität folgendermaßen berechnet:

20

$$GA = (\text{Intensität}_{500\text{mg/dL}} - \text{Intensität}_{50\text{mg/dL}}) / \text{Intensität}_{50\text{mg/dL}}$$

Beispiel 3: Bestimmung des Einflusses der Matrix

Erfindungsgemäß werden das Glukose-bindende Protein und der Ligand in einer Hydrogelmatrix eingebaut, die eine gewisse Wechselwirkung mit dem Glukose-bindende Protein aufweist. Dabei wird die Hydrogelmatrix so ausgewählt, dass zum einen die Wechselwirkung Glukose-bindendem Protein und Hydrogelmatrix größer ist als die zwischen Glukose-bindendem Protein und wässriger Lösung (Anreicherung der Sensorkomponenten). Andererseits darf aber die Wechselwirkung zwischen Glukose-bindendem Protein und dem Analyten (Glukose) nicht oder nicht wesentlich durch die Wechselwirkung Glukose-bindende Protein und Hydrogelmatrix beeinträchtigt werden.

30

Bei geeigneter Auswahl der Hydrogelmatrix erzielt man durch die Wechselwirkung zwischen

Glukose-bindende Protein und Hydrogelmatrix eine Anreicherung des Glukose-bindenden Proteins in der Matrix weit über die Löslichkeitsgrenze des Glukose-bindende Protein in wässriger Lösung. Im Falle von Con A können beispielsweise bis zu 10-fach höhere Konzentrationen als in freier Lösung erzielt werden. Noch extremer gestalten sich die Löslichkeitsprobleme nach Zugabe des Liganden (z.B. Dextran), da der Glukose-bindende Protein-Ligand - Komplex aufgrund seiner Größe und häufig auch aufgrund von Multivalenzen eine geringere Löslichkeit aufweist. Während der ConA-Dextran-Komplex in Lösung bei einem Massenverhältnis von 1:10 schon ab einer ConA-Konzentration von 0,5 mg/g beginnt auszufallen, können in einer geeigneten Hydrogelmatrix bei gleichem Massenverhältnis ConA-Konzentrationen von über 50 mg/g eingestellt werden. Durch die Hydrogelmatrix kann der anwendbare Konzentrationsbereich des Glucosebindenden Proteins, z.B. ConA, um ein 100-faches erhöht werden.

Da bei einer In vivo-Anwendung der Bereich der Analyt-Konzentration fest liegt und nicht z.B. durch Verdünnen oder Aufkonzentrieren angepasst werden kann, müssen die Konzentrationen von Glukose-bindendem Protein und Ligand auf den In vivo-Konzentrationsbereich des Analyten angepasst werden. Oftmals besteht jedoch die Schwierigkeit, dass deshalb Glukosebindende Protein-Konzentrationen und / oder Ligand-Konzentrationen nötig wären, die die Löslichkeitsgrenze überschreiten.

Bei dem ConA-Dextran-System kann z.B. in Lösung nur eine ConA-Konzentration von 0,5 mg/g bei einem Massenverhältnis (Dex : ConA) von 1:10 eingestellt werden, da sonst der ConA-Dextran-Komplex beginnt, zu präzipitieren. Die bei dieser Konzentration erreichte Glucose-Aktivität (GA) wird hier zur Ermittlung der relativen Glucose-Aktivität (rel GA) gleich 1 gesetzt. Wie erwartet wird in einer nicht anreichernden Matrix die Glucose-Aktivität aufgrund der geringeren Beweglichkeit der Sensorkomponenten auf die Hälfte verringert (rel GA = 0,52). In anreichernder Matrix wird bei gleicher Konzentration fast die gleiche Response wie in Lösung erhalten (rel GA = 0,83). In der anreichernden Matrix sind jedoch auch wesentlich höhere ConA-Konzentrationen einstellbar. Bei einer ConA-Konzentration von 10 mg/g wird in anreichernder Hydrogelmatrix eine um das 2,6-fache gesteigerte Glucose-Aktivität erhalten (s. Tabelle 1).

Tabelle 1: Einfluss der Matrix

	in Lösung	in nicht anreichernder Mat-	in anreichern-der Matrix	in anreichern-der Matrix

		rix		
ConA-Konzentration	0,5 mg/g	0,5 mg/g	0,5 mg/g	10 mg/g
rel GA	1	0,52	0,83	2,55

Natives ConA mit DOL = 1, Dextran mit 0,001 mol Farbstoff (FS) pro mol Dex-Untereinheit (UE), Massenverhältnis Dex : ConA = 1:10

5 Beispiel 4: Bestimmung des Einflusses der Konzentration des Rezeptors

In anreichernder Matrix sieht man deutlich eine Abhängigkeit der Glucose-Aktivität von der Ausgangskonzentration des Glukose-bindende Proteins und des Liganden. Bei einem Anstieg der Konzentration wird auch ein Anstieg der Glucose-Aktivität erhalten. Bei sehr hohen Rezeptor-
 10 Konzentrationen nimmt die Glucose-Aktivität wieder ab. Die optimale ConA-Konzentration für einen in vivo-Assay liegt zwischen 8 und 20 mg ConA / g Matrix (s. Tabelle 2).

Tabelle 2: Einfluss der Rezeptor Konzentration

ConA-Konz [mg/g]	0,5	10,0	13,3	30	52,2
Relative Glucose-Aktivität (rel GA)	0,83	2,55	2,76	2,14	1,76

Natives ConA mit DOL = 1, Dextran mit 0,001 mol Farbstoff (FS) pro mol Dex-Untereinheit
 15 (UE), Massenverhältnis Dex : ConA = 1:10

Beispiel 5: Bestimmung des Einflusses des Markierungsgrades Rezeptor

20 Aufgrund der mit höheren Wellenlängen abnehmenden Eigenfluoreszenz des Gewebes müssen bei in vivo Anwendungen langwellige Fluoreszenzfarbstoffe eingesetzt werden. Diese Fluoreszenzfarbstoffe sind typischerweise aufgrund der größeren konjugierten Systeme recht unpolar. Wird das Glukose-bindende Protein mit solchen Farbstoffen markiert, so erniedrigt sich seine Löslichkeit, so dass aufgrund des Ausfallens häufig keine hohen Labelgrade möglich sind. Um
 25 die Löslichkeit des Glukose-bindende Proteins zu erhöhen, ist es vorteilhaft, diese z.B. mit Polyethylenglycol zu funktionalisieren. Dadurch erhöht sich die Löslichkeit des Glukose-bindende Proteins, wodurch höhere Labelgrade bei der Synthese möglich sind.

Pegylierte ConA's führen jedoch in Lösung nur zu weniger als der Hälfte der Glucose-Aktivität von nativen ConA (rel GA = 0,4). Überraschenderweise tritt in der Hydrogel-Matrix diese Verschlechterung nicht auf. Es wird mit PEG-ConA eine vergleichbare Glucose-Aktivität wie mit nativem ConA erhalten (rel GA = 2,2 vs. 2,6) (s. Tabelle 3).

5

Tabelle 3: Einfluss des Markierungsgrades (DOL)

DOL ConA		1	1
Typ		nativ	pegyliert
Lösung, c = 0,5 mg ConA / g	rel GA	1	0,43
Matrix, c = 10 mg ConA / g	rel GA	2,55	2,22

Durch die Pegylierung wird es erst möglich, ConA mit einem hohen Markierungsgrad eines langwelligen Fluoreszenzfarbstoffes zu versehen, welches in Lösung langzeitstabil ist und nicht präzipitiert. Überraschenderweise wird in anreichernder Matrix im Vergleich zu in Lösung keine Verschlechterung der Glucose-Aktivität durch die Pegylierung beobachtet. Nur durch den positiven Effekt der Matrix ist es somit möglich, in einem Assay PEG-ConA mit hohem Labelgrad in hohen Konzentrationen einzusetzen.

10

Erstaunlicherweise kann die Glucose-Aktivität durch eine Erhöhung des Labelgrades am ConA zusätzlich gesteigert werden. In der anreichernden Hydrogel-Matrix wird bei ConA mit DOL = 2,5 fast eine Verdoppelung der Glucose-Aktivität erreicht (rel GA = 4,3 vs. 2,6). Im direkten Vergleich zu der Messung in Lösung wird die Glucose-Aktivität in Matrix durch den kombinierten Effekt von Konzentration und DOL somit sogar um das 4,3-fache erhöht (s. Tabelle 4)

20

Tabelle 4: Einfluss des Markierungsgrades (DOL)

DOL ConA		1	1	2,5*	2,5
Typ		nativ	pegyliert	nativ*	Pegyliert
Lösung, c = 0,5 mg ConA / g	rel GA	1	0,43		1,03
Matrix, c = 10 mg ConA / g	rel GA	2,55	2,22		4,28

*natives ATTO680-ConA mit einem DOL von >1,5 ist in Lösung nicht stabil und fällt aus.

Beispiel 6: Bestimmung des Einflusses der Fluoreszenz-Farbstoffe

- 5 Die Struktur der Fluoreszenz-Farbstoffe, die an Glukose-bindendes Protein bzw. Ligand gebunden sind, hat ebenfalls einen Einfluss auf die Glucose-Aktivität. Als besonders geeignet hat sich eine Kombination aus einem Rhodamin- und einem Oxazin-Farbstoff erwiesen. Für das ConA-Dextran-System ist ein Rhodamin-Donor (z.B. ATTO590- oder ATTO610-Dextran, ROX-Dextran) und ein Oxazin-Acceptor (z.B. ATTO655- oder ATTO680-ConA, Evoblue30-ConA)
- 10 besonders bevorzugt. Im Gegensatz zu dem herkömmlich verwendeten TMR-ConA / FITC-Dextran-System (Xanthen – Rhodamin - Kombination) wird dadurch in Lösung eine 2,1-fache und in anreichernder Matrix sogar eine 2,6-fache Glucose-Aktivität erhalten. Bei einem Rhodamin-Oxazin-Farbstoffpaar kann eine Heterodimer-Wechselwirkung zwischen den Farbstoffen auftreten, welche die Glucose-Aktivität verstärkt (s. Tabelle 5 und 6).

15

Tabelle 5: Einfluss der Farbstoffe

ConA-Farbstoff		ATTO680	TMR
Dextran-Farbstoff		ATTO590	FITC
DOL ConA		2,5*	2,3
Typ		nativ*	nativ
Lösung, c = 0,5 mg ConA / g	rel GA	2,4	1,17
Relative Aktivität im Vergleich zu dem herkömmlichen System FITC/TMR		2,05	1
Matrix, c = 10 mg ConA / g	rel GA	4,92	1,9
Relative Aktivität im Vergleich zu dem herkömmlichen System FITC/TMR		2,59	1

entsprechenden Werte aufgrund der Erfahrungswerte mit PEG-ConA hochgerechnet:

FITC-Dextran mit 0,01 mol FS/mol UE, Massenverhältnis Dex : ConA = 1:10

Tabelle 6: Einfluss der Farbstoffe

		ATTO590/ATTO680	ROX/Evoblue30
Matrix, c = 10 mg ConA / g	rel GA	2,55	2,1

Natives ConA mit DOL = 1, Dextran mit 0,001 mol Farbstoff (FS) pro mol Dex-Untereinheit (UE), Massenverhältnis Dex : ConA = 1:10

5 Beispiel 7: Bestimmung des Einflusses der Beschaffenheit der Hydrogelmatrix

Die Glucose-Aktivität ist auch abhängig von der Beschaffenheit der Hydrogel-Matrix. Die Hydrogel-Matrix kann aus einem Polymer oder aus einer Mischung von mehreren Polymeren bestehen. Es hat sich eine Hydrogel-Matrix aus Alginat oder einer Mischung aus einem Alginat- und Polyvinylalkohol-Hydrogel als vorteilhaft herausgestellt. Das Alginat-Hydrogel ermöglicht durch seine Wechselwirkung mit dem ConA und dem Dextran die Anreicherung der Sensor-
komponenten in hohen Konzentrationen.

Das Präpolymer des 2. Hydrogels (z.B. PVA) kann in die Alginatkugeln eindringen und nach seiner Vernetzung ein interpenetrating Network mit dem Alginat bilden. Die Maschenweite des Interpenetrating Network beeinflusst die Beweglichkeit der Moleküle des Glukose-bindenden Proteins und des Liganden und somit auch die Glucose-Aktivität. Die Maschenweite kann beeinflusst werden durch die Art, das Molekulargewicht, den Feststoffgehalt des Polymers sowie den Anteil an Vernetzerguppen, welcher die Anzahl an Knotenpunkten bestimmt.

Ein geringerer Gehalt an Vernetzerguppen führt zu einer höheren Glucose-Aktivität. Durch eine Halbierung der Vernetzerguppen kann die Aktivität sogar um das 1,5-fache gesteigert werden. Im Vergleich zu dem System in Lösung kann somit ebenfalls eine 4,2-fache Verbesserung der Glucose-Aktivität erzielt werden, ohne eine Erhöhung des Labelgrades am ConA (s. Tabelle 7).

Tabelle 7: Einfluss des Vernetzergehaltes

Vernetzergehalt (mmol/g)	0,486	0,33	0,26
rel GA	2,76	4,04	4,24

Natives ConA (13 mg/g) mit DOL = 1, Dextran mit 0,001 mol Farbstoff (FS) pro mol Dex-

Untereinheit (UE), Massenverhältnis Dex : ConA = 1:10

Der Feststoffgehalt des Netzwerkes hat ebenfalls einen Einfluss auf die Glucose-Aktivität. Je höher der Feststoffgehalt umso geringer ist die Glucose-Aktivität (s. Tabelle 8).

5

Tabelle 8: Einfluss des Feststoffgehaltes

FG Präpolymer	25%	30%	35%	40%
rel. GA	2,87	2,76	2,48	1,96

Natives ConA (13 mg/g) mit DOL = 1, Dextran mit 0,001 mol Farbstoff (FS) pro mol Dex-Untereinheit (UE), Massenverhältnis Dex : ConA = 1:10

10

Patentansprüche

5

1. Vorrichtung umfassend ein Hydrogel mit einem darin eingelagerten Glukose-bindenden Protein und einem Liganden des Glukose-bindenden Proteins, wobei das Hydrogel eine erste Hydrogelmatrix aus Alginat umfasst und eine zweite Hydrogelmatrix, die innerhalb der ersten Hydrogelmatrix ein interpenetrierendes Netzwerk ausbildet.

10

2. Vorrichtung nach Anspruch 1, wobei die zweite Hydrogelmatrix aus einem wasserlöslichen Polymer besteht mit mindestens einer vernetzbaren Gruppe pro Molekül und einem Molekulargewicht von höchstens 500.000.

15

3. Vorrichtung nach Anspruch 1 oder 2, wobei die zweite Hydrogelmatrix ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus: Polyvinylalkoholen (PVAs; einschließlich Copolymere mit Vinylacetate und/oder Ethylene), Polyethylenglykolen (PEGs), und Polyhydroxyalkanoaten (PHAs), Poly (2-Methyl-2 oxazolinen), Poly (2-Ethyl-2 oxazolinen), Poly (2-Hydroxyethyl-2 oxazolinen), Poly (2-(1-(Hydroxymethyl)-ethyl)-2 oxazolinen), Poly-(hydroxyethylmetacrylat) (PHEMA), Poly-(hydroxyethylacrylat) (PHEA), Poly-vinylpyrrolidonen, Poly-(dimethyl)acrylamid, Poly-(hydroxyethyl)acrylamid, Poly(ethylene-co-vinylalkohol), Poly(vinylacetat-co-vinylalkohol), Poly(ethylene-co-vinylacetat-co-vinylalkohol) und Poly(ethylenglycol-co-propylenglycol).

20

25

4. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei die erste und/oder die zweite Hydrogelmatrix, die in der Lage sind, mit dem Glukose-bindenden Protein zu interagieren.

30

5. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei das Glukose-bindende Protein ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus: Lektinen, Enzymen, die Glukose als Sub-

strat binden, Antikörpern, die spezifisch Glukose erkennen, und Aptameren, die spezifisch Glukose erkennen.

- 5 6. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei der Ligand des Glukose-bindenden Proteins ein Oligosaccharid, ein glykosyliertes Markromolekül oder ein glykosylierter Nanopartikel ist.
7. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei das Glukose-bindende Protein Concanavalin A ist.
- 10 8. Vorrichtung nach Anspruch 7, wobei die Concanavalin A Konzentration größer als 0,5 mg/(g Matrix) ist.
- 15 9. Vorrichtung nach Anspruch 8, wobei die Concanavalin A Konzentration zwischen 2 und 60 mg/(g Matrix) liegt.
- 10 10. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 7 bis 9, wobei das Concanavalin A durch chemische Modifikation eine im Vergleich zu unmodifiziertem Concanavalin A erhöhte Wasserlöslichkeit aufweist.
- 20 11. Vorrichtung nach Anspruch 10, wobei die Modifikation ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus: Pegylierung, Acetylierung, Succinylierung und Polyoxazolinylisierung.
- 25 12. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 11, wobei das Glukose-bindende Protein mit einem Oxazin-Farbstoff verknüpft und der Ligand des Glukose-bindenden Proteins mit einem Rhodamin-Farbstoff verknüpft ist.
13. Verwendung einer Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 12 zur Bestimmung des Glukosegehalts in einer Probe.

14. Verwendung nach Anspruch 13, wobei die Probe aus einem Probanden gewonnen wurde, der einen gestörten Glukosemetabolismus aufweist oder der vermutlich einen gestörten Glukosemetabolismus aufweist.

5

15. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 12 zur Verwendung der Diagnose eines gestörten Glukosemetabolismus bei einem Probanden.

10

16. Verwendung nach Anspruch 13 oder 14 oder Vorrichtung nach Anspruch 15, wobei der gestörte Glukosemetabolismus durch Diabetes mellitus oder metabolisches Syndrom verursacht wird.

15

17. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 12 zur Verwendung bei der Bestimmung der Notwendigkeit für eine therapeutischen Maßnahme bei einem Probanden mit gestörtem Glukosemetabolismus.