

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4560403号
(P4560403)

(45) 発行日 平成22年10月13日(2010.10.13)

(24) 登録日 平成22年7月30日(2010.7.30)

(51) Int.Cl.	F I
GO 1 N 23/223 (2006.01)	GO 1 N 23/223
GO 1 N 21/78 (2006.01)	GO 1 N 21/78 C
GO 1 N 27/447 (2006.01)	GO 1 N 27/26 3 1 5 K
GO 1 N 30/02 (2006.01)	GO 1 N 27/26 3 3 1 K
GO 1 N 33/15 (2006.01)	GO 1 N 30/02 Z
請求項の数 7 (全 11 頁) 最終頁に続く	

(21) 出願番号 特願2004-524531 (P2004-524531)
 (86) (22) 出願日 平成15年6月24日 (2003.6.24)
 (65) 公表番号 特表2006-503268 (P2006-503268A)
 (43) 公表日 平成18年1月26日 (2006.1.26)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2003/020103
 (87) 国際公開番号 W02004/011898
 (87) 国際公開日 平成16年2月5日 (2004.2.5)
 審査請求日 平成18年5月26日 (2006.5.26)
 (31) 優先権主張番号 10/206,524
 (32) 優先日 平成14年7月25日 (2002.7.25)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 505031347
 ザ・リージェンツ・オブ・ザ・ユニバーシ
 ティ・オブ・カリフォルニア
 アメリカ合衆国 ニューメキシコ州, ロス
 ・アラモス, ロス・アラモス・ナショナル
 ・ラボラトリー, LC/IP, MS A
 1 8 7
 (74) 代理人 100112988
 弁理士 瀬戸 一宏
 (72) 発明者 ジョージ・ジェイ・ハブリラ
 アメリカ合衆国 ニューメキシコ州, ロス
 ・アラモス, カミノ・マンザナ 1 9 2 0

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 マイクロX線蛍光発光を使用した化学物質をスクリーニングするためのフロー方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

結合された複合体を形成するための少なくとも一つの対象バインダと、少なくとも一つの化学物質の間において化学結合が発生するか否かを決定するための方法であって、

少なくとも一つの化学物質と少なくとも一つの対象バインダを含む溶液を準備することと、

前記溶液を少なくとも二つの分離された成分にフロー分離することと、任意のフロー分離された成分中に存在する化学物質、及び、任意の結合された複合体の化学物質部分の原子からX線蛍光信号を生成するために、前記原子を励起することと、

分離された成分中に存在する化学物質、及び、任意の結合された複合体の化学物質部分に存在する励起された原子から生成されたX線蛍光信号を検出することと、

分離された成分中に存在する化学物質、及び、任意の結合された複合体の化学物質部分に存在する励起された原子から生成されたX線蛍光信号から、任意の分離された成分が結合された複合体を含むか否かを決定することを含む方法。

【請求項 2】

選択されたフロー分離された成分を転換させることをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記X線励起ビームが12keVより大きいエネルギーを有するX線を含む、請求項 1

に記載の方法。

【請求項 4】

前記 X 線励起ビームが微小焦点 X 線管を使用して生成される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

結合された複合体を形成するための少なくとも一つの対象バイндаと、少なくとも一つの化学物質の間において化学結合が発生するか否かを決定するための方法であって、

少なくとも一つの化学物質と少なくとも一つの対象バイндаを含む溶液を準備することと、

勾配圧力を使用して前記溶液を少なくとも二つの分離された成分にフロー分離することと、

任意のフロー分離された成分中に存在する化学物質、及び、任意の結合された複合体の化学物質部分の原子から X 線蛍光信号を生成するために、前記原子を励起することと、

分離された成分中に存在する化学物質、及び、任意の結合された複合体の化学物質部分に存在する励起された原子から生成された X 線蛍光信号を検出することと、

分離された成分中に存在する化学物質、及び、任意の結合された複合体の化学物質部分に存在する励起された原子から生成された X 線蛍光信号から、任意の分離された成分が結合された複合体を含むか否かを決定すること

を含む方法。

【請求項 6】

選択されたフロー分離された成分を転換させることをさらに含む、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

前記 X 線励起ビームが 12 KeV より大きいエネルギーを有する X 線を含む、請求項 5 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(連邦の権利に関する宣言) 本発明は、米国エネルギー庁により与えられた契約番号 W-7405-ENG-36 の下に政府の支援により行われた。政府は本発明について特定の権利を有する。

【0002】

本発明は、一般に結合現象を検出することに関し、より詳細には、潜在的な薬剤化学物質と対象バイндаの間の結合現象を検出するためのマイクロ X 線蛍光分光法を使用したフロー方法に関する。

【背景技術】

【0003】

薬剤化学物質は、現在人気のある PrilosecTM、LipitorTM、ZocorTM、ProzacTM、ZoloftTM 及び CelebrexTM のような薬剤における活性成分であり、これらの薬剤属性はこれらの一以上の蛋白質の「結合部位」に結合する能力に結びついていると信じられている。蛋白質の結合属性は、ポリペプチド鎖の露出面アミノ酸残基に大きく依存する (Bruce Alberts 他「Molecular Biology of the Cell」第二版、Garland Publishing, Inc., New York、1989年及び H. Lodish 他「Molecular Cell Biology」第四版、W. H. Freeman and Company、2000年参照)。これらのアミノ酸残基は、イオン及び他の分子と弱い非共有結合を形成し得る。有効な結合は、一般に、蛋白質の「結合部位」における多数の弱い結合の形成を必要とする。結合部位は、通常にはアミノ酸の特定の配列により形成された蛋白質内の空洞である。有効な結合が起こるためには、結合部位との正確なフィットがなければならない。結合部位の形状は異なる蛋白質の間において大きく異なる可能性があり、同一の蛋白質の異なる立体配座の間においてさえ異なる可能性がある。同一の蛋白質の僅かに異なる立体配座ですら、それらの結合能力において大きく異なり得る。これらの理由から、いずれの化学物質が蛋白質に有効に結合するかを予測することは極めて困難である。

10

20

30

40

50

【 0 0 0 4 】

有効な薬剤化学物質を識別するためには、多くの年数が掛かり得る。重要な薬剤化学物質の識別を急ぐ要望は、構造的又は化学的に関連した多数の物質をスクリーニングするためのスクリーニング戦略の使用を促進した不断の挑戦となり、これは従来技術における蛋白質への結合属性についての「ライブラリ」として知られる。

【 0 0 0 5 】

スクリーニング方法は、一般に、潜在的な薬剤化学物質を対象バイндаに組み合わせることと、結合が起こる場合に潜在的な薬剤化学物質のいずれが対象バイндаのいずれに結合するかを決定することを包含する。潜在的な薬剤化学物質は、好適には血流中に溶解し得る水溶性の有機化合物である。対象バイндаは、一般に、酵素、非酵素蛋白質、DNA、RNA、微生物（例えばプリオン、ウィルス、バクテリア等）、ヒト細胞、植物細胞、動物細胞等のような生物学的物質である。少なくとも一つの対象バイндаに結合する潜在的な薬剤化学物質は、さらなる薬剤的属性（例えば効能及び毒性）の調査のための候補となる可能性が高い。

10

【 0 0 0 6 】

下記の三つの特許において、いくつかの公知のスクリーニング方法が説明されている。

【 0 0 0 7 】

2000年11月14日に発行されたD. Allen Annis他への「Method for Identifying Compounds in a Chemical Mixture」と題する米国特許第6,147,344号は、化学物質化合物の混合物から質量分光法データを自動的に分析するための方法を説明する。

20

【 0 0 0 8 】

2002年2月5日に発行されたJonathan A. Ellman他への「Pharmacophore Recombination for the Identification of Small Molecule Drug Lead Compounds」と題する米国特許第6,344,334号は、対象生物学的分子をクロスリンクされた対象結合断片のライブラリに接触させることにより、前記対象生物学的分子の結合を抑制する薬剤先導化合物を識別するための方法を説明する。

【 0 0 0 9 】

2002年5月28日に発行されたOle Hindsgaul他への「Apparatus for Screening Compound Libraries」と題する米国特許第6,395,169号は、対象受容体に結合するライブラリのメンバを識別しランク付けするための質量分光分析と組み合わせられたフロントalkromatographyを使用する装置を説明する。

30

【 0 0 1 0 】

スクリーニング方法は、さもなければ相似のタグ付けされていない物質はスクリーニング方法のために選択された分析技術を使用しても不可視であるので、時にタグ付けされた物質を使用する。タグ付けはラベル付けされた化学物質の部分に化学物質に付加することを含み得る。タグを必要とするスクリーニング方法の例は、蛍光活性細胞選別である。前記方法の例は、蛍光タグを有する細胞と抗体の溶液を準備することを含む。抗体のいくつかは、細胞のいくつかに結び付いている。一度に一つ、細胞はレーザービーム及び（紫外線/可視蛍光検出器のような）検出器を越えて流れる。蛍光を発する細胞は、タグ付けされた抗体に結び付いていると決定され、その後回収器に向かって転換させられる（例えば Bruce Alberts他「Molecular Biology of the cell」第二版、Garland Publishing, Inc., New York, 1989年、第159~160頁参照）。

40

【 0 0 1 1 】

一般に、蛍光タグの付加は、化学物質及び/又は対象バイндаを可視/さもなければ不可視にするためにのみ提供され、タグ付けされていない相似物の結合特性を変化させないと仮定される。化学物質又は対象バイндаの構造への小さな変化であっても、その作用に影響を与え得ることは良く知られているため、前記仮定は有効なものではないことがあり得る。タグ付けされた代替物はそのタグ付けされていない対応物と構造的に異なり、これらの構造的な違いはこれらの結合特性に影響を与え得る。

【 発明の開示 】

50

【発明が解決しようとする課題】**【0012】**

対象バインダに結合するための潜在的な薬剤化学物質をスクリーニングするための効率的な方法は、高度に望まれたままである。

【0013】

従って、本発明の目的は、潜在的な薬剤化学物質の結合特性を評価する効率的な方法を提供することである。

【0014】

本発明の別の目的は、潜在的な薬剤化学物質と対象バインダの間の結合現象をスクリーニングするための効率的な方法である。

【0015】

本発明のさらなる別の目的は、九以上の原子番号を有する少なくとも一つの原子を含む潜在的な薬剤化学物質と対象バインダの間の結合現象を検出するスクリーニング方法である。

【0016】

本発明の追加の目的、利点及び新規な特徴は、部分的には以下の記載において述べられ、部分的には以下を検証することにより当業者にとって自明となり、あるいは本発明の実施により知得され得る。本発明の目的及び利点は、添付の特許請求の範囲において特に指摘される手段及び組み合わせにより実現及び達成され得る。

【課題を解決するための手段】**【0017】**

(発明の要旨) 本発明の目的及び趣旨によれば、本明細書において具現され広く記載されるように、本発明は少なくとも一つの対象バインダに結合するための化学物質の混合物をスクリーニングするための方法を含む。前記方法は、化学物質の混合物を少なくとも一つの対象バインダに組み合わせることによって、化学物質の混合物の溶液を準備することを含む。前記溶液は、少なくとも二つの分離された成分にフロー分離される。少なくとも一つのフロー分離された成分は、X線励起ビームに曝される。前記方法は、少なくとも一つのフロー分離されて被曝された成分から放射されたX線蛍光信号を検出することと、検出可能なX線蛍光信号を有するフロー分離された成分を隔離することをも含む。その後、フロー分離されて隔離された成分の同一性が決定され得る。

【0018】

本発明は、少なくとも一つの対象バインダに結合するための潜在的な薬剤化学物質の混合物をスクリーニングするための装置をも含む。前記装置は、化学物質と少なくとも一つの対象バインダの混合物の溶液を収容するための容器を含む。前記装置は、前記溶液を少なくとも二つの分離された成分に分離するためのフロー分離器をも含む。前記装置は、分離されて流れる成分のうちの一つをX線励起ビームに曝すためのX線励起源をも含む。前記装置は、フロー分離された成分から放射されたX線蛍光信号を検出するためのX線検出器と、選択されたフロー分離された成分を転換させるためのダイバータと、選択されたフロー分離された成分を隔離するための容器をも含む。

【発明を実施するための最良の形態】**【0019】**

(発明の詳細な説明) 簡潔には、本発明は潜在的な薬剤化学物質と対象バインダの間の結合現象を識別するための方法を含む。前記方法は、少なくとも一つの対象バインダを前記混合物に加えることによって、潜在的な薬剤化学物質の混合物を変更することを含む。潜在的な薬剤化学物質のいずれかと対象バインダのいずれかの間に任意の結合した複合体を形成し得る場合に前記複合体を形成するのに十分な時間を与えた後、結果として生じる溶液は少なくとも二つの成分にフロー分離される。各成分は、X線励起ビームに曝される。被曝された成分が検出可能なX線蛍光信号を放射する場合、当該成分は隔離される。隔離された任意の成分の同一性は、ガスクロマトグラフィー、液体クロマトグラフィー、質量分光分析、核磁気共鳴分光法、赤外分光法、紫外分光法、可視分光法、元素分析、細胞

10

20

30

40

50

培養、免疫学的検定等のような一以上の標準分析技術を使用して決定され得る。

【0020】

本発明の方法は、結合現象を検出するためのプローブとしてX線蛍光発光を使用する。X線蛍光発光は、化学物質試料内に存在する化学元素を決定し、試料内のそれらの元素の重量を決定するために使用されてきた強力な技術である。前記方法の基礎をなす物理的原理は、特定の元素の原子がX線放射により照射された時、当該原子がK殻電子のような核電子を放出することである。結果として生じる原子は励起された状態にあり、放出された電子をより高いエネルギー軌道からの電子に置き換えることによって基底状態に戻り得る。これは、光子の放射、即ちX線蛍光発光を伴い、光子エネルギーは前記二つの電子のエネルギーの差分に等しい。各元素は軌道エネルギーの特徴的なセットを有し、それゆえに特徴的なX線蛍光スペクトルを有する。

10

【0021】

PrilosecTM、LipitorTM、ZocorTM、ProzacTM、ZoloftTM及びCelebrexTMのような多くの人気のある薬剤化学物質は、フッ素、塩素及び/又は硫黄の元素を含む。X線蛍光発光は、前記の元素を検出し計量するのに使用され得て、また一般に、九以上の原子番号を有する任意の元素を検出し計量するのに使用され得るので、潜在的な薬剤化学物質を検出するのに特に適している。

【0022】

本発明は、少なくとも一つの対象バイндаに結合するための潜在的な薬剤化学物質の混合物をスクリーニングするための装置をも含む。前記装置は、化学物質と少なくとも一つの対象バイндаの混合物の溶液を収容するための容器を含む。前記装置は、前記溶液を少なくとも二つの分離された成分に分離するためのフロー分離器をも含む。前記装置は、少なくとも一つのフロー分離された成分をX線励起ビームに曝すためのX線励起源をも含む。前記装置は、フロー分離された成分から放射されたX線蛍光信号を検出するためのX線検出器と、選択されたフロー分離された成分を転換させるためのダイバータと、選択されたフロー分離された成分を隔離するための容器をも含む。

20

【0023】

X線蛍光分光計は、X線励起源とX線検出器を含む。前記X線蛍光分光計は、試料にX線ビームを照射し、試料からX線蛍光発光を検出し、いずれの元素が試料内に存在するかを決定するためにX線蛍光発光を使用し、これらの元素の量を提供することが可能である。本発明を実証するために使用されるX線蛍光分光計は、微小焦点X線管と、リチウム拡散型シリコン固体状態検出器と、処理電子機器と、製造供給元から供給されたオペレーティングソフトウェアを備えた、商業的に利用可能なEDAX Eagle XPLエネルギー分散X線蛍光分光計であった。

30

【0024】

X線蛍光による毛管電気泳動の使用は、本明細書において参考として組み込まれる「Element-Specific Detection in Capillary Electrophoresis Using X-Ray Fluorescence Spectroscopy」、Analytical Chemistry, vol. 72、第1754~1758頁(2000年)においてS. E. Mann他により記載されている。Mann他は、CDTA(シクロヘキサンジアミン四酢酸)のキレート化複合体の混合物の準備及びこれに続く毛管電気泳動を使用した分離を報告している。分離された複合体は、シンクロトロン生成された単色10KeV X線ビームを使用して検出された。

40

【実施例1】

【0025】

本発明の実施は添付の図面によりさらに理解され得る。類似又は同一の構造は、同一の参照符号を使用して識別される。図1は、本発明のための典型的な処理フロー図を示す。本発明によれば、貯蔵器12からの潜在的な薬剤化学物質は、対象バイнда貯蔵器14からの少なくとも一つの対象バイндаと組み合わせられて、貯蔵器16内の溶液を形成する。本発明に使用される潜在的な薬剤化学物質は、典型的には水溶性の有機化学物質であり、九以上の原子番号を有する少なくとも一つの元素を有する。好適には、前記薬剤化学物質

50

は、フッ素、塩素、臭素、ヨウ素、硫黄、リン、セレンウム、ランタン、セリウム、プラセオジウム、ネオジウム、サマリウム、ユーロピウム、ガドリニウム、テルビウム、ジスプロジウム、ホルミウム、エルビウム、ツリウム、イッテルビウム、ルテチウム、アンチモン、ビスマス及びヒ素から選択された少なくとも一つの元素を含む。この発明に使用され得る対象バイндаは、酵素、非酵素蛋白質、DNA、RNA、植物細胞、動物細胞、ヒト細胞及び微生物（例えばプリオン、ウィルス、バクテリアを含む）等を含む。

【0026】

潜在的な薬剤化学物質と対象バイндаの混合物の溶液は、フロー分離器18に入る。フロー分離器18は、前記溶液を少なくとも二つの成分にフロー分離する移動相を使用する。本発明に使用され得るフロー分離器は、遠心分離機、細胞選別器又はクロマトグラフ（例えば高性能液体クロマトグラフのような液体クロマトグラフ、毛管電気泳動分離器のような電気泳動分離器、ゲル濾過クロマトグラフ、ゲル浸透クロマトグラフ等）を含むが、これらに限られない。好適には、分離器は毛管電気泳動分離器、即ち、管内側の移動相（例えば水性緩衝溶液）と管の長さによる電位を有する長く細い管である。

【0027】

上記混合物は複数の成分に分離されるので、前記成分はX線に曝される。好適にはロジウムターゲットX線管であるX線励起源20は、X線ビーム22を分離された成分に伝達する。前記成分は、X線蛍光信号24を放射し又は放射しない。X線蛍光信号24は、X線蛍光検出器26によって検出される。本発明に使用され得るX線検出器は、リチウム拡散型シリコン検出器、シリコン拡散検出器又はPINダイオードを含むが、これらに限られない。被曝された成分がX線蛍光信号を放射しない場合、当該成分は第一の回収器28に向けられる。被曝された成分がX線蛍光検出器26によって検出される蛍光信号を放射する場合、当該成分は第二の回収器30に向けられる。前記成分は、少なくとも一つの潜在的な薬剤化学物質と対象バイндаの結合された複合体を含むことが期待される。

【0028】

第一の回収器と第二の回収器のみが図1に示されているが、上記混合物から隔離された分離された成分の数に依存して、より多くの回収器が使用され得ることは理解されるべきである。

【0029】

検出可能なX線蛍光信号を放射する分離された成分、即ち第二の回収器30に向けられた成分は、その後分析器32に送られ得る。本発明に使用され得る分析器は、ガスクロマトグラフ、液体クロマトグラフ、質量分光計、核磁気共鳴分光計、赤外分光計、紫外-可視(UV-VIS)分光計、フッ素計、燃焼分析器(元素分析用)、細胞培養、免疫学的検定等を含むが、これらに限られない。分析器の選択は、分析される潜在的な薬剤化学物質及び/又はバイндаの性質に依存するであろう。

【0030】

図2は、本発明のスクリーニング装置の実施形態の模式図を示す。図2が示すように、スクリーニング装置34はインレット移動相貯蔵器36を含み、インレット移動相貯蔵器36は毛管分離器40に移動相38を与える。分離器のインレット端42はインレット移動相貯蔵器36の中に所在し、アウトレット端44はアウトレット移動相貯蔵器46の中に所在する。移動相38が分離器40を満たした後、潜在的な薬剤化学物質と少なくとも一つの対象バイндаの混合物の総量が、分離器40のインレット端42に導入される。その後、インレット端42は、移動相貯蔵器36に置き換えられる。分離器40のインレット端42とアウトレット端44の間の電位は、分離器40を通じて移動相38の流れと前記混合物の流れを促進する。図2は、成分48が前記混合物から分離されたことを示す。図2は、分離された成分48にX線励起ビーム22を方向付けるX線励起源20を示し、分離された成分48はその後X線蛍光検出器26によって検出されるX線蛍光信号24を放射する。放射されたX線蛍光信号の検出は転換弁50を始動させ、転換弁50は移動相36と分離された成分48の流れをダイバータ52に転換させる。ダイバータ52は、移動相36と分離された成分48を成分回収器54に向ける。

【0031】

前述した分離は電位を使用して達成され、電位は毛管分離器40の長さに亘る電気傾度を与えた。前記分離は、管の長さに沿って勾配圧力を与えることによっても達成され得る。本実施形態において、高性能液体クロマトグラフィーのために、管は固定相を含み、試料射出インレットは溶液を管に導入するために使用され、ポンプは勾配圧力を与えるであろう。

【0032】

図2が示すように、成分48は、毛管分離器40の水平部分に沿って分離される。この特定の構成は、微生物又は細胞である対象バインダから派生した複合体を分離するためには最適でないと思われる。これらの対象バインダについては、垂直部分に沿って分離する分離器/選別器が好適である。図3は、この発明に使用され得る前記のような分離器/選別器の実施形態を示す。分離器/選別器56は、付加された蛋白質又は核酸等を有する細胞、微生物、小球体から派生した混合物を分離及び選別するために使用され得る。分離器/選別器56は垂直分離器58を含み、垂直分離器58を通じて分離が起こる。図3が示すように、混合物は成分48と成分60に分離された。X線励起源20からのX線ビーム22を受けた成分48はX線蛍光信号を放射し、前記X線蛍光信号はX線蛍光検出器26により検出された。これは印加電圧源62における反応を引き起こし、印加電圧源62は成分48を回収器64に逸らす電圧を印加する。成分60が検出可能なX線蛍光信号を放射しない場合、成分60を逸らすための電圧は印加されず成分60は回収器66に流れ込む。しかし、成分60が検出可能なX線蛍光信号を放射する場合、成分60を逸らすための電圧が印加されて成分60は回収器64に流れ込む。

【0033】

分離器/選別器56は、Bruce Alberts他「Molecular Biology of the Cell」第二版、Garland Publishing, Inc., New York, 1989年、第159~160頁により述べられたタイプの従来の蛍光発光活性化細胞選別を実行するためのレーザー源及び関連付けられた検出器を含み得る。

【0034】

潜在的な薬剤化学物質が特定の対象バインダと結合する必要がある場合、例えば、本発明に従って当該蛋白質に結合するために多数の異なる潜在的な薬剤化学物質がスクリーニングされ得る。本発明は、どの潜在的な薬剤化学物質が強く当該蛋白質に結合するかを、弱く結合するもの又は全く結合しないものから見分けるために使用され得る。前記蛋白質は約十から一万の潜在的な薬剤化学物質と組み合わせられ、それぞれの潜在的な薬剤化学物質は九又はそれより大きい原子番号を有する少なくとも一つの元素を含む。好適には、潜在的な薬剤化学物質は九又はそれより大きい原子番号を有する元素を含み、スクリーニング方法を単純化するため前記元素は対象バインダ内に発見されない。

【0035】

本発明は、例えばコバルトイオン(Co^{2+})及び/又はシアノコバラミンのいずれが公知の生物学的に活性である蛋白質Ure2p(Finny G. Kuruville他「Dissecting Glucose Signaling With Diversity-Oriented Synthesis and Small-Molecule Microarrays」、Nature、Vol. 416、第653~657頁参照)に結合するかを決定するために使用され得る。硝酸コバルト(II)及びシアノコバラミンの水溶液がUre2pに加えられる。結果として生じる水溶液は、例えば毛管電気泳動分離器を使用して本発明によりフロー分離される。Ure2pと Co^{2+} 及び/又はシアノコバラミンの間に形成されるいずれの複合体も Co^{2+} 及びシアノコバラミンのいずれかから異なる保持時間を有するべきであり、検出可能なX線蛍光信号を放射し、本発明を使用して隔離可能である。

【0036】

上記分離は、例えば、電位を与えるためのBertanTMモデルARB-30高電圧電源と、長さ70cm、内径(id)100 μm 、外径(od)170 μm の寸法を有する石英ガラス毛管(Polymerico TechnologiesTM)を使用して実行され得る。前記毛管は最初に15分間1.0モルのNaOH溶液により洗い流され、次に15分間蒸留され脱イオン化された水により洗浄され、次に追加

10

20

30

40

50

の15分間75ミリモルのTrisma緩衝液 (pH 8.0) により洗い流され満たされることによって状態が整えられる。

【0037】

ベースラインは、コバルト硝酸塩 ($\text{Co}(\text{NO}_3)_2$ 、200ppm Co^{2+}) とシアノコバラミン (10.2ミリモル) の水性混合物を毛管内に導入し、前記毛管の両端間に10kVの電位を印加し、前記混合物をその成分に分離することにより得られた。Rh対象励起源及びSiLi検出器を備えたEDAX™ Eagle IIマイクロX線蛍光システムが、分離された各成分を尋問し、放射された任意のX線蛍光信号を測定するために使用された。前記システムのX線管は、40kV及び1000 μA にて動作させられた。CoK X線放射は、結合していない Co^{2+} とシアノコバラミンを検出するために監視された。スペクトル取得時間は約10秒であった。結合していない Co^{2+} によるピークは、約1分の半値全幅 (FWHM) と共に約4.5分に検出された。シアノコバラミンのピークは、約1.5分のFWHMと共に約8.5分に検出された。

10

【0038】

同様に、本発明はフェリチン及び/又はシアノコバラミンがUre2pに結合するか否かを決定するために使用され得る。フェリチン及びシアノコバラミンの水溶液は、Ure2pに加えらる。結果として生じる水溶液は、毛管泳動分離器を使用してフロー分離され得る。X線ビームに被曝された時、フェリチン中の鉄及びシアノコバラミン中のコバルトが、それぞれ識別可能かつ検出可能なX線蛍光信号を放射する。前記X線蛍光信号は、フェリチン及び/又はシアノコバラミンとUre2pの間の複合体が形成されたか否かを決定するために使用され得る。

20

【0039】

ベースラインは以下のように得られた。毛管電気泳動分離器は、分離電位を与えるためのBertan™モデルARB-30高電圧電源と、長さ70 cm、内径 (id) 100 μm 、外径 (od) 170 μm の寸法を有する石英ガラス毛管 (Polymicro Technologies™) を使用して準備される。前記毛管は最初に15分間1.0モルのNaOH溶液により洗い流され、次に15分間蒸留され脱イオン化された水により洗浄され、次に追加の15分間75ミリモルのTrisma緩衝液 (pH 8.0) により洗い流されることによって状態が整えられる。

【0040】

フェリチン (1.16mg/ml) とコバラミン (10.2ミリモル) の水溶液が、毛管内に導入された。9.5kVの分離電位が毛管の両端の間に印加された後、前記溶液は前記毛管を通じて流れ、二つの成分に分離した。Rh対象励起源及びSiLi検出器を備えたEDAX™ Eagle IIマイクロX線蛍光システムが、分離された各成分を尋問し、放射された任意のX線蛍光信号を測定するために使用された。前記システムのX線管は、40kV及び1000 μA にて動作させられた。CoK 及びFeK X線放射線は、 Fe^{3+} 結合フェリチンとコバラミンを検出するために監視された。スペクトル取得時間は約10秒であった。フェリチンの Fe^{3+} によるピークは、約1.7分の半値全幅 (FWHM) と共に約9.3分に検出された。シアノコバラミンのピークは、約1分のFWHMと共に約6.3分に検出された。

30

【0041】

本発明は、潜在的な薬剤化学物質の危険な代謝副産物を検出するための薬学的代謝物質研究において使用され得る。丸又はそれより大きい原子番号を有する少なくとも一つの原子を有する潜在的な薬剤化学物質は、ラット (又は他の実験動物) に与えられ得る。ベースラインを提供するために、潜在的な薬剤化学物質を管理する前にラットから血液サンプルが採取される。潜在的な薬剤化学物質を管理した後、この発明の方法を使用して代謝の存在についてラットからの血液が検査される。

40

【0042】

要約すれば、この発明は潜在的な薬剤化学物質と対象バイндаの間の結合現象を検出するための装置及び方法を提供する。この発明は、フッ素、塩素、臭素、ヨウ素、リン及び硫黄のような元素の存在及び相対的な量を決定するために、マイクロX線蛍光発光を使用する。リン及び硫黄は、酵素、非酵素蛋白質、DNA及びRNAの重要な構成要素である。このように、本発明は、蛋白質又は核酸のような対象バイндаと潜在的な薬剤化学物質

50

の結合をスクリーニングする非破壊的方法を提供する。公知の方法は、バイнда及び/又は潜在的な薬剤化学物質が紫外線励起放射に曝された時に蛍光発光する共有結合性のタグを含むことをしばしば必要とするが、本発明はタグ付けされた物質を必要としない。

【0043】

本発明の上記説明は、図示及び記述の目的のために提示されたものであり、網羅的であること又は開示された正確な形式に限定することは意図されておらず、また上記教示に照らして明らかに多くの変更及び変形が可能である。

【0044】

上記実施形態は、本発明の原理及び実際の応用を最良に説明する目的で選択され記載されたものであり、これにより他の当業者が本発明を種々の実施形態において最良に利用することを可能にし、種々の変更により特定の熟考された使用に適する。本発明の範囲は、本明細書に添付の特許請求の範囲により定義されることが意図されている。

10

【図面の簡単な説明】

【0045】

添付の図面は、本明細書に包含されその一部を形成し、本発明の実施形態を図示し、その説明と共に本発明の原理を説明するために提供される。

【0046】

【図1】本発明のための典型的な処理フロー図を示す。

【図2】本発明の装置の実施形態の模式的な表現を示す。

【図3】本発明に使用され得る分離器/選別器の実施形態を示す。

20

【図1】

【図2】

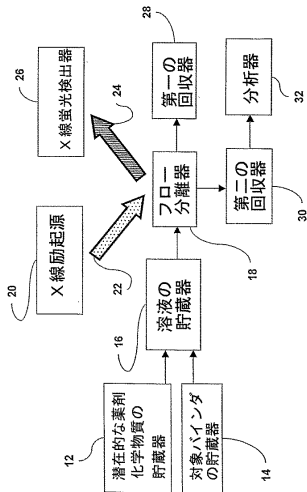


図 1

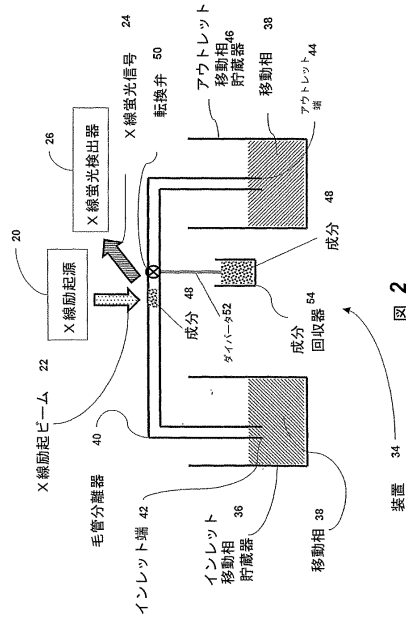


図 2

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
G 0 1 N 33/50 (2006.01) G 0 1 N 33/15 Z
 G 0 1 N 33/50 Z

(72)発明者 トーマシン・シー・ミラー
 アメリカ合衆国 ニューメキシコ州, ロス・アラモス, フォーティーファースト・ストリート, 2
 0 5 9 G

(72)発明者 ベンジャミン・ピー・ワーナー
 アメリカ合衆国 ニューメキシコ州, ロス・アラモス, テワ・ループ903

(72)発明者 クリス・エル・ルイス
 アメリカ合衆国 ニューメキシコ州, ロス・アラモス, シックスティーンズ・ストリート1705

(72)発明者 シンシア・エー・マハン
 アメリカ合衆国 ニューメキシコ州, ロス・アラモス, フォーティーセカンド・ストリート153
 1

(72)発明者 シンディー・エー・ウェルズ
 アメリカ合衆国 ニューメキシコ州, ロス・アラモス, エスペランザ4611

審査官 比嘉 翔一

(56)参考文献 特開昭63-118638(JP,A)
 森勝伸, キャピラリー電気泳動法 - 蛍光X線分析による金属元素の特定, 化学と工業, 日本, 2
 001年 9月 1日, 第54巻第9号, 1069頁
 Stephanie E. Mann, 他4名, Element-Specific Detec
 tion in Capillary Electrophoresis Using X-r
 ay Fluorescence Spectroscopy, Analytical Che
 mistry, 米国, 2000年 4月15日, Vol.72, No.8, 1754-1758
 頁

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N23/00-23/227

JSTPlus(JDreamII)