

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2010-528311

(P2010-528311A)

(43) 公表日 平成22年8月19日 (2010.8.19)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/553 (2006.01)	GO 1 N 33/553	2 G O 4 5
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 8 1 A	
GO 1 N 33/50 (2006.01)	GO 1 N 33/50 Z	
GO 1 N 33/15 (2006.01)	GO 1 N 33/15 Z	

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 60 頁)

(21) 出願番号	特願2010-509920 (P2010-509920)	(71) 出願人	509329671
(86) (22) 出願日	平成20年5月28日 (2008.5.28)		ファーマ・ダイアグノスティックス・ナム
(85) 翻訳文提出日	平成22年1月28日 (2010.1.28)		ローゼ・フェンノートシャップ
(86) 国際出願番号	PCT/IB2008/003187		PHARMA DIAGNOSTICS
(87) 国際公開番号	W02009/031049		N V
(87) 国際公開日	平成21年3月12日 (2009.3.12)		ベルギー、ペー 1 7 3 1 ゼリック、ゼッ
(31) 優先権主張番号	60/940, 641		ト 1 リサーチ・パーク 3 1 0 番
(32) 優先日	平成19年5月29日 (2007.5.29)	(74) 代理人	100068526
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 田村 恭生
		(74) 代理人	100100158
			弁理士 鮫島 睦
		(74) 代理人	100138900
			弁理士 新田 昌宏
		(74) 代理人	100162684
			弁理士 呉 英燦

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 新規化学物質および薬物候補の PK / A D M E - T O X 特性決定のための試薬および方法

(57) 【要約】

貴金属ナノ粒子か/導電性高分子が少なくとも生体外の予測のための試薬としてのコロイドを合成する安定した金属のコロイド性の導電性高分子、または測定に使用する、新規化学物質 (NCEs) の PK / ADME - tox 資産を提供する。また、そのアプリケーションのための対象のメソッドと試薬を含んでいるキットも提供されます。本発明に関係するこれらの方法と試薬の顕著な特質は、それらとかわる反応が均質であって、急速で、そして「ミックスとリード」のプロセスを経たという事実です。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

候補合成物の生体内ADME/TOXの特性を決定する生体外の方法、前述のメソッド包括

(a) 前述のナノ粒子コロイド候補化合物に接触する；

(b) 前述の接触された候補合成ナノ粒子の光学的性質を検出すること。又、

(c) 前述の検出された光学的性質から前述の候補化合物の予測された生体内のADME/TOXの特性を決定する。

【請求項 2】

特許請求1に従う方法、エージェントは、ナノ粒子コロイドと言われた物の表面に表示されます。そこで言われたエージェントは、下記のグループから選ばれます。シトクロム家族、親水性膜、恐水病の膜、洗剤、核酸、およびペプチドの酵素

10

【請求項 3】

特許請求1の方法により、ADME/TOX特性は吸収である。

【請求項 4】

特許請求1の方法により、ADME/TOX特性は分配である。

【請求項 5】

特許請求1の方法により、ADME/TOX特性は新陳代謝である。

【請求項 6】

特許請求1の方法により、ADME/TOX特性は排出である。

【請求項 7】

特許請求1の方法により、ADME/TOX特性は毒性である。

20

【請求項 8】

特許請求1の方法により、ADME/TOX特性はレドックス電位である。

【請求項 9】

特許請求1の方法により、ナノ粒子コロイドは導電性高分子コロイドを含むものとする。

【請求項 10】

特許請求1の方法により、ナノ粒子コロイドは貴金属コロイドを含むものとする。

【請求項 11】

特許請求1の方法により、ナノ粒子コロイドは金属/導電性高分子の合成コロイドを含むものとする。

30

【請求項 12】

特許請求1の方法により、ナノ粒子コロイドは前述の候補化合物と相互に作用するエージェントを包括する。

【請求項 13】

特許請求12の方法により、前述のエージェントは候補合成物と結合するものとする。

【請求項 14】

特許請求12の方法により、前述のエージェントはペプチドまたはタンパク質である。

【請求項 15】

特許請求12の方法により、前述のエージェントは酵素である。

【請求項 16】

特許請求12の方法により、前述のエージェントはレセプターである。

40

【請求項 17】

特許請求12の方法により、前述のエージェントは膜である。

【請求項 18】

特許請求12の方法により、前述のエージェントは前述の候補化合物に電子対を共有して接着するものとする。

【請求項 19】

特許請求1の方法により、ナノ粒子コロイドは洗剤を含むものとする。

【請求項 20】

特許請求1の方法により、光学特性は、軽い吸収度である。

50

【請求項 2 1】

特許請求1の方法により、メソッドは検出された光学特性を支配と比較することを含むものとする。

【請求項 2 2】

特許請求1の方法により、ナノ粒子コロイドは明確に前述の候補化合物に付くエージェン

トを含むものとし前述のメソッドは以下の内容も含むものとする。
(イ) 候補化合物の結合のために前述のエージェントに結合等温線を準備し；および、
(ロ) 前述のエージェントと前述の結合等温線から候補化合物の結合親和力を推定するものとする。

【請求項 2 3】

特許請求1の方法により、メソッドは前述の候補化合物のpKaを決定を含むものとする。

10

【請求項 2 4】

特許請求1の方法により、ナノ粒子コロイドは前述の候補化合物と結合するエージェン

トを含むものとし前述の方法は以下の内容から構成するものとする。
(イ) 前述の候補化合物の初期濃度は、協会動力学を決定するために前述のナノ粒子コロ

イドに接触し、；および
(ロ) 前述の候補化合物の2番目の濃度は、分離動力学を決定するために前述のナノ粒子コロイドに接触する。

【請求項 2 5】

特許請求1の方法により、メソッドは前述の候補化合物のレドックス電位を得るために複

20

【請求項 2 6】

特許請求1の方法により、メソッドは少なくとも1つの追加候補化合物に予測されたADME/T

【請求項 2 7】

特許請求26の方法により、メソッドは大体同時に最低限10の異なった候補化合物にADME/T

【請求項 2 8】

特許請求27の方法により、メソッドはハイスループット・スクリーニング装置で実施する

30

【請求項 2 9】

特許請求1の方法により、ナノ粒子コロイドは、固体基板に関連するものとする。

【請求項 3 0】

特許請求1の方法により、ナノ粒子コロイドは固体支持体に関連しないものとする。

【請求項 3 1】

デバイスは下記内容から構成されている

ナノ粒子コロイドを含む容器；

前述の容器と結合された光学検波器；および

プロセッサは前述の光学検波器によって前述の容器から入手された光学信号から候補化

40

【請求項 3 2】

特許請求32の方法により、デバイスは各ナノ粒子コロイドは最低限10の異なるコンテナを

【請求項 3 3】

特許請求33により、前述のデバイスはハイスループット・スクリーニング装置とする。

【請求項 3 4】

候補合成物の予測された生物学的特性を決定するためのキットとは以下を含むものとする

；
ナノ粒子コロイド；および

50

特許請求1により、使用説明はメソッドで前述のコロイドを使用する指示。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

この申請は2007年5月29日に採択された米国・仮出願番号第60/940,641号に記載された優先権の利点を申し立てるものであり、申請を参照することにより本書に組み込まれるものとする。

【背景技術】

【0002】

序論

現在、新規化学物質(NCEs)を市販の薬品に切り替えるプロセスが効率的でないことは一般的に受け入れられている。製薬会社は市場に参入する各新薬のために約5-10,000の化合物をスクリーニングしなければならない。最も一般的に引用されている算出方法からすると、1つの新薬を立ち上げるには研究開発費として約8億USドルがかかると言われているが、費用の大部分は不敗作に費やされた。(Bains.W (2004年) 創薬と開発の失敗率: いつになれば改善できるか? 薬品ディスカバリー・ワールド5(4)9-18ページ)。

薬品は従来、1つずつ自然源やの合成物質から得ていた。伝統的な創薬プロトコルでは、新化合物の合成は創薬と開発過程の律速段階だと考えられていた。自動化されたコンビナトリアル・ケミストリ(組合せ化学)の誕生は、1日何千個もの化合物の合成を可能にすることによって、律速段階を回避した。

ハイスループット・スクリーニング(HTS)方法の実施を急速した有機合成技術の進歩は、製薬科学者が細胞受容体、イオンチャネルまたは酵素(Englebienne、P.(2005)と言われている製薬の目標に向けた多くの合成物の生物活性を数日間テストできる機会を与えている。ハイスループット・スクリーニング: 過去は未来に満たせるだろうか? -- 位置: フロンティアの薬品設計と発見のフロンティアVol.1 (G.W. Caldwell, Atta-Uhr-Rahman and B.A. Springer, eds.), Bentham科学出版社(株), Hilversum, 69-86ページ)。しかしながら、合成物質と生物学的評価の促進が急速したにもかかわらず、完全な薬剤開発プロセスとして残る化合物の数は依然として非常に低い。1年当たりに開発される新薬の量は1963年から1999年までほぼ横ばいである。(Service R.F(超大シンδροームを乗り切る(2004) 科学303、1796-1799)

多くの新規化学物質(NCEs)に失敗する主な理由は、薬物動態学(PK)、ADMEとアドメトックス(ADME(吸収、分配、新陳代謝、および排泄)とTox(毒性学))の特性に欠けていることである。これらの理由は、薬品開発のプロセス間で、新薬剤候補の減少率のおよそ50%を占めている。減少率のその他の理由は、薬効不足(30%)、人への副作用(10%)、商業用またはその他(10%)である。(Wang, J. and Urban, L. (2004) 創薬と開発戦略の早期ADME分析. 薬品ディスカバリー・ワールド 5(4), 73-86ページ)。

創薬と開発過程は3つの段階に分類される: 発見、開発および登録。発見段階(統合、発見最適化を導く)は3、4年続く場合がある。開発段階は臨床段階I-IIIを含む。後期発見と早期発見(臨床段階I)間における、PK/ADME-Toxの特性は、細胞培養と動物モデル(Englebienne、2005年、同上)のそれぞれを評価している。臨床段階Iは通常約2年間続くことを考えると、ほとんどの失敗が発生するのは新規化学物質(NCE)の研究を2年~6年行った後になる。その結果、創薬プロセス間で薬剤候補のPK/ADME-Toxの特性に関する重要情報をできるだけ早く収集することが望ましい。

創薬と開発プロセス間にできるだけ早く情報を得るために、多くの定量的構造活性相関研究(QSAR)モデルが提案された。(Yoshida, F. and Topliss, J.G. (2000) ヒト経口バイオアベイラビリティ薬剤用のQSARモデル. J. Med. Chem. 43, 2575-2585; Bergström, C.A.S., Strafford, M. et al. (2003) 分子表面特性に基いた経口薬の吸収分類. J. Med. Chem., 46, 558-570; Skold, C., Winiwater, S. et al. (2006) 相関関係とベンチマーキング研究のために定められた構造的に異なる、または商業的に利用可能な薬剤のデ

10

20

30

40

50

ータのプレゼンテーション。J. Med. Chem., 49, 6660-6671. QSARモデルはコンピュータ・プログラムで、コンピュータ(シリコン)内で(すなわち、コンピュータを使った計算)特性から分子的特徴のような分子ベアリングがADME特性を表示する。そのようなコンピュータ(シリコン内で)のテクニックを説明したいいくつかの特許および特許出願が提出された。アメリカ合衆国特許出願公開番号2004009536と2005119832を参照いただきたい。

薬剤候補の親油性を推論させるインビトロ法もまた改善され、発行された(Lombardo, F., Obach, R.S. 他 (2004) 中性および塩基性薬物の配布量の人体内数値の予測。2. 拡張データ・セットとクラスを分けてない統計。J. Med. Chem. 47, 1242-1250; Wilson, D.M., Wang, X. Et al. (2001) 液体クロマトグラフィー-質量分析を使ったハイスループット対数 D の決定。組合せ化学。ハイスループット・スクリーニング (HTS) . 4, 511-519)、膜透過の将来性(Taillardat-Bertschinger, A., Carrupt, P.A. 他 (2003) 薬物研究における固定された人工生体膜高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 医薬と化学雑誌 46, 655-665 ページ)、または血漿タンパク結合 (Cimitan, S. Lindgren, M.T. 他(2005) 抗腫瘍とエイズ撲滅薬の早期吸収と配布分析: 脂質膜と血漿タンパク質相互作用。医薬と化学雑誌 48, 3536-3546 ページ)、すべてのADME-Tox特性を制御する特徴。また、公表された国際特許番号を参照。WO9942511; WO03027656; WO2005034915, およびアメリカ特許番号US 6,868,343を含む。

インビトロ法の実態にもかかわらず、通常はハイスループット・スクリーニングの特性として分類され、それらの性能と効率はかなり低い。そのような多くの方法は、長い培養時間を必要とし、遊離薬物から固相試薬の分離を実行しなければならない。(例えば、遠心分離によって)。固相試薬と遊離薬物の濃縮度の測定をする前に行われる。

さらに、薬物濃度は高速液体クロマトグラフィー(HPLC)、放射性同位体勘定および/または質量分析を含む複雑な技術で得られたデータから推論されている。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0003】

概要

本発明の実例は、以下でさらに詳細に説明されているように、貴金属コロイドのフォトリソ反応度、導電性ポリマーコロイド、或いは二者の長所をまとめた「混入及び読み取る」という技術を利用することによって新規化学物質 (NCEs) のADME(吸収、分配、新陳代謝、および排泄)の特性測定を生体外の方法を提供し、これらの欠点を避ける。

【課題を解決するための手段】

【0004】

金または銀のような貴金属のナノ粒子は、球、ロッドまたはピラミッドのような様々な幾何学的な形)によって作ることができる。これらの小さい物は化学的に還元された形の金属元素が含まれ、作る方法によっては、縮小した粉末固体の形や、または水などの有機溶液の中に安定したサスペンションの形で保存することができる(例えば、コロイド)。粒子がナノメートル・サイズであるため、肉眼で真溶液から正しくサスペンションを区別できないが、顕微鏡を使ってでき、そのようなサスペンションをコロイド溶液という。したがって、これらの粒子は、より明確な構造を形成するために様々なサポートを簡単に投入できる。

これらの金属ナノ粒子の研究は独特な電子、光学及び触媒特性のため、近年のとても活発な分野となった。光が電磁界と関係があることから、ナノ粒子の光電子特性は特に興味深い分野である。実際に、金属であって電気を通すことから、貴金属ナノ粒子の表面は伝導する電子の密雲に囲まれている。これらの電子が光によって励起されると、電磁放射はこれらの電子と化合し、粒子表面から広がる集団振動を形成する。その結果、粒子は分析技術にうまく適用できる特定の光吸収、反射、放射と拡散する特性を示す。実際に、ナノ粒子表面で固定された受容体と配位子が結合し、粒子の周りの屈折率における変化を引き起こし、フォトリソ特性における特定の変化となる。(Englebienne, P., 他(2003年)表面のプラスモン共振: 生医学的な科学の原則、方法と生物医薬科学における応用。分光学 1

10

20

30

40

50

7, 255-278)。今までの粒子研究の大部分は、同じ金属で等質的に作られている。しかし、構造内で異なる金属の交流でナノ物を構成することが可能だと最近示された。この新たな進歩はナノ・バーコードを生体分子の相互作用の定量的検出を含む多くの分野で活用される道を切り開いた。(Bao, Y.P., Wei, T.F., Lefebvre, P.A., 他(2006年)ナノ粒子ベースのバイオバーコード技術を通じたタンパク質検体の検出。分析化学。78, 2055-2059ページ)。

同様に、導電性ポリマーおよび導電性ポリマーと貴金属で作られた混合物もまた、ナノ粒子を含むコロイド形態から得ることができる。導電性ポリマーはアルキン、フェニル基または複素環式の単量体から作られた有機ポリマーである。これらの重合体は、酸化(燐をドーピング)あるいは絶縁状態を減少(窒素をドーピング)することによって金属に近い導電性を獲得することができる。導電性ポリマーが共通するもう一つの重要な特徴は、酸化する際のクロムの変化を耐える能力である。(Englebienne, P., (1999年) クロムの変化を耐える生体分子識別能力を報告することができる合成材料。医薬と化学雑誌9, 1043-1054ページ)。導電性ポリマーの層に囲まれた貴金属で作られた複合ナノ粒子の使用は、両方の材料が伝導する電子の相互作用を引き起こす。さまざまな環境の変化に応じて、屈折率と酸化還元電位を含むナノ材料のフォトニック反応性の増加が可能になった(Englebienne, P. Van Hoonacker, A. (2005) 金導電性ポリマーナノ粒子：環境の刺激への高められたフォトニック反動があるハイブリッド材料。コロイドとインターフェンス科学雑誌。292, 445-454ページ)ここに開示されたアメリカ特許アプリケーションナンバーを参照：2007-0172834；この開示を参照することにより本書に組み込まれている。

これらのナノ粒子が環境への特定のフォトニック感受性のため、分析物の量的免疫測定を含む様々な同質的分析テクニックのラベルとして使用された。(Englebienne, P. (2000) 理論と実際における免疫および受容体測定。CRC 出版社, Boca Raton, 392ページ)。特異受容体を含む脂質二分子膜、共有結合で標識された導電性ポリマーとおよび固担体もまたUS 6,395,561に説明されているように直接分光測定で特定の配位子との相互作用を直接監視する提案された。

本発明は、溶液または固体の支持に用いる導電性のポリマー、貴金属またはそれらの複合物(解決で、または、固体の支持に関して使われる)からなるコロイド状ナノ粒子が新規化学物質(NCEs)の薬物動態学/アドメトックス(PK/ADME-Tox)特性に対する権利の要求を表明し、提出している。

それに従い、溶液或いは固体の支持でナノ粒子コロイドを使用する方法を提供した。例えば、コロイド状導電性のポリマー、貴金属ナノ粒子が安定した金属/導電性ポリマーの合成コロイドの試薬は少なくとも具体化予測ができる。新規化学物質(NCE)の薬物動態学/アドメトックス(PK/ADME-Tox)特性の生体外測定も含む(例えば、薬剤候補が鉛化合物)。その他に方法を実践するための装置やそのアプリケーションを対象とした方法と試薬を含むキット(一式)を提供している。これらの方法と試薬の具体化の例は、均質であり、急速に「混入して、読み取る」プロセスとして進行している。

定義

別に定義されなければ、ここに使用されたすべての技術・化学的用語は、この発明が属する学術における一般的な理解と同じ意味である。但し、一部の用語は分かりやすく参考しやすいように以下に定義する。

用語「コロイド」とは液体の中に浮かんでいる微細粒子の液体成分であり、代表とするコロイドのサイズは、1ナノメートルから1マイクロメートルまでである。

用語金属コロイドとはその中で浮かんでいる微細粒子が金属粒子であるコロイドである。

用語「貴金属」とは周期表グループVIIIの金属：プラチナ、イリジウム、パラジウム、および銀の金などを含むがそれだけとは限らない。

用語「導電性ポリマー」とは電気を伝導するポリマー材料を意味する。具体的例として、 π によって活用した有機ポリマーのような有機ポリマーである。例として、ポリピロール、ポリチオフェン、ポリベンゾチオフェン、ポリイソチアナフテン、ポリチエニレンビニレン、ポリアニリン、ポリアセチレン、ポリジアセチレン、ポリアズレン、ポリピレン、

ポリカルバゾール、ポリセレノフェン、ポリフランとポリベンゾフラン、ポリ(p-フェニレン)、ポリインドール、ポリピリダジン、とポリアセンナフタセン、ペンタセン、ヘキサセン、ヘプタセン、ジベンゾペンタセン、テトラベンゾペンタセン、ピレン、ジベンゾピレン、クリセン、ペリレン、コロネン、テリレン、オパレン、クオテリレン、とサーカムアントラセンとそれらの派生物を含む。

当技術分野で周知のように、ジメチルアミノグループ、シアノグループ、カルボキシル基、およびニトロ基などの機能を持っているポリマー材料に盛込むことによって、導電性ポリマーをドーピングすることができる。ベンゾキノ誘導体や、テトラシアノキノジメタンと同様にテトラシアノエチレンなどの材料、その派生物、電子を受け入れるアクセプタとして、働いている。または、例として、アミノグループ、トリフェニルグループ、アルキル基、水酸基、アルコキシルグループ、およびフェニル基などの機能を持つ材料が、分類される。置換アミンは、フェニレンジアミン、アントラセン、ベンゾアントラセン、置換ベンゾアントラセン、ピレン、置換ピレン、カルバゾールとその派生物、またはテトラチアフルバレンとその派生物に電子を提供して稼動する。ここに説明されるドーピングは、電子受諾分子(アクセプタ)か電子寄付分子(ドナー)が前述の重合体の中にドーピングを組み込んでいることを意味す。本発明に使用されるドーパントとして使われているのは、アクセプタかドナーのどちらかである。

用語「コロイド性の導電性ポリマー」とは導電性ポリマー粒子で作られたコロイドを示す。

用語「金属/導電性ポリマーの合成コロイド」とはその表面の現在の導電性ポリマーを持つ金属粒子で作られたコロイドを示す。

「コロイド接合体」または「抱合型ナノ粒子」とは、分子が反応性を与えるために示される表面でコロイドの参加しているナノ粒子です。それには受容体、核酸、触媒とされたアルキルチェーンなどを含むが、それだけに限らない。

用語「強固な支持」と「固体基板」はガラスまたはクォーツのようなどんな小さい透明な固相を意味する。そこでは、コロイドはセンサーとして使われるフォト反応性膜を形成するために沈澱する。

用語「吸収」とは、分子の薄い層(例:受容体、膜または配位子)、接触している複合粒子のような固形物の表面、金属または複合粒子での接着を意味する。

ここに使われる用語「接触」とは引き付ける、または合わせるを意味する。そのため、2つのアイテムを引き付ける、または合わせる場合、一つ目のアイテムが二つ目のアイテムに接着する。例:それらを互いに接触させることによって。一つの合成物になるように、用語「組み合わせる」とは、2つの異なるものを接触させることである。

用語「動揺」とは、構成要素が互いに相対して動くように、物的移動から合成物のアプリケーションを意味する。そのようなものとしてに、学期動揺は、混合、かくはん、適合などに広く使用されている。

ここで用いられる用語「配位子」とは、特定の拘束力のある一組のメンバーのいずれの種類の分子である。生体分子に限られないが、影響できる配位子を含む。用語「生体分子」とは、無機のいずれか、また有機あるいは生化学分子、影響できるグループまたは種を意味す。それは、特に影響できる(例えば抗体、細胞受容体、イオンチャネル、血漿蛋白、酵素または脂質の構造)受容体と結合することができるか、相互に作用することができる。配位子も、対応する結合分子で共有結合付加物を作る。例えば、スルフヒドリル基の酸化性の稼動、典型的な生体分子(ペプチド、タンパク質、アミノ酸と核酸を含む)である。現在の発明の特定の実施例として、配位子は候補薬である場合がある。あるいは、いずれの新規化学実体(NCE)でも薬発見と開発プロセスの鉛化合物として薬剤師が単独で開発する。

用語ここで用いられる「ペプチド」とは、1つのアミノ酸のカルボキシル基ともう一つのグループのアミノ基の間でアミド構造によって生産されるいずれかの合成物を意味する。ここで用いられる用語「オリゴペプチド」とは、約10~20未満の(すなわちアミノ酸モノマー単位)残留物質のペプチドを意味する。

10

20

30

40

50

ここで用いられる用語「ポリペプチド」とは、約10～20以上の残留物質のペプチドを意味する。

条件「ポリペプチド」と「タンパク質」は交互に用いられる。

ここで用いられる用語「タンパク質」は、DとL形式、変形の形式、その他を含む残留物質が約50以上ある特定配列のポリペプチドを意味する。

ここで用いられる用語「核酸」とは、ヌクレオチド（例えば、デオキシリボヌクレオチドまたはリボヌクレオチド）から成るポリマーを意味し、あるいは合成物が総合的に生産される。例えば自然に起こっている2個の核酸のものへ類似の系列特定の方法で自然に起こっている核酸に交雑されることができ、ワトソン・クリックベース組み合わせ相互作用に参加できる。

用語「ヌクレオシド」と「ヌクレオチド」とは、既知のプリンとピリミジン塩基半分だけではなく、変形した他の複素環塩基半分も含むそれらの半分を含むものとする。そのような変形は、メチル化されたプリンまたはピリミジン、アシル化されたプリンまたはピリミジンまたは他の複素環を含む。そのほか、「ヌクレオシド」と「ヌクレオチド」は、従来のリボースとデオキシリボース砂糖、他の砂糖を含む。また、変形のヌクレオシドかヌクレオチドは糖成分における変形を含み、例えば、1つ以上の水酸基とハロゲン原子、或いは脂肪族、エーテル、アミン、または同様の官能基化の変形を示す。

ここに使用される「リボ核酸」と「リボ核酸RNA」は、リボヌクレオチドで構成された重合体である。

ここに使用される用語「新規化学物質」、「薬剤候補」、および「鉛化合物」とは、無機的、または、有機的な化合物である。金属塩、小分子はシリコン、ペプチドをタンパク質に酸素、水素、窒素のリンの炭素複合体、人間か動物使用のためのドラッグとして開発される自然あるいは合成された蛋白質と核酸を含むものとする。

用語「同質」とは構成があらゆる点で同じであり、同様の種類または自然の構造であることを意味する。

用語「均質の分析評価」とは「混入して、読み取る」という原理に基づいた分析評価システムで、例えば、いずれの自由な配位子の物理的分離を要求せず、結果が完全反応混合物から直接測定されたものとする。

ここに使用される「デオキシリボ核酸」と「デオキシリボ核酸DNA」とは、デオキシリボヌクレオチドで構成された重合体である。

ここで用いられる用語「オリゴヌクレオチド」とは、長さで約10～100で最高200のヌクレオチドからの一本鎖ヌクレオチド多量体を意味する。

「生物ポリマー」とは、一つ以上の繰り返し単位の種類からなるポリマーである。生物ポリマーは、生体システム（それらが合成されたものの場合もある）に位置し、ペプチド、タンパク質またはポリヌクレオチド、アミノ酸の類似体または非アミノ酸グループから構成しあるいはそのような合成物を含む場合がある。従来の中身が非自然或いは合成の中身に取り替えられたポリヌクレオチドを含み、そして、（合成または、自然に起こるアナログ）の従来の1つ以上の基はワトソン・クリックに参加できる水素結合相互作用グループ（天然、または、合成の）に取り替えられた。ポリヌクレオチドは一本鎖と一本鎖DNA高次構造多型を含み一本鎖と一本鎖DNA高次構造多型は他のものと完全に一致するか、しないかは五分五分である。例えば、その源と関係なく「生体ポリマー」は、米国特許番号5,948,902に引用された文献（ここにそのすべてを参照に組み込まれている）で説明されるように、受容体、抗体、結合タンパク質、DNA（cDNAを含みいる）、リボ核酸、オリゴヌクレオチド、PNA、および他のポリヌクレオチドを含むものとする。

代表的な光学特性が含む所で、フレーズ「光学特性とは光学パラメータであり、（すなわち、その値が特徴を決定し、その他作用を確定できる）。下記の代表的な光学特性を含むが、それだけに限らない：光吸収、光放射、光反射と光散射。

用語「局所的な表面のプラスモン共振」とは、貴金属ナノ粒子あるいは、導電性のポリマー複合物の可視スペクトルでの特定の光吸収バンドである。技術者に知られているように、周囲の媒体の屈折率（すなわち誘電体の平方根）が修正される場合、波長と特定の吸収

10

20

30

40

50

バンドの高さはそれぞれ移され、増やされる。

「表面プラズモン共振カップリング」とは、少なくとも2つ以上の貴金属ナノ粒子が多くとも2.5倍の平均直径の距離に置かれる時に起こる局所化された表面プラズモン共振効果の増加である。

ここに使用される用語「薬物動力学」(PK)、「ADME」、および「毒物学」(Tox)とは、人間のような哺乳動物を含む動物の薬物を吸収、分配、新陳代謝、排泄、および毒性効果である。薬物の効果にも影響を与える。特に、これらの用語は特定の時間内に均等または不規則的にその量を動物あるいは人間のボディーに分布する薬物、薬剤候補、鉛化合物または新規化学物質(NCE)の能力を示し、有機体セル或いは脳などの部分にアクセスして、急速に或いは緩やかに代謝し、血清、血しょう蛋白質または特定の代謝酵素に付き、生物或いは合成膜または合成層と相互に作用して、分子或いは代謝(例:グルクロニド、システインまたはグルタチオン)の派生物をつくり、ある程度アフィニティしているシトクロム族のメンバーを示すがそれだけとは限る。

交互に用いられる用語「参照」と「コントロール」は、観測値と比較できる既知数或いは既知数のセットである。ここに使用されているように、概知数がわかるパラメタ、例えばアフィニティ、割合結合、分配のボリューム、光吸収、光放射などである。

交互に用いられる用語「評価」と「評価する」とは、いずれの形式の測定で、それに媒体にある元素がコロイドとかその接合体と相互に作用を確定します。取り換えて使える用語「決定する」、「測る」、「評価する」と「分析する」は、量的と質的の測定を含みます。評価は、相対的であるか、または絶対である場合がある。「反応性を評価する」とは、

ここに使われる用語「検出」とは質的、または量的に信号を確かめることである。

用語「バインディング」とは、2つの物が結合して、安定した複合構造を形成すること。

具体化の例として、2つの相補の核酸の間のバインディングは、特に交雑と呼ばれる場合もある。用語「特に交雑」、「特に交雑する」、「特定の交雑」、または「選択的に、交雑する」は交互に用いられ、厳しい条件下で優先してバインディング、デュプレキシングまたは、特定の核酸分子の配列に交雑することを示し、他の例として、配位子と受容体の間のバインディングは、特に所定のアフィニティまたは活動性の相互作用と呼ばれる場合がある。また、分子と配位子のバインディングは、配位子の反応構造と目標分子の特定のグループ間の共有結合の形成の場合もある。

この「競争的である」或いは「競争」は、1つの配位子についての所定の分析で受容体または酵素ともう一つ配位子またはそのタンパク質-接合体との競争を意味する。

用語「アフィニティ」と「活動性」とは、バインディングする配位子がもう一つと結びつける力の強さである。

用語「選別」は何か興味があるものの存在を決定するの意味である。例:分析物、発生等。本文に使用されるように、「測定」とは、識別の意味である。例えば、興味のある特定のパラメタの値の確立、確定、評価或いは測定する。例えば、交雑パラメタ。値の測定は質的である場合(存在かどうか)、量的を意味する場合もある。量の測定は相対的(例:ユニットがコントロールに比例している値か既知数(基準値)である場合、絶対的(例えば、実際の分子数の測定)の場合もある。

「サンプル」という本文に使用される用語は、液体成分を意味する。実例の1つに、液体成分は水の構成である。

【0005】

詳述

ナノ粒子コロイド、コロイド性と同等の導電性ポリマー、ナノ粒子か金属/導電性ポリマーが少なくとも予測のための試薬としてのコロイドを合成する貴金属、または決断、生体外に、NCEsのPK/ADME-Toxの特性、薬剤候補または鉛化合物を提供する。また、本発明の実施を証明するためのキットとデバイスも提供する。

本発明がさらに詳細に説明される前に、この発明が記述される特定の具体化に限られてい

ないことを理解すべきである。異なる場合もあるが、ここに使用された用語が、特定の実施例だけについて説明する目的のためであり制限されないことを理解するものとする。本発明の範囲が単に追加されたクレームで制限される。

値の範囲が提供される場合、各介入を評価することを理解する。前後関係がなければ、はっきり口述しない限り、下限の単位の第10まで、その範囲の上下の制限と定まった間の範囲の価値は、発明の範囲内に含まれる。定まった範囲のどんな特に除外された制限を前提としてでも、これらのより少ない範囲の上下の範囲は、より少ない範囲に独立して含まれる場合がある。発明の範囲内にも含む。定まった範囲が限度の一方または両方を含む所で、それらの含まれた限度のどちらでもまたは両方とも除外している範囲は発明にも含まれる。

「ある一定の範囲」という用語によって先行されている数値をここに与えます。「アバウト」という用語は、それが先行する正確な数の文字通りのサポートを提供するのに使用する。それが近い数か用語が先行するおよその数である。数が近いかどうかにかかわらず、決定すること、またはほぼ特に復唱された数において、近いか近づいている非復唱された数は、それが示される前後関係で、特に復唱された数に相当な等しい分を提供する数である場合がある。

別に定義される他、ここに使用された学術用語は、本発明が属する技術における通常の意味と同じ意味を持っている。本文に記入した方法と同様の、または、同等ないかなるメソッドと材料も、現在の発明の実行またはテストする際に用いることもできるが、代表的な事例説明に役立ったメソッドと材料は現在説明されている。

参照として、本文には引用したすべての刊行物と特許を添付しています。各刊行物と特許が専門的に個別に参考資料を添付。また本文に添付した参考資料は本刊行物引用した方法、または、材料を記述している。出版の表彰状でも、ファイリング日付の前にその発表のため、現在の発明が先の発明によってそのような出版に先だつ権利がないという告白として解釈してはいけません

どんな刊行物の引用でもファイリング日付の前に発表するためである。本発明が先願発明によってそのような出版に先行する権利がないという告白として解釈されてはいけません。

本文と添付主張要求に単数形「a」、「an」、および「the」が複数の概念も含みます。本文に明確に説明したのが例外である。主張がどんなオブションの要素でも除外することもあります。そのため、この声明は主張に関する「唯一」のような排他的な用語、「単に」、および同様のものの使用、または「否定的な」制限の使用の根拠である。

専門家が読まれるこの開示された内容は記述と説明した実施例は分立の部分があり、本発明の範囲または趣旨を逸脱しない前提で、その特徴が容易に他の何らかの実例の特徴と切り離され、結合できる。どんな復唱方法でも復唱の順序、または、論理的の順序で実行できます。

上述のように、本発明が生体外の予測のための試薬、キット、および装置、NCESのPK/A DME-TOXの特性、薬剤候補または鉛化合物(本文には「候補合成物」と総称する)を提供する。そのように、候補化合物の予測されたPK/ADME-TOXの特性を決定する方法を提供します。発明とその特定の具体化の面をさらに記述する際に、使われる従属するコロイドの代表例とフォトリック特性は、最初に概説されている。代表的な作り事プロトコルに関する議論と現在の発明の範囲内の従属するコロイドを使う方法を議論します。そのうえ、試薬として対象のコロイドを含む本発明の練習方法で使われるキットと装置のレビューを提供している。

CONDUCTIVE POLYMERS, METAL AND METAL/CONDUCTIVE POLYMER COMPOSITE COLLOIDS

導電性高分子、金属、および金属/導電性高分子の合成コロイド

上述のように、本発明が導電性高分子のフォトリック、金属または金属所有物、導電性高分子の合成コロイドを使って、結合パートナーとの配位子のインタラクションを報告する(生体外の同質分析評価システム)。膜、電荷または酸化還元敏感なナノ粒子などの相互関係構造で、1つまたはそのいくつかのPK/ADME-Toxの特性を推論することである。例えば、

10

20

30

40

50

生体外に候補化合物の1つ以上のPK/ADMEの特性を予測する場合を含む。

本発明の実施例に使われているコロイドは安定している。ここに使われている安定するという用語はコロイドの粒子がコロイドのキャリアー媒体にサスペンションに留まる能力である。例えば、粒子がサスペンションからはある程度の沈殿を発生しません。本発明の方法で使われるコロイドのもう一つの面は屈折率、電荷またはレドックス電位のような環境の変化を報告するということである。ここに使用されるように、また技術上の用語としてフォトリック特性はナノ材料が紫外線、または、可視光を吸収するか、または散乱させ、燐光や蛍光やルミネッセンスなどを放つ能力である。

対象のコロイドが導電性高分子、金属またはその合成物でできている場合があり、導電性高分子成分、金属部材か金属部材と導電性高分子成分を含むものとする。コロイドの金属構成要素が存在しているとき、その構成要素は貴金属の場合がある。その貴金属が以下に限られない：元素周期表のグループVIII金属、以下に限られない：プラチナ、イリジウム、パラジウムとその他金、銀等。

用語「導電性ポリマー」とは電気を伝導するポリマー材料を意味する。代表の例として、導電性ポリマーは有機ポリマーであり、すなわち π によって活用した有機ポリマーを意味する。使われているのは、ポリピロール即ちポリピロール、ポリ(N-エ-テル置換ピロール)、poly(3-エ-テル置換ピロール)、とポリ(3,4-二置換ピロール)、ポリチオフェン即ちポリチオフェン、ポリ(3-エ-テル置換チオフェン)、ポリ(3,4-二置換チオフェン)、とポリベンゾチオフェン、ポリイソチアナフテン即ちポリイソチアナフテン、ポリチエニレンビニレン即ちポリチエニレンビニレン、ポリ(p-フェニレンビニレン)即ちポリ(p-フェニレンビニレン)、ポリアニリン即ちポリアニリン、ポリ(N-エ-テル置換アニリン)、ポリ(3-エ-テル置換アニリン)、とポリ(2,3-エ-テル置換アニリン)、ポリアセチレン即ちポリアセチレン、ポリジアセチレン即ちポリジアセチレン、ポリアズレン即ちポリアズレン、ポリピレン即ちポリピレン、ポリカルバゾール即ちポリカルバゾール、とポリ(N-エ-テル置換カルバゾール)、ポリセレノフェン即ちポリセレノフェン、ポリフラン即ちポリフランとポリベンゾフラン、ポリ(p-フェニレン)即ちポリ(p-フェニレン)、ポリインドール即ちポリインドール、ポリピリダジン即ちポリピリダジン、とポリアセン例えば、ナフタセン、ペンタセン、ヘキサセン、ヘプタセン、ジベンゾペンタセン、テトラベンゾペンタセン、ピレン、ジベンゾピレン、クリセン、ペリレン、コロネン、テリレン、オバレン、クオテリレン、とサーカムアントラセンとそれらの派生物(例えばトリフェノジオキサジン、トリフェノジチアジン、ヘキサセン-6,15-キノン)それは、ポリアセンの炭素原子例えばN、SとOのような原子を代える官能基(例えばカルボニル基)、ポリマー(例えばポリビニルカルバゾール、ポリフェニレンサルファイドとポリビニレンサルファイド)。ポリピロール、ポリ・チオフェン、ポリ・アニリンまたはそれらの派生物。

合成コロイドの中で、金属粒子の表面には導電性ポリマーが付着し、コーティングされて液体に浮かび、水媒体などの媒体を含む。アメリカが公表した特許出願ナンバー20070172834号と公表された国際アプリケーションナンバーWO2006047371記述した通り、(EnglebienneとVan Hoonacker、2006年)。ここに参考として取り込まれている。「コーティングされた表面」の意味は少なくとも粒子の表面の一部分(粒子の全表面でなくても)が導電性ポリマーの分子層に覆われているということである。

粒子の寸法は異なりますが、具体的な例として、約1nmから約1マイクロメートルまでである。例えば、約1nmから100nmまでで、約30nmから60nmです。一部の具体的な例として、このような粒子は狭い粒径に分布している。狭い粒径とは粒子の相対的な標準偏差は30%以下です。一部の具体的な例として、20%以下です。例えば17%以下、平均直径10%以下です。

一部の具体的な例は、粒子はコロイド溶液または固体基質でとして使われます。例えば、ガラスや他の適当な固体に付くセンシング膜として使用されている。

一部の具体的な例は、粒子はまたは受容体の親水性か疎水性、または混ぜられた膜に表示する。それは特に、非特異的に、関心の配位子表面に結合します。表示の意味とは、受容体または膜は粒子の表面で固定され、受容体または膜は共有または非共有で粒子の表面に

10

20

30

40

50

結合する。粒子表面の受容体分子または膜を作っている分子の密度は異なるが、約2～50個で、一つの粒子に当たり5～25個ある。

つまり、いろいろな種類の受容体または膜の層は、コロイドの粒子の表面に表われる。一部の具体的な例として、存在する特定の受容体は、少なくとも予測あるいは決定できる薬物のPK/ADME-Toxの特性に依存する。例えば、下記のアプリケーションである。関心の代表的な受容体は、上述の受容体（プラズマ結合タンパク質、シトクロム族の酵素、親水性あるいは疎水性の膜、洗剤、核酸、ペプチドなど）を含むが、それだけとは限らない。コロイドのpHは異なるが、一部の具体的な例として、2から12までで、例えば4.5から9.0がある。コロイドは、ポリマーがコーティングされた金属粒子以外の構成要素を含む場合がある。関心のほかの部分は塩、バッファリングエージェント、洗剤、スタビライザーなどの似たようなものを含めますが、但しそうとは限りません。

【0006】

製造方法

主体コロイドは、本発明のいずれのコロイドの生産に便利なプロトコルを使用して作れます。例えば、上述のプロトコルである。一つの具体的な例は、コロイド状導電性ポリマーは、安定エージェントが存在する場合、適当なモノマーの水性酸の中で、酸化によって生産されます。例えば、ポリビニルピロリドンあるいはポリビニルアルコールである。コロイド状の導電性ポリマーは、更なる誘導体化の前にクロマトグラフィーによって精製できます。もう一つの具体的な例は、貴金属コロイドは、適当な温度で水の中で金属塩の減少によって作れます。このようなコロイド状ナノ粒子の生産プロトコルの例は「理論と実行の免疫と受容体分析」(Englebienné, P. (2000) 理論と実行の免疫と受容体分析. CRC 出版社、Boca Raton 392pp) の243ページと234ページに記載があります。もう一つの具体的な例は、初期の導電性金属コロイドと水溶性導電性ポリマーは、水溶性導電性ポリマーが金属コロイドの粒子の表面に吸着できる方法でお互いに結合し、本発明の製品の合成コロイドを作り出す。このような安定の複合ナノ・コロイド生産のプロトコルは、出版された米国特許出願番号第20070172834号と発表された国際出願ナンバーWO2006047371号(EnglebiennéとVanHoonacker (2006)) に記載があります。ここに参照として取り入れました。

本発明の一部の具体的な例として、コロイドはさらに、関心の候補合成物と相互に作用するエージェントを表す。エージェントがいろいろな実体（上述のように）で、受容体、酵素、自然であるか合成膜、ヌクレオチド、抗体、配位子またはその派生物を含めますが、但しそうとは限りません。例えば、バイオセンシングのためである。これらの表われた分子は便利に電荷吸着か共有結合により粒子表面に付着することができます。どんな適当な結合プロトコルでも使用される可能性があります。

【0007】

効果

主体コロイドは先に述べたように、いろいろなアプリケーションに使用され、候補合成物（例えば新規化学物質NCEs、候補薬または鉛化合物）のPK/ADME-Tox特性を予測或いはし推測するためである。この方法は確定できなくても、少なくとも候補合成物の一つ以上のPK/ADME-tox特性を予測できます。

一部の具体的な例として、関心がある特性は吸収である。合成物が組織で薬理効果を発揮する前に、必ず血流に入らなければなりません - 通常に粘液を分泌する表面を通す。例えば消化管（腸管吸収）である。標的器官または細胞の吸収は、確実にされる必要があります。これは血液脳関門の障害のないいくつかの天然バリアという深刻な問題の場合がある。胃の中での貧しい合成物可溶性、化学不安定性と腸壁に浸透することができないことのような要因は薬物が経口投与の後に吸収される程度を減らすことができます。吸収は化合物の生物学的利用能を決定する。経口投与の後に十分に吸収できない薬物は必ず静注または吸入のような望ましくない方法で使用されます。

一部の具体的な例として、関心がある特性は分布である。化合物は、たいてい血流で作用点まで運ばれます。化合物は組織と器官の中に分布し、通常、分布の程度が異なります。

一部の具体的な例として、特性は新陳代謝である。化合物は、ボディーに入るとすぐに分解し始めます。小分子薬物代謝の大部分は肝臓でシトクロムP450酵素と呼ばれた酸化還元酵素によって実現されます。新陳代謝が起こったため、初期の(母体)化合物は代謝物質と呼ばれる新しい化合物に変換されます。代謝物質が薬理的に不活性である場合、新陳代謝は母体薬物の投薬量の効力を無くし、通常これがボディーへの効果を減少させます。代謝物質は薬理的に活性である場合もあり、母体薬物以上に薬理的に活性である可能性もあります。

一部の具体的な例として、特性は排泄である。化合物とそれらの代謝物質は、通常排泄を通した腎臓(尿)または糞を通してボディーから取り除かれます。排泄が完全でない場合、異物の蓄積は正常な代謝に悪影響を与えることもあります。

一部の具体的な例として、関心がある特性は酸解離定数pKaである。化合物のpKa値は化合物の多くの特性に影響を及ぼす。例えば、その反応とスペクトル特性(色彩)。生化学では、タンパク質とアミノ酸側鎖のpKa値は酵素の活動とタンパク質の安定性にとってかなり重要である。化合物のイオン化がその物理的な行為と溶解度や親油性などのマクロ性質を変更するので、この特性は化学における一般的重要性のあるものです。例えば、どんな化合物のイオン化でも水の溶解度を増加し、親油性を減少させる。これは相応のpHのイオン性基のpKaを調節することによって、血の中での合成物の濃度を増やし、創薬において利用できます。しかしながら、イオン化された合成物が細胞膜を通す浸透力が弱くなるため、用心しなければなりません。

一部の具体的な例として、特性は毒性である。毒性はあるものに対して毒性で、またはある程度の毒性の基準である。毒性は、すべての生物(例えば、人間または基礎例えば細胞(細胞障害性)または器官例えば肝臓(肝毒性))に対して影響を与える有機毒性である。

本発明の一部の具体的な例として、主体コロイドは血漿蛋白と結合する配位子、受容体がナノ粒子の上に現れる自然あるいは合成の膜、または酵素、シトクロムP450家族、細胞膜チャンネル(例えば多種薬剤の抵抗タンパク質-1のようなATP結合性カセット輸送体のメンバー)等の稼動インタラクションのサンプルををスクリーニングするのに使われる。そこで、これらの受容体はナノ粒子に表示される。他の具体的な例において、適当なpHの洗剤で安定されたナノ粒子は、配位子を含んでいるサンプルと接触し、その電荷またはレドックス電位を測定する。ナノ粒子はその表面に配位子と共有結合付加物をつくれる分子を現す。一部の具体的な例として、関心がある配位子は、受容体、酵素などと結合するために別の配位子と競争する可能性もある。

一部のアプリケーションの中で、大量のコロイドまたは固定されたコロイド量は強固な支持にキャストされます。例えば、裸または配位子のため特に用意した受容体或いは酵素、天然または合成の膜の合成体をそれぞれスクリーニングされるサンプルと接触させます。そのうえ、相互作用する時の変化を検出するためにコロイドに関する光学パラメータモニターする。例えば、特定の波長におけるコロイドの吸収がもたらす変化。どんな便利な光学パラメータでも、このステップでモニターあるいは評価できますが、代表的なパラメータは吸収、散光、蛍光、ルミネッセンスなどだが、それだけとは限らない。光学パラメータを適当な装置とプロトコルでモニターされます。適当なプロトコルが当業者によく知られています。代表しているプロトコルは以下の実験セクションでさらに詳細に説明されている。

光学パラメータにおける変化の存在あるいは存在しない時、関心がある配位子が受容体と相互作用して、受容体、またはナノ粒子のために別の配位子と競争するかどうか、またはどの程度で競争するかを判断する。

コントロールに関しては、調剤の科学者が広く研究し、それにその薬物のPK/ADME-Toxの特性がすでに発表され、同じシステムからコントロールすることで得られたデータによって、結果と特定のPK/ADME-Tox特徴(例えば対数P、対数D、電荷、レドックス電位、分布のボリューム、細胞または血液脳関門浸透、代謝変化と可能な毒性)などを分析して評価する。一部の具体的な例として、光学結果から計算されたパラメータ(例えば、受容体に対

10

20

30

40

50

する配位子のアフィニティ)を直接に獲得することができる。そして、いずれの便利な方程式からもPK/ADME-Toxパラメタについて直接計算することもでき、今技術の面において広く知られる公式である。

化合物のpKaによって、所定のpH(例えば、異なる体器官(例えば血、十二指腸、回腸、その他)で)でイオン化されるパーセンテージを計算できます。下記のとおり

$$\%ionized = 100 \frac{1}{1 + 10^{\pm(pH - pKa)}}$$

その中に、指数記号の+はベースに対す、-は酸に対する。

同様に、pHが7.4である時、クリアランス(CL)と直接関連する分子のイオン化物の分配係数(D)の対数は、シェラーの関係によってオクタノール/水分割係数(ポー/w)とpKaから下記のように計算できます。

$$\log D(pH) = \log Po/w - \log[1 + 10^{(pH - pKa)}]$$

しかしながら、一塩基酸について、一塩基ベースの指数はpKa-pHと書かれます。より複雑な状況では、ポリ・プロトン性分子が含まれる場合、上記の方程式の第2の対数は下記になる。

$$\log[1 + 10^{-\left(\sum_1^n pKa - npH\right)} + 10^{-(pKa_1 - pH)}]$$

ナノ粒子が膜或いはセル層に囲まれる場合、ナノ粒子との分子の相互作用から生じる信号が直接に薬物(dQ/dt)の転送レートにかかわり、組織を通して透過係数(Papp)を計算することが許される。

$$P_{app} = \frac{dQ}{dt} \frac{1}{AC_0}$$

Aが層の表面積で、C0が初期濃度である。この関係はさらに組織に溶けている薬物の分数(fuT)を計算することが許される。同様に、血清タンパク質にn独立の分子を結合させ、例えばアルブミンとα1酸性糖蛋白のアフィニティ定数(KA)によって、プラズマの中に溶けている薬物の分数(fuP)を計算できます。

$$fu_P = 1 - \left[\frac{nK_A}{1 + K_A} \right]$$

次に、Oie-Tozer方程式によって、定常状態での分布ボリューム(VDss)を推定できる。

$$V_{Dss} = V_P \left(1 + R_{E/I} \right) + fu_P V_P \left(\frac{V_E}{V_P} - R_{E/I} \right) + \frac{V_R fu_P}{fu_T}$$

その中に、VPとVEはプラズマと細胞の外液量(体重はそれぞれ0.0436と0.151L/kg)で、RE/Iは血管外対の血管内のタンパク質(1.4として計算)の比率で、VRは薬物が分布する物理のボリュームから細胞外液スペースを引いた数量である(体重は0.380L/kg)。

シトクロムP450アイソザイムと分子の相互作用等温線は本質的なクリアランス(CLint)に対応するVmax/Km比の概算を提供した、さらにその結果はCLintにfuTをかけた総クリアランス(CLtot)だと概算できました。これらの相互補完的な関係によって、薬物の経口投与(t1/2)の後の半減期などの薬物動態パラメータを推論することが許される。

$$t_{1/2} = \frac{0.693 V_{Dss}}{CL_{tot}}$$

最も広い意味から言うと、方法は、質的であるか、または量的である。そのため、検出が質的である場合、メソッドは数値あるいは評価を提供する。例えば、検査されるサンプルにある目標配位子がナノ粒子と共に相互作用するかどうかに関する評価である。ほかの具

体的な例として、方法は検査されるサンプルにある目標配位子がコロイドの次第に増加する濃度と相互作用するかどうかに関する定量的検出を提供する。例えば、定量のコロイドと相互作用して、検査されるサンプルにある目標配位子の実際の量の評価である。これらの例において、定量的検出は絶対である場合がある。或いは、研究されるパラメタが知られているかまたは他の方法で評価されたなら、相対である場合もある。そのため、サンプルの目標配位子のアフィニティなどのパラメタを定量化する用語「定量化」は絶対か相対的な定量化である。絶対的定量化は、測定される配位子の既知濃度と分析の結合等温線などから知られます。また、相対的定量化はすべての同じコロイドと相互作用する目標配位子と参照配位子の光学信号を比較してから獲得でき、相対的な2つ以上の異なった配位子の相対的定量化を提供できる。

10

主体方法はさまざまなタイプのサンプルにあるコロイドと1つ以上の目標配位子との相互作用を検出することに使われ、水溶液と混合できる有機溶媒を含む複合試料を含めます。例えば、ジメチルスルホキシド(dimethyl sulfoxide)、ジメチルホルムアミド(dimethylformamide)、エタノール(Ethanol)、メタノール(methanol)などである。主体方法は高感度の目標配位子との相互作用の検出を提供しました。

本発明の方法は、ナノ粒子とのさまざまな配位子の相互作用を検出するのに使用される。関心がある配位子は、無機的または有機的な分子で、無機的または有機的な塩、タンパク質性分子を含みます。例えば、ペプチド、タンパク質、およびその断片を含むタンパク質性配位子と核酸及び他のタイプの配位子で、但しそうとは限りません。配位子は単一の分子である場合もあるか、二つ以上の電子対を共有あるいは共有せず結合する分子のサブユニットの複合物、微生物を含め、例えばウイルス、単細胞の病原体、細胞、多細胞生物またはその一部分である。

20

その他、主体方法は特定の特異結合メンバー組の相互作用を変調する化合物の選別使用されます。用語「調節」は、2個の分子の間の相互作用を低下(例えば、抑制)と向上両方とも含んでいます。例えば、コロイドは組の最初のメンバーを表示し、候補エージェントが存在する場合で第2のメンバーと接触し、組のメンバーの相互作用に対する候補エージェントの効果が評価される。

さまざまな配位子と候補エージェントを上の方法で検査できます。これらの配位子と候補エージェントは多数の化学的分類を含めます。有機分子を含めますが、但しそれだけに限りません。例えば、原子質量単位50以上約2,500未満の小さい有機化合物である。配位子と候補エージェントはナノ粒子特に水素か疎水結合とタンパク質或いは受容体と相互作用するには必要な機能的なグループを含めます。少なくともアミン、カルボニル、アシル、ハロゲン、水酸基またはカルボキシル基を含み、例えば2つの最少の機能的な化学基を含めます。配位子と候補エージェントは置換される1つ以上の機能的なグループの炭素あるいは複素環構造または芳香族とかポリアロマテラピー構造を含む。また、配位子と候補エージェントはペプチド、糖類、脂肪酸、ステロイド、プリン、ピリミジン類、派生物、似たような構造の物またはその組み合わせなどの生物分子の中から見つかります。

30

合成または自然の化合物含むさまざまな源から配位子と候補エージェントを得ます。例えば、多数の手段は、多種多様な有機化合物と生体分子のランダムで方向的な合成に使えます。ランダム化されたオリゴヌクレオチドとオリゴペプチドの表れを含みます。あるいは、細菌、菌類、植物と動物性抽出物の形の天然合成物ライブラリは利用でき、またすぐに生成する。そのうえ、天然または合成的に生産されたライブラリと化合物は、従来の化学、物理と生化学の手段で変形されて、組合せのライブラリを作り出すことに使用されます。既知の薬物は方向性的あるいはランダムな化学変形(例えばアシル化、アルキル化、エステル化、アミド化反応など)する可能性があり、似たような構造の物を生成する。

40

一部の具体的な例において、主体方法は高処理量(HT)形式で実行されます。主体発明のHT例では、多くの異なった化合物が同時にテストされます。同時にテストするとは、多くの化合物がほぼ同時にテストされるということです。そのため、全部でなくても、少なくとも一部の化合物が同時に効果を検査されます。同時にテストされる多数の化合物の数は、5以上である場合もある。、例えば、10以上です。ほかの具体的な例では、数は100以上と

50

か1000以上です。テストされる化合物の数はより高い場合がある。HTの具体化的な例では、テストされる化合物の数は10から1万までである場合がある。例えば、100から10000まで、1000から5000までの範囲を含めます。装置はテストするために、化合物と同じくらい多くの容器である場合もある。例えば、5以上、10以上、100以上、1000以上、5000以上、10000以上などです。一部の具体的な例において、関心があるのは96ウェルプレート、384ウェルプレート、1536ウェルプレートなどです。

候補エージェントを決定するさまざまな高処理量スクリーニング検定は技術的によく知られていて、容易に本発明に適用する。公表されたアメリカ特許番号6127133に記述した内容を含め、参考としてここに添付する。

上述のスクリーニング検定で識別されたエージェントは、さまざまな方法に使われます。特定の受容体に関連する活動の条件の下で目標配位子の活動を調節する方法を含みます。潜在的に市場向きの治療薬として、候補化合物例えば新規化学物質NCEsとか薬剤候補とか鉛化合物などの効力を予測して、決定するために主体方法を使用できます。上述のように、許容できるpK/ADME-Toxの特性は候補化合物の治療の有効性を容易にするものです。候補化合物が許容できるpK/ADME-Toxの特性を有するかどうかを確定するために、主体発明の方法を実施する可能性があります。pKaや、吸収や、分配や、新陳代謝や、排泄や毒性などの関心がある特性の結果を獲得するがそれだけとは限らない。これらの結果はコントロール値に対照する場合がある。一部の具体的な例において、コントロール値は、本発明の既知のpK/ADME-tox特性の既知化合物を分析評価してから得られた値である。一部の具体的な例において、コントロール値は、許容できるpK/ADME-Toxの特性を持っている既知の化合物に相応する値に等しいか、またはその値にほぼ等しい。一部の具体的な例において、コントロール値は、許容できるpK/ADME-Toxの特性を持っている二つ以上の既知の化合物に相応する平均値に等しいか、またはその値にほぼ等しい。ここに使われる用語「等しい」、「ほぼ等しい」とは指定された範囲でもう一つの値に等しいということである。例：±40%、±20%を含み、例：±10%や±5%のようである。

一部の場合、主体方法から得た候補化合物の結果は、コントロール値と上述の関心がある特性を対比する場合がある。主体方法から得た結果がコントロール値にほぼ等しいと、例えば一定の範囲内で、±40%、±20%を含め、例えば±10%或いは±5、それでは、候補化合物には、関心の特性について許容できる数値を持ちます。候補化合物には、関心の特性について許容できる数値を持けば、候補化合物が潜在的に市場向きの治療薬として実用される可能性があります。コントロール値から得た結果とで主体方法との1つ以上関心がある特性について上述の比較を実行する。1つ以上の興味がある特性が許容できる数値であれば、候補化合物が追加のテストに適用する。例えば、動物または人間の生体外の研究、生体内の研究などの臨床試験などだがそれだけとは限らないそのため、一部の例では、さらに候補化合物が許容できる数値を持つかどうかを確定する。もしあれば、一回以上のテストを行い、例えば、さらに動物または人間の生体外の研究、生体内の研究などの臨床試験を実施する。

逆に、主体方法から得た結果がコントロール値と実に等しくないと、候補は関心がある特性の許容できる数値を持ちません。候補は関心がある特性の許容できる数値を持たなければ、候補化合物が潜在的に市場向きの治療薬みなされる可能性があります。1つ以上の興味がある特性が許容できない数値であれば、候補化合物が追加のテストに適しないという可能性があります。そして、化合物をテストするかを決定する。

【0008】

キットとシステム

上述のように、主体方法を実践するためのキットとシステムを提供しています。キットとシステムは少なくとも上述の液体、固体のコロイド或いはそのコンポを含んでいます。また、キットとシステムは主体方法で使われるオプションも含む場合がある。関心があるオプションはバッファおよび同様のものを含んでいます。

主体キットの具体的な例では、これらの情報を得るためにキットはさらに主体方法を実践するための指示を含めます(例えば、ユーザを指示のウェブページにのウェブサイトURLに

10

20

30

40

50

導く)。これらの指示は基板などのところで印刷され、基板とは1つ以上の下記のものである場合もある。即ち添付文書、パッケージ、試薬容器、およびそのようなものです。主体キットでは、1つ以上のコンポーネントを同じあるいは異なった容器の中で保管するのが便利でまたは望ましいかもしれない。

装置

また、主体方法特にそのHT具体的な実践のために高処理量(HT)装置を提供しています。高処理量装置は一般に便利な構成も持っていて、分析評価ができる2つ以上の流体を封じ込める部品、エージェント部品および信号検出部品を含めます。例えば、本発明のHT装置は多くの流体を含むウェル(例えば、96、384、1536など)を持っているプレートとか基板を含みます。例えば、添加される試薬例えば候補エージェントのコンピュータに反応が起こる試薬添加設備、サンプルとコロイドの少なくとも1つの属性例えば光学的性質を測定する設備、それに、先に1つウェルと試薬を添加するコンポーネントを測定装置のコンピュータに反応のある設備である。米国特許番号6,127,133で説明されるように、ここに参考に取り入れました。その上、関心するのは米国特許番号6,468,736と5,989,835で説明された装置で、ここに参考に取り入れました。本発明のHT装置は前で説明されるように、ナノ粒子コロイドを含む少なくとも1つの流体容器を含みます。

【図面の簡単な説明】

【0009】

【図1】図1ウシ血清アルブミン (BSA) - 金のコロイド抱合体でテオフィリンの結合等温線を示す。

【図2】図2ウシ血清アルブミン (BSA) - 金のコロイド抱合体でビリルビンの結合等温線を示す。

【図3】図3燐酸塩でバッファリングされたポリ(アニリン)の滴定曲線を示す。

【図4】図4人間血清アルブミン (hSA) - ジゴキシンの結合と分離の動力学を示す。

【図5】図5アスコルビン酸標準曲線を示す。

【図6】図6パラセタモール、アセチルサリチル酸、エリスロマイシン、テオフィリン、クロルフェニラミンのデータから得られた分配量と、インビボ薬物動態から得られたサリチル酸塩の分配量の回帰および相関関数を示す。

【図7】図7ジゴキシシンと人間血清アルブミン (hSA) - 金のコロイド抱合体で結合等温線を示す。

【図8】図8チオペンタールと人間血清アルブミン (hSA) - 金のコロイド抱合体で結合等温線を示す。

【図9】図9人間血清アルブミン (hSA) - 金コロイド抱合体の6種の既存の薬品の再生性検査結果を示す：フロセミド、インドメタシン、イブプロフェン、オキサシリン、塩酸イミプラミン、およびナプロキセン。

【図10】図10 HSA-金のコロイド抱合体分析から観測されたアフィニティと文献からのデータの相関関係を示す(実験的であるか%血清から計算された蛋白結合)。点線はアイデンティティを示す。

【図11】図11ヒト・オロソムコイド(α 1酸性糖蛋白)金のコロイド抱合体でのベラパミルとエリスロマイシンの結合等温線を示す。

【図12】図12ヒト・オロソムコイド(α 1酸性糖蛋白)金のコロイド抱合体分析再現性と塩酸アミトリプチリン、クロルフェニラミン、クロルプロマジン、デシプラミン、ジフェンヒドラミン、エリスロマイシン、ハロペリドール、インドメタシン、塩酸イミプラミン、フェニルブタゾン、ピンドロル、プラゾシン、プレドニゾロン、プロプラノロール、キニジン、ツボクラリン、バルプロエート、ベラパミル、およびワルファリンを観測したアフィニティの明確な相関関係を示す。

【図13】図13一般的に知られている局所化された表面プラズモン共振 (LSPR) 信号とCa co-2細胞浸潤速度定数の間の既知薬物として得た相関関係を示す。(文献資料)

【図 1 4】図14断片が腸管で吸収したLSPR信号と%の間の既知薬物として得た相関関係を示す。

【図 1 5】図15既知化合物とそれらのそれぞれの減少の可能性との反応の後にポリアニリン - カルボン酸 (PANI-COOH) に関する450nmの信号の間の相関関係を示す。(文献資料)

【図 1 6】金コロイドとのキニジンの滴定曲線を示す。

【図 1 7】金コロイドとの p K a 値の測定値および予想値の間の較正 ($n = 7$; $r^2 = 0.89$) を示す。

【発明を実施するための形態】

【0010】

制限を通して提供するのではなく、実例として以下の例を提供する。

10

【実施例】

【0011】

実験

実験1

平均直径40nmの金ナノ粒子の溶液は、1リットルのエルレンマイアーで500mlの蒸留水に200mgのテトラクロロ金(III)酸四水和物(アクロス22362-0010)を溶かすことによって作られました。磁気バーを加え、容器を電磁攪拌機に置きます。溶液を沸騰まで加熱し、力大きく攪拌する。沸騰するとき、1%のクエン酸ナトリウム(1%のクエン酸と無水のシグマ C-0759を中和することによって作ります)の30mlを急速に容器に注ぎます。沸騰と攪拌を溶液が黒く、それから赤くまで続け、ナノ粒子が形成する。そして、溶液は室温に冷やされた。

20

コロイド溶液の特徴は524nmの吸収バンドと4の光学密度(1cm)である。金コロイド溶液の10mlをで電磁攪拌バーがつくビーカーに注がれて、10mM水酸化ナトリウムを使用して電磁攪拌の下でpH値6.5まで中和する。ウシ血清アルブミン(脱脂ウシ血清アルブミンBSA、Equitech 会社、750mg/ml、2ml)の水溶液は急速に電磁攪拌の下注がれました。混合物は10分間室温で反応でき、そして、228mgの四ホウ酸ナトリウム十水和物(Fluka72000)を添加してバッファする。pHが 9 ± 0.1 に調整されて、溶液を茶色のガラスビンの中に格納し、アルブミン受容体を表すコロイドとして使用する。薬学研究でヒト血清アルブミンの代わりによくウシ血清アルブミンBSAを試用し、その理由は両者が薬物に対して非常に同様のことが起こります。

ビリルビン(オールドリッチR750972)とテオフィリン(Fluka88308)のソリューション(100mM)はジメチルスルホキシド(DMSO、Fluka41640)で作られる。これらの溶液をpH9(10mM硫酸マグネシウムを含む50mM)の硼酸塩緩衝液で100倍希釈して、1%のジメチルスルホキシドDMSOを含む1mMの緩衝液を生成する。これらの溶液は連続で1%のDMSOを入れてある同じ硼酸塩緩衝液で希釈し、濃度の低い配位子のサンプルを生成する。

30

そして、これらの配位子溶液(30 μ l)と空白の溶液(配位子のない1%のDMSOと共にバッファする)を96ウェルプレートに吸い込まれ、二等分する。硼酸塩緩衝液(pH9の50mM120 μ l、10mM硫酸マグネシウムと40g/lポリ(エチレン・グリコール) 6,000-- Fluka81260を含む)を50 μ lのBSAの金コロイド抱合体と共に加えました。プレート内容が徹底的に混合し、室温で4時間培養する。そして、525nmの一個一個のウェルの光学密度を分光光度計Spectramax Plus(分子装置)で読み取ります。空白の溶液の光学密度(O.D)は各結果から引きまます。それぞれのO.Dsは配位子濃度によって記録し、図1(テオフィリン)と図2(ビリルビン)のそれぞれの結合等温線を形成する。それぞれの図で、O.D信号は平均 $\pm$ の重複統計に表れ、図2はさらに2つの独立の実験の結果を示す。

40

図1に示されていた結合等温線によって、テオフィリンがBSAに対するアフィニティを予測することができ、 r^2 が0.82である時、1モグラあたり5.1.104 リットルである。同様に、図2に示されていた結合等温線は、ビリルビンがBSAに対するアフィニティを予測することができ、 r^2 が0.73である時、1モグラあたり1.2.108リットルである。これらの2つの配位子の例がアルブミンに対する結合アフィニティが異なるため、選択しました。ビリルビンだけが最も研究された配位子で、1モグラあたり9.5.107リットルの平均9.5.107だと見積もられます(Peeters, T.Jr. (1996) すべてアルブミンに関する、学術出版社、サンディ

50

エゴ432ページのp.97ページ)。テオフィリンがアルブミンに対するアフィニティがはるかに低く、したがって前者が血清アルブミンと100%近く結合し、後者がプラズマタンパク質と結合するのは $56 \pm 4\%$ しかありません (Goodman and Gillman (1996) 治療の薬理学的基礎, 九版、Hardman, J.G., McGraw-Hillなど、ニューヨーク)。現在のテクニックで得られたテオフィリンのアフィニティから、プラズマの結合分数(0.558非常に上述の実験で得られた0.56の平均値に近い)を推測でき、公表された方程式を使用してボリウムを知ることができます (Lombardo, F., Shalaeva, M.Y. など (2000) ElogPoct: 創薬における親油性決断のためのツール 医薬化学雑誌 43, 2922-2928ページ)。そのような方程式にこれらのデータを取り入れることによって、1Kgあたり0.551リットルの人間のテオフィリンの分布ボリウム、実験で観測された1Kgあたり 0.50 ± 0.16 リットルの範囲内です (Goodman and Gillman (1996) 同上)。薬物の分配ボリウムは定量の薬物の動力学カーブの下面積(AUC)を計算する重要なパラメータである。

10

【0012】

実験2

以下の通りコロイド性のポリ(アニリン)を得られます: 10gもある一部のポリ(ビニール・アルコール)を200mlの熱湯に溶かす。熱い溶液は、フィルターにかけ、室温に冷す。そして、溶液に16.8mlの12N塩酸を加え、酸性化する。この溶液の一部分(100ml)を4で電磁攪拌機にある磁気バーが付く清潔なビーカーに置きます。溶液を攪拌し、0.25mlのアニリン(オールドリッチ24,861-4)を注入する。注入直後、5mlの水に溶かされた658mgのアノモニウムペルオキシジスルファート(オールドリッチ24,861-4)が加えられます。溶液を4で48時間続いて攪拌する。コロイドは0.5%のポリソルベート20を含む0.1Mペーハー8の燐酸塩緩衝液で溶出したSephacryl S-1000コラムでクロマトグラフィーによって精製しました。次に緩衝液をHClかNaOHのどちらかで滴定し、滴定の間に各pH値のスペクトルを記録する (Ultrospec 2000, Pharmacia)。このペーハー範囲内で800ナノのエメラルジン塩基と相応のピークを形成し、リン酸アニオンのpKaを吸収する。(理論:7.21; カーブから計算される: 6.80) これは図3で説明されます。

20

したがってこの実験で示されたように、候補薬物を含む分子のpKaを測定するのに分析評価システムを使用できます。これはとても重要なパラメータで、薬物動力学(吸収と膜透過)に顕著な効果を持っている。

【0013】

30

実験3

コロイド金ゾルは、上述の実験1の方法で作られました。そして、コロイドは、上述のように、ヒト血清アルブミン(HSA、シグマ A-1653)でコーティングされます。金コロイドがペーハー5.5であるのを除きます。そして、試薬に50mMの硼酸塩を注入して緩衝する。その上、150mM塩化ナトリウム、ポリソルベート20(0.2%)、および魚ゼラチン(0.1%)を加え、さらに安定化する。

ジゴキシシン(Fluka37100)をメタノール(100mg/リットル、128 μ M)に溶かし、PBSでそれぞれ256、128、64、25.8、および12.8nMのサンプル溶液に希釈しました。これらのサンプル(30 μ l)は加速緩衝液(120 μ l; 200mMペーハー8のTris-HCl、250mM塩化マグネシウム、70g/lのポリエチレングリコール6000、15g/lポリエチレングリコール3万5000、およびトリトンX-100をそれぞれ10ミリリットル/リットル)と混ぜられます。混合と反応は37 恒温の臨床化学分析器 (Cobas Mira Plus分析器、ABX分析器、フランス Montpellier)の使い捨てのキュベットで実行されます。サンプルと緩衝液が混合すると、金とHSAの抱合体(50 μ l)を反応混合物に加えます。そのあと600ナノで結合動力学の分析をする。数分後、500倍以上のジゴキシシン(20 μ l)を反応混合物の中に注入する。自動化器具で同じ波長で解離分析を続けます。図4に結果を表示し、矢印は過剰配位子添加時間を示す。結合と解離曲線を計算する線形回帰は0.86から0.99までの相関関係の係数を提供しました。

40

結合と解離動力学の分析によって1モグラあたり $1.6 \pm 2.5 \cdot 10^5$ (± 5 分析評価の統計)リットルの薬物-HSA平均アフィニティを計算できます。透析で確定したジゴキシシンがヒト血清アルブミンに対するの外見のアフィニティは1モグラあたり $1.85 \cdot 10^5$ リットルである。透

50

析で断固としたヒト血清アルブミンのためのジゴキシンの外見のアフィニティは1.85.105リットルである。(Westphal, U.(1986)ステロイドとタンパク質の相互作用II。Springer-Verlag出版社ベルリン603ページ)

【0014】

実験4

そして、金ナノ粒子とポリ(o-アントラニル酸)の合成コロイド公表されたアメリカ特許出願番号No.20070172834と公表された国際アプリケーション番号No.WO2006047371(Englebienne and Van Hoonacker, 2006年)によって多く生産されています。参考としてここに取り込まれている。

複合溶液にペーハー5で酢酸ナトリウム50mMを添加して緩衝する。複合溶液(0.5ml)は3%の酢酸と濃縮したアスコルビン酸を含める等容積の水溶液と10分間室温で反応させます。空白溶液を水に等容積のコロイドと3%の酢酸を混合することによって作りました。培養の後に、アスコルビン酸のサンプルが空白溶液に対する600nmの光学密度における変化をアスコルビン酸濃度によって記録し、標準曲線を形成する。図5に結果を表示する。コロイドが強い酸化剤に対して非常に敏感なので、アスコルビン酸という強い還元体を使って類似で反対のカーブを形成できます。その結果、特定の薬剤候補の酸化還元電位は特定のペーハーと濃度でコロイドと反応し、そして、図5の例で既知酸化剤あるいは還元体と光の反応を比較することによって、急速に評価できます。一つの例として、Trolox分子(6-ヒドロキシ-2,5,7,8-テトラメチルクロマン2カルボン酸)、水溶性ビタミンEの派生物で、同じ状態でテストされるアスコルビン酸とほぼ同じ酸化還元の電位を表示する。この結果は公表されたデータと完全に一致している。

参考として引用した公表された国際番号WO03027656で記述されたように、新規化学物質NC E、薬剤候補、鉛の酸化還元電位はその分子をさらに開発するかどうかを決めるための重要なパラメータである。実は、還元体薬物は有益な治療の効果を生む場合もあるが、酸化剤は毒性である場合がある(Shargel, L. と Yu, A.B.C. (1999) 応用生物薬剤学と薬物動力学, 4版 . McGraw-Hill, ニューヨーク768ページ)。薬物の酸化還元電位は、さらに新陳代謝の種類と速度を制御して、そのため、薬物の代謝動力学特徴の調節ができる。

【0015】

実験5

実験1で記載した手順によって、一連の既知薬物のウシ血清アルブミンのアフィニティを測定検査されました。これらの薬物は劣等の接合剤である場合がある(パラセタモールとアセチルサリチル酸)、中等の接合剤(エリスロマイシン、テオフィリン、クロルフェニラミン)、または、高等の接合剤(サリチル塩)である場合がある。結合し組み合わせるアフィニティ定数に関する対数を計算し、公表されたデータ(Goodman and Gillman, 1996, 年, 同上)得た生体内の血しょう蛋白質との結合割合のグラフを画きました。非線形性の最小2乗は十分に重要な相関係数の平方($r^2=0.95$)を提供し、生体外から得るアルブミンのアフィニティから特定のサンプルの血漿タンパク結合データを控除できます。プラズマのタンパク結合の薬物の一部によって人はさらにその分配のボリュームを計算できます。これは薬物の薬物動力学の特徴の不可欠なパラメータである。図6はその例にある6種の薬物のデータから得た分布外見容積(縦座標)と生体内の薬物動力学から得た分布容積(横座標 Goodman and Gillman, 1996, 同上)と復帰との間の相関関数を示した。

【0016】

実験6

それらの表面にヒト血清アルブミン(HSA、シグマ A-1653)が現れるナノ粒子を含む金のコロイドは、実験3で説明されるように作ります。ジゴキシシン(Fluka37100)をメタノール(100mg/リットル、128 μ M)に溶かし、PBSでそれぞれ256、128、64、25.8、および12.8nMのサンプル溶液に希釈しました。これらのサンプルとPBS空白溶液(100 μ l)をそれぞれラベルされた使い捨てプラスチックチューブに入れ、加速緩衝液(600 μ l; 200mMペーハー8のTris-HCl、250mM塩化マグネシウム、70g/lのポリエチレングリコール6000、15g/lポリエチレングリコール3万5000、およびトリトンX-100をそれぞれ10ミリリットル/リットルと金-HS

Aの抱合(200 μ l)を含める)を添加する。渦を混ぜた後に、チューブは10分間室温でかえされました。渦巻ミクシング(vortex-mixing)をした後に、チューブを10分間室温で培養する。培養の後に、540nmの光学密度を分光光度計(Ultrospec2000、Pharmacia)によって記録し、空白溶液がゼロでした。そして、それぞれのサンプルの光学密度が増加し、その濃度によって図7のような図面を書きます。そのような2つの独立している実験で計算した結合等温線から得た外見のアフィニティの平均値は $7.5 \pm 2.3 \cdot 10^5$ である。透析で確定したジゴキシンがヒト血清アルブミンに対する外見アフィニティは1モグラあたり $1.85 \cdot 10^5$ リットルである。

【0017】

実験7

薬物を連続希釈し、室温で3時間表面にヒト血清アルブミンがつく金コロイドナノ粒子を使って二部分に分けます。薬物とタンパク質の相互作用から生じる紫外-可視分光(UV-vis)信号は、加える濃度によって図面を書き、結合等温線に基づいて外見のアフィニティ定数を計算する。図8はそのような結合等温線の例を示しています。図9は6つの既知薬物(フロセミド、インドメタシン、イブプロフェン、オキサシリン、塩酸イミプラミン、およびナプロキセン)の再生測定結果を示しています。ドラッグは3枚の別々のプレートに分配されます。図10はこの技術によって得た外見アフィニティと文献の外見アフィニティの相関関係(血清蛋白結合パーセンテージから実験あるいは計算)を示しています。点線はアイデンティティを示す。

【0018】

実験8

薬物を連続希釈し、室温で二時間表面に人間のオロソムコイド(α 1酸性糖蛋白)がつく金コロイドナノ粒子を使って二部分に分けます。薬物とタンパク質の相互作用から生じる紫外-可視分光(UV-vis)信号は、加える濃度によって図面を書き、結合等温線に基づいて外見のアフィニティ定数を計算する。図11はベラパミルとエリスロマイシンの結合等温線の例を示しています。図12は再生性測定の結果及び12の既知薬物(塩酸アミトリプチリン、クロルフェニラミン、クロルプロマジン、デシプラミン、ジフェンヒドラミン HCl、エリスロマイシン、ハロペリドール、インドメタシン、塩酸イミプラミン、フェニルブタゾン、ピンドロル、ブラゾシン、プレドニゾロン、プロプラノロール、キニジン、ツボクラリン、バルプロエート、ベラパミル、およびワルファリン)の外見アフィニティと文献の外見アフィニティの相関関係を示す。

【0019】

実験9

コロイド金ナノ粒子は、脂質二重層を模擬するように11-メルカプトウンデカン酸の層でコーティングされました。ナノ粒子は既知薬物と96ウェルあるマイクロタイタープレートで100 μ Mの最終濃度(1%のジメチルスルホキシドDMSO)で反応する。薬物と膜の相互作用が1時間経ってから、530nmで局在表面プラズモン共鳴(LSPR)の推移を記録する。図13は既知薬物のLSPR信号とCaco-2浸潤速度定数(文献資料)の間相関関係を示しました。図14は既知薬物のLSPR信号と腸管で吸収したパーセンテージ相関関係を示す。

【0020】

実験10

還元既知薬物の酸化還元電位は測定されました。特定の最終濃度(100 μ M)の薬物はペーハー4の導電性高分子(ポリアニリン2カルボン酸、PANI-COOH)の緩衝液に入れられます。溶液を室温で10分間培養する。光学密度を450nmで読み取り、空白溶液の結果を修正する。既知化合物とそれらのそれぞれの減少の可能性との反応の後にポリアニリン-カルボン酸(PANI-COOH)に関する450nmの信号の間の相関関係を示しています(文献資料)。既知分子の450nmの信号と還元電位の間に直線関係を観測しました(図15)。新規化学物質NCEsの還元電位を推測できるようになりました。

60の周知の薬物を含むのライブラリを識別すると、プロモクリプチンは比較的強い酸化剤($E = -364\text{mV}$)だと分かりました。比較的強い還元体はブラゾシンとクロルプロバミド(E

10

20

30

40

50

=747和848 mV)である。これが文献データと合っています(Wardman, 1989年)。還元体薬物は有益な治療効果を生む場合もあるが、酸化剤は毒性である場合がある。薬物の化還元電位の濃度はさらにその新陳代謝の種類と速度を決定する。そのため、今後は薬物薬物動態学の特徴を調節する(Shargel and Yu, 1999, 同上)。

上述の議論と結果から見れば、主体発明が重要な新しいタイプの分析評価方法を提供した。創薬の過程で早期新規化学物質NCEs、薬剤候補、および鉛化合物のPK/ADME-Toxの特性の急速な高処理量測定 of のさまざまなアプリケーションに用いられます。例えば、創薬と開発アプリケーションにおける主体コロイドの使用は現在の使用での遊離の部分から結合体の物理的分離の放射性、クロマトグラフィーと質量分析技術のない利点を示す。コロイド性の導電性高分子、コロイド金属、および合成物は均質「混入及び読み取り」を適用できます。これらの分析評価は様々な器具と普通の技術者により実施できます。多くのフォトリック検出システムを使用するのは当然である。本発明の分析システムはNCEs、薬剤候補、および鉛化合物の生体外のPK/ADME-Tox選別などの多くの場合で使われます。例えば、血しょう蛋白質の結合、膜の相互作用、代謝酵素に向かう活動、疎水性、酸化還元電位などのいくつかの代表的なアプリケーションである。そのため、主体発明は技術に対して重要な貢献した。

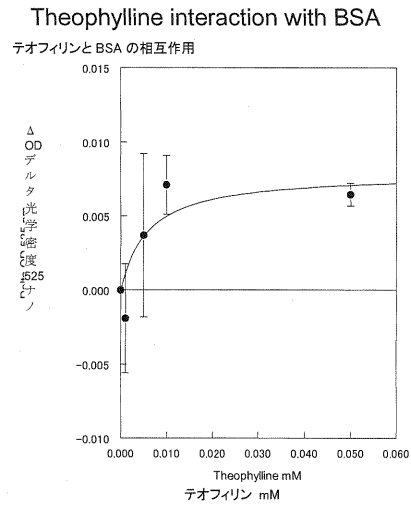
10

上述の発明について理解してもらうためにイラストと実験で詳細に説明しましたが、普通の技術者にとって分かりやすい。本発明を伝授について、添付の権利の要求と精神及び範囲に違反しない前提の下で変更と修正ができるものとする。

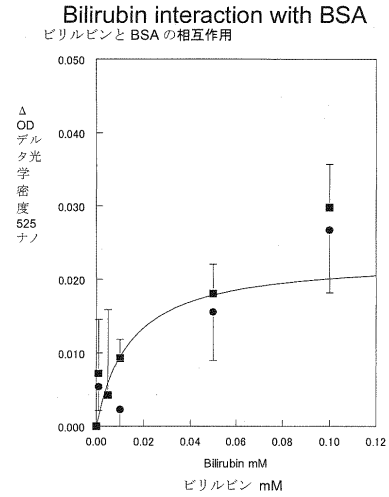
上述の内容は本発明の原則だけを説明する。というのは、当業者がここに明らかに説明または表明されていないけれども、本発明の原則、趣旨と範囲で様々なアレンジメントを具体化にできます。その上、すべての実験と条件付きの用語は、読者に発明者が技術発明を促進する原則と概念の貢献を理解させるという目的で、これらの実験と条件に限らないと理解する。また、ここに引用した本発明の原則、状況、実験および特定の例に関するすべての記述は、構造的、機能的な同等内容を包含する。さらに、そのような同等内容は今現在既知の同等内容と将来開発された同等内容の両方を含み、すなわち構造にかかわらずいずれの同じ機能を実行する要素です。したがって、本発明の範囲は、ここで記述し説明した具体的な実験に限りません。むしろ、本発明の範囲と精神は添付したクレームで明記されます。

20

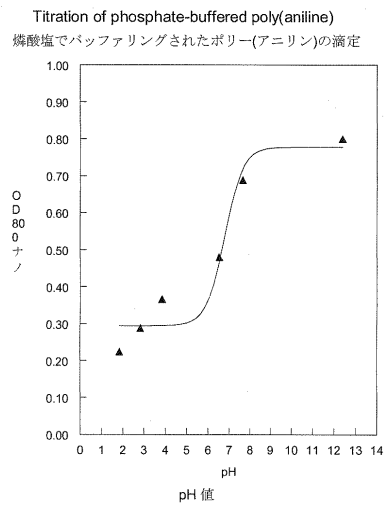
【 図 1 】



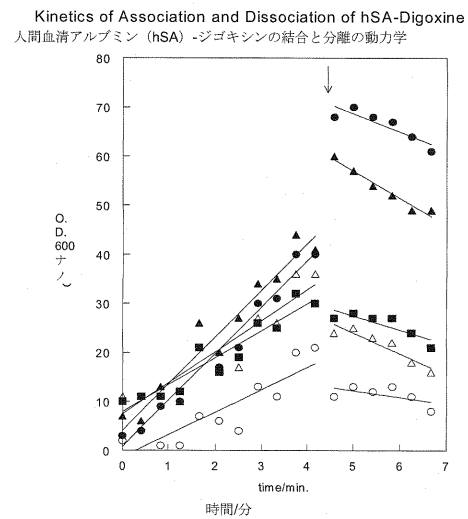
【 図 2 】



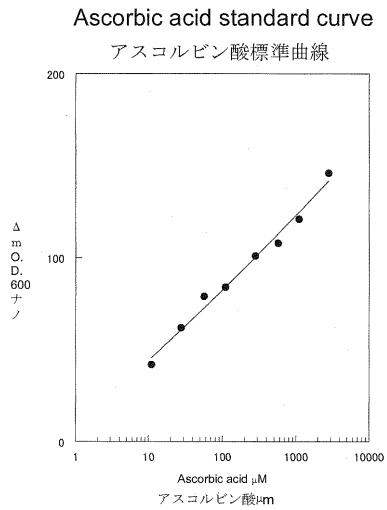
【 図 3 】



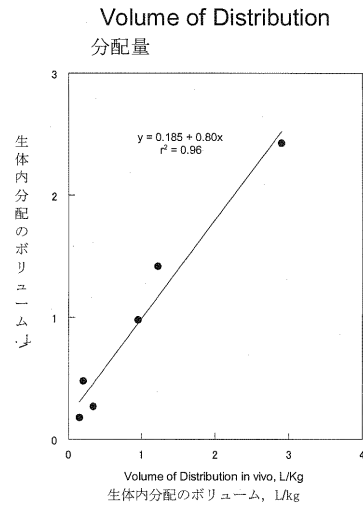
【 図 4 】



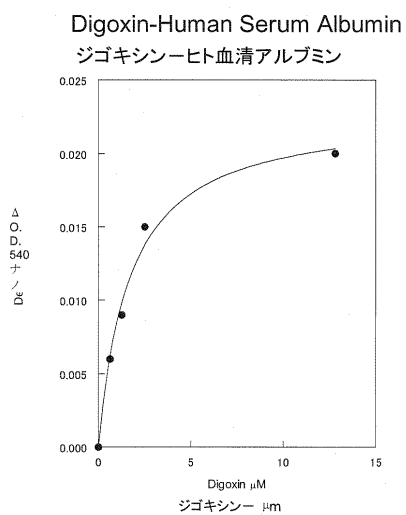
【 図 5 】



【 図 6 】

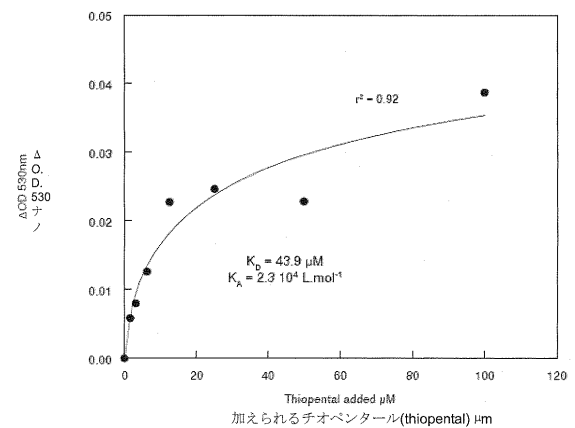


【 図 7 】



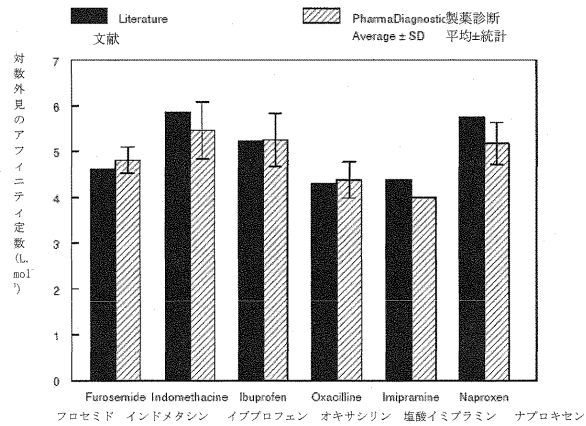
【 図 8 】

hSA Binding Isotherm (Thiopental)
hSA 結合等温線 (チオペンタール)



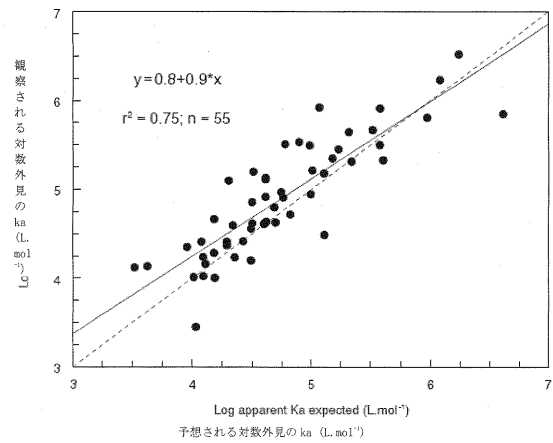
【図 9】

Assay Reproducibility
分析再現性



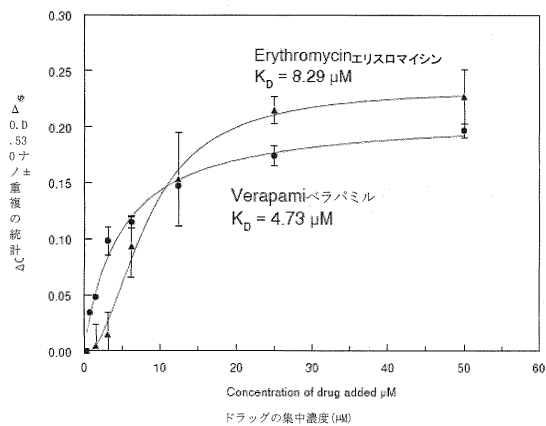
【図 10】

Correlation Between Observed and Expected Apparent Affinities (log)
観測後と予想された外見のアフィニティ(対数)の相関関係



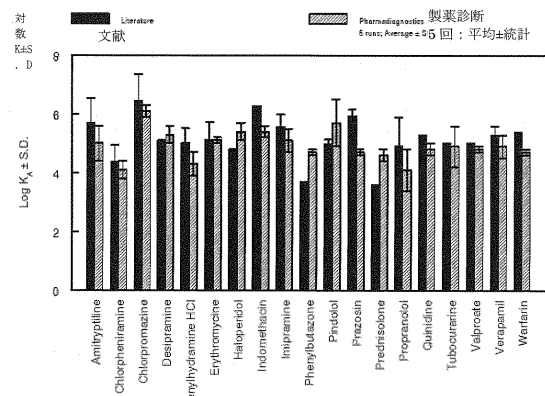
【図 11】

オロソムコイド結合等温線(ベラパミルとエリスロマイシン)



【図 12】

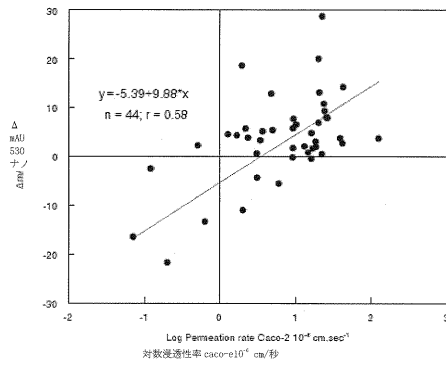
文献データと再現性のオロソムコイド相関関係



アミトリプチリン(amitriptyline), クロルフェニラミン(chlorpheniramine), クロロプロマジン(chlorpromazine), デンブラミン(desipramine), 塩酸ジフェニル水アミン(diphenylhydramine hydrochloride), エリスロマイシン(erythromycin), ハロペリドール(haloperidol), インドメタシン(indomethacin), イミプラミン(imipramine), フェニルブタゾン(phenylbutazone), ピンドロール(pindolol), プラゾシン(prazosin), プレドニソロン(prednisolone), プロプラノロール(propranolol), キニジン(quinidine), ツボクラリン(tubocurarine), バルプロエート(valproate), ベラパミル(verapamil), ワルファリン(warfarin)

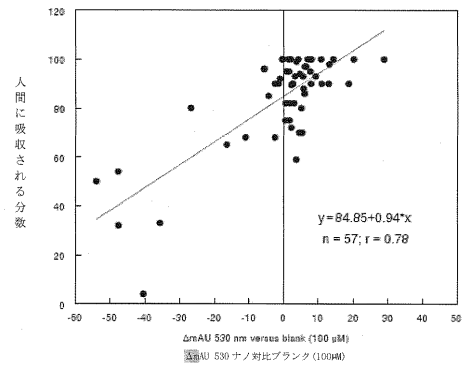
【図 13】

認識された薬剤 LSPR 信号と Caco-2 浸透性速度定数 (文献データ) の相関関係



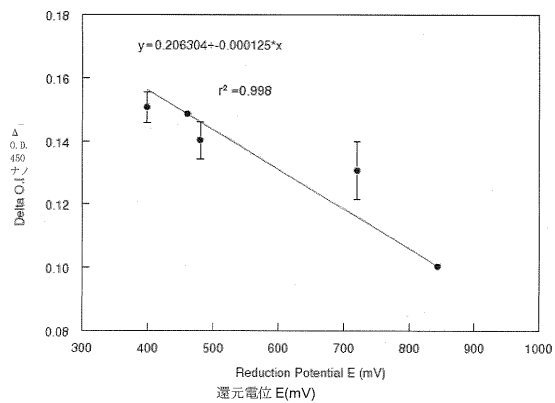
【図 14】

認識された薬剤 LSPR 信号と経口投与によって吸収されるパーセンテージ分数 (文献データ) の相関関係



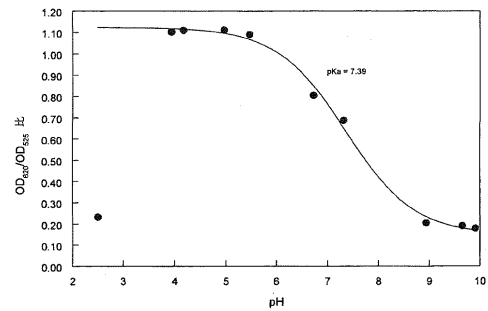
【図 15】

Pani-COOH を使用したレドックス電位分析評価



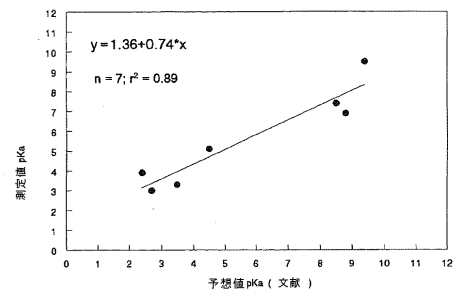
【図 16】

キニジン
金コロイドとの pKa 測定



【図 17】

金コロイドとの
pKa



【誤訳訂正書】

【提出日】平成22年5月26日(2010.5.26)

【誤訳訂正 1】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】全文

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【書類名】明細書

【発明の名称】新規化学物質および薬物候補のPK/ADME - TOX特性決定のための試験および方法

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本願は2007年5月29日に提出された米国仮出願第60/940641号の優先権の利益を主張するものであり、該仮出願は参照により本明細書に組み込まれる。

【背景技術】

【0002】

序論

現在、新規化学物質(NCE)を市販薬に切り替えるプロセスが効率的でないことは一般的に受け入れられている。製薬会社は市場に参入する各新薬に対し約5-10000の化合物のスクリーニングを行う必要がある。最もよく引用される概算によると、1つの新薬を販売するには8億USドルの研究開発費がかかり、その費用のほとんどが失敗に終わると言われている。(Bains, W. (2004) Failure rates in drug discovery and development: Will we ever get any better? Drug Discovery World 5(4), 9-18.)。

【0003】

従来、薬物は1度に1つずつ天然物や合成物質から得られていた。従来の薬物開発プロトコルでは、新しい化合物の合成が、創薬や開発過程の律速段階と考えられていた。自動化されたコンビナトリアル・ケミストリ(組合せ化学)の出現により、1日に何千もの化合物の合成が可能となりこの律速段階を回避した。

【0004】

有機合成技術の進歩により、細胞受容体、イオンチャネルあるいは酵素といった製薬の標的のための多くの合成物の生物活性を、製薬研究者が数日中にテストを行うことが可能なハイスループット・スクリーニング(HTS)の実施が早急に必要とされた。(Englebienne, P. (2005) High-Throughput Screening: Will the past meet the future? In: Frontiers in Drug Design and Discovery, Vol. 1 (G.W. Caldwell, Atta-Uhr-Rahman and B.A. Springer, eds.), Bentham Science Publishers, Ltd, Hilversum, pp. 69-86)。しかしながら、合成および生物学的評価速度が劇的に増加したにもかかわらず、全薬物開発プロセスを切り抜ける化合物の数は非常に少ない。1年に販売される新薬の数は1963年から1999年にかけてはほぼ横ばいである。(Service, R.F. (2004) Surviving the blockbuster syndrome. Science 303, 1796-1799)。

【0005】

多くのNCEに対する失敗の主な原因は、薬物動態学(PK)、ADME(吸収、分布、代謝、排泄)とTox(毒性学)特性が欠けていることにある。これらの原因が、薬品開発のプロセスで、新薬物候補の減少のおよそ50%を占める。減少のその他の原因として、薬効不足(30%)、人への副作用(10%)、商業的理由またはその他(10%)がある。(Wang, J. and Urban, L. (2004) The impact of early ADME profiling on drug discovery and development strategy. Drug Discovery World 5(4), 73-86)。

【0006】

創薬と開発過程は発見、開発、登録の3段階に分類される。発見段階(合成、リードの探索、リード最適化)では3~4年かかる可能性がある。開発段階は臨床第I-III相を含む

。後期発見と初期開発（臨床第Ⅰ相）では、PK/ADME-Tox特性がそれぞれ細胞培養モデルと動物を用いて評価される。（Englebienné、2005、上記）。臨床第Ⅰ相は通常約2年間かかることを考えると、ほとんどの失敗はNCEの研究を2～6年間すでに費やした後に起こる。したがって、創薬プロセスのできるだけ早い段階で薬物候補のPK/ADME-Tox特性に関する重要情報を得ることが望ましい。

【 0 0 0 7 】

創薬および開発プロセス中にできるだけ早く情報を得る目的で、多くの定量的構造活性相関（QSAR）モデルが提案された。（Yoshida, F. and Topliss, J.G. (2000) QSAR model for drug human oral bioavailability. J. Med. Chem. 43, 2575-2585; have been filed Bergstrom, C.A.S., Strafford, M. et al. (2003) Absorption classification of oral drugs based on molecular surface properties. J. Med. Chem., 46, 558-570; Skold, C., Winiwater, S. et al. (2006) Presentation of a structurally diverse and commercially available drug data set for correlation and benchmarking studies. J. Med. Chem., 49, 6660-6671）。QSARモデルはコンピューター・プログラムで、コンピューター（シリコン）内で（すなわち、コンピューターを利用した計算）化学的構造特性と、分子的特徴のような分子ベアリングがADME特性に対応して表示する特定の可能性とを関連づけることができる。このようなコンピューター技術を説明したいいくつかの特許および特許出願が提出されている。たとえば米国特許公開公報第2004009536号、米国特許公開公報第2005119832号を参照。

【 0 0 0 8 】

またインビトロ法も開発・発表されたため、薬物候補の親油性（Lombardo, F., Obach, R.S. et al. (2004) Prediction of human volume of distribution values for neutral and basic drugs. 2. Extended data set and leave-class-out statistics. J. Med. Chem. 47, 1242-1250; Wilson, D.M., Wang, X. Et al. (2001) High-throughput Log D determination using liquid chromatography-mass spectrometry. Combinatorial Chem. High Throughput Screen. 4, 511-519）、膜透過性（Taillardat-Bertschinger, A., Carrupt, P.A. et al. (2003) Immobilized artificial membrane HPLC in drug research. J. Med. Chem. 46, 655-665）、血漿タンパク結合（Cimitan, S. Lindgren, M.T. et al. (2005) Early absorption and distribution analysis of antitumor and anti-AIDS drugs: lipid membrane and plasma protein interactions. J. Med. Chem. 48, 3536-3546）などADME-Tox特性に影響を与える全ての特性の推測が可能となった。国際特許公開第WO9942511号、国際特許公開第WO03027656号、国際特許公開第WO2005034915号、米国特許第 6868343号を参照。

【 0 0 0 9 】

通常、先述のインビトロ法がハイスループット・スクリーニング特性として分類されるにもかかわらず、その性能と効率はかなり低い。固相試薬に結合した、あるいは溶液中に遊離した薬物の濃度をそれぞれ測定する前に、このような方法の大多数は、長い培養時間を必要とし、且つ、薬物から遊離物を分離しなければならない（たとえば、遠心分離により）。さらに薬物濃度は、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）、放射性同位体定量および/または質量分析などを含む複雑な技術から得られたデータによって推定される。

【 発明の概要 】

【 発明が解決しようとする課題 】

【 0 0 1 0 】

概要

本発明の実施は、以下により詳細に論じるように、貴金属コロイド、導電性ポリマーコロイドおよびそれらの複合体の光子反応性の利点を利用した "mix and read" 技術に基づくNCEのADME特性決定のためのインビトロ法を提供することでこれらの欠点を回避する。

【 0 0 1 1 】

金、銀といった貴金属ナノ微粒子は球、棒、角錐のようなさまざまな幾何学的形状に形成されうる。このような微小物質は化学的還元状態の金属的要素を含んでおり、それらの

形成方法により還元された固体粉体として保存されるかあるいは、水、有機溶媒のような溶媒中に安定性の高い溶液として（すなわち、コロイドとして）分散される。ナノメートルサイズ粒子のため、肉眼では本来の溶液と前記の分散系を識別することはできないが顕微鏡では識別され、これらの分散系はコロイド溶液と称される。したがってこれらの粒子はさまざまな担体に容易に塗布され明確な構造を形成することができる。

【 0 0 1 2 】

金属ナノ微粒子の研究は、その微粒子が有するユニークな電子、光学、そして触媒特性のために近年非常に盛んに研究が行われている分野である。光は電磁場と関連性があるため、ナノ微粒子の光電子特性は特に興味深い。実際、貴金属ナノ微粒子は金属性でかつ電気伝導性を有するため、その表面は、高密度な伝導電子の雲に覆われている。これらの電子が光により励起されると、その電磁放射はこれらの電子とともに粒子表面から離れ、集合振動を発現させ放射される。その結果粒子は分析技術に応用される事のできる、特有の光の吸収・反射・放射・散乱特性を示す。実際、ナノ微粒子表面上に固定された受容体へのリガンドの結合が、粒子の光子特性における特有の変化により直接粒子周辺の屈折率の変化を引き起こす。（Englebieenne, P. et al. (2003) Surface plasmon resonance: Principles, methods and applications in biomedical sciences. Spectroscopy 17, 255-278）。現在までに研究されている粒子のほとんどは、同一金属から均一に形成されたものである。しかしながら、構造中で異なった金属を交互に入れ替えて形成されたナノ物質を構成することが可能であることが最近になって示されている。この新たな進歩により、生体分子相互作用の定量的検出などさまざまな応用技術で、ナノ微粒子をナノバーコードとして利用することが可能になりつつある。（Bao, Y.P., Wei, T.F., Lefebvre, P.A. et al. (2006) Detection of protein analytes via nanoparticle-based bio code technology. Anal.Chem.78, 2055-2059）。

【 0 0 1 3 】

同様に導電性ポリマー、あるいは導電性ポリマーおよび貴金属の複合体は、ナノ微粒子を含むコロイド形態中でも形成されうる。導電性ポリマーは、アルキン、フェニル、ヘテロサイクリックモノマーがそれぞれの高度に共役した繰り返し配列により形成された有機ポリマーである。これらのポリマーは、絶縁状態から酸化（p-doping）あるいは還元（n-doping）により金属とほぼ同等の伝導性が得られる。導電性ポリマーに共通な他の重要な特徴として、酸化状態の変化によってクロミック変化（変色）するという性質がある。（Englebieenne, P. (1999) Synthetic materials capable of reporting biomolecular recognition events by chromic transition. J. Mater. Chem. 9, 1043-1054）。導電性ポリマー層で覆われている貴金属から成るナノ微粒子複合体の利用は、両構成要素の伝導電子の相互作用を引き起こす。これは屈折率や酸化還元電位などを含むさまざまな変化に対するナノ材料の光学反応性を増加させる。（Englebieenne, P. and Van Hoonacker, A. (2005) Gold-conductive polymer nanoparticles: A hybrid material with enhanced photonic reactivity to environmental stimuli. J. Coll. Interface Sci. 292, 445-454）米国特許公開公報第2007 - 0172834号を参照：その内容を本明細書に援用する。

【 0 0 1 4 】

環境に対するナノ微粒子の特異性光学感受性のため、ナノ微粒子はさまざまな分析物の定量的免疫測定法などの多様で同質な分析技術において標識として利用されてきた。（Englebieenne, P. (2000) Immune and Receptor Assays in Theory and Practice. CRC Press, Boca Raton, 392pp）。特異的受容体を有し、共有結合により導電性ポリマーで標識され、固体担体上に投じられた脂質二重層は、米国特許第 6395561号に記載されているように特定リガンドとの相互作用を分光光度法により直接モニタリングするために提案されてきた。

【 0 0 1 5 】

本発明は、NCEのPK/ADME-Tox特性の迅速な決定に利用される溶液中または固体担体上の導電性ポリマー、貴金属またはそれらの複合体からなるコロイド状ナノ微粒子の有益な適用を明らかにし請求する。

【 0 0 1 6 】

したがって、NCE（たとえば、薬物候補またはリード化合物）のインビトロ法によるPK/ADME-tox特性決定の少なくとも予測または実施形態のための試薬として、溶液中または固体担体上のコロイド状導電性ポリマー、安定金属/導電性ポリマー複合コロイドの貴金属ナノ微粒子といったナノ微粒子コロイドの使用方法が提供される。また、適用のための主題の方法および試薬ならびに方法を実施するための装置を含むキットが提供される。これらの方法および試薬の実施形態のいずれかの態様は、そのプロセス中の反応が均一、迅速であり、“ミックス・アンド・リード（mix and read）”のプロセスとして続行されるという事実を含む。

【課題を解決するための手段】

定義

【 0 0 1 7 】

特に定義しない限り、ここで用いる全ての技術的、化学的用語は、本発明が属する技術分野の普通の能力の当事者が理解するのと同じ意味を有するものとする。さらに一部の用語は分かりやすく参照しやすいように以下に定義する。

【 0 0 1 8 】

用語「コロイド」とは液状媒体に分散している微細粒子の液体成分を示す。ここでの代表的コロイド粒子サイズは1ナノメートルから1マイクロメートルである。

【 0 0 1 9 】

用語「金属コロイド」とは分散している微細粒子が金属粒子であるコロイドを示す。

【 0 0 2 0 】

用語「貴金属」とは、プラチナ、イリジウム、パラジウムなど、ならびに金、銀などの周期表のVIII族遷移金属を意味するが、これらに限定されるものではない。

【 0 0 2 1 】

用語「導電性ポリマー」とは導電性の重合体材料を意味する。代表的実施態様において、導電性ポリマーは π 共役系有機ポリマーのような有機ポリマーである。たとえば、ポリピロール、ポリチオフェン、ポリベンゾチオフェン、ポリイソチアナフテン、ポリチエニレンビニレン、ポリアニリン、ポリアセチレン、ポリジアセチレン、ポリアズレン、ポリピレン、ポリカルバゾール、ポリセレノフェン、ポリフランとポリベンゾフラン、ポリ（p-フェニレン）、ポリインドール、ポリピリダジン、またナфтаセン、ペンタセン、ヘキサセン、ヘプタセン、ジベンゾペンタセン、テトラベンゾペンタセン、ピレン、ジベンゾピレン、クリセン、ペリレン、コロネン、テリレン、オバレン、クオテリレンなどのポリアセン類およびサーカムアントラセンとそれらの誘導体が用いられる。

【 0 0 2 2 】

当分野において既知の通り、導電性ポリマーは、ジメチルアミノ基、シアノ基、カルボキシル基、ニトロ基などの官能基を持つポリマー材料、電子を授与する受容体として作用するベンゾキノ誘導体、テトラシアノキノジメタン、テトラシアノエチレンまたそれらの誘導体などの材料、または例えばアミノ基、トリフェニル基、アルキル基、水酸基、アルコキシ基、フェニル基などの官能基を持つ材料、電子供与体である供与体として作用するフェニレンジアミン、アントラセン、ベンゾアントラセン、置換ベンゾアントラセン、ピレン、置換ピレン、カルバゾールとその誘導体、テトラチアフルバレンとその誘導体などの置換アミン類へ組み込まれることによりドーピングされる。本明細書に記載されるドーピングされるとは、電子受容分子（受容体）または電子供与分子（供与体）が前述の挿入されるポリマーに組み込まれることを意味する。本発明に使用されるドーパントとして用いられるのは、受容体あるいは供与体いずれかである。

【 0 0 2 3 】

用語「コロイド状導電性ポリマー」とは導電性ポリマー粒子からなるコロイドを示す。

【 0 0 2 4 】

用語「金属/導電性ポリマー複合コロイド」とは、その表面に存在する導電性ポリマーを持つ金属粒子からなるコロイドを示す。

【 0 0 2 5 】

用語「コロイド複合体」または「複合ナノ微粒子」とは、反応性を与えるために分子（たとえば受容体、核酸、チオールアルキル鎖などが挙げられるが、これらに限定されるものではない）が提示されている表面上のコロイドに参加するナノ微粒子を示す。ナノ微粒子の表面への反応分子の固定は、物理的、化学的方法によりおこなわれる。

【 0 0 2 6 】

用語「固体担体」および「固体基板」とは、いずれかの光を透過する固体を意味し（たとえばガラスまたは石英を含むがこれらに限定されるものではない）、そのうえにコロイドを載せて光反応性膜を形成しセンサーとして使用されるものである。

【 0 0 2 7 】

用語「吸着」とは、受容体、膜、リガンドなどの分子の薄層が、それが接触している、金属または複合粒子などの固体表面へ付着することを示す。

【 0 0 2 8 】

本明細書において用いられる用語「接触」とは、一緒にする、または合わせることを意味する。したがって、2つのアイテムをたとえばお互いを触れさせることによって一緒にした時に、最初のアイテムが2つ目のアイテムに接触していると言う。用語「合わせる」とは、2つの異なる成分が1つの組成物になるように接触させることを示す。

【 0 0 2 9 】

用語「攪拌」とは、構成要素が互いに相対的に動くような、成分への物理的動作の適用を示す。したがって用語「攪拌」は混合、攪拌などを示すために広範に用いられる。

【 0 0 3 0 】

本明細書で用いられる用語「リガンド」とは、特定の結合対のメンバーの1つであるいずれかのタイプの分子を示す。その中で興味のあるリガンドとして生体分子が含まれるがそれらに限定されるものではない。ここで、用語「生体分子」とは、たとえば抗体、細胞受容体、イオンチャネル、血漿タンパク、酵素または脂質構造などの、興味のある受容体に特異的に結合または相互作用しうるいずれかの無機、有機または生化学分子、グループまたは化学種を意味する。またリガンドは、たとえばスルフヒドリル基の酸化攻撃などにより、対応する結合分子と共有結合付加体を形成する。典型的な生体分子として、ペプチド、タンパク質、アミノ酸および核酸が挙げられる。本発明の特定の実施態様として、リガンドは、創薬または開発過程において薬学化学者により、リード化合物として合成または単離される、薬物候補またはいずれかの新規化学物質（NCE）であってよい。

【 0 0 3 1 】

本明細書で用いられる用語「ペプチド」とは、1つのアミノ酸のカルボキシル基ともう1つのアミノ酸のアミノ基の間で起こるアミド生成によって生成されるいずれかの化合物を示す。

【 0 0 3 2 】

本明細書で用いられる用語「オリゴペプチド」とは、約10～20個未満の残基、すなわちアミノ酸モノマー単位のペプチドを示す。

【 0 0 3 3 】

本明細書で用いられる用語「ポリペプチド」とは、約10～約20個以上の残基を含むペプチドを意味する。用語「ポリペプチド」と「タンパク質」は同じ意味で用いられる。

【 0 0 3 4 】

本明細書で用いられる用語「タンパク質」とは、約50個以上の残基の特定の配列のポリペプチドを示し、D体およびL体または修飾体が含まれる。

【 0 0 3 5 】

本明細書で用いられる用語「核酸」とは、たとえば、デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド、または、たとえば、ワトソン・クリック塩基対の相互作用に参与することができる2つの天然核酸の様式に類似した配列特異の様式で天然の核酸とハイブリダイズすることができる合成された化合物（たとえば、米国特許第5948902号およびその引用文献に記載されているPNAなど）などのヌクレオチドから成るポリマーを意味する。

【 0 0 3 6 】

用語「ヌクレオシド」および「ヌクレオチド」とは、既知のプリン、ピリミジン塩基部分だけではなく、他の修飾された複素環塩基部分を含む部分を包含することを意図する。このような修飾体として、メチル化プリンもしくはピリミジン、アシル化プリンもしくはピリミジン、またはその他の複素環が挙げられる。さらに、用語「ヌクレオシド」および「ヌクレオチド」は、従来のリボースとデオキシリボース糖類だけでなくその他の糖類も含む部分を含む。修飾ヌクレオシドまたはヌクレオチドは、糖部分における修飾（たとえば、1つ以上の水酸基がハロゲン原子または脂肪族基で置換されるか、またはエーテル、アミンなどとして官能基化されることなど）を含む。

【 0 0 3 7 】

本明細書で用いられる用語「リボ核酸」および「RNA」は、リボヌクレオチドで構成されたポリマーを意味する。

【 0 0 3 8 】

本明細書で用いられる用語「新規化学物質」、「薬物候補」および「リード化合物」とは、ヒトまたは動物に使用するための薬物として開発されるために、天然源から分離または新たに合成された、金属塩、酸素、水素、窒素、リン、ケイ素の炭素複合体からなる小分子、ペプチド、たんぱく質および核酸などの無機または有機化合物を示す。

【 0 0 3 9 】

「均一な」とは、全体的に組成物が同じまたは類似の種類または性質であること、すなわち全体的に同一構造または組成であることを意味する。

【 0 0 4 0 】

用語「均一なアッセイ」とは、「ミックス・アンド・リード」の原理、すなわち、結合リガンドおよび遊離リガンドの物理的分離を必要とせず、その結果、完全な反応混合物から直接測定されることに基づく分析アッセイシステムを示す。

【 0 0 4 1 】

本明細書で用いられる用語「デオキシリボ核酸」および「DNA」とは、デオキシリボヌクレオチド類で構成されたポリマーを意味する。

【 0 0 4 2 】

本明細書で用いられる用語「オリゴヌクレオチド」とは、長さが約10～100個のヌクレオチドであって、200個以下のヌクレオチドからなる単鎖ヌクレオチドポリマーを意味する。

【 0 0 4 3 】

用語「バイオポリマー」とは、1種類以上のタイプの繰り返しユニットからなるポリマーである。バイオポリマーは、生体系で見られ（合成されてもよい）、ペプチド、タンパク質またはポリヌクレオチドならびにアミノ酸類縁体または非アミノ酸グループ、またはヌクレオチド類縁体または非ヌクレオチドグループから構成されるか、または含有する化合物を包含する。これは、従来の骨格が非天然骨格または合成骨格で置き換えられたポリヌクレオチド、または1つ以上の従来の塩基がワトソン・クリック型水素結合相互作用に關与することが可能な基（天然または合成）で置き換えられた核酸（または合成あるいは天然類縁体）を含む。ポリヌクレオチドは単鎖または複鎖配置を含み、ここで、1つ以上の鎖は、もう1つの鎖と完全に整列するかもしれないし、しないかもしれない。たとえば、「バイオポリマー」は、その源の如何にかかわらず、米国特許第5948902号およびその引用文献に記載されているような受容体、抗体、結合タンパク質、DNA（cDNAを含む）、RNA、オリゴヌクレオチドおよびPNAならびに他のポリヌクレオチドを含む（これら全ては参照によって本明細書に組み込まれている）。

【 0 0 4 4 】

「光学特性」とは、光学パラメーター、すなわち、その値が何かの特徴または挙動を決定する特性を示し、ここで、代表的な光学特性として、光吸収、光放射、光反射、光散乱が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【 0 0 4 5 】

用語「局在表面プラズモン共鳴」とは、貴金属ナノ微粒子またはその導電性ポリマー複合体の可視領域における特定光吸収帯を示す。当業者には既知の通り、周囲媒体の屈折率（すなわち誘電率の平方根）が変更されるとき、このような吸収帯の特定の波長と高さがそれぞれシフトし、増加する。

【0046】

「表面プラズモン共鳴カップリング」とは、少なくとも2つ以上の貴金属ナノ微粒子が、それらの平均直径の最大2.5倍にほぼ等しい距離内まで接近して引きつけられるときに起こる局在表面プラズモン共鳴効果の増加を意味する。

【0047】

本明細書において用いられる用語「薬物動態学」（PK）、「ADME」および「毒物学」（Tox）とは、薬物としての効果に影響を及ぼす、ヒトなどの哺乳動物を含む動物における薬物の吸収、分布、代謝、排泄および毒性効果を示す。さらに詳しくは、これらの用語は、薬物、薬物候補、リード化合物またはNCEの所定の時間内に動物またはヒトの体内に均一または不均一に分布する能力、細胞または脳などの器官の各部に接近する能力、すばやく代謝されるかまたは代謝されない能力、血清、血漿タンパク質もしくは特定の代謝酵素（たとえば親和性の高いまたは親和性の低いチトクロームファミリーのメンバーを含むがこれらに限定されるものではない）と結合する能力、生体膜または合成膜または層と相互作用する能力、またはグルクロニド、システインまたはグルタチオンなどの代謝に関与する分子またはその誘導体と共有結合付加体を形成する能力を示す。

【0048】

用語「レファレンス」および「コントロール」は、同じ意味で用いられ、観測値と比較される既知値または一連の既知値を示す。本明細書で用いられる既知とは、値が、たとえば親和性、結合パーセント、分布容積、光吸収、光放射などの理解されたパラメーターを表すことを意味する。

【0049】

用語「評価」および「査定」は、同じ意味で用いられ、いずれかの測定の状態を示し、媒体中に存在する元素が、コロイドまたはその複合体と相互作用するかどうかを決定することを含む。用語「決定」、「測定」、「評価」および「アッセイ」は、同じ意味で用いられ、定量的および定性的決定の両方を含む。評価は相対的または絶対的である。「反応性の評価」とは、リガンド同士またはリガンドとナノ微粒子またはその複合体との相互作用レベルの決定を含む。

【0050】

本明細書において用いられる用語「検出する」とは、定性的に、または定量的に、のいずれかで、信号を確認することを意味する。

【0051】

用語「結合」とは、安定した複合構造を形成するために2つの物質がお互いに相互関係をもつことを示す。特定の実施態様において、2つの相補的核酸の結合は、特異的にハイブリダイズすることを意味する。用語「特異的にハイブリダイズする」、「に特異的にハイブリダイズする」、「特異的ハイブリダイゼーション」および「選択的にハイブリダイズする」は、同じ意味で用いられ、核酸分子が、ストリンジェントな条件下で優先的に特定のヌクレオチド配列に、結合すること、二重鎖を形成すること、ハイブリダイズすることを示す。特定の実施態様において、リガンドと受容体の結合は、所定の親和性またはアビディティーをもつ特異的相互作用として示される。その他の実施態様において、リガンドの分子への結合は、リガンドの反応性構造と標的分子の特定の官能基との間の共有結合の形成を意味する。

【0052】

本明細書において、「競合的」または「競合」とは、所定のアッセイにおいて、受容体または酵素と結合するために、1つのリガンドが別のリガンドまたはそのタンパク質複合体と競合することを意味する。

【0053】

用語「親和性」および「アビディティー」とは、2つの結合リガンドが互いに結合する強さを示す。

【0054】

用語「スクリーニング」とは、たとえば分析物、発生率などの対象物の存在を決定することを示す。本明細書で用いられる用語「決定」とは、ハイブリダイゼーションパラメータなどの興味のある特定のパラメータの値を同定すること、すなわち、確立、確定、査定または測定することを意味する。値の決定は、定性的（たとえば、存在または不在）または定量的であってよく、ここでの定量的決定とは相対的（すなわち、コントロールまたは既知値（すなわちレファレンス値）と比較した値）または絶対的（たとえば実際の分子数を決定するなど）のいずれかである。

【0055】

本明細書において用いられる用語「サンプル」とは、液体組成物を示し、特定の実施態様において、液体組成物は水性組成物である。

【課題を解決するための手段】

【0056】

詳細な説明

本発明は、NCE、薬物候補またはリード化合物のPK/ADME-Tox特性を、インビトロで、もし決定しないとしても、少なくとも予測するための試薬として、コロイド状導電性ポリマー、貴金属ナノ微粒子または金属/導電性ポリマー複合コロイドなどのナノ微粒子コロイドを用いる方法を提供する。本発明はまた、本発明の実施態様を実施するためのキットおよび装置を提供する。

【0057】

本発明を詳細に説明する前に、本発明が、記載された特定の実施態様に限定されるものではなく、したがってもちろん多様であると理解されるべきである。また本発明の範囲は特許請求の範囲のみによって限定されるものであり、本明細書で用いられる用語は、特定の実施態様を記載することのみを目的とし、限定を意図するものではないと理解されるべきである。

【0058】

ここでは、さまざまな値が提供されるが、その範囲の上限と下限の間のそれぞれの中間値およびその規定された範囲でのいずれかの他の規定された値または中間値は、特に本文脈が明らかに他のやり方を指示しない限り、下限単位の10分の1まで、本発明内に含まれていることを理解されたい。これらの、より小さな範囲の上限および下限は、より小さな範囲において独立して含まれ、規定された範囲内ではいずれかの特に排除される限界を条件として、本発明内に含まれる。既定された範囲が限界の一方または両方を含む場合、これらの限界が含まれるいずれか一方または両方を排除する範囲もまた本発明に含まれる。

【0059】

本明細書において、ある特定の範囲では、用語「約」を付けた多くの数値が提供される。本明細書において、用語「約」は、それが前に付く正確な数値ならびにこの用語が前に付く数値の近隣あるいはおおよその数値のための文言上のサポートを提供するために用いられる。数値が特定の記載された数値に近いまたはおおよその記載されていない数値は、本内容において述べられている特に記載された数値の実質的等価物を提供する数値である。

【0060】

他に特記しない限り、本明細書で用いる全ての技術的および科学的用語は、本発明が属する業界の当業者が通例理解するものと同じ意味を有する。本明細書に記載されるものと同様または等価ないずれかの方法および材料が、本発明の実施または試験に使用されうるが、代表的な例示的方法または材料をここに説明する。

【0061】

本明細書に引用されたすべての公報および特許は、個々の公報または特許が特別のおよ

び個別的に参考文献として組み込まれるように指示されたように、本明細書に参考文献として組み込まれており、公報が引用する方法および/または材料を開示および説明するために参考文献として組み込まれている。いずれかの公報の引用は、その出願日前の開示のためであり、本発明が、先行発明を理由として、このような公報に先行する資格がないという承認として解釈されるべきではない。さらに、提供された公報の公開日は、実際の公開日とは異なるものであり、独立して確認される必要がある。

【 0 0 6 2 】

本明細書および請求の範囲に用いられる単数形「a」、「an」および「the」とは、特に本文が明記していない限りは、複数の指示対象を含むことに留意されたい。さらに、請求の範囲は、いずれかの任意の要素を除くように作成されることに留意されたい。したがって、この陳述は、請求項の要素の引用に関連する「唯一」、「のみ」などのような排他的な述語の使用、または「ネガティブ」な制限の使用のための先立つ基礎として働くことを意図している。

【 0 0 6 3 】

本明細書の開示を読む際に当業者には明らかなように、本明細書において開示および説明される各々の実施態様は、本発明の範囲または精神から逸脱することなく、その他のいくつかの実施態様のいずれかの特徴から容易に分離するか、または組み合わせることができる別々の要素および特徴を有する。記載された方法はいずれも、列挙されたイベントの順番、あるいは論理的に可能ないずれかの他の順番で実施することができる。

【 0 0 6 4 】

上記にまとめたように、本発明は、NCE、薬物候補またはリード化合物（ここではまとめて「候補化合物」と称することができる）のPK/ADME-Tox特性を、インビトロで、もし決定しないとしても、少なくとも予測するための方法、試薬、キットおよび装置を提供する。したがって、候補化合物の少なくとも予測されるPK/ADME-Tox特性の決定方法が提供される。本発明のさらなる態様およびその特定の実施態様において、使用される対象コロイドの代表例およびフォトリック特性の詳細がまず概観され、続いて、本発明の範囲内で対象コロイドを使用するための代表的な製作プロトコルおよび方法が概観される。さらに試薬として対象コロイドを含み、本発明方法の実施において使用を見出すキットおよび装置の概観が提供される。

【 0 0 6 5 】

導電性ポリマー、金属および金属/導電性ポリマー複合コロイド

上記にまとめたように、本発明は、ひとつもしくは複数のPK/ADME-Tox特性を推定する、すなわち、候補化合物のひとつもしくは複数のPK/ADME-Tox特性を予測するために、導電性ポリマー、金属/導電性ポリマー複合コロイドのフォトリック特性を用い、リガンドとその結合パートナーとの相互作用、膜、電荷、もしくは、酸化還元反応感受性ナノ微粒子などの相互作用構造を、インビトロ均一アッセイシステムにおいて報告するものである。

【 0 0 6 6 】

本発明の実施態様において使用を見出すコロイドは安定している。本明細書で用いる用語「安定した」は、コロイドの微粒子が、コロイドの担体媒体内で、懸濁したままでいることがコロイド粒子の能力（たとえば、かなりの程度まで、微粒子が懸濁状態から沈澱しないことなど）を意味する。本発明の方法において使用を見出すコロイドのもう1つの態様は、コロイドが、たとえば屈折率、電荷または酸化還元電位などの物理的環境における変化を、フォトリック特性における有意な変化によって報告することである。本明細書で使用され、当業者に公知のように、用語「フォトリック特性」とは、これらのナノ微粒子が、紫外線または可視光線を吸収するか、または散乱させること、燐光、蛍光または発光を放射する能力を意味する。

【 0 0 6 7 】

当該コロイドは、導電性ポリマー、金属またはその複合体からできていてもよいので、導電性ポリマー成分、金属成分、または金属成分と導電性ポリマー成分の両方のいずれか

である。コロイドのその金属成分は、もし存在するならば、貴金属であってよい。興味のある貴金属としては、原子周期表の第VIII族金属である、プラチナ、イリジウム、パラジウムなど、ならびに金、銀などが挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【0068】

用語「導電性ポリマー」とは、導電性のポリマー物質を意味する。特定の実施態様において、導電性ポリマーは、p-もしくは π -共役系有機ポリマーなどの有機ポリマーである。たとえば、ポリピロール、ポリ(N-置換ピロール)、ポリ(3-置換ピロール)およびポリ(3,4-ジ置換ピロール)などのポリピロール類；ポリチオフェン、ポリ(3-置換チオフェン)、ポリ(3,4-ジ置換チオフェン)およびポリベンゾチオフェンなどのポリチオフェン類；ポリイソチアナフテンなどのポリイソチアナフテン類；ポリチエニレンビニレンなどのポリチエニレンビニレン類；ポリ(p-フェニレンビニレン)などのポリ(p-フェニレンビニレン)類；ポリアニリン、ポリ(N-置換アニリン)、ポリ(3-置換アニリン)およびポリ(2,3-置換アニリン)などのポリアニリン類；ポリアセチレンなどのポリアセチレン類；ポリジアセチレンなどのポリジアセチレン類；ポリアズレンなどのポリアズレン類；ポリピレンなどのポリピレン類；ポリカルバゾールおよびポリ(N-置換カルバゾール)などポリカルバゾール類；ポリセレノフェンなどのポリセレノフェン類；ポリフランおよびポリベンゾフランなどのポリフラン類；ポリ(p-フェニレン)などのポリ(p-フェニレン)類；ポリインドールなどのポリインドール類；ポリピリダジンなどのポリピリダジン類；ナフタセン、ペンタセン、ヘキサセン、ヘプタゼン、ジベンゾペンタセン、テトラベンゾペンタセン、ピレン、ジベンゾピレン、クリセン、ペリレン、コロネン、テリレン、オバレン、クオテリレンおよびサーカムアンスラセンなどのポリアセン類；トリフェノジオキサジン、トリフェノジチアジン、ヘキサ6,15-キノンなどのポリアセン類のいくつかの炭素原子をN、S、もしくはOなどの原子またはカルボニル基などの官能基で置換することによって製造される誘導体；ポリビニルカルバゾール、ポリフェニエンスルフィドおよびポリビニエンスルフィドなどのポリマーであってよい。代表的な態様において特に対象となるものは、ポリピロール、ポリチオフェン、ポリアニリンまたはその誘導体である。

【0069】

米国特許公開公報20070172834および国際公開公報WO2006047371 (Engleblenne and Van Hoonacker, 2006) (これらは、参照することにより本発明に援用される)に記載されているように、複合コロイドにおいて、金属粒子は、導電性ポリマーで表面コーティングされており、水性媒体(これに限定されるものではない)などの液体媒体に懸濁している。「表面コーティング」とは、粒子の少なくとも一部分もしくは全体が、導電性ポリマー分子の層に覆われている状態を意味する。

【0070】

粒子の寸法はさまざまであってよいが、特定の実施態様において、約1ナノメートル~約1ミクロンの範囲であってよく、たとえば、約1nm~約100nm、あるいは約30nm~約60nmの範囲であってよい。特定の実施態様において、粒子の粒径分布は狭い。狭い粒径分布とは、相対標準偏差が平均直径の30%以下であることを意味し、特定の実施態様において、相対標準偏差は平均直径の20%以下、たとえば17%以下であり、あるいは10%以下である。

【0071】

特定の実施態様において、粒子は、コロイド溶液として、または、ガラスもしくはその他の適当な固体材料などの固体基板上に成型されたセンサーフィルムとして使用される。

【0072】

特定の実施態様において、粒子は、たとえば興味のあるリガンドに特異的もしくは非特異的に結合するといったような、受容体、または親水性、疎水性もしくはそれらの混合性の膜を提示する。ここで「提示する」とは、受容体または膜が、粒子の表面に固定され、そこで、受容体または膜が、粒子の表面上に共有結合または非共有結合されうることを意味する。粒子の表面を構成している受容体分子(単数/複数)の密度はさまざまであって

よいが、一粒子当たり、約 2 ~ 約 5 0 個、さらには約 5 ~ 約 2 5 個の分子の範囲であってよい。

【 0 0 7 3 】

上記のとおり、コロイドの粒子の表面上に、さまざまな異なるタイプの受容体または膜層が提示されうる。特定の実施態様において、存在する特定の受容体は、以下に議論される適用などの所定の適用において、少なくとも予測されるか、または決定されるべきPK/ADME-Tox特性に応じて変わる。代表的な興味のある受容体として、血漿結合タンパク質、シトクロムファミリーの酵素、親水性または疎水性膜、界面活性剤、核酸、ペプチドなどの上記に議論した受容体が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【 0 0 7 4 】

コロイドのpHはさまざまであってよく、特定の実施態様において、約2~約12、たとえば、約4.5~約9.0の範囲である。コロイドには、ポリマーがコーティングされた金属粒子以外に、さまざまな異なる追加成分が含まれてよく、興味のある追加成分として、塩、緩衝剤、界面活性剤、安定剤が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【 0 0 7 5 】

製作方法

当該コロイドは、上記のような、本発明コロイドの生成をもたらす便利なプロトコルのいずれかを用いて製造される。1つの実施態様において、コロイド状導電性ポリマーは、ポリ(ビニルピロリドン)またはポリ(ビニルアルコール)などのポリマーといったような安定剤の存在下で、適当なモノマーの水性酸中での酸化によって生成される。コロイド状導電性ポリマーは、さらなる誘導体化の前に、クロマトグラフィーにより精製することができる。もう1つの実施態様において、貴金属コロイドは、適当な温度での水中における金属塩の還元によって製造される。このようなコロイドナノ微粒子の製造のためのプロトコルのそれぞれの例は、Immune and Receptor Assays in Theory and Practice (Englebienné, P. (2000), CRC Press, Boca Raton, 392pp) の243頁および234頁に、それぞれ提供されている。もう1つの実施態様において、初期または前駆体の金属コロイドおよび水溶性導電性ポリマーは、水溶性導電性ポリマーが金属コロイドの粒子の表面に吸着することによって、本発明において用いる複合体コロイドが製造されるのに十分な方法で、互いに混合される。そのような安定した複合ナノコロイドの製造プロトコルは、米国特許公開公報20070172834および国際公開公報WO2006047371 (Englebienné and Van Hoonacker, 2006) に提供されており、これらは、参照することにより本発明に援用される。

【 0 0 7 6 】

本発明のいくつかの実施態様においては、コロイドは、興味のある候補化合物と相互作用する作用剤をさらに提示し、該作用剤は、上記に示したように、さまざまであってよく、受容体、酵素、天然もしくは合成膜、ヌクレオチド、抗体、リガンドまたはバイオセンシングのためなどのその誘導体が挙げられるが、これらに限定されるものではない。これらの提示された分子は、適宜、電荷吸着または共有結合によって微粒子の表面に結合する。いずれの適切な結合プロトコルを使用してもよい。

【 0 0 7 7 】

有用性

上記に示したように、コロイドは、たとえばNCE、薬物候補、リード化合物などの候補化合物のPK/ADME-Tox特性を予測もしくは演繹することにおいて意図されるさまざまな異なる適用に用いることができる。この方法は、候補化合物の1つ以上の異なったPK/ADME-Tox特性を、たとえ決定しなくても、少なくとも推定することに使用することができる。

【 0 0 7 8 】

特定の実施態様において、興味のある特性は、吸着である。組織において薬理学的な効果を発揮する前に、通常、消化器官などの粘膜表面を介して、化合物は血流に入っていくなければならない(腸内吸収)。また、標的の器官または細胞への取り込みが確保されなければならない。これは、たとえば血液脳関門などの天然の関門において重大な問題となりうる。胃内で化合物の溶解度が低いこと、化学的に不安定であること、および、腸壁を

通過できないことなどの要素は、すべて、薬物が経口投与後に、吸収される程度を低下させる。吸収は、化合物のバイオアベイラビリティの決定に重大な影響を及ぼす。経口で投与されると吸収が悪い薬物は、静脈内または吸入などの他のより望ましくない経路で投与されなければならない。

【0079】

特定の実施態様において、興味のある特性は、分配である。化合物は、作用部位に運搬される必要があり、血流を介することが最も多い。そこから、化合物は、通常は、異なる程度で、組織および器官に分配される。

【0080】

特定の実施態様において、特性は、代謝である。化合物は、体内に入った直後から、分解され始める。小分子薬物の代謝の大部分は、肝臓で、シトクロムP450酵素と呼ばれる、酸化還元酵素によって行われる。代謝が起これば、最初の（親）化合物はメタボライトと呼ばれる新たな化合物に変換される。メタボライトが、薬理的に不活性である場合、代謝は、投与された親薬物を不活性化し、これが通常身体における効果を低減化することになる。メタボライトは、薬理的に活性であることもあり、親薬物よりさらに強くなる場合もある。

【0081】

特定の実施態様において、特性は、排泄である。化合物とそのメタボライトは、排泄により身体から除去される必要がある、通常、腎臓経由（尿）で、もしくは糞便において行われる。排泄が完全でない場合、異物の蓄積が通常の代謝に悪影響をもたらす可能性がある。

【0082】

特定の実施態様において、特性は、pKaである。化合物のpKa値は、反応性およびスペクトル特性（色）などの化合物の多くの特徴に影響を及ぼす。生化学において、タンパク質およびアミノ酸側鎖のpKa値は、酵素の活性およびタンパク質の安定性にとって非常に重要である。この特性は、化学物質のイオン化はその物理的挙動ならびに溶解度および親油性などのマクロ特性を変更するので、化学においても一般的に重要である。たとえば、いずれの化合物においても、そのイオン化は水溶性を増加させるが、親油性を減少させる。このことは、薬物の発見に利用して、適切なpHにおけるイオン化基のpKa値を調整することによって、その化合物の血流中の濃度を増加させることができるが、イオン化された化合物は細胞膜透過性が低くなるために、これは慎重に行う必要がある。

【0083】

特定の実施態様において、特性は、毒性である。毒性とは、何かが毒であるか、または有害であるかという程度の尺度である。毒性は、ヒトなどの生物全体に対する影響を意味する場合と、その下部組織、たとえば細胞（細胞毒性）または器官（たとえば肝臓などの器官毒性（肝臓毒性））に対する影響を意味する場合がある。

【0084】

本発明の特定の実施態様において、当該コロイドは、血漿タンパク質に結合させるためのリガンド、天然もしくは合成膜との相互作用、またはシトクロムP450ファミリーのメンバーなどの酵素、多剤耐性タンパク質1のようなATP結合カセットトランスポーターのメンバーなどの細胞膜チャネルなどを含むサンプルをスクリーニングする目的で 사용할ことができ、これらの受容体は、ナノ微粒子上に提示される。もう1つの実施態様において、適切なpHにて界面活性剤で安定化したナノ微粒子を、電荷または酸化還元電位を決定するように、リガンドを含むサンプルと接触させることができる。ナノ微粒子はまた、リガンドが共有結合付加体を形成する分子をその表面に提示することができる。いくつかの実施態様において、興味のあるリガンドは、受容体、酵素などと結合するためのもう1つのリガンドと競合する。

【0085】

このような適用において、何も担持していないコロイド、または、リガンド特異的受容体もしくは酵素、天然おまたは合成膜をそれぞれ含む、コロイドまたは固体支持体に載せ

られた固定コロイドを、スクリーニングされるサンプルと接触させ、たとえばコロイドの所定の波長における吸収率の変化といったようなコロイドの光学パラメーターを、相互作用における変化を検出するためにモニターする。いずれかの便利な光学パラメーターが、この段階において評価もしくはモニターされ、その代表的なパラメーターとして、吸収、散乱、蛍光、発光が挙げられるが、これらに限定されるものではない。光学パラメーターは、いずれの便利な装置とプロトコルを使用してモニターされてもよく、適当なプロトコルは、当業者には公知であり、その代表的なプロトコルは下記実験セクションに詳しく記載される。

【 0 0 8 6 】

次いで、光学パラメーターにおける変化の有無は、興味のあるリガンドが、一つの受容体と相互作用するかどうか、1つの受容体に対するもう1つのリガンドまたはナノ微粒子と競合するかどうか、そしてそれはどの程度までなのか、などを決定するために使用される。

【 0 0 8 7 】

たとえば、医薬品科学者により広く研究され、そのPK/ADME-Tox特性が文献に公表されているコントロール既知薬物を用いる同一のシステムから得られたデータなどのコントロールと比較することによって、アッセイの結果を、logP、logD、電荷、酸化還元電位、分配量、細胞または血液脳関門貫通、代謝変換および毒性の可能性などの特定のPK/ADME-Tox特性と比較する。特定の実施態様において、たとえば受容体に対するリガンドの親和性などの計算されたパラメーターは、光学的な結果から得られ、現在当業者に既知であるいずれかの便利な計算式から、PK/ADME-Toxパラメーターを直接計算することができる。

【 0 0 8 8 】

化合物のpKaによって、たとえば血液、十二指腸、回腸などの異なる身体の器官での所定のpHにおけるイオン化パーセント（% ionized）を以下の関係式によって、計算することができる：

$$\%ionized = 100 \frac{1}{1 + 10^{\pm(pH - pKa)}}$$

【 0 0 8 9 】

ここで、指数記号は+が塩基、そして酸が-である。

【 0 0 9 0 】

同様に、Scherrerの関係式によれば、一塩基酸については、分子のイオン化された化学種のlog分配係数（D）は、pH7.4においてクリアランス（CL）と直接関連しており、オクタノール/水分配係数（Po/W）およびそのpKaから計算することができる：

$$\text{Log}D(pH) = \log Po / w - \log[1 + 10^{(pH - pKa)}]$$

【 0 0 9 1 】

しかしながら、一酸塩基については、指数はpKa - pHと記載される。多塩基分子が関与する、より複雑な状況では、上記の式の第2項は下記となる：

$$\log[1 + 10^{-\sum_1^n pKa - npH} + 10^{-(pKa_1 - pH)}]$$

【 0 0 9 2 】

ナノ微粒子が膜または細胞層で囲まれている場合、時間中にその膜を通過して出てくる、分子とナノ微粒子との相互作用から得られる信号は、薬物の移動速度（dQ/dt）に直接関係し、したがって、組織を通る見かけの透過係数（Papp）を計算することができる：

$$P_{app} = \frac{dQ}{dt} \frac{1}{AC_0}$$

【 0 0 9 3 】

ここで、Aは層の表面積であり、C₀は初期濃度である。さらに、この関係は、組織に結合していない薬物の割合（fu_T）を近似予測することを可能にする。同様に、アルブミンおよびα 1 - 酸性糖タンパク質などの血清タンパク質のn個の独立した結合部位への分子の結合に影響を及ぼす親和定数（K_A）により、血漿中で非結合の薬物の割合（fu_P）を計算することができる：

$$fu_P = 1 - \left[\frac{nK_A}{1 + K_A} \right]$$

【 0 0 9 4 】

さらに、同様に、Oie-Tozer方程式は、定常状態における分配量（V_{Dss}）を予測することを可能にする：

$$V_{Dss} = V_P \left(1 + R_{E/I} \right) + fu_P V_P \left(\frac{V_E}{V_P} - R_{E/I} \right) + \frac{V_R fu_P}{fu_T}$$

【 0 0 9 5 】

V_PとV_Eは、血漿と細胞外液の量であり（それぞれ、0.0436および0.151 L/体重Kgである）、R_{E/I}は、血管内タンパク質に対する血管外タンパク質の比率であり（1.4になる）、V_Rは、薬物が分配される物理的体積から細胞外空間を差し引いたものである（0.380 L/体重Kg）。

【 0 0 9 6 】

シトクロムP450アイソザイムと分子の相互作用等温線は、固有クリアランス（CL_{int}）に対応するVmax/Km比を近似予測することを可能にし、それによって、fu_TによるCL_{int}の積に等しいトータルクリアランス（CL_{tot}）を近似予測することを可能にする。これら補完的な関係によって、経口投与後の半減期（t_{1/2}）などのいくつかの薬物動態パラメーターを演繹することが最終的に可能になる：

$$t_{1/2} = \frac{0.693 V_{Dss}}{CL_{tot}}$$

【 0 0 9 7 】

最も広義には、本発明方法は定性的または定量的でありうる。検出が定性的である場合、本発明方法は、たとえば、アッセイされるサンプル中に存在する標的リガンドがナノ微粒子と相互作用するかどうかの評価などの読み取りまたは評価を提供する。さらに他の実施態様において、本発明方法は、アッセイされるサンプル中に存在する標的リガンドが、次第に濃度を増加させて、コロイドと相互作用するかどうか、すなわち、コロイドの固定量と相互作用するアッセイされるサンプル中の標的リガンドの実際の量の計算または評価の定量的検出を提供する。そのような実施態様において、定量的検出は、絶対的であるか、または研究されているパラメーターが既知であるか、もしくは他の方法によって評価されている場合、相対的である。このように、「定量化する」という用語は、サンプル内の標的リガンドの親和性などのパラメーターを定量化するという文脈で使用された場合、絶対的または相対的な定量化を意味する。絶対的な定量化は、アッセイにおけるリガンドの既知の濃度を含めて結合等温線を分析することにより、達成できる。また、相対的な定量化は、全て同一のコロイドと相互作用を起こしている標的リガンドおよびレファレンス

リガンドから発生する光学的信号を比較して、２種類以上の異なったりリガンドの、たとえば、互いに相対するといったような相対的な定量化を提供することによって達成できる。

【００９８】

本発明方法は、ジメチルスルホキシド、ジメチルホルムアミド、エタノールまたはメタノールなどの水溶液との混和性をもつ有機溶媒などの複雑なサンプルを含むさまざまな異なる種類のサンプルにおける、コロイドと１種以上の標的リガンドとの相互作用を検出するために用いることができ、本発明方法は、標的リガンドの相互作用の検出を高感度で提供する。

【００９９】

本発明方法は、多種多様なリガンドとナノ微粒子との相互作用を検出するために使用できる。興味のあるリガンドは、無機または有機塩などの有機または無機分子、ペプチドおよびタンパク質およびそのフラグメントなどのタンパク質性リガンド（これらに限定されるものではない）などのタンパク質性分子、ならびに核酸、および単一分子または互いに共有結合するか、またはしていない２つ以上の分子サブユニットを含む複合体であってもよいその他のタイプのリガンド、ウイルスまたは単細胞病原体、細胞、多細胞生物もしくはその一部などの微生物などでありうる。

【０１００】

さらに、本発明方法はまた、所定の特異的結合メンバー対の相互作用を調節する化合物をスクリーニングするために使用することができる。用語「調節する」は、２つの分子間の相互作用を低下させる（阻害する）ことと、増強することの両方を意味する。たとえば、コロイドが第１の結合対のメンバーを提示し、次いで、コロイドが候補薬物の存在下で第２のメンバーと接触する場合、結合メンバー対の相互作用における候補薬物の効果を査定または評価することができる。

【０１０１】

上記の方法で、さまざまな異なるリガンドと候補薬物をスクリーニングすることができる。これらのリガンドと候補薬物には、たとえば分子量５０～約２５００ダルトンの小さな有機化合物などの有機分子といったような多数の化学種が含まれるが、それらに限られるものではない。リガンドと候補薬物は、ナノ微粒子に提示されたタンパク質またはその他の受容体との、特に水素結合または疎水性結合などの、構造的相互作用に必要な官能基を含み、そして、アミン、カルボニル、アシル、ハロゲン、ヒドロキシルまたはカルボキシル基などを含んでもよく、これらのうちの少なくとも２つの官能基を含んでもよい。リガンドと候補薬物は、１つ以上の上記官能基で置換された環式炭素または複素環式構造および／または芳香族または多環芳香族構造を含むことが多い。リガンドと候補薬物はまた、ペプチド、サッカリド、脂肪酸、ステロイド、プリン、ピリミジン、誘導体、構造的類似体またはその組み合わせなどの生体分子から見出される。

【０１０２】

リガンドと候補薬物は、合成または天然化合物のライブラリーなどの多種多様な源から得られる。たとえば、ランダム化オリゴヌクレオチドおよびオリゴペプチドの発現などの、多種多様な有機化合物および生体分子のランダムおよび指向性合成のために、多くの手段を利用することができる。別法として、細菌、真菌、植物および動物抽出物の形態の天然化合物のライブラリーが、利用されうるか、または容易に製造される。さらに、天然または合成により作成されたライブラリーおよび化合物は、従来の化学、物理学および生化学的手段を介して容易に変更され、コンビナトリアルライブラリーを作成するのに用いることができる。既知の薬理学的作用剤を、アシル化、アルキル化、エステル化、アミド化などの指向性またはランダム化学修飾に付して、構造的類縁体を作成することができる。

【０１０３】

特定の実施態様において、本発明方法は、ハイスループット（HT）様式で行われる。本発明のハイスループットの実施態様において、複数の異なる化合物が、同時にテストされる。同時にテストするとは、複数のそれぞれの化合物が、実質的に同時にテストされることを意味する。したがって、すべてでなくとも、少なくとも幾つかの複数の化合物が、そ

これらの効果について平衡して検定される。同時にテストされる複数の化合物の数は、10またはそれ以上などの5またはそれ以上であり、特定の実施態様において、その数は、100またはそれ以上、あるいは1000またはそれ以上であり、テストされる化合物の数をより多くすることができる。ハイスループット実施態様において、同時にテストされる化合物の数は、10から10000であり、100から10000、1000から5000などが含まれる。デバイスは、たとえば5またはそれ以上、10またはそれ以上、100またはそれ以上、1000またはそれ以上、5000またはそれ以上、10000またはそれ以上などのテストされる化合物と同数の容器を有する。特定の実施態様においては、特に、96ウェルプレート、384ウェルプレート、1536ウェルプレートなどである。米国特許第6127133号（これは、参照することにより本発明に援用される）に記載のアッセイなど、候補薬物の活性を決定するためのさまざまなハイスループットスクリーニングアッセイが、当業界で既知であり、本発明に容易に適合させることができる。

【0104】

上記スクリーニングアッセイにおいて同定された作用剤は、特定の受容体上の標的リガンドの活性を調節する方法およびその活性に関連する条件などのさまざまな方法において用途が見出される。

【0105】

本発明方法を用いて、NCE、薬剤候補、リード物質などの候補化合物または潜在的に市場性のある治療薬としての実現可能性を予測または決定することができる。上記のとおり、許容しうるpK/ADME-Tox特性が候補化合物の治療有効性を促進することができる。候補化合物が許容しうるpK/ADME-Tox特性を有するかどうかを決定するために、本発明方法を行って、興味のある（pKa、吸収、分散、代謝、排泄および毒性（これらに限定されるものではない）などの興味のある特性に対応する結果を得ることができる。これらの結果をコントロール値と比較することができる。特定の実施態様において、コントロール値は、既知のpK/ADME-Tox特性をもつ既知の化合物に対して本発明アッセイを用いて得られる値である。特定の実施態様において、コントロール値は、許容しうるpK/ADME-Tox特性を有する既知の化合物に対する対応値と等しいか、または実質的に同じである。いくつかの実施態様において、コントロール値は、許容しうるpK/ADME-Tox特性を有する2種類以上の既知の化合物に対する対応値の平均と等しいか、または実質的に同じである。本明細書で用いる用語「実質的に同じ」または「実質的に類似」は、もう1つの値に対して特定の範囲内、たとえば、 $\pm 40\%$ 、 $\pm 20\%$ 、 $\pm 10\%$ あるいは $\pm 5\%$ などで等価である値を意味する。

【0106】

いくつかの例では、上記のとおり、候補化合物に対して本方法から得られた結果を、興味の対象の特性に対するコントロール値と比較することができる、もし本発明方法より得られる値が実質的に同じ、すなわち、 $\pm 40\%$ 、 $\pm 20\%$ 、 $\pm 10\%$ あるいは $\pm 5\%$ などの特定の範囲内にあるならば、候補化合物は、興味の対象の特性について許容しうる値を有する。もし候補化合物が興味の対象の特性について許容しうる値を有するならば、候補化合物は、潜在的に市場性のある治療薬として存続可能である可能性がより高い。本発明方法から得られた結果とコントロール値との上記の比較を、1種以上の興味のある特性について行うことができる。1種以上の興味のある特性についての許容しうる値は、候補化合物がさらなるインビトロの研究、動物でのインビボの研究、または、ヒトにおける臨床試験などのさらなる試験を行うのに適していることを示す。このように、特定の実施態様には、候補化合物が許容しうる値を持つかどうかを決定することが含まれ、もしそうである場合、1つ以上のさらなる試験、たとえば、インビトロ研究、動物におけるインビボ研究、またはヒトにおける臨床試験を行うことが含まれる。

【0107】

反対に、もし本発明方法から得られた結果がコントロール値と実質的に同等でない場合、その候補化合物は興味のある特性について許容しうる値を持たない。もし候補化合物が

興味のある特性について許容しうる値を持たない場合、候補化合物は、潜在的に市場性のある治療薬として存続可能である可能性が少ない。興味の対象である1つ以上の特性について許容できない値は、候補化合物がそれ以上の試験を行うのに適していないかもしれないことを示す。その場合その化合物をさらに試験しないという決定がなされる。

【0108】

キットおよびシステム

上記に要約した様に、本発明はまた、本発明方法の実施において用いるためのキットおよびシステムを提供する。該キットおよびシステムには、液状もしくは固体状の当該コロイド、または上記に既述したようなその構成要素が少なくとも含まれている。該キットおよびシステムはまた、本発明方法における使用が見出される多くの任意の構成要素を含んでもよい。興味のある任意の構成要素としては、緩衝液などが含まれる。

【0109】

キットの特定の実施態様において、キットは、本発明方法を実施するための説明書または説明書と同様のものを得るための手段（たとえば、説明書を提供するウェブページに使用者を誘導するウェブサイトURLなど）をさらに含み、ここで、これらの説明書は、基板に印刷されてもよく、該基板は、1つ以上の添付文書、包装、試薬容器などであってもよい。本発明のキットにおいて、1つ以上の構成要素は、便利であるか、または望ましいように、同じか、または異なる容器中に存在する。

【0110】

本発明はまた、本発明方法、特にハイスループットの実施態様の実施において使用を見出されるハイスループット（HT）デバイスを提供する。ハイスループットデバイスは、どのような便利な構造であってもよく、一般に、アッセイを行うことができる2つ以上の複数の液体格納容器要素、試薬投与要素および信号検出要素を含む。米国特許第6127133号（これは、参照することにより本発明に援用される）にさらに記載されるように、たとえば、本発明のハイスループットデバイスは、複数の液体含有ウェル（たとえば、96、384、1536個など）を有するプレートまたは基板、たとえば候補薬物などの試薬をウェルに添加するためのコンピューターに応答する試薬添加装置、ウェルに入っているサンプルおよびコロイドの、たとえば光学的特性などの少なくとも1つの特性を測定するための測定装置、およびウェルの1つを最初に試薬添加構成要素、次いで測定装置に合わせるためのコンピューターに応答する移動装置を含むことができる。米国特許第6468736号および第5989835号に記載のデバイスも興味の対象である（これらは、参照することにより本発明に援用される）。上記のとおり、本発明のハイスループットデバイスは、ナノ微粒子コロイドを含んでいる少なくとも1つの液体含有要素を包含する。

【図面の簡単な説明】

【0111】

【図1】テオフィリンとBSA-金コロイド複合体の結合等温線を示す。

【図2】ピリルビンとBSA-金コロイド複合体の結合等温線を示す。

【図3】リン酸緩衝ポリ（アニリン）の滴定曲線を示す。

【図4】hSA-ジゴキシンの会合動態および解離動態を示す。

【図5】アスコルビン酸標準曲線を示す。

【図6】パラセタモール、アセチルサリチル酸、エリスロマイシン、テオフィリン、クロルフェニラミンおよびサリチル酸塩のデータより得られた見かけの分布容積とインビボ薬物動態から得られた分布容積との間の回帰関数および相関関数を示す。

【図7】ジゴキシンのHSA-金コロイド複合体の結合等温線を示す。

【図8】チオペンタールとHSA-金コロイド複合体の結合等温線を示す。

【図9】6種類の既知薬物：フロセミド、インドメタシン、イブプロフェン、オキサシリン、イミプラミン、ナプロキセンにおけるHSA-金コロイド複合体分析再現性を示す。

【図10】HSA-金コロイド複合体分析より観測される見かけの親和性と文献より得られる見かけの親和性データ（実験に基づくか、または血清タンパク結合（%）から計算される）との間の相関関係を示す。破線は同一性を表す。

【図 1 1】ベラパミルおよびエリスロマイシンとヒトオロソムコイド ($\alpha 1$ -酸性糖タンパク質) 金コロイド複合体の結合等温線を示す。

【図 1 2】ヒトオロソムコイド ($\alpha 1$ -酸性糖タンパク質) 金コロイド複合体分析再現性およびアミトリプチリン、クロルフェニラミン、クロルプロマジン、デシプラミン、ジフェニルヒドラミンHCl、エリスロマイシン、ハロペリドール、インドメタシン、イミプラミン、フェニルブタゾン、ピンドロール、プラゾシン、プレドニゾロン、プロプラノロール、キニジン、ツボクラリン、バルプロ酸塩、ベラパミルおよびワルファリンから観測される見かけの親和性の相関関係を示す。

【図 1 3】既知薬物のLSPR信号とCaco-2透過速度定数 (文献値) の相関関係を示す。

【図 1 4】既知薬物のLSPR信号と腸管内の吸収率 (%) の相関関係を示す。

【図 1 5】既知化合物との反応後のPANI-COOHの450nmにおける信号とそれらの各還元電位 (文献値) との相関関係を示す。

【図 1 6】金コロイドによるキニジンの滴定曲線を示す。

【図 1 7】金コロイドによる pK_a 値の測定値および予測値の間の相関関係 ($n = 7$; $r^2 = 0.89$) を示す。

【発明を実施するための形態】

【0112】

下記の実施例は、説明のために提供されるものであり、制限をするためのものではない。

【実施例 1】

【0113】

1 リットルの三角フラスコ内で、テトラクロロ金酸 (III) (Acros社、22362-0010) 200 mgを蒸留水 500 mlに溶解させることによって、平均直径約 40 ナノメートルの金ナノ微粒子の溶液を調製した。磁気攪拌子を加え、容器を磁気攪拌器の上に置いた。溶液を沸騰するまで加熱し、激しく攪拌した。沸騰したとき、クエン酸ナトリウム 1 % 溶液 30 ml (無水クエン酸 1 %、Sigma C-0759を中和することによって調製) を容器の中にすばやく投入した。溶液が順次黒色から、その後深い赤色に変わり、ナノ微粒子の形成が示されるまで、沸騰および攪拌を継続した。次いで、溶液を室温まで冷却した。溶液は、524 nmにおける吸収帯、光学密度 (1 cm) 4によって特徴付けられた。

次いで、金コロイド溶液 10 ml分を、磁石攪拌子とともにビーカーに注ぎ入れ、磁気攪拌下、10 mM水酸化ナトリウムを用いてpH6.5まで徐々に中和した。ウシ血清アルブミン水溶液 (脱脂BSA、Equitech Inc.、750mg/ml、2ml) を磁気攪拌下ですばやく加えた。混合物を室温にて10分間放置して反応させ、次いで、228 mgの四ホウ酸ナトリウム十水和物 (Fluka 72000) を加えて緩衝した。pHを 9 ± 0.1 に調整し、溶液を褐色のガラス瓶に貯蔵し、アルブミン受容体を表面に提示しているコロイド溶液として使用した。BSAは、薬剤研究にてヒト血清アルブミンに代用されることが多いが、両方のタンパク質の薬剤に対する挙動が非常に似ているためである。

【0114】

デオフィリン (Fluka 88308) とビリルビン (Aldrich R750972) の溶液 (100 mM) が、ジメチルスルホキシド (DMSO、Fluka 41640) 中で調製した。次いで、これらの溶液をホウ酸緩衝液中 (50 mM、硫酸マグネシウム 1000 mMを含む) で100倍に希釈して、1 %DMSOを含む1 mM緩衝溶液を作成した。次いで、これらの溶液を同じ1 %DMSOを含むホウ酸緩衝液で連続的に希釈して、低濃度のリガンドサンプルを作成した。

次いで、これらのリガンド溶液 (30 μ l) ならびにブランク溶液 (リガンドなしで1 %DMSOを含む緩衝液) 96 ウェルプレートに2回ピペティングした。次いで、ホウ酸緩衝液 (120 μ lの50 mM溶液、pH 9、硫酸マグネシウム 10 mMと40 g/lのポリエチレングリコール 6,000 - Fluka 81260を含む) を、50 μ lのBSA-金コロイド複合体とともに加えた。プレートの内容物を十分に混合し、室温にて4時間インキュベートした。次いで、525 nmにおける個々のウェルの光学密度をスペクトロマックスプラスプレートリーダー (Molecular Devices) で読み取った。ブランク溶液の光学密度を各結果から減じた。それぞれの光

学密度をリガンド濃度に対してプロットして、それぞれ図 1 (テオフィリン) および図 2 (ビリルビン) に示す結合等温線を作成した。各図において、光学密度信号は、2 回の平均 $\pm$ s.d. として示される。図 2 は、2 つの別の実験の結果をさらに示す。

【0115】

図 1 に示された結合等価線は、BSA に対するテオフィリンの親和性が、 $5.1 \cdot 10^4$ リットル / モルで、 $r^2 = 0.82$ であるという評価を可能にする。同様に、BSA に対するビリルビンの親和性が、 $1.2 \cdot 10^8$ リットル / モルで、 $r^2 = 0.73$ であるという評価を可能にする。これらの 2 つのリガンド例は、アルブミンに対する結合親和性が、区別的であるという理由から選択された。ビリルビンは、アルブミンの最も良く研究されているリガンドであり、 $9.5 \cdot 10^7$ リットル / モルの平均親和性で結合すると評価されている (Peeters, T.Jr. (1996) All about Albumin. Academic Press, San Diego, 432pp p.97)。それに対して、テオフィリンは、アルブミンに対して、もっと低い親和性で結合し、前者に関しては、血清アルブミンの 100% が結合するのに対して、後者はわずか $56 \pm 4\%$ が血漿中の同タンパクと結合する (Goodman and Gillman (1996) The Pharmacological Basis of Therapeutics, 9th ed. (Hardman, J.G. et al. eds). McGraw-Hill, New York)。本発明技法によって得られたテオフィリンの親和性から、血漿に結合した割合 (0.558、これは上記によって得られた実験結果の平均 0.56 に非常に近いものとなっている) を演繹することが可能であり、したがって、公開されている方程式 (Lombardo, F., Shalaeva, M.Y. et al. (2000) Elog Poct: A tool for lipophilicity determination in drug discovery. J. Med. Chem. 43, 2922-2928) を用いることによってその分布容積を演繹することが可能である。このようなデータをそのような方程式に導入する事により、ヒトにおけるテオフィリンの分布容積 0.551 リットル / Kg が得られ、これは、(Goodman and Gillman, 1996, 上記) の実験によって観察された 0.50 ± 0.16 リットル / Kg の範囲内に入るものである。薬剤の分布溶積は、特定の用量についての薬物動態の曲線下面積 (AUC) を計算することを可能にする重要なパラメーターである。

【実施例 2】

【0116】

コロイド状ポリアニリンを以下のとおり得た：10g のポリ (ビニルアルコール) の最大限を 200mL の沸騰水に溶解した。次いで、熱い溶液を濾過し、室温に冷却した。次いで、12N の HCl 16.8 ml を添加することによって溶液を酸性化した。この溶液の一部 (100 ml) を磁気攪拌子とともにきれいなビーカーに移し、4 にて磁気攪拌機上に置いた。溶液を攪拌し、0.25 ml のアニリン (Aldrich 24,861-4) を注入した。注入後、直ちに、5 ml の水に新たに溶解したペルオキシ二硫酸アンモウム (Aldrich 24,861-4) 658 mg を加えた。溶液を 4 にて攪拌した。次いで、セファクリル S-1000 カラムにて Tween20 0.5% を含む 0.1 モルのリン酸塩緩衝剤 (pH 8) で溶離するクロマトグラフィーによってコロイドを精製した。

【0117】

次いで、HCl または NaOH のいずれかにて緩衝液を滴定し、滴定中に記録された各 pH 値にてスペクトルを測定した (Ultrospec 2000、Pharmacia)。この pH 範囲におけるエメラルジン塩基の累進的形成に対応するピーク (800 nm) における吸光度から、リン酸塩アニオンの pKa を同定することが可能である (理論値：7.21；曲線からの計算値：6.80)。この実験を図 3 に示す。

【0118】

したがって、この実施例によって明らかにされるように、該アッセイシステムを用いて、薬物動態 (吸収および膜透過) において顕著な効果を有するので重要なパラメーターである、候補薬物などの分子の pKa を測定することができる。

【実施例 3】

【0119】

上記実施例 1 と同様にして、金コロイド溶液を調製した。次いで、金コロイド処理を pH 5.5 にて行う以外は前記と同様にして、ヒト血清アルブミン (HSA、Sigma A-1653) でコロ

イドをコーティングした。次いで、前述のとおり、試薬を50mMのホウ酸塩で緩衝し、150mMの塩化ナトリウム、Tween 20 (0.2%) および魚ゼラチン (0.1%) をそれぞれさらなる安定化のために加えた。

【0120】

ジゴキシシン (Fluka 37100) をメタノール (100 mg/リットル、128 μ M) に溶解し、PBSでさらに希釈して、それぞれ256、128、64、25.8および12.8 nMのジゴキシシンを含むサンプル溶液を作成した。これらのサンプル (30 μ l) を促進緩衝液 (120 μ l; 250 mMの塩化マグネシウム、70g/lのポリ (エチレングリコール) 6000、15g/lのポリ (エチレングリコール) 35,000およびTriton X-100 10ml/lを含む、200 mMのTris-HCl、pH 8) と混合した。混合および反応は、37 °Cに恒温化した臨床化学分析装置 (Cobas Mira Plus、ABX Diagnostics、Montpellier、France) において、ディスプレイキュベット中で行った。サンプルと緩衝液を混合した後ただちに、金-HSA複合体 (50 μ l) を反応混合物に加えた。会合動態を600 nmにて追跡し、反応混合物に2、3分後に500倍過剰のジゴキシシン (20 μ l) を注入し、自動機器にて同じ波長で解離をさらに追跡した。結果を図4に示す。矢印は、リガンド過剰添加の時間を示す。会合曲線と解離曲線の両方について計算された線形回帰から、0.86~0.99の間の相関係数が提供される。

【0121】

会合動態および解離動態の分析から、 $1.6 \pm 2.5 \cdot 10^5$ リットル/モル (5つのアッセイの平均 $\pm$ s.d.) という薬物-HSA相互作用についての平均親和性を計算することができる。透析によって決定されたヒト血清アルブミンに対するジゴキシシンの見かけの親和性は $1.85 \cdot 10^5$ リットル/モルである (Westphal, U. (1986) Steroid-Protein Interactions II. Springer-Verlag, Berlin, 603pp)。

【実施例4】

【0122】

公開された米国特許出願番号20070172834および国際公開公報W02006047371 (Englebienne and Van Hoonacker, 2006) (これらは、参照することにより本発明に援用される) における広範な記載にしたがって、金ナノ微粒子とポリ (o-アントラニル酸) からなる複合コロイドを調製した。

【0123】

50mMの酢酸ナトリウムを加えて複合体溶液をpH5にて緩衝した。次いで、複合体溶液 (0.5 ml) を3%酢酸中で作成され、濃度が増加するアスコルビン酸を含む等体積の水溶液と室温にて10分間反応させた。同体積のコロイドと3%酢酸水溶液を混合することによってブランクを調製した。インキュベーション後、ブランクに対するアスコルビン酸サンプルについての600nmにおける光学密度の変化を記録し、アスコルビン酸濃度に対してプロットして、標準曲線を作成した。結果を図5に示す。アスコルビン酸は強力な還元剤であり、酸化-還元に対するコロイドの感受性が非常に強いために、強力な酸化剤を用いると、類似するが反対の曲線を作成することができる。したがって、特定の薬物候補を特定のpHおよび濃度においてコロイドと反応させ、図5に例示するように、既知の酸化剤または還元剤の光反応性とその光反応性を比較することによって、その酸化還元電位を迅速に評価することができる。一例として、水溶性ビタミンE誘導体であるTrolox (登録商標) (6-ヒドロキシ-2,5,7,8-テトラメチルクロマン-2-カルボン酸) は、同じ条件下で試験する場合、アスコルビン酸と類似する酸化還元電位を提示し、公開されているデータと一致する。

【0124】

さらに、参照することにより本発明に援用される国際特許公開公報W003027656に記載されるように、NCE、薬物候補またはリード化合物の酸化還元電位は、その分子をさらに開発するかどうかを決定する重要なパラメーターである。実際、還元剤薬物は、有利な治療効果を発揮する可能性があるが、酸化剤は、有毒である可能性がある (Shargel, L. and Yu, A.B.C. (1999) Applied Biopharmaceutics and Pharmacokinetics, 4th Ed. McGraw-Hill, New York, 768pp)。薬物の酸化還元電位はさらに、薬物の代謝の性質および速度も管理するものであり、今後、薬物の薬物動態プロファイルを調節することになる。

【実施例 5】

【0125】

実施例 1 に記載の手順と同様にして、一連の既知薬物のウシ血清アルブミンに対する親和性を評価した。これらの薬物は、該タンパク質に対して弱い結合剤であるか（パラセタモールおよびアセチルサリチル酸）、中程度の結合剤であるか（エリスロマイシン、テオフィリン、クロルフェニラミン）、または強い結合剤であるか（サリチル酸塩）のいずれかである。次いで、各結合ペアについて計算された親和性定数の対数を、公開されたデータから得られるインビボでの血漿タンパク質への結合パーセントに対してグラフにプロットした（Goodman and Gillman, 1996, 上記）。非線形最小二乗回帰により、インビトロで得られたアルブミンに対する親和性から特定のサンプルのインビボでの血漿タンパク質結合データを演繹することを可能にするために十分な重要性をもつ相関係数二乗値（ $r^2 = 0.95$ ）が提供された。血漿タンパク質 - 結合薬物の割合はさらに、薬物の薬物動態を特徴付けるための必須のパラメーターである分布容積を計算することを可能にする。図 6 は、本実施例の 6 種の薬物についてのデータから得られた見かけの分布容積（縦座標）と、インビボ薬物動態から得られた見かけの分布容積（横座標, Goodman and Gillman, 1996, supra）との間の回帰および相関関数を示す。

【実施例 6】

【0126】

ヒト血清アルブミン（HSA, Sigma A-1653）をその表面に提示しているナノ微粒子を含む金コロイドを実施例 3 の記載と同様にして調製した。ジゴキシシン（Fluka 37100）をメタノール（100 mg/l、128 μ M）に溶解し、PBSでさらに希釈して、それぞれ12.8、6.4、2.5および1.25 μ Mのジゴキシシンを含むサンプル溶液を作成した。これらのサンプルとPBSブランク（100 μ l）それぞれを、ラベルを付けたディスプレイのプラスチックチューブに入れ、促進緩衝液（600 μ l；250 mM塩化マグネシウム、70g/lポリエチレングリコール6000、15g/lポリエチレングリコール35,000およびTriton X-100 10ml/lを含む200 mMトリス塩酸緩衝液、pH 8）および金-HSA複合体（200 μ l）を加えた。ボルテックス混合した後、チューブを室温にて10分間インキュベートした。インキュベートした後、540nmにおける光学密度を、ブランクをゼロとした分光光度計（Ultrospec 2000, Pharmacia）にて記録した。次いで、各サンプルの光学密度増加を、濃度に対して、プロットした。プロットを図 7 に示す。そのような 2 種の独立した実験から計算された結合等温線から、平均の見かけの親和性 $7.5 \pm 2.3 \cdot 10^5$ が得られた。透析によって測定されたヒト血清アルブミンに対するジゴキシシンの見かけの親和性は、 $1.85 \cdot 10^5$ リットル / モルである（Westphal, 1986, 上記）。

【実施例 7】

【0127】

薬物の一連の希釈液を、ヒト血清アルブミンをその表面に有する金コロイドナノ微粒子とともに室温にて3時間二重にインキュベートした。薬物とタンパク質との相互作用から得られる紫外線 - 可視信号を、加えた濃度に対してプロットし、見かけの親和定数を結合等温線から計算した。図 8 はそのような結合の等温線の一例を示す。図 9 は、6 種類の既知薬物、フロセミド、インドメタシン、イブプロフェン、オキサチリン、イミプラミンおよびナプロキセンについての分析再現性を示す。薬物は、3 つの別々のプレートに無作為に分配した。親和性データを文献からのデータと比較した。図 10 は、この技術により観察された見かけの親和性と文献からの見かけの親和性データ（実測値または血清タンパク質結合%からの計算値）との間の相関関係を示す。破線は、同一性を表す。

【実施例 8】

【0128】

薬物の一連の希釈液を、ヒトオロソムコイド（ α 1-酸性糖タンパク質）をその表面に有する金コロイドナノ微粒子とともに室温にて2時間二重にインキュベートした。薬物とタンパク質との相互作用から得られる紫外線 - 可視信号を、加えた濃度に対してプロットし、見かけの親和定数を結合等温線から計算した。図 11 は、ベラパミルおよびエリスロマ

イシンについてのそのような結合の等温線の例を示す。図 1 2 は、分析再現性および 1 9 種の既知薬物について観測された見かけの親和性と文献から得られた見かけの親和性との相関関係を示す。1 9 種の既知薬物は、アミトリプチリン、クロルフェニラミン、クロルプロマジン、デシプラミン、ジフェニルヒドラミン塩酸塩、エリスロマイシン、ハロペリドール、インドメタシン、イミプラミン、フェニルブタゾン、ピンドロール、プラゾシン、プレドニゾロン、プロプラノロール、キニジン、ツボクラリン、バルプロ酸塩、ペラパミルおよびワルファリンであった。

【実施例 9】

【0 1 2 9】

実施例 1 と同様にして、40 nm の金コロイドナノ微粒子の溶液を調製した。次いで、そのようにして得られたコロイドナノ微粒子 (pH 4.76) を 11-メルカプトウンデカン酸 (95 %、Aldrich 450561) で以下のとおりコーティングした：100 ml の金コロイド溶液を、1:10 の Tween 20 (Aldrich 274238) 水溶液 0.4 ml と混合し、磁気攪拌下、室温で 20 分間インキュベートした。11-メルカプトウンデカン酸の溶液 1 mg/ml をメタノール中で調製した。200 μ l (0.2 ml ; 200 μ g) のこの溶液を 9.8 ml のエタノールで希釈し、磁気攪拌下でコロイドと混合した。次いで、混合物を室温にて 2.5 時間インキュベートした。この手順により、該メルカプトウンデカン酸のチオールによってナノ微粒子に結合し、カルボキシル基によって外側において終わることによって、生理的二重層膜を模擬する、親水性アルカン鎖からなる膜をもつ完全に安定化されたナノ微粒子が提供された。溶液の最終的 pH (5.09) は、ヒト十二指腸における pH に近似した。次いで、このナノ微粒子溶液を水で 1:4 に希釈し、Tecan Freedom EVO ピペッターを用いて 0.198 ml をポリスチレン 96 ウェルプレートにピペティングした。次いで、同じ自動装置を用いて、2 μ l の既知薬物の DMSO 溶液 (10 mM) を三重に分配した。DMSO を含むブランクウェルも調製した。溶液を混合し、室温にて 1 時間インキュベートした。530 nm における LSPR (局在表面プラズモン共鳴) シフトによって、薬物と膜の相互作用を記録した。データを平均し、DMSO のみによるブランク OD を減じた。Caco-2 細胞層薬物の見かけの透過率の対数 (log) との相関関係を見出した ($n = 44$; $r = 0.58$; $p < 0.005$)。図 1 3 は、既知薬物について得られた、LSPR 信号と Caco-2 透過率定数 (文献データ) との間の相関関係を示す。インビボでヒトに吸収された薬物のパーセント割合と、人工膜に囲まれた金ナノ微粒子との薬物相互作用の程度に対応する LSPR 信号との間で相関関係 ($n = 57$; $r = 0.78$) が、観測された。図 1 4 は、既知薬物について得られた、LSPR 信号と腸管で吸収されるとパーセント割合との間の相関関係を示す。

【実施例 10】

【0 1 3 0】

既知薬物の酸化還元電位を評価した。既知薬物を特定の最終濃度 (100 μ M) で、導電性ポリマー (ポリアニリン-2-カルボン酸 ; PANI-COOH) の緩衝液に pH 4 にて導入した。溶液を混合し、室温にて 10 分間インキュベートした。450nm にて光学密度を測定した。薬物およびフタレート緩衝液を含むブランクサンプルを調製し、インキュベートし、同じ方法で測定した。ブランク溶液の 450nm における光学密度を、導電性ポリマー反応混合物の 450 nm における光学密度から減じた。図 1 5 は、既知薬物との反応後の PANI-COOH の 450nm 信号と、それぞれの酸化還元電位 (文献データ) との間の相関関係を示す。450nm 信号と既知分子の還元電位との間に線形の相関関係が見られる (図 1 5) ことから、NCE の還元電位の推測が可能である。

【0 1 3 1】

60 種の既知薬物のライブラリーのスクリーニングから、プロモクリプチンが、比較的強力な酸化剤 ($E = -364$ mV) であり、プラゾシンとクロルプロパミドが比較的強力な還元剤 ($E = 747$ および 848 mV) であることを明らかにできたが、このことは、文献データ (Wardman, 1989 : Reduction potentials of one-electron couples involving free radicals in aqueous solution. J. Phys. Chem. Ref. Data 18, 1637-1755) と一致する。還元剤薬物は、有利な治療効果を発揮する可能性があるが、酸化剤は、有毒である可能性がある

。薬物の酸化還元電位はさらに、薬物の代謝の性質および速度も管理するものであり、今後、薬物の薬物動態プロファイルを調節することになる (Shargel and Yu, 1999, 前出)。

【実施例 11】

【0132】

実施例 1 と同様にして、金ナノ微粒子の溶液を調製した。pH2-12の一連の50 mM緩衝液を調製し (リン酸塩 [pH2、3、6、7、8]、酢酸塩 [pH4および5] およびホウ酸塩 [pH9、10、11、12])、金コロイド溶液でさらに5倍に希釈した。次いで、10 mMの緩衝コロイドの最終pHを記録した。次いで、薬物溶液 (100 mMのDMSO溶液、10 μ l) を1 mlの緩衝コロイドにピペッティングし、混合物をボルテックス混合した。30分間インキュベートした後、溶液を96ウェルのポリスチレンプレートにピペッティングし、620 nmおよび525 nmでの光学密度を記録した。620 nm光学密度 / 525 nm光学密度の比率を計算した。この比率は、コロイドの凝集に関係する (すなわち、比率が高いと凝集性が大きい)。典型的には、分子のイオン化が、コロイドの凝集を促進しうる電荷を作り出す。したがって、広範なpHにわたって緩衝金コロイドで分子を滴定することが、pHの関数として凝集コロイドから非凝集コロイドへと引かれたS字形曲線の補間された中点からイオン化定数を決定することを可能にする。このような滴定曲線の例 (キニジン) を図 16 に示す。以下の表 1 は、本発明方法で得られたpKaの結果と文献からの基準値を比較するものである。図 17 は、金コロイドにより測定されたpKaとと予測されるpKaの間の相関関係 ($n = 7$; $r^2 = 0.89$) を示す。

【0133】

表 1

1 mMの薬物の金コロイドpH滴定によって得られたpKa値と、Williams, D. A. and Lemke, T. L. (2002)の、いくつかの薬物ならびに種々の有機酸および塩基についてのpKa値からの参照データとの比較: Foye's Principles of Medicinal Chemistry, 5th Edition, Lippincott, Williams and Wilkins, Philadelphia, PA, pp.1070-1079。

薬物	pKa 観測値	pKa 参照値
アスピリン	3.3	3.5
ダブソン	3.9	2.4
ドキシサイクリン	4.3(1) 8.7(2)	3.4(1) 9.3(2)
エリスロマイシン	6.9	8.8
インドメタシン	5.1	4.5
ナフシリン	3.0	2.7
パラセタモール	9.5	9.4
キニジン	7.4	8.5

【0134】

これらのデータから明らかなように、本実施例に記載の方法により、さまざまなpHにおいて薬物のpKaを測定することが可能になる。参照値との差異は、本発明技術におけるDMSOの存在によるものである (Bordwell, F.G. (1988), Equilibrium acidities in dimethyl sulfoxide solution. Acc. Chem. Res. 21, 156-463)。

【0135】

上記の議論と結果から、本発明が、薬物発見プロセスの早期において、NCE、薬物候補およびリード化合物のPK / ADME-Tox特性を迅速ハイスループット測定するためのさまざまな種々の適用における使用を見出す重要な新型のアッセイを提供することが明らかである。たとえば、コロイド状導電性ポリマー、コロイド金属およびその複合体は、均一な “ミックス・アンド・リード” アッセイに適用することができるので、薬物発見および開発の

適用における本発明コロイドの使用は、遊離部分からの結合部分の物理的分離を必要とする現在使用中の放射性技術、クロマトグラフ技術および質量分析技術を超える利点を提供する。該アッセイは、さまざまな器具で行うことができ、当業者には光子検出システムを用いることができることが明らかである。本発明の分析システムは、いくつかの代表的な適用を挙げると、血漿タンパク質への結合、膜相互作用、代謝酵素へ向かう活性、疎水性、電荷相互作用、酸化還元電位などのNCE、薬物候補およびリード化合物のインビトロPK / ADME-Toxスクリーニングの多くの態様において使用が見出される。このように、本発明は、当業界における重大な貢献を表す。

【 0 1 3 6 】

前述した本発明は、理解を明確にするための説明および例示によって詳細に記載されているが、請求の範囲またはその精神から逸脱することなく、特定の変更および修飾をなすことができる。当業者には、本発明の教示を踏まえて容易に明らかである。

【 0 1 3 7 】

したがって、これまでに述べたことは、本発明の原則を説明するにすぎない。当然のことながら、当業者であれば、本明細書に明確に記載または示されていないが、本発明の原則を具体化し、本発明の精神および請求の範囲に含まれるさまざまなアレンジメントを考案しうるであろう。さらに、本明細書に列挙されるすべての例および条件言語は、本発明の原則および本発明者らが当業界の促進に貢献する概念を理解することにおいて読者を補助することを原則として意図するものであり、そのような特に引用された例および条件に限定されることはないと解釈されるべきである。さらに、本発明の原則、態様および実施態様ならびにその特定の例を本明細書に列挙するすべての陳述は、その構造的および機能的等価物を含むことを意図するものである。さらに、このような等価物として、現在既知の等価物、および将来開発される等価物、すなわち、構造にかかわらず同じ機能を実行する開発された要素のいずれもの両方が挙げられることが意図される。したがって、本発明の範囲は、本明細書に示され、記載された例示的实施態様に限定されることを意図されるものではない。むしろ、本明細書の範囲および精神は、請求の範囲によって具体化される。

【 誤 訳 訂 正 2 】

【 訂 正 対 象 書 類 名 】 特 許 請 求 の 範 囲

【 訂 正 対 象 項 目 名 】 全 文

【 訂 正 方 法 】 変 更

【 訂 正 の 内 容 】

【 特 許 請 求 の 範 囲 】

【 請 求 項 1 】

候補化合物の予測されるインビボ生物学的特性のインビトロ決定方法であって、

(a) 該候補化合物をナノ微粒子コロイドと接触させ；

(b) 該候補化合物が接触したナノ微粒子のコロイドの光学特性を検出し；そして

(c) 検出された光学特性から、該候補化合物の予測されるインビボ生物学的特性を決定すること；

を含む方法。

【 請 求 項 2 】

生物学的特性が、ADME - TOX特性である請求項 1 に記載の方法。

【 請 求 項 3 】

ADME - TOX特性が、吸収である請求項 2 に記載の方法。

【 請 求 項 4 】

ADME - TOX特性が、分布である請求項 2 に記載の方法。

【 請 求 項 5 】

ADME - TOX特性が、代謝である請求項 2 に記載の方法。

【 請 求 項 6 】

ADME - TOX特性が、排泄である請求項 2 に記載の方法。

【請求項 7】

ADME - TOX特性が、毒性である請求項 2 に記載の方法。

【請求項 8】

生物学的特性が、酸化還元電位である請求項 1 に記載の方法。

【請求項 9】

ナノ微粒子コロイドが、導電性ポリマーコロイドを含む請求項 1 に記載の方法。

【請求項 10】

ナノ微粒子コロイドが、貴金属コロイドを含む請求項 1 に記載の方法。

【請求項 11】

ナノ微粒子コロイドが、金属 / 導電性ポリマー複合体コロイドを含む請求項 1 に記載の方法。

【請求項 12】

ナノ微粒子コロイドが、候補化合物と相互作用する作用剤をさらに含む請求項 1 に記載の方法。

【請求項 13】

作用剤が、候補化合物に特異的に結合する請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】

作用剤が、ペプチドまたはタンパク質である請求項 12 に記載の方法。

【請求項 15】

作用剤が、酵素である請求項 12 に記載の方法。

【請求項 16】

作用剤が、受容体である請求項 12 に記載の方法。

【請求項 17】

作用剤が、膜である請求項 12 に記載の方法。

【請求項 18】

作用剤が、候補化合物に共有的に結合する請求項 12 に記載の方法。

【請求項 19】

ナノ微粒子コロイドが、界面活性剤を含む請求項 1 に記載の方法。

【請求項 20】

光学的特性が、吸光度である請求項 1 に記載の方法。

【請求項 21】

方法が、検出された光学的特性をコントロールと比較することをさらに含む請求項 1 に記載の方法。

【請求項 22】

ナノ微粒子コロイドが、候補化合物に特異的に結合する作用剤を含む請求項 1 に記載の方法であって、

(i) 作用剤への候補化合物の結合についての結合等温線を作成し；そして

(ii) 結合等温線から、作用剤に対する候補化合物の結合親和性を評価すること；

をさらに含む方法。

【請求項 23】

方法が、候補化合物のpKaを決定することをさらに含む請求項 1 に記載の方法。

【請求項 24】

ナノ微粒子コロイドが、候補化合物に特異的に結合する作用剤を含む請求項 1 に記載の方法であって、

(i) ナノ微粒子コロイドを第 1 濃度の候補化合物と接触させて、会合動態を決定し；そして

(ii) ナノ微粒子コロイドを第 2 の濃度の候補化合物と接触させて、解離動態を決定すること；

を含む方法。

【請求項 25】

方法が、複数の異なる濃度およびpH値にて、候補化合物をナノ微粒子コロイドと接触させて、候補化合物についての酸化還元電位を得ることを含む請求項 1 に記載の方法。

【請求項 26】

方法が、少なくとも 1 つのさらなる候補化合物についての予測される生物学的特性を決定することをさらに含む請求項 1 に記載の方法。

【請求項 27】

方法が、実質的に同時に、少なくとも 10 種の異なる候補化合物についての予測される生物学的特性を決定することを含む請求項 26 に記載の方法。

【請求項 28】

方法が、ハイスループットスクリーニングデバイスにて行われる請求項 27 に記載の方法。

【請求項 29】

ナノ微粒子コロイドが、固体基板と会合する請求項 1 に記載の方法。

【請求項 30】

ナノ微粒子コロイドが、固体担体と会合しない請求項 1 に記載の方法。

【請求項 31】

ナノ微粒子コロイドを含む容器；

容器に連結した光学検出器；および

光学検出器によって容器から得られる光信号から、候補化合物の予測される生物学的特性を決定するように設定されているプロセッサ；
を含むデバイス。

【請求項 32】

デバイスが、それぞれナノ微粒子コロイドを含む少なくとも 10 個の異なる容器を含む請求項 31 に記載のデバイス。

【請求項 33】

デバイスが、ハイスループットスクリーニングデバイスである請求項 32 に記載のデバイス。

【請求項 34】

ナノ微粒子コロイド；および

請求項 1 に記載の方法においてコロイドを使用するための説明書；
を含む、候補化合物の予測される生物学的特性を決定するためのキット。

【誤訳訂正 3】

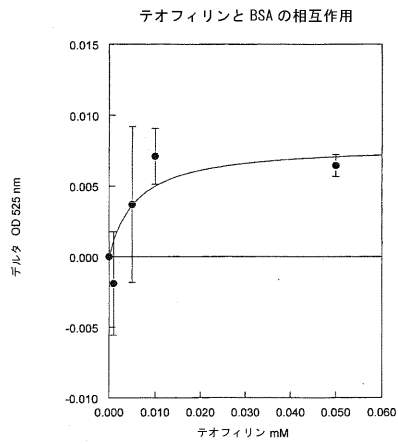
【訂正対象書類名】図面

【訂正対象項目名】全図

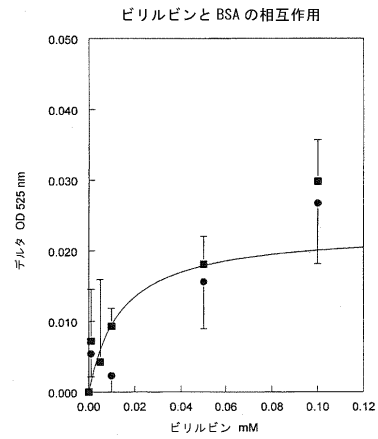
【訂正方法】変更

【訂正の内容】

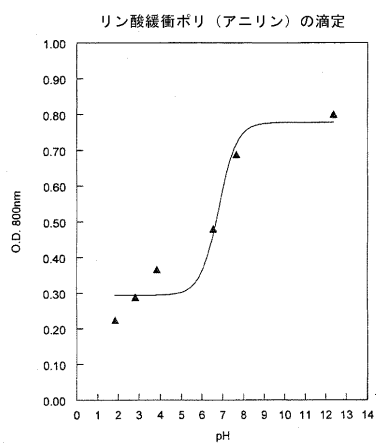
【図 1】



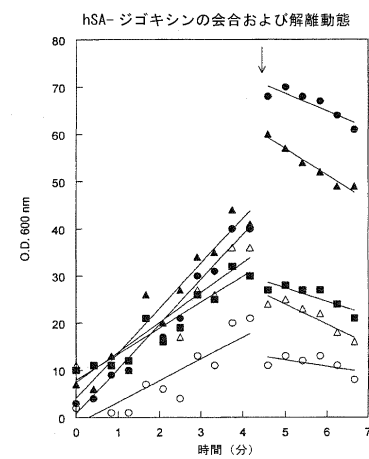
【図 2】



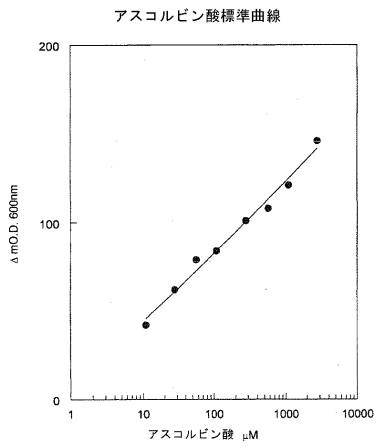
【図 3】



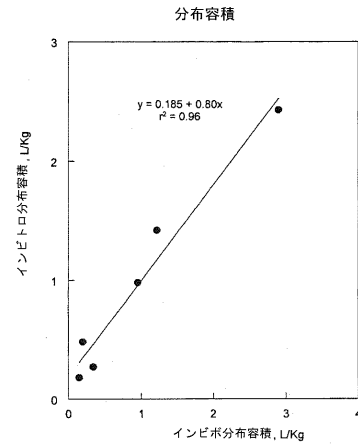
【図 4】



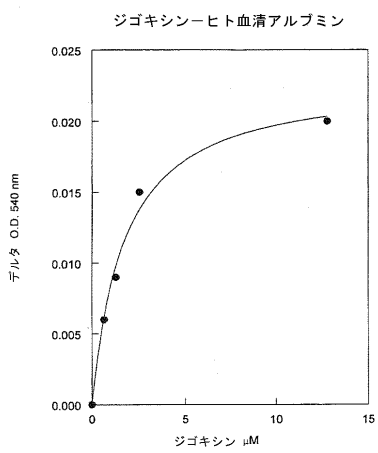
【図 5】



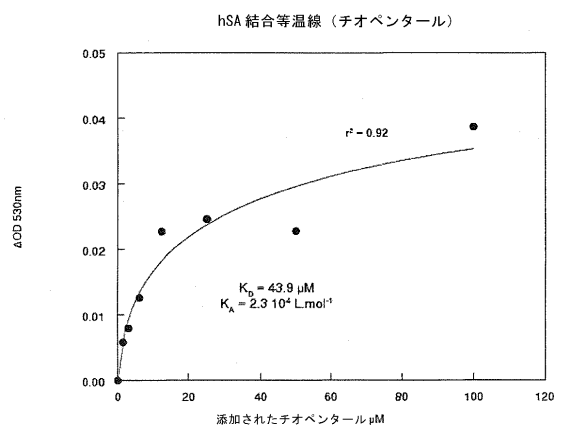
【図 6】



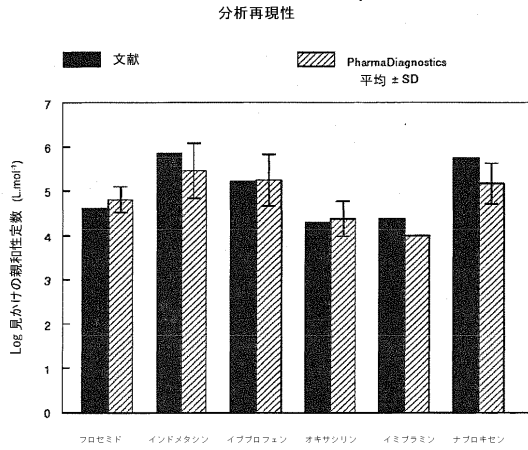
【図 7】



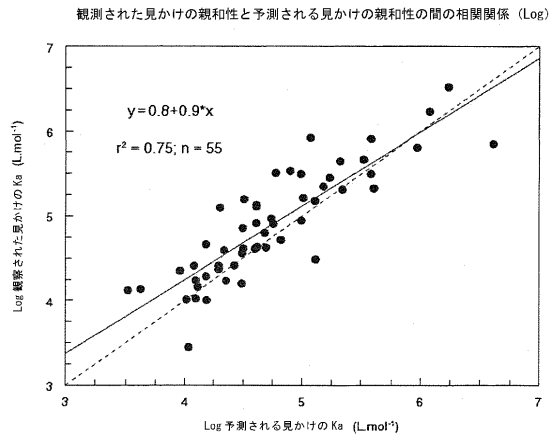
【図 8】



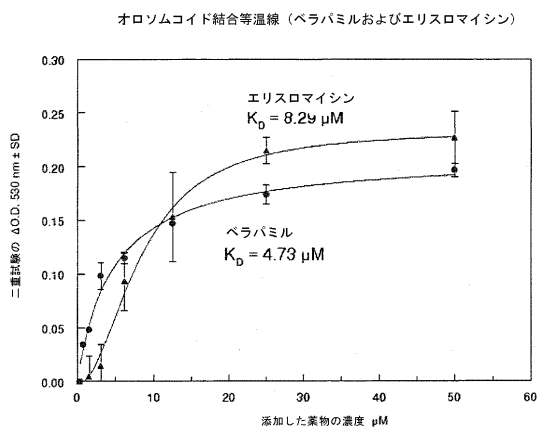
【図 9】



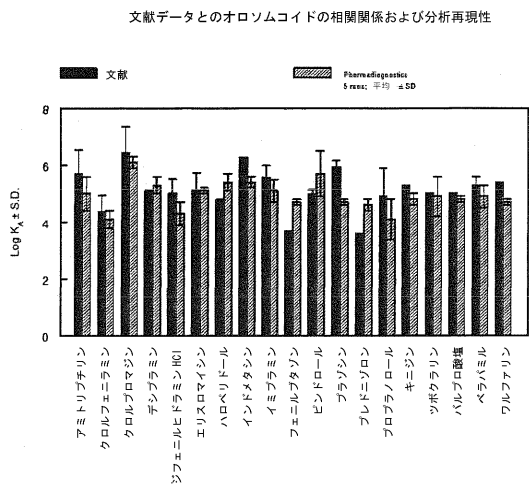
【図 10】



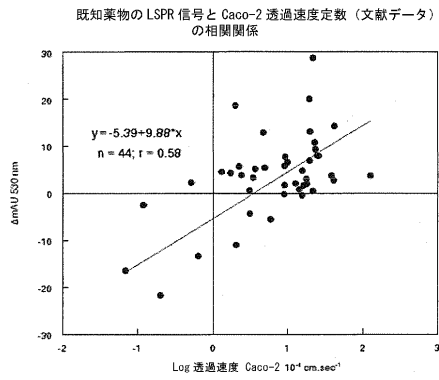
【図 11】



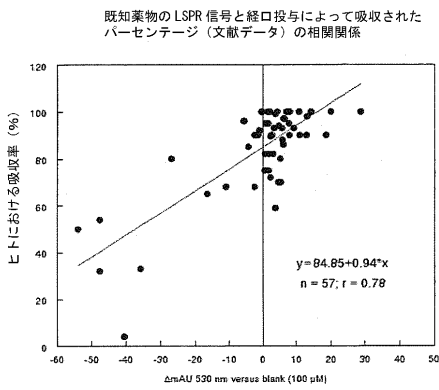
【図 12】



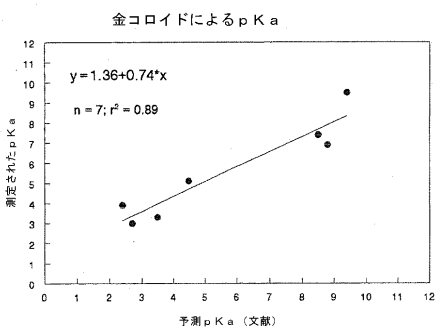
【図 13】



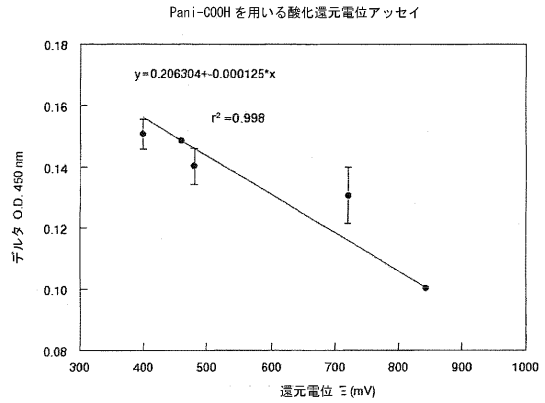
【図 14】



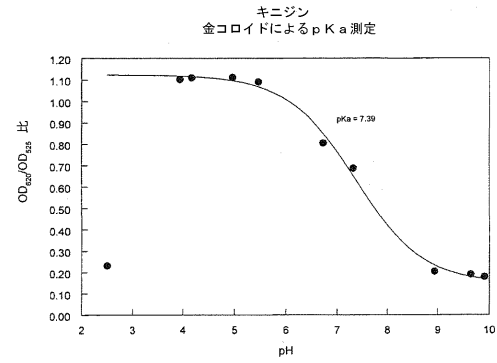
【図 17】



【図 15】



【図 16】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/IB2008/003187

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. G01N33/543

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	ENGLEBIENNE, P. ET AL: "High-throughput screening using the surface plasmon resonance effect of colloidal gold nanoparticles" THE ANALYST, vol. 126, 2001, pages 1645-1651, XP002520452 the whole document ----- -/--	1-34

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

E earlier document but published on or after the international filing date

L document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

& document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

21 March 2009

Date of mailing of the international search report

02/04/2009

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2

NL - 2280 HV Rijswijk

Tel. (+31-70) 340-2040,

Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Moreno de Vega, C

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/IB2008/003187

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	ENGLEBIENNE, P.: "Use of colloidal gold surface plasmon resonance peak shift to interafinity constants from the interactions between protein antigens and antibodies specific for single or multiple epitopes" THE ANALYST, vol. 123, 1998, pages 1599-1603, XP008015733 the whole document	1-34
X	ENGLEBIENNE, P. ET AL: "Advances in high-throughput screening: biomolecular interaction monitoring in real-time with colloidal metal nanoparticles" COMBINATORIAL CHEMISTRY & HIGH THROUGHPUT SCREENING, vol. 6, 2003, pages 777-787, XP009035035 the whole document	1-30
Y		1-34
Y	WO 2006/047371 A (NANOTECH LOGIC CORPORATION) 4 May 2006 (2006-05-04) claims 1-82	1-34

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/IB2008/003187

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2006047371 A	04-05-2006	AU 2005299747 A1	04-05-2006
		BR P10516227 A	26-08-2008
		CA 2583729 A1	04-05-2006
		CN 101175994 A	07-05-2008
		EP 1812603 A2	01-08-2007
		JP 2008518405 T	29-05-2008
		KR 20070085400 A	27-08-2007

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(72)発明者 パトリック・エングレビエンネ

ベルギー、ペー - 9 7 5 0 ジンゲム、ストレイプストラート 2 1 番

(72)発明者 アンネ・ファン・ホーナッケル

ベルギー、ペー - 9 7 5 0 ジンゲム、ストレイプストラート 2 1 番

(72)発明者 ロベルト・マルティネツ - ネイラ

ベルギー、ペー - 1 0 8 3 ガンショアン、アブニュ・マリー・ド・オングリ 6 2 / 3 3 番

(72)発明者 パトリシア・デ・プリル

ベルギー、ペー - 9 5 5 0 シント - リーヴェンス - エッセ、ザヴェルストラート 1 7 番

F ターム(参考) 2G045 AA40 FB03