

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4497778号
(P4497778)

(45) 発行日 平成22年7月7日(2010.7.7)

(24) 登録日 平成22年4月23日(2010.4.23)

(51) Int. Cl.	F I	
GO 1 N 35/02 (2006.01)	GO 1 N 35/02	G
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	GO 1 N 35/02	A
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	
C 1 2 M 1/34 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	
C 1 2 Q 1/37 (2006.01)	C 1 2 M 1/34	B
請求項の数 10 (全 41 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2001-530594 (P2001-530594)	(73) 特許権者	502308136
(86) (22) 出願日	平成12年10月12日 (2000.10.12)		ヴァーテックス ファーマシューティカルズ (サンディエゴ) エルエルシー
(65) 公表番号	特表2003-511702 (P2003-511702A)		アメリカ合衆国 92121 カリフォルニア州, サンディエゴ, トレイアナ ロード 11010
(43) 公表日	平成15年3月25日 (2003.3.25)	(74) 代理人	100123788
(86) 国際出願番号	PCT/US2000/028447		弁理士 宮崎 昭夫
(87) 国際公開番号	W02001/027635	(74) 代理人	100088328
(87) 国際公開日	平成13年4月19日 (2001.4.19)		弁理士 金田 暢之
審査請求日	平成19年9月28日 (2007.9.28)	(74) 代理人	100106297
(31) 優先権主張番号	09/417, 246		弁理士 伊藤 克博
(32) 優先日	平成11年10月12日 (1999.10.12)	(74) 代理人	100106138
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 石橋 政幸
(31) 優先権主張番号	09/665, 546		
(32) 優先日	平成12年9月19日 (2000.9.19)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 マルチウェルスキャナおよびその走査方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

上面及び底面を有するプラットフォーム上に配置された複数のサンプルの光学的な属性を検出する方法であって、

(a) 前記光学的な属性を検出するための検出器の上に前記プラットフォームを置くことを含み、前記検出器は前記プラットフォームに対して調整可能な垂直位置を有し、

(b) 前記プラットフォーム上の異なる位置で前記検出器とプラットフォーム要素の間の距離を測定し、

(c) 停止することなく前記検出器が少なくとも1つの前記サンプルを横切るように、前記検出器を連続的に、前記プラットフォームに対して相対的に動かすこと、および

(d) 前記連続移動の間に、前記検出器を用いて前記サンプルの前記光学的な属性を測定し、前記垂直位置を調整して、前記検出器と前記プラットフォーム要素の間の距離を実質的に一定に維持すること

を含み、

前記プラットフォーム要素は、前記上面、前記底面、及び前記プラットフォーム上に配置された前記サンプルの表面から選択される方法。

【請求項 2】

上面及び底面を有するプラットフォーム上に配置された複数のサンプルの光学的な属性を検出する方法であって、

(a) 前記光学的な属性を検出するための検出器の上に前記プラットフォームを置くこと

を含み、前記検出器が調整可能な垂直位置を有し、

(b) 前記プラットホーム上の異なる位置で前記検出器とプラットホーム要素の間の距離を測定し、および

(c) 前記検出器を用いて前記サンプルの前記光学的な属性を測定し、前記垂直位置を調整して、前記検出器と前記プラットホーム要素の間の距離を実質的に一定に維持すること

を含み、

前記プラットホーム要素は、前記上面、前記底面、及び前記プラットホーム上に配置された前記サンプルの表面から選択される方法。

【請求項 3】

前記光学的な属性を測定する段階がさらに、前記垂直位置の複数の調整を実施して、前記検出器と前記プラットホーム要素の間の距離を実質的に一定に維持することを含み、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記プラットホームがマルチウェルプレートである、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 5】

前記光学的な属性が蛍光であり、前記検出器が蛍光を測定するように適合される、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 6】

前記光学的な属性が蛍光であり、前記検出器が蛍光を測定するように適合される、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 7】

化学物質スクリーニングシステムにおいて、1つまたは複数のウェル中の化学的活性の徴候を求めて上面及び底面を有するマルチウェルプレートを走査する方法であって、

(a) 前記マルチウェルプレート上の異なった位置で、前記化学的活性の検出器とマルチウェルプレート要素の間の距離の輪郭を求め、前記検出器は前記マルチウェルプレートに対して調整可能な垂直位置を有し、および

(b) 走査処理の実行中に前記輪郭に基づいて前記垂直位置を調整して、前記検出器と前記マルチウェルプレート要素の間の距離を実質的に一定に維持すること

を含み、

前記マルチウェルプレート要素は、前記上面、前記底面、及び前記 1つまたは複数のウェル中に配置されたサンプルの表面から選択される方法。

【請求項 8】

上面及び底面を有するマルチウェルプレートの複数のウェルに入れられた個々のサンプルの光学的な属性を検出する方法であって、

(a) 前記光学的な属性を測定するように適合された検出器の中に前記マルチウェルプレートを置くことを含み、前記検出器は、検出ヘッド、前記マルチウェルプレートに対して調整可能な垂直位置、および前記検出器とマルチウェルプレート要素の間の距離を測定するためのセンサを有し、

(b) 前記距離の前記センサを用いて前記マルチウェルプレート上の所定の複数の位置で複数の測定を実施して、それぞれの前記所定の位置で前記距離の測定値を得ることを含み、それぞれの前記所定の位置が、前記マルチウェルプレートの所定のウェルまたはそのすぐ近くに位置し、および

(c) 前記検出器を用いてそれぞれの所定のウェル中のサンプルの前記光学的な属性を測定し、それぞれの所定のウェルまたはそのすぐ近くの所定の位置における前記距離の測定値に基づいて前記マルチウェルプレートに対して調整可能な垂直位置を調整して、前記検出器と前記マルチウェルプレート要素の間の距離を実質的に一定に維持すること

を含み、

前記マルチウェルプレート要素は、前記上面、前記底面、及びそれぞれの所定のウェル中のサンプルの表面から選択される方法。

10

20

30

40

50

【請求項 9】

標的分子に対する調節活性を有する化学物質を同定する方法であって、

(a) 化学物質貯蔵 / 取出しモジュールから複数のサンプル化学物質を取り出すこと、

(b) 前記複数のサンプル化学物質を、上面及び底面を有するマルチウェルプレートのそれぞれのウェルに入れること、

(c) 前記マルチウェルプレートを、化学的、生物学的または生化学的サンプルの光学的な属性を測定するように適合された検出器を備えた自動分析システムに移動することを含み、前記検出器は、検出ヘッド、前記マルチウェルプレートに対して調整可能な垂直位置、および前記検出器とマルチウェルプレート要素の間の距離を測定するためのセンサを有し、

10

(d) 前記マルチウェルプレートを前記検出器の上に置くこと、

(e) 前記距離の前記センサを用いて前記マルチウェルプレート上の所定の複数の位置で複数の測定を実施して、それぞれの前記所定の位置で前記距離の測定値を得ることを含み、それぞれの前記所定の位置が、前記マルチウェルプレートの所定のウェルまたはそのすぐ近くに位置し、

(f) 前記検出器を用いてそれぞれの所定のウェル中のサンプルの前記光学的な属性を測定し、それぞれの所定のウェルまたはそのすぐ近くの所定の位置における前記距離の測定値に基づいて前記マルチウェルプレートに対して調整可能な垂直位置を調整して、前記検出器と前記マルチウェルプレート要素の間の距離を実質的に一定に維持すること、および

20

(g) 前記光学的な属性の測定値を解析して前記調節活性を検出することを含み、

前記マルチウェルプレート要素は、前記上面、前記底面、及びそれぞれの所定のウェル中のサンプルの表面から選択される方法。

【請求項 10】

50,000 化学物質 / 24 時間を超える速度で、前記貯蔵 / 取出しモジュールから化学物質を取り出すことを含む、請求項 9 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

(発明の背景)

30

発明の分野

本発明は一般に、液体サンプル中の生物学的活性を有する化学物質を迅速に同定するための装置および方法に関し、詳細には、新しい薬剤、農薬または化粧品のための小体積サンプルの自動スクリーニングに関する。

【0002】

関連技術の説明

薬剤の発見は、極めて時間依存性かつタイムクリティカルなプロセスであり、方法の大幅な改良によって、有用な化学物質が有効な手がかりとなり、最終的に薬剤開発の基礎を形成するペースを劇的に向上させることができる。多くの場合、有用な薬剤の最終的な価値は、市場への投入のタイミング、および特定の病気の排他的な治療法として薬剤が享受する時間の長さによって設定される。

40

【0003】

製薬会社の主要な課題は、このプロセスの速度および効率を増大させ、同時にコストを最小化することである。この問題の1つの解決策は、24時間あたり数千の化合物の急速な分析ができる高スループットスクリーニング装置を開発することであった。このような多数の化合物をスクリーニングする普通ならとてつもなく高くなるコストを低減するため、これらのシステムは一般に、試薬コストを劇的に低減させ、生産性を向上させる小型の検定システムを使用する。多数の小型検定を効率的に処理するためには、信頼性の高い試薬の添加および操作を達成できるロボット制御の自動分析システムを実現する必要がある。サンプルの迅速かつ効率的な処理を可能にするため、これらのシステムおよび本明細書に

50

記載の発明は、中央化合物貯蔵装置などの他のシステムのサブコンポーネントと協調的に対話することができることが好ましい。

【0004】

小型の高スループットスクリーニング装置では、壊れにくく、信頼性が高く、再現可能で、かつ小さなサンプルサイズでも十分に機能する高感度の分析法が必要である。巨視的分析では首尾よく使用できる多くの潜在的な分析法があるが、これらの方法の多くが簡単には小型化できず、または小型化したとしても十分な感度を欠く。所与のサンプルからの絶対信号強度はサンプルサイズとともに低下するが、背景の光学雑音または検出器雑音は、サンプルの大小に関わらず概ね一定であるので、このことは一般的に言えることである。小型の高スループットスクリーニング検定に対して好ましい検定は、非常に小さなサンプルサイズに対して高い信号対雑音比を有するものである。

10

【0005】

励起および放出光の内部フィルタリングなどの係数が低減される蛍光ベースの測定は高い感度を有し、小さなサンプルでも十分に機能する。したがって蛍光ベースの測定は、小さなサンプルサイズであっても良好な信号対雑音比を示す。蛍光ベースの信号検出を使用する特に好ましい方法は、2つ以上の波長で同時に変化する蛍光（発光）信号を生成する方法である。第1の波長での発光強度を第2の波長での発光強度で除すことによって、比を計算することができる。蛍光検定のこのレシオメトリック（*ratio metric*）な測定は、他の非レシオメトリック型の分析に優る重要ないくつかの利点を有する。第1に、この比は、蛍光を発している蛍光染料の実際の濃度から十分に独立している。第2に、この比は、蛍光化合物を励起している光の強度から十分に独立している。第3に、両方の波長での検出効率に関して検出器の感度変化が同じである場合には、この比は、検出器の感度の変化から十分に独立している。日ごと、および検定ごとの再現性が重要な高スループットスクリーニング装置にとって、この利点の組み合わせは、蛍光ベースのレシオメトリック検定を非常に魅力的なものにする。

20

【0006】

伝統的に、マルチウェルプレートからの蛍光を読み取る一般的な2つの方法がある。一配置では、読取りヘッドがウェルからウェルへと動かされ、それぞれのウェルで、蛍光信号をデジタル化し、メモリに保存するためのドウェル時間がかかる。光学的にはこの方式が最も単純である。あるのは、光学アセンブリ1つ、フィルタ1組、検出器1つだけである。しかし、プレートにあるウェルの数によっては、読取り時間が容認できないほどに長くなることがある。総読取り時間に寄与するのはドウェル時間だけではない。読取りヘッドをウェルからウェルへ移動させるたびに、装置セットの移動に使用するステージを加速/減速させる時間がかかる。

30

【0007】

別の配置では、ある種の並行処理を使用する。CCDカメラまたは他の撮像配置を使用してプレートの写真を撮影するか、または複数の光学式読取りヘッドを使用する。この配置の利点は読取り時間が大幅に短縮されることである。しかし、新たな問題すなわち標準化の問題が持ち込まれる。複数の読取りヘッドによって複数のウェルを同時に読み取るときには、集光効率、検出感度、フィルタ品質などに関して、これらのヘッドが同じように振る舞うことをどのようにして保証するかという疑問が生じる。CCDカメラの場合には、類似の問題としてフラットフィールドリング（*flat-fielding*）の問題がある。したがって、高スループットスクリーニング環境で蛍光信号を迅速かつ正確に測定するための改良式の方法およびシステムが求められている。

40

【0008】

（発明の概要）

一実施形態では、本発明に基づく方法が、サンプルの属性を検出するための検出器の上にプラットホームを置くことを含み、検出器が調整可能パラメータを有する。この方法は、プラットホームの特性の複数の測定を実施して、プラットホーム上の異なる位置でその特性の複数の測定値を得ることを含む。属性は、この測定値に基づいてパラメータを調整し

50

た検出器を用いて測定する。

【0009】

一実施形態では、プラットホームがマルチウェルプレートであり、特性が、マルチウェルプレートの底面の等高線を含み、調整可能パラメータが、光学検出器とマルチウェルプレートの底面との間の距離を含む。これらのいくつかの実施形態では、光学系とプレートの間の最適な距離を維持するため、検出器が、関心のプレート要素の位置を検出するのに使用するセンサを備える。さらに光学系は、光学系位置決め装置、例えば直線状ステージに装着される。一実施形態では、光学系位置決め装置の向きを垂直軸方向にして、プレートに対して光学系の垂直位置を調整できるようにすることができる。光学系を調整する代わりに、垂直軸方向を向いたステージにプレート位置決め装置を装着し、プレートを動かして、プレートと光学系の相対位置を調整してもよい。光学系位置決め装置は、光学系に対するプレートの水平位置を制御するプレート位置決め装置上のステージに連結される。

10

【0010】

プレート変動を補償しながらマイクロプレートを読む方法は、関心のプレート要素の位相、例えば光学系に対するプレート底面の高さをマップする第1のマッピングを含む。関心のプレート要素全体または代表的部分に沿ってプレートを、センサに対して相対的に動かす。プレートは、所望の領域をカバーする所望のパターンで動かすことができるが、ラスト走査で動かすことが好ましい。プレートが動いているときに、センサは、関心のプレート要素の位置を測定する。これらの測定から、プレート位相を記述する関心のプレート要素の等高線図を計算することができる。このマッピングが完了した後にスキャナはプレートを読み取る。この読み取り走査の間に、光学系位置決め装置は、マップされたプレート位相に基づいて光学系の位置を調整して、光学系とプレート要素の間の所望の距離を維持する。例えば、光学系位置決め装置は、光学系とそれぞれのウェルの底面との間の距離を調整して、それぞれのウェルを走査するときに、光学系とプレートの底面との間の距離を実質的に一定に維持することができる。有利な実施形態では、読み取り走査が、ウェル列に沿って実質上連続的に実施され、そのためそれぞれのウェルのドウェル時間が回避され、これによって、マルチウェルプレートを走査するのに要する時間が短縮される。

20

【0011】

他の実施形態では、プラットホーム上に配置された複数のサンプルの属性を検出するための装置が、プラットホームを支持し、プラットホームの所定の位置を所定の位置と整列させるためのプラットホーム位置決めステージを備える。この装置はさらに、プラットホームの特徴を複数の異なる位置で測定し、測定値をコントローラに伝送する第1のセンサを備える。属性を表す信号出力を有する検出器が提供され、検出器が、サンプルが所定の位置と整列したときにサンプルの属性を検出するように配置され、検出器が、サンプルから伝送された光を受け取るための光学系を有し、光学系が、光学系位置決め装置上に装着される。さらにコントローラが、測定値を受け取り、プラットホームに対する光学系の相対位置を制御する信号を光学系位置決め装置に伝送するように適合され、光学系位置決め装置が、測定値に基づくコントローラからの信号に応答して、プラットホームに対する光学系の相対位置を自動的に調整するように適合される。

30

【0012】

本発明の他の実施形態は、標的分子に対する調節活性を有する化学物質を同定する方法を含む。特定の一実施形態では、このような方法が、化学物質貯蔵/取出しモジュールから複数のサンプル化学物質を取り出すこと、複数のサンプル化学物質を、マルチウェルプレートのそれぞれのウェルに入れること、マルチウェルプレートを、化学的、生物学的または生化学的サンプルの属性を測定するように適合された検出器を備えた自動分析システムに移動することを含み、検出器が、検出ヘッド、調整可能パラメータおよびマルチウェルプレートの特徴を測定するためのセンサを有する。マルチウェルプレートは検出器の上に置かれ、特徴を測定するセンサを用いて、マルチウェルプレート上の所定の複数の位置で、またはこれらの位置のすぐ近くで複数の測定を実施する。この特定の方法はさらに、それぞれの所定のウェル中のサンプルの属性を、それぞれの所定のウェルまたはそのすぐ近

40

50

くの所定の位置で測定した特徴の測定値に基づいて調整可能パラメータを調製した検出器を用いて測定して、それぞれのサンプルの属性測定値を得ることを含む。測定した属性値を解析して調節活性を検出する。

【0013】

さらに、本発明の他の実施形態は、マルチウェルプレートの複数のウェルに化学物質を入れること、マルチウェルプレートを、化学的、生物学的または生化学的サンプルの属性を測定するように適合された検出器の中に置くことを含み、検出器が、検出ヘッド、調整可能パラメータおよびマルチウェルプレートの特徴を測定するためのセンサを有し、さらに、特徴を測定するセンサを用いて、マルチウェルプレート上の所定の複数の位置で、またはこれらの位置のすぐ近くで複数の測定を実施して、それぞれの所定の位置で特徴の測定値を得ることを含み、それぞれの所定の位置が、マルチウェルプレートの所定のウェルまたはそのすぐ近くに位置するプロセスによって薬理的に活性な化学物質を同定するプロセスによって作られた薬剤を含む。この方法はさらに、それぞれの所定のウェル中のサンプルの属性を、それぞれの所定のウェルまたはそのすぐ近くの所定の位置で測定した特徴の測定値に基づいて調整可能パラメータを調整した検出器を用いて測定し、これによって、少なくとも1つの前記サンプルの薬理的活性を検出すること、および少なくとも1つの薬理的に活性なサンプルの有効量を生体適合性担体に組み込むことを含む。

10

【0014】

本発明の他の実施形態は、マルチウェルプレートのウェルを連続的に走査する検出器を備えたマルチウェルプレートスキャナを含む。このスキャナはさらに、マイクロアレイ、バイオチップおよび物理的分離のないサンプル領域を走査する目的にも使用することができる。

20

【0015】

他の実施形態では、本発明が、マルチウェルプレートのウェル中の発光分子を検出する方法を対象とする。この方法は、マルチウェルプレートの第1のウェルの一面に光集光器を配置すること、集光器が第1のウェルの第1の縁を横切りし、第1のウェルを横切り、第1のウェルの第2の縁を横切るように、マルチウェルプレートに対して集光器を連続的に相対的に動かすことを含む。集光器が第1のウェルにある少なくとも一部の時間の間に、蛍光の強度を測定する。

【0016】

このスキャナは、貯蔵/取出しモジュール、サンプル分配モジュール、試薬分配モジュール、およびスキャナを組み込んだ検出器を備える高スループットスクリーニングシステム中で使用することができる。したがって本発明の一実施形態は、化学物質貯蔵/取出しモジュールから化学物質を取り出すこと、化学物質をマルチウェルプレートのウェルに入れること、実質的に連続的なラスタ走査でマルチウェルプレートを走査して、1つまたは複数の化学物質の化学的または生物学的活性を検出することを含み高スループット薬剤発見法を含む。走査パターンは、サンプルまたはサンプル容器の形状に応じて、らせん、同心円または他の適当な任意の数学関数とすることができる。

30

【0017】

本発明はさらに、開示の方法によって同定された組成物および治療薬を対象とする。このような一実施形態は、化学物質貯蔵/取出しモジュールから化学物質を取り出すこと、化学物質をマルチウェルプレートのウェルの中に入れること、および実質的に連続的なブラウマン (plowman) 走査でマルチウェルプレートを走査して、1つまたは複数の化学物質の薬理的活性を検出することを含むプロセスによって薬理的に活性な化学物質を同定することを含むプロセスによって作られた薬剤を含む。同定後に、少なくとも1つの薬理的に活性な化学物質の有効量を生体適合性担体に組み込む。

40

【0018】

本発明の他の態様は、本発明の方法を使用して化合物を同定し、生体内モデルでの治療薬の毒性および有効性を監視することによって、治療薬の治療薬活性および毒性を試験する方法である。

50

【0019】

(発明の詳細な説明)

次に、添付した図を参照しながら本発明の実施形態について述べるが、これらの図では全体を通し、同様の参照番号が同様の要素を指す。本明細書に記載される記述の中で使用される用語は、単に本発明のある特定の実施形態の詳細な記述に関連して利用するだけであるので、どのようにも限定しまたは制限するように解釈することを意図するものではない。さらに、本発明の実施形態はいくつかの新規な特徴を含んでよく、そのいずれも、単にその所望の特性に対して責任を負うものではなく、また本明細書で述べる本発明の実施に不可欠のものではない。

【0020】

他に特に定義しない限り、本明細書で使用する全ての技術的用語および科学的用語は、本発明が属する技術分野の当業者に一般に理解されているものと同じ意味を有する。一般に、本明細書で使用される専門用語と、以下に述べる自動化、コンピュータ、検出、化学および実験手順の多くは、当技術分野で周知のものであり一般に使用されているものである。標準的な技法は、通常、工業技術、ロボット工学、光学、分子生物学、コンピュータソフトウェア、および統合に使用されるものである。一般に、化学反応、細胞アッセイ、および酵素反応は、適切な場合には製造業者の仕様に従って行われる。この技法および手順は、一般に、当技術分野での従来方法および様々な一般の参考文献に従って行われる。読者は、一般に、蛍光技法に関してはLakowicz, J. R. Principles of Fluorescence Spectroscopy, New York: Plenum Press (1983) およびLakowicz, J. R. Emerging Applications of Fluorescence Spectroscopy to Cellular Imaging: Lifetime Imaging, Metalligand Probes, Multi-photon Excitation and Light Quenching, Scanning Microsc. Suppl VOL. 10 (1996) 213~24ページを、分子生物学的な方法に関してはSambrook他Molecular Cloning: 実験手引書、第2版(1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press、Cold Spring Harbor, New Yorkを、一般的な光学的方法に関してはOptics Guide 5 Melles Griot (登録商標) Irvine CAを、光ファイバの理論および材料に関してはOptical Waveguide Theory, Snyder & Love, Chapman & Hall出版およびPeter CheoのFiber Optics Devices and Systems, Prentice-Hall出版を参照することができる。

【0021】

その開示全体を通して用いられるように、以下の用語は、他に特に示さない限り以下の意味を有するものとする。

【0022】

「マルチウェルプレート」または「マイクロプレート」は、実質上平らな面に位置付けられたサンプルウェルの二次元配列を指す。マルチウェルプレートは、任意の数の別個のサンプルウェルを含んでよく、また任意の幅または深さのサンプルウェルを含んでよい。マルチウェルプレートの一般的な例には、本願の譲受人に譲渡された「Low Fluorescence Assay Platforms Having Greater Than 864 Wells and Related Methods for Drug Discovery」という名称の米国特許出願第09/028,283号であって、その内容の全体が参照により本明細書に組み込まれた上記出願に開示されるような、96ウェルプレート、384ウェルプレート、1536ウェルプレート、および3456ウェルプレートが含まれる。

【0023】

「医薬品としての薬剤または薬物」は、患者に適正に投与された場合に所望の治療効果を

10

20

30

40

50

もたらしことができる、化学的な化合物または組成物を指す。

【 0 0 2 4 】

本明細書で使用する「光学特性」は、特定の波長で放射された光の強さ、偏光の強さまたは度合い、化合物または組成物の透過率、あるいは化合物または組成物の反射率など、測定可能なサンプルの特性を指す。

【 0 0 2 5 】

「ボールレンズ」は、適切な、透明な屈折性材料でできた球状、先が切り取られた形の球状、円筒状、または先が切り取られた形の円筒状を指し、通常は球状である。

【 0 0 2 6 】

「動作可能に結合した」は、並置、すなわちそのように記述された構成要素がその意図されるやり方で機能できるような関係にある状態を指す。

10

【 0 0 2 7 】

「ヒット」は、かなりの重要性を有すると確認されたサンプル、または、試薬が標的に著しい効果をもたらしたことを示すと確認されたサンプルを指す。

【 0 0 2 8 】

「ラスト走査」は、ある領域を、左右に一線をなすように、行から行へまたは列から列へと続けて走査し、あるいはそれらの任意の組合せで走査するようになされた走査パターンを指す。

【 0 0 2 9 】

本発明は、マルチウェルプレートのサンプルウェルから放射された光の検出および測定
速度および精度を改善することを対象とする。本発明のいくつかの態様は、アッセイが行
われるプラットフォームの寸法、構成、および/または材料のばらつき、不一致、および
その他の差を補償する方法および装置を対象とする。本発明のこの態様の一実施形態は、
検出器の光学系と、マルチウェルプレートのウェルの底部（底部は、関連するウェルのサ
ンプルの位置のインジケータとして使用される）などの非常に重要なプレート要素との最
適な距離を維持する装置および方法を含む。この能力は、プレートの様々なフォーマット
間の差、様々な製造業者間の差、また同じソースからの同じフォーマットのプレートにお
ける平面度の不一致および不足を含む、プレート寸法の差の補償に使用することができる
。例えば、いくつかのマイクロプレートは、0.5 mm程度またはそれ以上、弓形に曲げ
られた底面を有する。プレートのウェルの密度が増大するほど、ウェルに入るサンプルの
量が少なくなるので、平面度がさらに重要になる。その結果、サンプルからの信号も同様
に減少する。集光を最大限にするには開口数を増大させなければならないが、このよう
にすると、焦点深度が必ず非常に浅くなる。したがって光学系の焦点深度の読取りは、プレ
ート同士、また単一のプレート内でのウェル同士のプレート寸法の不規則性を説明するの
に不十分と考えられる。本発明は、特に、多数の化合物についてその生物学的または化学
的な活性が好ましくはできる限り迅速に試験される、高処理能力スクリーニングシステム
（HTSS）への有利な適用例を見出すものである。

20

30

【 0 0 3 0 】

典型的な場合、本発明の態様を利用するシステムは、有用な化学物質を同定するための液
体サンプルの処理、すなわち大量の種々の試薬（通常は液体）から始まって化学反応や分
析物の検出またはサンプルの物理的性質の測定など後段の処理ステップに至る処理に使用
される構成要素のほとんどまたは全て、ならびにそのようなプロセスから得られる情報を
収集する構成要素を含むと考えられる。そのような図1に示すシステムは、通常、以下の
構成要素、すなわち

40

（1）容器内の非常に多数（少なくとも約100,000種）の種々の試薬を貯蔵し取り
出すための貯蔵および取り出しモジュール10と、

（2）高い率または高速で少量の液体を取り扱う（例えば容器からのサンプルの吸引や、
サンプル容器へのサンプルの分配）サンプル分配モジュール11と、

（3）選択された構成要素から別の構成要素に、適合性あるスループット率で試薬を移送
する、サンプル移送器12と、

50

(4) 高いスループット率で化学反応または物理測定を行うための反応モジュール(例えば試薬ディスペンサや検出器)と、

(5) モジュール動作を制御することができるデータ処理および統合モジュール16とを含む。

【0031】

望むなら、別個のモジュールのそれぞれを統合しかつプログラム可能に制御して液体サンプルの高速処理を容易にするとともに、液体サンプルの高速処理が容易になるように動作可能にリンクさせる。そのような1つのシステムが、「Systems and Methods for Rapidly Identifying Useful Chemicals in Liquid Samples」という名称の、Stylii他に付与された米国特許第5,985,214号に記載されており、その全体を参照により本明細書に組み込む。

10

【0032】

図2は、本発明による別の高処理量スクリーニングシステム18を示す。図1に示すシステムと同様に、HTSS18は、貯蔵および取り出しモジュール19を含む。HTSS18は、サンプル分配モジュール22、試薬分配モジュール23、自動プレート反復モジュール24、反応モジュール25、読取り装置26、ヒットプロファイリングロボット27、高容量積層システム28、およびこれらのモジュールのそれぞれに動作可能にリンクする移送システム29をさらに含む。システム管理モジュール29は、構成要素およびモジュールのそれぞれに動作可能にリンクして、システム動作制御および統合およびデータ管理を行う。

20

【0033】

貯蔵および取り出しモジュール19は、アッセイ手順のため、プラットフォーム(マルチウェルプレートなど)の試薬の貯蔵および送達を完全に自動化する。貯蔵および取り出しモジュール19は、ロボット工学、計測器、電気機械装置、コンピュータ装置、試薬の貯蔵および取り出しと貯蔵および取り出しモジュール19から移送システム20への送達を完全に自動化する関連ソフトウェアを含むことが企図される。貯蔵および取り出しモジュールは、上記参照した米国特許第5,985,214号に記載されているものと実質上同様と考えられる。

【0034】

移送システム20は、HTSS18のモジュールのそれぞれの間でプレートを管理し移動させるための装置および制御器を含む。移送器システム20は、上記参照した出願第08/858,016号に記載されているものと実質上同様と考えられる。

30

【0035】

ヒットプロファイリングロボット27は、アッセイが行われたウェルを有する別個のプレートからのヒットを混載して生成されたプレートをフォーマットする。いくつかのマルチウェルプレート上でアッセイを行うためのHTSS18の操作では、一般に、スクリーニングを行うヒットを示すウェルが、非常に多くのマルチウェルプレート間にまばらに分布される。当然ながらプレートは、特定のアッセイによって同定されたヒットを全く含まなくてよく、あるいは特定のアッセイによって同定されたヒットを1つまたは複数含んでもよい。ヒットプロファイリングロボット27はそれらのヒットを集め、一まとめにして新たな目的をもつマルチウェルプレートにする。

40

【0036】

自動プレート反復モジュール24は、マルチウェルプレート間のサンプルをフォーマットし直す。例えば自動プレート反復モジュール24は、384ウェルプレートから、4枚の96ウェルプレートが1組になったものに、サンプルを分配することができる。あるいは、自動プレート反復モジュール24は、いくつかの異なる384ウェルプレートのウェルから1枚の384ウェルプレートに、サンプルが分配されるように構成することができる。この自動プレート反復モジュール24は、自動アッセイを行う際に使用されるプレートをフォーマットする他、いくつかの他の有用なタスクを実行することができる。例えば、

50

貯蔵および取り出しモジュール 19 に入力するためのサンプルプレートをフォーマットするのに使用することができる。また、HTSS 18 とは無関係に行われるアッセイ用のアッセイプレートのフォーマットにも使用することができる。

【0037】

サンプル分配モジュール 22 は、マルチウェルサンプルプレートから、試験されるアッセイプレートへと、サンプルを分配する。一般にサンプルプレートは、貯蔵および取り出しモジュール 19 からの直接のマルチウェルプレートであり、または自動プレート反復モジュール 24 から再フォーマットされたプレートである。サンプルプレートは、貯蔵および取り出しモジュール 19 および / または自動プレート反復モジュール 24 から、移送システム 20 上で、サンプル分配モジュール 22 へと移送される。アッセイプレートは、3456 ウェルプレートなど、非常に高い密度のものでよい。適切なサンプル分配モジュール 22 は、本願の出願人に譲渡された同時係属の米国出願第 09 / 210, 260 号に開示されており、その開示の全体を参照により本明細書に組み込む。

10

【0038】

試薬分配モジュール 23 は、サンプル分配モジュール 22 によってサンプルと共に前もってフォーマットされたマルチウェルプレートに、試薬を分配する。試薬分配モジュール 23 は、上記参照された係属中の米国出願第 08 / 858, 016 号に開示された対応する装置と実質上同じと考えられる。

【0039】

高容量積層システム 28 は、短期間の一時的なプレートの貯蔵および取り出しのためにバッファを提供する。高容量積層システム 28 は、サンプルプレート、貯蔵プレート、アッセイプレート、および空のプレートのバルク装入および取外しに使用することができる。係属中の米国出願第 08 / 858, 016 号には、そのような 1 つの高容量積層システムが記載されている。

20

【0040】

反応モジュール 25 は、一時的な貯蔵部に対し、特定のアッセイの反応に繋がる制御可能な環境条件を与える。1 つの好ましい形で、反応モジュール 25 は、自動プレート取扱いサブシステムを有するインキュベータを含んでよい。

【0041】

読取り装置 26 は、以下に述べる蛍光検出器などの検出器を含む。HTSS 18 のモジュール全ての場合と同様に、読取り装置 26 は、移送システム 24 からプレートから受け取るための、かつ移送システム 24 にプレートを送るための、さらに、モジュール内でプレートを操作するための、自動プレート取扱いサブシステムを含む。

30

【0042】

システム管理モジュール 29 は、システムオペレーションの制御および統合およびデータ管理を行うことができるように、構成要素およびモジュールのそれぞれに動作可能にリンクされた、マイクロコンピュータを含むことが好ましい。適切なシステム管理モジュール 29 の記述は、上記参照された出願第 08 / 858, 016 に記載されている。

【0043】

図 3 は、反応モジュール 14 (図 1) または読取り装置 26 (図 2) 内の、検出器の一実施形態のいくつかの構成要素を示す。本明細書に詳細に記述される実施形態で、検出器は、サンプルの蛍光を 2 つの異なる波長で測定するよう適合される。しかし、本発明の原理は、サンプルの任意の光学的性質の検出および / または測定に適用でき、蛍光測定は、本発明によって特に有利な適用例であることが見出された単なる一例であることが理解されよう。さらに、本明細書に開示される走査装置および方法は、放射能センサ、温度センサ、磁気センサ、およびその他の電磁測定装置が含まれるがこれらに限定することのない、光センサ以外の測定装置と共に使用することが企図される。

40

【0044】

再び図 3 を参照すると、マルチウェルプレート 30 が可動位置決めステージ上に載置されている。ボールレンズ 32 および光ファイバ束 33 を含んでよい集光アセンブリは、マル

50

チウエルプレートの表面に隣接して位置決めされている。化学物質の水溶液、細胞懸濁液、および化合物が入っているプレートは、手で、またはコンピュータ制御されたアームで反応モジュールに装入される。

【 0 0 4 5 】

マルチウエルプレート 30 は、直交した状態でボルト締めされた 2 つの電動式線形ステージによって x 方向および y 方向に移動可能なプレートポジション上の所定位置に、しっかりと締め付けられる。別の態様では、プレートポジションは、別の電動式線形ステージを使用して垂直方向または z 方向に移動することが可能である。これらのステージは、高分解能線形エンコーダを備えており、ステッピングモータによって駆動される。3 つの精密手動線形ステージによって、光ファイバ束 33 の先端 36 を、ボールレンズ 32 に対して x 方向、y 方向、および z 方向に位置決めすることができる。集光アセンブリ全体は、マルチウエルプレートの底面に対するその垂直方向の位置が精密に調整できるように、手動ステージ上に載置することができる。この設計では、束 33 の先端 36 がボールレンズの中心に来るように位置合わせし、ボールレンズによって励起光を集束させ、また、集光アセンブリ全体をマルチウエルプレートの底面に対して垂直に位置決めすることも可能である。

10

【 0 0 4 6 】

適切な一実施形態では、ファイバ束 33 のフェルール (f e r r u l e) を 1 つのステージ上に載置し、それによって、そのボールレンズまでの垂直方向の距離を調整することが可能になる。ボールレンズホルダは 2 つの直交するステージ上に載置され、それによって、その中心を束の中央の励起ファイバ (図 4 中、54 で示す) に合わせることができる。束の先端 36 がボールレンズ 32 からどの程度離れているかによって、励起ビームは実質上平行化される。焦点はなく、ビームはわずかに発散する。4 mm から 6 mm まで、直径約 150 μ m の集束スポットがある。最も高い信号とバックグラウンドとの比は、ファイバの先端からボールレンズまでの距離が 4 mm のときに得られ、励起ビームが集束する。上述のように、集光アセンブリ全体は、そのマルチウエルプレート 30 の底面に対する垂直方向の距離を調整することができるように、第 4 の線形ステージ上に載置される。この調整は、励起ビームが集束するとき最も必要とされるが、それはビームスポットがウェル内に最適に位置決めされるからである。これは特に、細胞を含有するサンプルを使用するときと言えることである。細胞は、一般にウェルの底部に単層を形成し、したがってこの層に対するビームスポットの相対位置は、細胞がどの程度十分に照明されるか、したがって蛍光信号の大きさに、大きな影響を与える。

20

30

【 0 0 4 7 】

図 3 の実施形態で、マルチウエルプレートはこのシステム残りの部分に対して水平な x - y 平面内を移動するが、集光器はこのシステムの残りの部分に対して静止したままであり、その結果、光ファイバ集光装置の位置決めは妨害されない。しかし、蛍光のためプレートのウェルを走査するのに使用される相対的な運動をもたらし、移動する集光器および静止状態のマルチウエルプレートも利用できることが理解されよう。このため、「プレートに対して集光器を移動させる」と「集光器に対してプレートを移動させる」という用語は同義語とされ、静止スクリーニング装置の残りの部分で述べる移動するプレートおよび移動する集光器の両方を包含する。

40

【 0 0 4 8 】

図 3 の実施形態では、2 つの光電子増倍管 34、35 を使用して、放射比検出を可能にした状態で、マルチウエルプレートのウェル内に存在する蛍光を検出する。より短い波長の放射 (300 ~ 650 nm) を検出するには、一般に青色に感受性のある重アルカリ光電子増倍管を使用し、一方、より長い波長の放射 (300 ~ 850 nm) を検出するには、マルチアルカリ光電子増倍管を使用する。

【 0 0 4 9 】

蛍光化学種によって放射された光は、三叉光ファイバ束 30 の共通端 36 により、マイクロプレートウェルの透明な底面を通して収集される。三叉ファイバ束の 1 本の脚 38 は、

50

励起源として使用される。三叉ファイバの他の2本の脚40、42は、蛍光放射の検出に使用される。したがって三叉束33の共通端36は、蛍光放射の刺激および収集の両方に使用される。

【0050】

蛍光励起源として、放物線状の反射器を備えたCXP300、ILC Technology、Sunnyvale、CAなどの300ワットのキセノンアークランプを使用することができる。励起光は、直径2インチの2つの干渉フィルタ46（例えば400RDF15や480RDF20、Omega Optical、Brattleboro、VT）によってフィルタリングされる。この二重フィルタリングにより、個々のフィルタのそれぞれのピンホール欠陥に起因する白色光の励起経路への漏れが、最小限に抑えられる。

10

【0051】

次いで励起光を、レンズ48によって三叉束の励起脚へと集束させる。光経路には、干渉フィルタが熱によるダメージを受けないように、IR熱を吸収する水フィルタとシャッタシステムの両方を含めることができる。蛍光放射の検出には、直径1インチの「ヘッドオン」光電子増倍管（例えばHC124シリーズ、Hamamatsu Corp、Bridgewater、NJ）チューブを使用することができる。光電子増倍管34、35の入力側には、放射干渉フィルタ50、52を設けることもできる。

【0052】

光ファイバ束33は、励起および放射束の数および配置構成の広く様々なパッキングパターンで構成することができ、励起脚と放射脚とでファイバの数を異ならせて構成することができる。一実施形態で、励起脚および放射脚の両方のファイバを束にするのはランダムである。別の実施形態では、ファイバが特定の画定されたパターンに配置され、それによって好ましい光学特性がシステムに与えられる。例えば、上記論じた好ましい一実施形態では、光ファイバ束の中心に励起ファイバを置き、その外側に放射ファイバを配置して、同軸光ファイバ束が作製されるように1つに束ねることができる。二叉ファイバ束と三叉ファイバ束の両方をこの好ましい構成に作製することができる。あるいは、放射束を小さいグループに配置して配列を作製し、または束の軸の周りに放射状に配置し、または任意のその他の対称的または非対称的なパターンに作製することができる。

20

【0053】

図4は、7本のファイバの、可能性ある1つの構成を示す。中心ファイバ54は励起脚を構成する。各放射脚40、42は3本のファイバを含む。束の共通端36では、各脚の3本のファイバが、中心ファイバ54の周りに交互に配置される。したがって、一方の放射脚40を形成する3本のファイバ56と他方の放射脚42を形成する3本のファイバ58は、中心ファイバ54の周りの正三角形の頂点に存在する。ファイバ束/ボールレンズの構成および試験といくつかの実施形態についても、本願の譲受人に譲渡された同時係属出願第09/122,544号に記載されており、その内容全体を参照により本明細書に組み込む。

30

【0054】

図3に示すように、本発明の一実施形態では、正規化が困難になることを避けるために、シングルヘッド手段を採用する。しかし、走査されるウェルの数が増加するほど、古典的な移動および休止手段では、望ましい高スループット率を得ることができなくなる。代わりに、ウェル上で停止させることなくプレートを連続的に走査することができ、そのため、蛍光サンプルが入っているウェル、ならびにウェル間のプラスチック領域を、光学系で読み取ることができる。したがってこの技術は、多数の集光器間の正規化の問題を回避しながら高処理量を可能にする。

40

【0055】

一実施形態で、マルチウェルプレートは、図5に示すラスタ走査において、その長軸に沿って走査される。一般にマルチウェルプレートは、透明プラスチック底面を有する円筒状ウェルの二次元配列を形成する黒色プラスチックを含む。このため列の各走査は、プレートの片側の黒色「ノンウェル」領域62で始まって、これと対をなすもう一方の側のノン

50

ウェル領域 6 4 で終わる。ウェル間にも存在するこれらの黒色領域の下に集光器があるときはいつでも、光はほとんど見られない。蛍光サンプルが入っているウェルの下を集光器が通過するとき、より多くの光が収集される。

【 0 0 5 6 】

蛍光を検出するための集光器が各ウェル上で停止する移動および休止方法とは対照的に、本発明のこの実施形態の集光器は、ウェル 6 6 の第 1 の縁部を通過し、ウェルそのものの上を通過し、次いでそのウェルの第 2 の縁部を通過するというように、移動し続ける。これは、第 2 のウェル 6 8 についても引き続き行われ、そのようにして停止することなく 1 列を完全に走査していく。

【 0 0 5 7 】

この方法による利益は、プレート当たりのウェルが増加するほど増大する。図 5 の実施形態で、プレートは、それぞれ 7 2 個のウェルを有する列が 4 8 列あり、合計で 3 4 5 6 個のウェルを含む。マルチウェルプレートをどの程度速く走査することができるか決定する、3 つの制限がある。第 1 は、約 3 0 0 mm / s の失速を恐れることなく、典型的な電動式ステージを安全に移動できることである。第 2 は、プレートが速く移動するほど、集光器で収集できる光が少なくなることである。この範囲では、プレートを非常に速く移動させるために光電子増倍管の光が制限され、すなわち暗ノイズが光信号に匹敵する点がある。第 3 は、ウェルに細胞が入っている場合、速く移動するステージの激しい加速および減速が原因となって、細胞が予測できないほど衝突し合う可能性があることである。図 5 の 3 4 5 6 ウェルプレートは、最大約 1 , 5 0 0 mm / s² の加速度で、最大約 9 0 mm / s で走査できることがわかった。処理量は、速度および加速度が増すにつれ増大するので、約 1 0 0 0 ~ 1 5 0 0 mm / s² でプレートを加速し減速することが有利であり、ウェル上の走行速度を約 7 0 ~ 9 0 mm / s にすることが有利である。これらの値では、3 4 5 6 個のウェルを有するマルチウェルプレートの走査を完了するのに約 1 分かかり、細胞サンプルが著しく乱されることはない。

【 0 0 5 8 】

図 6 に、蛍光データ収集電子回路の概略を示す。この図を参照すると、2 つの光電子増倍管 3 2、3 4 のアナログ出力は、コンピュータ装置 7 2 のデータ収集電子回路 7 0 に向けて送られる。例えばデータは、多機能ラボラトリデータ収集回路カードによって、P e n t i u m (登録商標) をベースとしたパーソナルコンピュータに収集することができる。データ収集電子回路 7 0 は、アナログからデジタルへの変換を行い、そのデータをコンピュータシステム 7 2 に提供して、記憶、分析、および表示を行う。

【 0 0 5 9 】

集光アセンブリとマルチウェルプレートの相対位置は、ステッピングモータで制御する。ウェルの列の寸法内で運動を制御するモータ 7 4 を、図 6 に示す。このモータ 7 4 は、ステッピングモータコントロール 7 6 によって制御する。プレートの移動は線形エンコーダ 7 8 によって検出され、この線形エンコーダ 7 8 は、一連のパルス、すなわち対応する一連の光検出器とマルチウェルプレートの間の増分計算位置シフトを表すパルスを構成する、出力 8 0 を有する。

【 0 0 6 0 】

典型的な移動および休止スキームでは、アナログ光電子増倍管出力のデジタル化が、時間に応じて行われる。固定されたそれぞれの時間間隔で、アナログ信号をサンプリングしてデジタル化する。本発明の場合、この簡単な配置構成を利用することはできないが、その理由は、電動式線形ステージを、各走査の開始時にその最終速度まで上昇させなければならない、次いで走査の終了時には速度を 0 に下げなければならないからである。そのため、走査のかなりの部分が行われている間、プレートは一定の速度で移動せず、時間をベースとするデジタル化によって、データ集合の始めと終わりで誤差が生じると考えられる。この問題を回避するために、線形エンコーダからのパルスを使用して、デジタル化を開始させる。線形ステージが約 2 μ m の距離だけ移動するたびに、線形エンコーダから TTL パルスを発生させるが、このプロセスは、ステージの速度および加速度に完全に無関係であ

10

20

30

40

50

る。このTTLパルスはデータ収集ボードに向けて送られ、光電子増倍管32、34からのアナログ信号の信号サンプリングおよびデジタル化を引き起こす。アナログ信号サンプリングが時間ではなく位置をベースとする場合、ステージがその一定の走行速度に加速および減速され、またステージがその一定の走行速度から加速および減速されるとき、データ集合に歪みは導入されない。さらに、同じプレートを2つの異なる速度プロファイルで2回走査する場合、得られる2つのデータ集合は同一である。

【0061】

しかし、この位置をベースとする収集スキームでは、電動式ステージを移動するよう命令が出されないときであっても、建物の振動など制御することができないソースから生じる小さな機械的振動が原因となって、完全に静止したままにはならない。これは、妨害されるたびにサーボ制御によってステージがその元の位置に戻るとき、スプリアス(spurious)なエンコーダパルスが一定にまたランダムに発生することを意味する。これらのスプリアス(spurious)なエンコーダパルスによって引き起こされたデータ収集の防止は、エンコーダ出力80が、NORゲートとして図6に示されるゲート82に向けて送られることにより実現されるが、ゲート82の広く様々な論理実装が可能であることが理解されよう。信号サンプリングを引き起こすために直接エンコーダ78の出力を使用するのではなく、ゲート82の出力84をデータ収集電子回路に向けて送り、それによってトリガパルスを供給する。

10

【0062】

ステージがアイドル状態でデータ収集が行われないうち、コンピュータ72からのゲート信号86は論理的に高く保たれてトリガパルスはデータ収集回路84に到達しないが、その理由は、エンコーダ78の出力80にパルスが存在するかどうかに関係なく、NORゲート82の出力が強制的に下げられるからである。走査の開始時、ゲート信号86は低くなる。ゲート信号86が低いとき、エンコーダ出力でのパルスはゲート出力84(図6のNORゲート実装では逆になっているが)に移り、トリガパルスはデータ収集回路に到達する。

20

【0063】

図7および図8に、上述の走査方法により得られた生データを示す。72ウェル列の走査のそれぞれは、72個のピーク88をもたらす。第1のウェルの前の領域90内の蛍光強度と、隣接するウェル同士の間領域92内の蛍光強度はほぼ等しい。集光器が第1のウェルの前の領域90の下にあるとき、集光器は全ての蛍光サンプルから安全に、遠く離れており、そこで得られる強度はバックグラウンド値と解釈される。したがって、集光器が隣接するウェル同士の間にあるときに得られる強度は、やはり本質的にバックグラウンド値である。この発見は、隣接するウェル同士の間クロストーク(cross-talk)がないことを実証しており、また集光器がウェル同士の間にあるときは、もはやサンプルからのいかなる蛍光もサンプリングせず、黒色プラスチックの使用によってさらに最小限に抑えられたプラスチック本体からのバックグラウンドのみであることを実証している。

30

【0064】

ウェル内のサンプルの性質に応じて、ピーク88は異なる形状を持つ可能性がある。蛍光種が溶解された液体サンプルを使用する場合、ピークはほぼ正弦曲線を描く。しかし図8に示すように、細胞サンプルを走査すると、ピークはより複雑な内部構造を示す。

40

【0065】

各ウェルの蛍光強度を計算するため、対応するピークを一部包含する積分窓96を画定することができる。この窓は、隣接するウェル同士のどのようなクロストーク(cross-talk)も避けられるように十分に小さいものであるべきだが、信号対雑音比が最大になるよう十分に大きいものであるべきである。したがって蛍光強度は、この窓内に閉じ込められた全てのデータ点の合計平均である。窓96は、得られる合計平均が最大になるまでそれを前後にスライドさせることにより、ピークに対して位置決めされる。このアルゴリズムでは、ピークが対称的ではなく内部サブピークなどを含むときであっても、計算

50

された蛍光強度はウェルに入っているサンプルを表す。したがって信号対雑音比が高いと、サンプルウェル当たり短い時間を使用しながら蛍光の測定が正確に行われる。

【0066】

別の態様では、本発明は、アッセイが行われるプラットフォーム（例えばマルチウェルプレート30）の寸法、構成、および/または材料のばらつき、不一致、およびその他の差を補償するための方法および装置を含む。図9を参照すると、そのような一実施形態は、集光器アセンブリ41の光学系37と、マルチウェルプレート30の底面31との相対距離を調整するための方法および装置を含む。図9の装置は図3の装置よりも小さく、したがって図9の実施形態の記述では、その両方に共通の要素について再び詳細に記述しない。調整の機能は、マルチウェルプレート30の底面の平坦度の不足、底面31のその他のばらつきまたは不一致、あるいはマルチウェルプレートの種々のタイプおよびフォーマットのばらつきを補償するのに使用することができる。

10

【0067】

集光器アセンブリ41の全体は、垂直軸を調整できるような向きに配置された垂直ステージ101上に載置される。垂直ステージ101は、上述のx、yステージと同様の電動式線形ステージでよい。あるいはプレートポジションに電動式線形ステージを備え付けて（図示せず）、マルチウェルプレート30を垂直方向に移動できるようにすることが可能である。集光器アセンブリ41にはセンサ103が設けられ、センサ103とプレート30の底面31との距離を測定する。底面31と光学系37の相対位置を測定するために本発明で使用するのに適する様々な感知方法および装置が知られており、市販されている。一実施形態において、センサ103は、KeyenceのLaser Displacement Sensor、Model LK-031である。このKeyenceセンサは、レーザビームを伝送し、反射光を測定する。三角法を使用して、反射面とセンサとの距離の変化をその距離の変化に比例する出力信号に変換する。一実施形態で、センサと反射面との公称ゼロ出力距離は約30mmであり、出力信号は、この距離が変化するにつれてmm当たり1ボルトの割合で変化する。この特定のセンサのダイナミックレンジは約±5mmであり、分解能は約1μmである。

20

【0068】

底面31の高度のばらつきを補償しながらプレート30を読み取るための第1の方法は、まず、底面31の予備走査を使用して底面31の位相をマッピングすることを含む。底面31の全てまたは代表的な部分に沿って、プレート30をセンサ103に対して移動させる。プレートは、所望の領域を包含する任意の所望のパターンで移動させることができるが、ラスタ走査で移動させることが好ましい。例えば図10は、48列でそのそれぞれが72個のウェルを有し、合計3456個のウェルが図示する長方形のパターンおよび寸法で並んでいるマルチウェルプレート30の、例示的な予備走査パターン110を示す。3456ウェルプレートを含む高密度マルチウェルプレートは米国特許出願第09/030,578号に開示されており、その開示の全体を参照により本明細書に組み込む。この実施例で、走査パターン110は、走査線112に沿ってセンサ103上の底面31の高度を測定する。走査線112は、6列ごとに、かつプレート30の各端部に位置付けられており、それぞれの長さが72mmである走査線が合計で13本になる。走査パターンは、所望の分解能に応じてより多くのまたはより少ない走査線を含むことができることを理解されたい。走査線112（最初と最後を除く）は、ウェルの列と列の間の中心点にあることが好ましい。これは、ウェルの底部が透明で、正確な測定が行われるよう十分にセンサ103のレーザビームが反射されない場合に有利である。

30

40

【0069】

プレートが走査パターン112に沿って移動するとき、センサ103は、センサ103の位置にある底面31の高度を測定する。図11を参照すると、各走査線112は、48個の1.5mmのセグメント114に分解することができ、そのような各セグメントは1つのウェルを対称的に跨いでいる。Keyenceセンサ103のアナログ出力は、マルチウェルプレートのウェルの蛍光データを得るために、上述と同じ位置ベースの収集方法を

50

使用してデジタル化される。72 mmの各走査線112は、いくつかのサンプル点をもたらす。データ収集が約2 mごとに行われる場合、約36,000のサンプル点を得られる。またはウェルごとに分析する場合、走査線112の各ウェルに隣接する48個のセグメント114のそれぞれは、750のサンプル点を有する。各ウェルごとのサンプル点が平均され、これら48個の平均は、底面31上の48個の点116の高度を表す。図12に、底面31上の点116を概略的に示す。当然ながら、必要とされる精度および速度に応じて、より高くまたはより低いレベルの高度測定のサンプリングおよび密度を使用することができる。確かに、図3に示す点のそれぞれで1回の測定を行うことができた。しかし、この実施例で使用される高レベルのオーバーサンプリング(oversampling)および平均化によって、底面31のランダムな不完全さに起因すると考えられる不正確な測定が減少する。

10

【0070】

高度の測定および平均化の方法によって、図13に示す48×13行列の高度点を得られる。高度行列は、底面31の位相マップを表す。実際、高度点116の輪郭マップは、図14の例に示すように構成することができる。この例では、底面31が、短い方向のほぼ中央に配置されかつ長さ方向にわずかに右にシフトした概ね細長い谷を有することがわかる。谷の底部にある最低点から左下のコーナの最高点までの高度の差は、この例では約0.6 mmである。

【0071】

輪郭マップは情報を与えることができるが、走査線に沿って位置プロファイルを計算することが有利である。図2に戻ると、一実施形態では、プレート読取りプロセスの間、48列のウェルのそれぞれに対して順次走査が行われる。したがって、底面の高度の変化を補償しながら各列のウェルの走査を行うため、各列のウェルに沿って集められた13個のデータ点を、各列に沿って底面の輪郭を滑らかに近似する曲線にフィットさせることができる。48のプロファイルは、13点の各集合を、列に沿った位置の関数として底面の高さの多項式関数にフィットさせることにより、高度行列の48列から計算することが有利である。一実施形態では、6次多項式へのフィットが行われる。例えば、図14に示されるプレート輪郭の第0列、23列、および47列へのフィットを図15、16、および17にそれぞれ示すが、センサ上方の30 mmという公称高さとの高さの差が垂直軸上にプロットされており、各列に沿った距離が水平軸に沿ってプロットされている。したがって

20

30

【0072】

上記計算されたプロファイルは、底面31とセンサ103との距離に関する。これらのプロファイルは、絶対的な垂直距離「Z」、すなわち、光学系とマルチウェルプレートの底面との一定の予備選択ギャップ「G」を維持するために、列の走査進行中のプレート位置に応じて光学系37が初期ホームまたは休止位置から移動しなければならない絶対的な垂直距離「Z」に変換されることが好ましい。図18および19を参照すると、これを実現する一方法は、平らなリファレンスプレート118をマルチウェルプレートの代わりにプレートポジション内に配置することによって、スキャナを校正することである。

40

【0073】

スキャナをリファレンスプレートで校正するため、光学系37のホームまたは休止位置とリファレンスプレート118の底面との絶対距離Sを測定する。これは、光学系37がやっとリファレンスプレートに接触するようになるまで集光器アセンブリをそのホーム位置から垂直ステージ101で上昇させ、例えば垂直ステージの一部として設けられた位置エンコーダを用いて移動した距離(S)を測定することによって行うことができる。さらに、リファレンスプレート118の高度は、マルチウェルプレートの底面31の高度を測定するために記述されたものと同じかまたは類似する走査および平均化方法により、センサ103を使用して測定される。センサとリファレンスプレート118との距離Rは、リファレンスプレートの48×13の高度行列の平均として計算することができる。1列が垂

50

直ステージ上を通過するときにはホーム位置から垂直ステージがあるべきホーム位置からの正確な絶対距離 Z を決定するため、列プロファイルの関数は、リファレンスプレート118からの測定によって訂正される。具体的には、距離 Z は

$$Z = S + - G$$

で与えられ、ただし S は、光学系をリファレンスプレートに接触させるための測定距離であり、 G は所望のギャップであって、リファレンスプレート測定値と、マルチウェルプレートの底面を測定したときに生成された測定値プロファイルとの差である。したがって列の輪郭プロファイルは、リファレンスプレート118の底面の位置付近で0になり、走査中に行われる垂直位置の訂正は、光学系の最上部とリファレンスプレート118の底面との既知の測定された絶対距離 S に関して行われる。

10

【0074】

ウェルのそれぞれの列の走査ごとに、光学系37の垂直方向の調整プロファイルを決したら、プロファイルを画定する情報を、プレート位置決めステージおよび垂直ステージを制御するコントロールにロードすることができる。高精度の位置制御は様々な方法で行うことができ、本発明での使用に適するいくつかの異なる製品が市販されている。簡単な一実施形態では、図15~17に示されるような計算された曲線から、各ウェル位置での正確な Z 変位を推定することができる。光学系の垂直位置は、各ウェルに隣接させて休止時間中に適切に調整することができる。別の有利な実施形態では、光学系が各列の長さを連続的に走査するとき、高さの補正が小さいステップで行われる。後者の実施形態では、Parker ControlsのCompumotor事業部からのモデル6K4移動コントローラでステージを制御することが適切であることが見出された。

20

【0075】

次に図20を参照すると、上述のモデル6K4コントローラを使用する場合、光学系が追跡する経路を画定するためにコントロールにダウンロードされたデータの量は、一連のセグメントを有する各ウェル列に沿ってプロファイルを画定することにより、最小限に抑えることができ、各セグメントは、(1)プレート位置決めステージの水平方向の移動量、(2)垂直ステージの垂直方向の移動量、および(3)セグメントの勾配によって画定されるものである。各セグメントに関する適切な値は、多項式フィットから48プロファイルまで得ることができる(図15~17参照)。第 i 番目のセグメントでは、垂直移動 Z_i が $Z_i - Z_{i-1}$ と計算される。第 i 番目のセグメントの開始点での勾配は、その前のセグメントの終点の勾配である。リードインおよびリードアウトと呼ばれる2つの追加のセグメントを、プロファイルの始まりおよび終わりにそれぞれ追加する。リードインおよびリードアウトセグメントは、水平方向の長さが0.5mmであり、両方ともその垂直方向の移動 Z が0である。リードインセグメントに関する勾配は、 Z_0 での初期プロファイル勾配である。リードアウトセグメントの場合、その勾配は0である。このダウンロードされた情報により、6K4コントローラは、各列の走査ごとにプロファイルを十分に追跡するのに必要な加速度や速度、距離などの移動に関する基準を計算する。

30

【0076】

したがって、72個のウェルを有する各列の走査は以下のように進行する。プレートを、第1のウェルの中心に隣接する出発点に位置決めする。光学系37は、上述の所望のギャップ G およびマルチウェルプレート/リファレンスプレート校正測定値に従い、垂直ステージ101によってホーム位置から距離 Z_0 だけ上に移動させる。次いでプレートを、その長さ方向に沿って列の終わりまで走査する。この走査中、光学系37をプロファイルに従って上昇させかつ/または降下させ、それによって、第1の列に沿って光学系37と底面31との距離を実質上一定に維持する。このプロセスを、3456ウェルプレート30の48列それぞれについて繰り返す。

40

【0077】

上述の方法および装置と、光学系37の高さをモニタするために設けられた第2のセンサ(図示せず)を使用して、光学系37の垂直位置を首尾良く調整してプレート30の底面31の様々に変化する高度を補償できることを、経験的に示すことができる。この実施例

50

では、図14のマップに関する上記の実施例で使用了なものと同じプレート30と、図15～17にそれぞれ示される第0列、23列、および47列の計算されたプロファイルとを使用した。第2のセンサは、上述の得られたプロファイルを使用してプレートを走査するときの、光学系37の高さの測定に使用した。次いでモニタリングセンサからのデータを、各列ごとのフィット済みプロファイルに重ね合せた。第0列、23列、および47列に関する結果を図15、16、および17にそれぞれ示す。光学系37の実際の移動は、所望のプロファイルにぴたりと一致することがわかる。

【0078】

プレート30のウェルの蛍光データの読取りの改善も実証された。まず、3456個のウェル全てに同量のフルオロセインが入っている3456ウェルプレートを、プレートの底面の様々な高度を補償する方法を使用せずに(すなわち光学系37の垂直方向の位置を調整せずに)走査した。第1の走査からのデータを図21に示す。変動係数(CV)が15%であることから明らかなように、データには、かなりのレベルのばらつきおよび分散がある。図22は、上述の補償方法を使用して同じプレートを走査した結果を示す。測定値のばらつきに著しい減少があり、CVは2.1%まで低下したことが明らかである。図23から図28までは、これらの個々の第0列、23列、および47列の走査に関する同様の比較を示す。これらの結果も、補償方法によってマルチウェルプレートから得られる測定値の質が著しく改善されることを証明している。

【0079】

底面31の高度のばらつきを補償しながらプレート30を読み取る第2の方法は、底面31の高度を検出し、マルチウェルプレート30のウェルの走査中に、光学系37の高さを調整することを含む。この方法によれば、センサ103は、光学系37に対するプレートの第1の移動方向において、光学系37の経路の前方に精密に位置付けられる。第2のセンサ(図示せず)は、第1の方向とは反対の第2の方向において、光学系37の経路の前方に位置付けられる。このように2個のセンサは、光学系がセンサの位置に到達する前に底面31の高度を測定することができ、図5に示すラスタ走査パターンでは、光学系37に対するプレート30の移動方向それぞれに対して1個のセンサが用いられる。走査パターンが追加の方向でのプレートの移動を含む場合、より多くのセンサを追加して、それらの方向に移動している間に底面31の高度を測定することができる。

【0080】

この構成では、プレートの特定の移動方向に適切なセンサによって、光学系37がその位置に到達するよりも決定可能な時間および/または距離だけ前に、底面31の高度が測定される。プロファイルが、上述のように列全体ではなくウェルの列に沿って1つまたは2～3のセグメントだけを含むことを除き、高度データは、上述のものに類似するプロファイルを計算するために使用される。このデータは、上述のものと同じかまたは類似する校正方法を使用して正規化され、次いで得られたデータはコントロールにロードされる。コントロールは、垂直ステージ101に対し、プロファイルに従って光学系37の高さを調整するよう信号を送り、それによって、底面31と光学系37との距離を実質上一定に維持する。この第2の方法では、上述の第1の方法の底面31の予備走査がない。

【0081】

本発明では、検出器とプレート底面との距離以外のプラットフォーム特性を検出し補償するための、その他の構成および方法が企図される。例えば、マルチウェルプレートのウェルの最上部、ウェルのそれぞれに入っている溶液の表面、または各ウェル内に位置付けられたマーカ、あるいはプレートの底面の透過率または厚さなどを検出するために、センサを設けることができる。次いでセンサからのデータを分析し処理して補償スキームを生成する。次いでスキャナのパラメータを、そのスキームに従って調整し、検出されたプラットフォームの特性を補償する。

【0082】

本発明では、広く様々なマルチウェルプレートのフォーマット、ならびに他のサンプル測定フォーマットを用いて、走査装置および方法を利用できることが企図される。例えばマ

10

20

30

40

50

マルチウェルプレートは、様々な設計およびフォーマットに順応させかつ構成することができる。蓋を備えまたは蓋がない状態で存在させることができる。一般に「マイクロプレート」と呼ばれるマルチウェルプレートは、何十年にもわたって一般的に使用されており、広く用いられてきたフォーマットは、96個のサンプルウェルを8×12の長方形の配列として有する成形プラスチックマルチウェルプレートである。典型的なウェル体積は、製造業者およびマルチウェルプレートのモデルによって200マイクロリットルまたは300マイクロリットルであるが、特定の用途には他の体積のものを利用でき、例えば、Whattman/Polyfiltronics 1998 Microplate Product Guide. Polyfiltronics Inc., 136 Weymouth Street, Rockland, Massachusetts 02370 USAを参照されたい。「Microplate 96-Well Standard」(MP96)と呼ばれる提案された規格は、Journal of Biomolecular Screening, Volume 1, Number 4, 1996に公表されたように、The Society for Biomolecular Screeningによって広められ、その開示を参照により本明細書に組み込む。規格の一般的な寸法要件を満たすマルチウェルプレートは、MP96-3である。本発明の利点の1つは、スキャナが、ウェル密度に関係なく、マルチウェルプレートのほとんどのフォーマットにも容易に適合できることである。

【0083】

マルチウェルプレートは、化学ライブラリの生成および貯蔵を含めた多くの種々のタイプの適用例に使用され、さらに、マルチウェルプレートは、例えばSchena(1996) Genome analysis with gene expression microarrays BioEssays 18 no 5 427~431; Johnson(1998)、Gene chips: Array of hope for understanding gene regulation Current Biology 8 R171~R174; Scholler他(1998) Optimization and automation of fluorescence-based DNA hybridization for high-throughput clone mapping Electrophoresis 19 504~508に記載されているように、発現分析またはゲノム分析に使用されるポリヌクレオチドの配列を保持するために使用することもできる。マルチウェルプレートは、Rapid Screening Method of Gene Amplification Products in Polypropylene Platesという名称の米国特許第5,545,528号に記載されるように、ポリメエラーゼ連鎖反応を使用した遺伝子増幅にも使用することもできる。このような蛍光をベースにしたマルチウェルプレートへの適用例が、本発明では適すると考えられる。

【0084】

高処理量分析の出現により、また小型化したフォーマットの使用が増加してきたことにより、1998年12月2日に公開されたLow Background Multi-Well Plates With Greater Than 864 Wells for Fluorescence Measurements of Biological and Biochemical Samplesという名称の出願番号PCT/US98/11061によって特定されるPCT特許出願に記載されるように、例えば384個、864個、3456個のウェルという、より高いフォーマットマルチウェルプレートの開発がなされてきた。例えば小型化したマイクロ流体デバイスを含むチップを使用して、さらに高い密度のサンプル処理システムが開発されている(例えば、Marshall(1998) Lab-on-a-Chip: Biotech's Next California Gold Rush R&D Magazine, 1998年11月、第38~43頁を参照されたい)。これらの小型化したマイクロ流体システムは、本発明の方法を使用した検出に容易に適應させることができる。

10

20

30

40

50

【0085】

別の実施形態では、システムは、例えば1980年8月5日にJohnsonに発行された米国特許第4,216,245号、1998年2月24日にTrollに発行された第5,721,435号、および1997年2月11日にGordon他に発行された第5,601,980号に記載されるように、培養基板上に分散された光プローブなど、サンプルの二次元配列を測定することができる。そのような手法により、多数の光プローブまたは多数のサンプルを、簡単で小型化した高処理量フォーマットで迅速にプロファイルすることができるようになる。

【0086】

本発明の別の態様では、生化学的な、細胞をベースとするアッセイなど、本明細書に開示した装置および方法と共に多くの種々のアッセイを使用することができる。蛍光プローブは、酵素、染料、蛍光タンパク質、および適切な条件化で蛍光信号を生成することができる任意のその他の部分に対する基質にすることができる。例えば、PCT出願PCT US 95/14692 (Tsien)、PCT出願PCT US 96/04059 (Tsien)、PCT出願PCT US 96/09652 (Tsien)、米国特許出願第08/680,877 (TsienおよびCubitt)、米国特許出願第08/706,408号 (Tsien)、および米国特許出願第09/301,525号に記載されているプローブを使用することができる。

【0087】

蛍光測定

蛍光染料や基質などの蛍光プローブと共に本発明の実施には種々のタイプの蛍光モニタリングシステムを使用できることが理解される。例えば96個やそれ以上のウェルを有するマイクロリットルプレートなど、高処理量スクリーニング専用のシステムを使用することが好ましい。蛍光材料のアッセイを行う方法は、当技術分野では周知であり、例えば、Lakowicz, J. R., Principles of Fluorescence Spectroscopy, New York: Plenum Press (1983); Herman, B., Resonance Energy Transfer Microscopy, in: Fluorescence Microscopy of Living Cells in Culture, Part B, Methods in Cell Biology, vol. 30, Taylor編, D. L. & Wang, Y. - L., San Diego: Academic Press (1989), pp. 219~243; Turro, N. J., Modern Molecular Photochemistry, Menlo Park: Benjamin/Cummings Publishing Co., Inc. (1978), pp. 296~361、およびMolecular Probe Catalog (1997)、OR, USAに記載されている。

【0088】

サンプル中の蛍光は、本明細書に記載する検出器またはマルチウェルプラットフォーム用として当技術分野で知られている検出器を使用して測定することができる。一般に、第1の波長を有する励起源からの励起放射は、励起光学系を通過する。励起光学系により、励起放射はサンプルを励起する。それに応答して、サンプル中の蛍光プローブは、励起波長とは異なる波長を有する放射線を放射する。次いで収集光学系が、サンプルからの放射を収集する。この装置は、サンプルが走査されている間、サンプルを特定の温度に維持するために、温度コントローラを含むことができる。一実施形態によれば、種々のウェルが露光されるように位置決めするため、多軸並進ステージ(例えば専用のX、Yポジション)が、複数のサンプルを保持するマルチウェルプラットフォームを移動させる。多軸並進ステージ、温度コントローラ、オートフォーカスフィーチャ、画像形成およびデータ収集に関連する電子部品は、適切にプログラミングサレタデジタルコンピュータによって管理することができる。コンピュータは、アッセイ中に収集されたデータを、表示のために別のフォーマットに変換することもできる。

10

20

30

40

50

【0089】

サンプル（細胞または生化学的な）中のプローブをモニタする方法として、FRET（蛍光共鳴エネルギー伝達）を使用することが好ましい。FRETの程度は、励起された構成物の任意のスペクトルまたは蛍光の寿命特性によって決定することができ、例えば、供与体からの蛍光信号の強度、受容体からの蛍光信号の強度、受容体の放射の最大値付近の蛍光振幅と供与体の放射の最大値付近の蛍光振幅との比、または供与体の励起状態の寿命を決定することによって、決定することができる。例えば、リンカーの開裂によって、供与体からの蛍光の強度が増大し、受容体からの蛍光の強度が低下し、受容体からの蛍光振幅と供与体からの蛍光振幅との比が小さくなり、供与体の励起状態寿命が長くなる。

【0090】

信号の変化は、2つの異なる放射波長での蛍光の比として決定することが好ましく、このプロセスは「比率化（ratioing）」と呼ばれる。アドレス可能なウェル同士でのプローブ（または基質）、細胞、励起強度、および濁度またはその他のバックグラウンド吸光度の絶対量の差は、蛍光信号に影響を及ぼす可能性がある。したがって2つの放射強度の比は、ただ1つの放射強度よりも強く活性の好ましい測定基準である。

【0091】

本発明では、比率測定蛍光プローブシステムを使用することができる。例えばPCT公開WO96/30540（TsienおよびZlokarnik）に記載されているレポーター（reporter）システムは、遺伝子発現分析に関する既存のレポーター（reporter）に優る相当な利点を有しており、感度の高い検出と、発現している単一の生体細胞および発現していない単一の生体細胞の両方の分離が可能になる。このアッセイシステムは、細胞内に容易に取り込まれて捕捉される無毒性で非極性の蛍光基質を使用する。ペニシリナーゼによって蛍光基質が開裂すると、基質が産物に変換されるにつれて、蛍光放射シフトが生じる。ペニシリナーゼレポーター（reporter）の読出しは比率測定によるので、これは、個々の細胞内に取り込まれる基質の量などの変数を制御するという点で、レポーター（reporter）遺伝子アッセイの中では独特のものである。安定で容易に検出される細胞内読出しでは、洗浄ステップの必要性を無くすことによってアッセイ手順が簡単になり、したがって本発明を使用した細胞に関するスクリーニングの小型化が容易になる。

【0092】

サンプル中の分析物の存在を検出するための方法

本発明の方法は、標的の活性を変調させるのに有用な化学物質など、サンプル中の分析物の存在を検出するための標的を使用する。一般に、以下に論じるように、標的は、細胞表面タンパク質や酵素などの、タンパク質でよい。生物学的プロセスまたは標的は、生化学的アッセイ（細胞を含まない標的）または細胞ベースのアッセイ（細胞に関連するアッセイ）によって、分析することができる。この方法は、サンプル中の生物学的プロセスまたは標的のモジュレーター（modulator）の同定にも使用することができる。この方法は、サンプルから放射された光を検出することによって、本発明の装置および走査方法の使用の存在を検出する。この方法は、第1の波長の放射線で少なくとも1つのサンプルを励起させるステップを含み、この場合、分析物を含有すると推測される少なくとも1つのサンプルが本発明のマルチウェルプラットフォームの少なくとも1つのウェルに入っており、生物学的プロセスまたは標的を含有する可能性があるものである。サンプルおよび生物学的プロセスまたは標的は、ウェル内でまたはウェルの外側で接触させることができ、また後でウェル内に入れることができる。サンプルから放射された第2の波長の放射線の放射を測定するが、測定された第2の波長の放射線の量は、サンプル中に分析物が存在するか否かを示している。

【0093】

標的は細胞でよく、この細胞には、イオンまたは電圧感受性のカルシウムチャネルやN-メチル-D-アスパラギン酸（NMDA）受容体、GABA受容体、カイニン酸/AMPA受容体、ニコチン性アセチルコリン受容体、ナトリウムチャネル、カルシウムチャネル

10

20

30

40

50

、カリウムチャンネル興奮性アミノ酸 (EAA) 受容体、ニコチン酸アセチルコリン受容体など、受容体またはイオンチャンネルの活性を報告させるために、染料を加えてもよい。このような受容体の活性を決定するためのアッセイは、試験される化学物質の活性を評価する負の対照または正の対照として使用するために、作動薬および拮抗薬を使用することもできる。受容体またはイオンチャンネルの機能を変調させる能力を有する化学物質を同定するための (例えば作動薬や拮抗薬) 自動アッセイの好ましい実施形態では、細胞質のイオンレベルまたは膜電位の変化が、イオン感受性インジケータまたは膜電位蛍光インジケータをそれぞれ使用してモニタされる。イオン感受性インジケータおよび電位プローブの中でも、参照により本明細書に組み込まれる *Molecular Probes 1997 Catalog* に開示されているものを使用することができる。

10

【0094】

本発明の別の方法は、レセプトルシンの活性および試験化学物質の存在を決定することに関する。受容体の活性化によって、一般に、カルシウムイオンまたは第2メッセンジャーという細胞内貯蔵物の放出など、後続の細胞内での事象が開始される。若干のGタンパク質結合受容体 (GPCR) が活性化すると、ホスホリパーゼCで媒介されるホスファチジルイノシトール4,5-ビスリン酸の加水分解 (BerridgeおよびIrvine (1984)、*Nature* 312:315~21) によって、イノシトール3リン酸の形成が刺激される (IP₃, Gタンパク質結合受容体第2メッセンジャー)。IP₃は、細胞内カルシウム貯蔵物の放出を刺激する。したがって、細胞内貯蔵物からのカルシウムイオンの放出によって引き起こされた細胞質カルシウムイオンレベルの変化を使用して、Gタンパク質結合受容体の機能を確実に決定することができる。Gタンパク質結合受容体には、ムスカリン性アセチルコリン受容体 (mAChR)、アドレナリン受容体、セロトニン受容体、ドーパミン受容体、アンギオテンシン受容体、アデノシン受容体、ブラジキニン受容体、メタボトロピック興奮性アミノ酸受容体などがある。そのようなGタンパク質結合受容体を発現する細胞は、細胞内貯蔵物から寄与されかつ原形質膜イオンチャンネルの活性を介して寄与がなされた結果、増大した細胞質カルシウムレベルを示すと考えられるが、この場合、そのようなアッセイは、カルシウム放出から得られた蛍光応答と内部貯蔵物とを区別するために、カルシウムを含有せずかつ任意選択でEGTAなどのキレート剤が補われた緩衝液中で実行することが、必ずしも必要ではないが望ましいと考えられる。

20

【0095】

その他のアッセイは、受容体の活性の決定を含むことができ、この受容体は、活性化するとき細胞内環状ヌクレオチド、例えばcAMPやcGMPのレベルに変化をもたらすものである。例えば、若干のドーパミン、セロトニン、メタボトロピックグルタミン受容体およびムスカリン性受容体の活性化によって、細胞質のcAMPまたはcGMPレベルが低下する。さらに、環状ヌクレオチドによってゲートされたイオンチャンネル、例えばロッド光受容体細胞チャンネルや嗅覚ニューロンチャンネル (Altenhofen, W. 他 (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88:9868~9872 および Dhallan 他 (1990) *Nature* 347:184~187 参照) であって、cAMPまたはcGMPの結合による活性化の際にカチオンに対して浸透性を有するものがある。受容体の活性化によって環状ヌクレオチドのレベルが低下する場合、アッセイ中、細胞に受容体活性化化合物を添加する前に、例えばフォルスコリンなど細胞内環状ヌクレオチドのレベルを増大させる薬剤に細胞を曝すことが好ましいと考えられる。このタイプのアッセイに用いられる細胞は、環状ヌクレオチドでゲートされたイオンチャンネルをエンコードするDNAおよび受容体 (例えばある特定のメタボトロピックグルタミン酸受容体、ムスカリン性アセチルコリン受容体、ドーパミン受容体、セロトニン受容体など) をエンコードするDNAであって、活性化するとき細胞質の環状ヌクレオチドのレベルを変化させるものを用いた宿主細胞のコトランスフェクションによって、形成することができる。

30

40

【0096】

細胞アッセイでの測定に十分な量でタンパク質標的を発現するどのような細胞も、本発明

50

で使用することができる。タンパク質を内生的に発現する細胞は、異種核酸からタンパク質を発現する細胞と同様に作用させることができる。例えば細胞は、当業者に知られているかまたは当業者が同定することのできる1つまたは複数のそのような標的をエンコードする適切なベクターでトランスフェクトすることができる。本質的に、内因性イオンチャネルまたは受容体活性を発現するどのような細胞も使用することができるが、標的として受容体またはチャネルを使用する場合、主として1種類のイオンチャネルまたは受容体が発現するように、そのようなイオンチャネルおよび/または受容体をエンコードする異種DNAで形質転換されまたはトランスフェクトされた細胞を使用することが好ましい。異種細胞表面タンパク質が発現するように遺伝子操作することができる、多くの細胞が知られている。そのような細胞には、生まれて間もないハムスタの腎臓(BHK)細胞(ATCC No. CCL10)、マウスL細胞(ATCC No. CCL1.3)、ジャーカット(ATCC No. TIB 152)および153 DG44細胞(Chasin(1986) Cell. Molec. Genet. 12:555参照)ヒト胎児腎臓(HEK)細胞(ATCC No. CRL1573)、チャイニーズハムスタ卵巣(CHD)細胞(ACTT No. CRK9618、CCL61、CRL9096)、PC12細胞(ACTT No. CRL17.21およびCOS-7細胞(ATCC No. CRL1651)が含まれるが、これらに限定されない。異種細胞表面タンパク質発現に好ましい細胞は、容易にかつ効果的にトランスフェクトすることができるものである。好ましい細胞には、米国特許第5,024,939号およびStillman他(1985) Mol. Cell. Biol. 5:2051~2060に記載されているような、ジャーカット細胞およびHEK293細胞が含まれる。

10

20

【0097】

例示的な膜タンパク質には、表面受容体およびイオンチャネルが含まれるが、これらに限定されない。表面受容体には、ムスカリン性受容体、例えばヒトM2(GenBank受入れ#M16404);ラットM3(GenBank受入れ#M16407);ヒトM4(GenBank受入れ#M16405);ヒトM5(Bonner他、(1988) Neuron 1、pp.403~410)などが含まれるがこれらに限定されない。ニューロンニコチン性アセチルコリン受容体には、例えばUSSN 504,455(1990年4月3日出願、これによりその全体を、参照により本明細書に特別に組み込む)開示されているヒト₂、₃、および₂、サブタイプ;ヒト₅サブタイプ(Chini他(1992) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89:1572~1576)、ラット₂サブユニット(Wada他(1988) Science 240、pp.330~334);ラット₃サブユニット(Boulter他(1986) Nature 319、pp.368~374);ラット₄サブユニット(Goldman他(1987) Cell 48、pp.965~973);ラット₅サブユニット(Boulter他(1990) J. Biol. Chem. 265、pp.4472~4482);ニワトリ₇サブユニット(Couturier他(1990) Neuron 5:847~856);ラット₂サブユニット(Deneris他(1988) Neuron 1、pp.45~54)ラット₃サブユニット(Deneris他(1989) J. Biol. Chem. 264、pp.6268~6272);ラット₄サブユニット(Duvoisin他(1989) Neuron 3、pp.487~496);ラットサブユニット、サブユニット、およびpサブユニットの組合せ;GABA受容体、例えばウシnおよびpサブユニット(Schofield他(1987) Nature 328、pp.221~227);ウシn、およびa、サブユニット(Levitan他(1988) Nature 335、pp.76~79);サブユニット(Pritchett他(1989) Nature 338、pp.582~585);p、およびp、サブユニット(Yrmer他(1989) EMBO J. 8、pp.1665~1670);6サブユニット(Shivers, B.D.(1989) Neuron 3、pp.327~337)などが含まれるが、これらに限定されない。グルタミン受容体には、例えばラットGluR1受容体(Hollman他(1989) Nature 342、p

30

40

50

p. 643~648); ラットGluR2およびGluR3受容体(Boulter他(1990) Science 249:1033~1037; ラットGluR4受容体(Keinanen他(1990) Science 249:556~560); ラットGluR5受容体(Bettler他(1990) Neuron 5:583~595) ラットGluR6受容体(Egebjerg他(1991) Nature 351:745~748); ラットGluR7受容体(Bettler他(1992) neuron 8:257~265); ラットNMDAR1受容体(Moriyoshi他(1991) Nature 354:31~37およびSugihara他(1992) Biochem. Biophys. Res. Comm. 185:826~832); マウスNMDAR1受容体(Meguro他(1992) Nature 357:70~74); ラットNMDAR2A、NMDAR2B、およびNMDAR2C受容体(Monyer他(1992) Science 256:1217~1221); ラットメタボトロピックmGluR1受容体(Houamed他(1991) Science 252:1381~1321); ラットメタボトロピックmGluR2、mGluR3、およびmGluR4受容体(Tanabe他(1992) Neuron 8:169~179); ラットメタボトロピックmGluR5受容体(Abe他(1992) J. Biol. Chem. 267:13361~13368)などが含まれるがこれらに限定されない。アドレナリン授与津アイには、例えばヒトpl(Frielle他(1987) Proc. Natl. Acad. Sci. 84, pp. 7920~7942); ヒト₂(Kobilka他(1987) Science 238, pp. 650~656); ハムスタ₂(Dixon他(1986) Nature 321, pp. 75~79)などが含まれるがこれらに限定されない。ドーパミン受容体には、例えばヒトD2(Stormann他(1990) Mol. Pharm. 37, pp. 1~6); 哺乳動物ドーパミンD2受容体(米国特許第5,128,254号); ラット(Bunzow他(1988) Nature 336, pp. 783~787)などが含まれるがこれらに限定されない。NGF受容体には、例えばヒトNGF受容体(Johnson他(1986) Cell 47, pp. 545~554)などが含まれるがこれらに限定されない。セロトニン受容体には、例えばヒト5HT1a(Kobilka他(1987) Nature 329, pp. 75~79); セロトニン5HT1C受容体(米国特許第4,985,352号); ヒト5HT1D(米国特許第5,155,218号); ラット5HT2(Julius他(1990) PNAS 87, pp. 928~932); ラット5HT1c(Julius他(1998) Science 241, pp. 558~564)などが含まれるがこれらに限定されない。

【0098】

イオンチャネルには、本願の所有者により1991年8月15日および1992年4月10日にそれぞれ出願された米国出願第07/745,206号および第07/868,354号であってその内容が参照により本明細書に組み込まれたものに開示されている、ヒトカルシウムチャネル₂ および/または サブユニットからなるカルシウムチャネル; (WO89/09834; ヒトニューロン₂サブユニットも参照されたい); ウサギ骨格筋a1サブユニット(Tanabe他(1987) Nature 328, pp. 313~E318); ウサギ骨格筋₂サブユニット(Ellis他(1988) Science 241, pp. 1661~1664); ウサギ骨格筋pサブユニット(Ruth他(1989) Science 245, pp. 1115~1118); ウサギ骨格筋サブユニット(Jay他(1990) Science 248, pp. 490~492)などが含まれるがこれらに限定されない。カリウムイオンチャネルには、例えばラット脳(BK2)(McKinnon, D.(1989) J. Biol. Chem. 264, pp. 9230~8236); マウス脳(BK1)(Tempel他(1988) Nature 332, pp. 837~839)などが含まれるがこれらに限定されない。ナトリウムイオンチャネルには、例えばラット脳IおよびII(Noda他(1986) Nature 320, pp. 188~192); ラット脳III(Kayano他(1988

) F E B S L e t t . 2 2 8、 p p . 1 8 7 ~ 1 . 9 4) ; ヒト I I (A C T T N o . 5 9 7 4 2、 5 9 7 4 3 および G e n o m i c s 5 : 2 0 4 ~ 2 0 8 (1 9 8 9) ; 塩化物イオンチャネル (T h i e m a n n 他 (1 9 9 2)、 N a t u r e 3 5 6、 p p . 5 7 ~ 6 0 および P a u l m i c h l 他 (1 9 9 2) N a t u r e 3 5 6、 p p . 2 3 8 ~ 2 4 1)、 および当技術分野で知られているかまたは開発されたその他ものが含まれるがこれらに限定されない。

【 0 0 9 9 】

細胞内受容体は、本発明において、エストロゲン受容体やグルココルチコイド受容体、アンドロゲン受容体、プロゲステロン受容体、ミネラルコルチコイド受容体など、標的として使用することもできる。転写因子およびキナーゼも、植物標的と同様に、標的として使用することができる。

10

【 0 1 0 0 】

イオンチャネル (P C T 公開 W O 9 3 / 1 3 4 2 3) および細胞内受容体 (P C T 公開 W O 9 6 / 4 1 0 1 3、 米国特許第 5, 5 4 8, 0 6 3 号、 米国特許第 5, 1 7 1, 6 7 1 号、 米国特許第 5, 2 7 4, 0 7 7 号、 米国特許第 4, 9 8 1、 7 8 4 号、 E P 0 5 4 0 0 6 5 A 1、 米国特許第 5, 0 7 1, 7 7 3 号、 および米国特許第 5, 2 9 8, 4 2 9 号) も含め、標的に関する化学物質の活性を確認する様々な方法を利用することができる。前述の参考文献の全ては、そのまま参照により本明細書に組み込む。

【 0 1 0 1 】

分析物がサンプル中に存在する場合、標的からの蛍光は増大または弱くなる。そのような蛍光は、本発明の方法を使用して検出ことができ、サンプル中の蛍光レポーター (r e p o r t e r) を励起する第 1 の波長の放射線でサンプルを励起し、そこから第 2 の波長の放射線を放射させ、それを検出する。放射の量を測定し、適正な対照またはバックグラウンド値と比較する。放射された放射線の量、すなわちバックグラウンドおよび対照レベルとは異なって増大または減少した量は、サンプル中の分析物の量または効力と相関する。標準的な曲線は、アッセイがより定量的に行われるように決定することができる。

20

【 0 1 0 2 】

治療薬物の治療活性および毒性の試験

本発明は、治療薬物に関し、治療活性および毒性の試験をする方法も提供する。治療薬物は、生物学的プロセスまたは標的の変調活性を有すると推測される試験化学物質を、本発明の装置および方法を利用して生物学的プロセスまたは標的に接触させることにより、同定する。サンプルがモジュレーター (m o d u l a t o r) を含有する場合、細胞の内側または外側などサンプル中の蛍光レポーター (r e p o r t e r) 産物の量は、バックグラウンドまたは対照レベルに対して増加または減少する。蛍光レポーター (r e p o r t e r) 産物の量は、蛍光レポーター (r e p o r t e r) 産物を適切な放射線または第 1 の波長で励起し、前記サンプルから放射された第 2 の波長の放射線の放射を測定することによって、測定される。放射の量を、放射のバックグラウンドまたは対照レベルと比較する。試験化学物質を有するサンプルが、対照またはバックグラウンドレベルの場合よりも増大または減少した放射を示す場合、候補モジュレーター (m o d u l a t o r) が確認されている。放射の量は、サンプル中の治療薬物の量または効力に関係する。そのような放射はたとえば T s i e n (P C T / U S 9 0 / 0 4 0 5 9) に記載されている。その候補モジュレーター (m o d u l a t o r) は、周知の方法を使用して、さらに特徴付け、構造、効力、毒性、および薬理的性質をモニタすることができる。

30

40

【 0 1 0 3 】

本発明によって同定された候補モジュレーター (m o d u l a t o r) の構造は、分光法など当技術分野で知られている方法により決定または確認することができる。長期間にわたって貯蔵される推定上のモジュレーター (m o d u l a t o r) について、その推定上のモジュレーター (m o d u l a t o r) の構造、活性、および効力を確認することができる。

50

【0104】

候補モジュレータ(modulator)の同定に使用されるシステム応じ、その候補モジュレータ(modulator)は、推定される薬理的活性を有することになる。例えば、候補モジュレータ(modulator)がT細胞の*in vitro*増殖(活性化)を阻害することがわかった場合、候補モジュレータ(modulator)は、免疫抑制薬または抗炎症薬として推定される薬理的性質を有すると考えられる(Suthanthiran他、Am. J. Kidney Disease、28:159~172(1996)参照)。そのような関連性は、いくつかの疾病状態の分野では知られており、今後より多くのことが発見されることが期待されている。そのような関連性に基づき、薬理的活性、ならびに毒性の、適切な確認*in vitro*および*in vivo*モデルを選択することができる。本明細書に記載する方法を使用して、薬理的選択性および特異性、および毒性を評価することもできる。

10

【0105】

候補モジュレータ(modulator)の毒性

候補モジュレータ(modulator)を同定したら、その候補モジュレータ(modulator)について毒物学的プロファイリングを評価することができるが、これは本願の譲受人に譲受された米国出願第09/301,525号に記載されているように、例えばシトクロムP450酵素による代謝の容易さの分析を介して、例えば蛍光シトクロムP450基質を使用して行われる。

【0106】

シトクロムP450酵素(CYP450)ファミリーは、疎水性薬剤、発癌物質、および血液中を循環するその他の可能性ある毒性化合物および代謝物の、生体異物代謝に関与するオキシゲナーゼ酵素を含む。肝臓は、生体異物代謝に関する主要な器官であり、最も重要なCYP450混合機能オキシゲナーゼを高レベルで含有することが知られている。非常に数多くのヒトP450酵素サブファミリーがあり、しばしば「アイソザイム」または「アイソフォーム」と呼ばれる。CYP3A4、CYP2D6、CYP2C、CYP2A1、およびCYP2E1サブファミリーのアイソザイムまたはアイソフォームは、薬剤代謝において重要であることが知られている。例えばMurray, M.、23 Clin. Pharmacokinetics 132~46(1992)を参照されたい。これらのアイソフォームの中で、CYP3A4は、これまで肝臓内および小腸内の主要なアイソフォームであり、それぞれ、それらの組織内の全CYP450タンパク質の30%および70%を含んでいる。主に*in vitro*研究に基づき、ヒトに使用される全薬剤の40%から50%の代謝には、CYP3A4触媒作用による酸化が伴うと推定された。Thummel, K. E. & Wilkinson, G. R.、In Vitro and In Vivo Drug Interactions Involving Human CYP3A、38 Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.、389~430(1998)を参照されたい。

20

30

【0107】

CYP450酵素による候補薬剤の効率的な代謝が行われると、薬物動態学的性質が不十分になる可能性があり、一方、効力の高いCYP450酵素の阻害剤として作用する薬剤候補は、同じCYP450と相互に作用する別の薬剤と共に投与した場合、薬剤と薬剤との望ましくない相互作用を引き起こす可能性がある。例えばPeck, C. C.他、Understanding Consequences of Concurrent Therapies、269 JAMA 1550~52(1993)を参照されたい。したがって、候補薬剤がCYP450と相互に作用する(すなわちCYP450の基質または阻害剤である)ことを示す、早くかつ信頼性ある指標があると、医薬品の研究開発の発見サイクルを大きく短縮することができ、そのため候補薬剤を市場に出すのに必要とされる時間を短縮することができる。結果的に、そのようなより早く利用できる信頼性あるCYP450薬物動態情報によって、薬剤開発コストを大きく削減することができ、かつ/またはより早く市場に参入できることによる利益が増大する。さらに、そのようなより早

40

50

く利用できる信頼性あるCYP450薬物動態情報によって、候補薬剤は、これまで実現可能であったコストよりも低いコストで、公の場により早く出すことが可能になる。したがって、ヒトにおける薬剤相互作用の大規模な薬物動態研究は、最近、医薬品としての薬剤開発および安全性評価プロセスに欠かせない部分になっている。例えばParkinson, A., 24 Toxicological Pathology 45~57 (1996)を参照されたい。本発明は、(1)薬剤発見プロセスにおいて現在可能であるよりも早い時期に、薬剤候補のCYP450酵素との相互作用に関するより迅速な情報収集を提供し、したがって(2)さらなる開発努力から不適切な化合物および化学物質の系列をより早くなくすことが可能になる。

【0108】

さらに、候補モジュレータ(modulator)を同定したら、その候補モジュレータ(modulator)に関し、既知の方法(Lu, Basic Toxicology, Fundamentals, Target Organs, and Risk Assessment, Hemisphere Publishing Corp., Washington (1985); Culbrethの米国特許第5,196,313号(1993年3月23日に発行)およびBenetの米国特許第5,567,952号(1996年10月22日に発行)参照)を使用して、毒物学的作用を評価することができる。例えば、候補モジュレータ(modulator)の毒物学は、哺乳動物などの細胞系、すなわちヒトの細胞系に対するin vitro毒性を決定することによって確立できる。候補モジュレータ(modulator)は、例えばマイクロソーム製剤など、肝臓の製剤などの組織抽出物で処理し、それによって、器官全体で代謝された後の化学物質の毒物学的性質の増減を決定することができる。これらのタイプの研究の結果は、ヒトも含めた哺乳動物などの動物内の化学物質の毒物学的性質をしばしば予測する。

【0109】

あるいは、またはこれらのin vitro研究に加え、マウスやラット、ウサギ、サルなどの動物モデル内の候補モジュレータ(modulator)の毒物学的性質を、確立された方法を使用して決定することができる(Lu、上記文献(1985);およびCreasey, Drug Disposition in Humans, The Basis of Clinical Pharmacology, Oxford University Press, Oxford (1979)参照)。候補モジュレータ(modulator)の毒性、標的器官、組織、座、および推定メカニズムに応じ、当業者は、適切な用量、LD₅₀値、投与経路、および候補モジュレータ(modulator)の毒物学的性質を決定するのに適切と考えられるレジームを決定する責任を負わない。動物モデルに加え、米国食品医薬品局(USFDA)または同等のその他の政府機関によって示され手順など、確立された手順に従って、ヒトの臨床試験を行うことができる。これらの毒性研究は、in vivoで候補モジュレータ(modulator)の効力を決定するための基礎を提供する。

【0110】

候補モジュレータ(modulator)の効力

候補モジュレータ(modulator)の効力は、in vitro方法、動物モデル、ヒト臨床試験など、いくつかの当技術分野で認められている方法を使用して確立することができる(Creasey、上記文献(1979)参照)。認められているin vitroモデルは、いくつかの疾病または状態に関して存在する。例えば、HIV感染細胞の寿命をin vitroで延ばすという化学物質の能力は、HIV感染またはAIDSに効き目があると予想される化学物質の同定に許容可能なモデルとしてみとめられる(Daluge他、Antimicro. Agents Chemother. 41:1082~1093(1995)参照)。さらに、T細胞のin vitro増殖を防止するというサイクロスポリンA(CsA)の能力は、免疫抑制剤としての効き目があると予想される化学物質の同定に許容可能なモデルとして確立されている(Shthanthiran他、上記文献(1996)参照)。ほぼどのクラスの治療、疾病、または状態にも、許

10

20

30

40

50

容可能な *in vitro* または動物モデルが利用可能である。そのようなモデルは、例えば胃腸障害、癌、心臓学、神経生物学、および免疫学に関して存在する。さらに、これらの *in vitro* 方法は、ミクロソーム製剤など、肝臓の製剤などの組織抽出物を使用して、候補モジュレータ (*modulator*) に対する代謝の影響の信頼性ある指標を提供することができる。同様に、許容可能な動物モデルを使用して、様々な疾病または状態を治療する化学物質の効力を確立することができる。例えばウサギの膝は、化学物質の関節炎を治療する効力を試験するために許容されるモデルである (Shaw および Lacy, *J. Bone Joint Surg. (Br)* 55:197~205 (1973) 参照)。関節炎を治療するためにヒトに使用することが認められたヒドロコルチゾンは、このモデルで効き目があり、このモデルの有効性が確認される (McDonough, *Phys. Ther.* 62:835~839 (1982) 参照)。候補モジュレータ (*modulator*) の効力を決定する適切なモデルを選択するとき、当業者は、現況技術によって、適切なモデル、用量、および投与経路、レジーム、および終点を選択するよう導かれ、したがって過度に負担を強いられることがない。

10

【0111】

動物モデルの他、ヒト臨床試験を使用して、ヒトの候補モジュレータ (*modulator*) の効力を決定することができる。USFDA または同等の政府機関は、そのような研究に関する手順を確立している。

【0112】

候補モジュレータ (*modulator*) の選択性

20

上述の *in vitro* および *in vivo* 方法は、候補モジュレータ (*modulator*) の選択性も確立する。化学物質は、広く様々な生物学的プロセスを変調することができ、または選択性を有するものであることが確認される。本発明に基づく細胞のパネルを使用して、候補モジュレータ (*modulator*) の特異性を決定することができる。選択性は、例えば化学療法の分野で明らかであり、その場合、癌細胞に対しては毒性を示す癌細胞ではないものに対しては毒性を示さないという化学物質の選択性が、明らかに望ましい。選択性モジュレータ (*modulator*) は、薬が使用される状況で副作用がより少ないので好ましい。候補モジュレータ (*modulator*) の選択性は、毒性と、様々な細胞経路および感受性を示す複数の細胞系に候補モジュレータ (*modulator*) が及ぼす影響とを試験することによって、*in vitro* で確立することができる。これらの *in vitro* 毒性研究から得られたデータは、候補モジュレータ (*modulator*) の毒性、効力、および選択性を決定する、ヒト臨床試験も含めた広範な動物モデル研究にすることができる。

30

【0113】

同定された組成物

本発明は、本明細書に記載された方法、システム、または構成要素の操作によって活性を有することが確認された、新規な化学物質や治療薬物などの組成物を含む。本明細書で使用する新規な化学物質は、本願の出願日現在、すでに当技術分野で公に知られている化学物質を含まない。一般に、化学物質は、本発明を使用することによって活性を有することが確認され、次いでその構造が、化学構造の専有データベースから明らかにされ、または質量分光分析などの分析技法を使用して決定される。

40

【0114】

本発明の一実施形態は、上述の方法によって同定された化学物質を含む、有用な活性を有する化学物質である。そのような組成物は、小さい有機分子、核酸、ペプチド、および当技術分野で利用可能であり将来開発される技法によって容易に合成されるその他の分子を含む。例えば、以下のコンビナトリアルな化合物は、スクリーニングに適している：ペプチド (PCT 公開 No. WO 91/19735、1991年12月26日)、エンコードされたペプチド (PCT 公開 No. WO 93/20242、1993年10月14日)、ランダムバイオオリゴマー (PCT 公開 WO 92/00091、1992年、1月9日)、ベンゾジアゼピン (米国特許第 5,288,514 号)、ヒダントインやベンゾジア

50

ゼピン、ジペプチドなどのデバースマー (Hobbs DeWitt, S. 他、Proc. Nat. Acad. Sci. USA 90: 6909~6913 (1993))、ピロロゴスポリペプチド (Hagihara 他、J. Amer. Chem. Soc. 114: 6568 (1992))、 β -D-グルコース骨格を有するノンペプチダルペプチドミメティクス (Hirschmann, R. 他、J. Amer. Chem. Soc. 114: 9217~9218 (1992))、小さい化合物ライブラリの類似有機合成 (Chen, C. 他、J. Amer. Chem. Soc. 116: 2661 (1994))、オリゴカルバメート (Cho, C. Y. 他、Science 261: 1303 (1993))、および/またはペプチジルホスホネート (Cambell, D. A. 他、J. Org. Chem. 59: 658 (1994))。一般に、Gordon, E. M. 他、J. Med. Chem. 37: 1385 (1994) を参照されたい。前述の刊行物の全ての内容を、参照により本明細書に組み込む。

10

【0115】

本発明は、貯蔵およびその後の投与のために調製された医薬品として許容されるキャリアを含む医薬品組成物中の、同定された組成物も包含し、これは、医薬品として許容されるキャリアまたは希釈剤中に、上記開示された医薬品として有効な量の産物を有するものである。治療用として許容されるキャリアまたは希釈剤は、医薬品の技術分野では周知であり、例えば、Remington's Pharmaceutical Science、Mack Publishing Co. (A. R. Gennaro 編、1985) に記載されている。保存剤、安定剤、染料、および着香剤でさえも、医薬品組成物に加えることができる。例えば、安息香酸ナトリウム、ソルビン酸、および p-ヒドロキシ安息香酸のエステルを、保存剤として添加することができる。さらに、酸化防止剤および懸濁剤を使用することができる。

20

【0116】

本発明の組成物は、例えば経口投与向けの錠剤、カプセル、またはエリクシルとして；直腸投与向けの坐薬として；注射投与向けの滅菌溶液、懸濁液として、処方し使用することができる。注射可能なものは、溶液または懸濁液として、注射前の溶液または懸濁液に適する固体の形として、あるいはエマルジョンとして、従来の形で調製することができる。適切な賦形剤は、例えば、水、塩類溶液、デキストロース、マンニトール、ラクトース、レシチン、アルブミン、グルタミン酸ナトリウム、システイン塩酸塩などである。さらに、望ましい場合、注射可能な医薬品組成物は、湿潤剤や pH 緩衝剤など、少量の無毒性補助物質を含有することができる。望むなら、吸収を高める製剤 (例えばリポソーム) を利用することができる。

30

【0117】

1回の用量として必要とされる医薬品として有効な組成物は、投与経路、治療する動物のタイプ、考慮中の特定の動物の物理的性質によって様々である。用量は、所望の効果が得られるように調整することができるが、重量、食餌、並行して行われる薬物療法などの因子や、医療分野の当業者が認識するその他の因子によって様々になる。本発明の方法を実施する際、産物および組成物は、単独で、または互いに組合せて、あるいは他の治療用または診断用薬剤と組合せて使用することができる。これらの産物は、*in vivo* で、通常は哺乳動物に、好ましくはヒトに、あるいは *in vitro* で利用することができる。それらを *in vivo* で使用する場合、産物または組成物は、様々な剤型を使用し、非経口、静脈、皮下、筋肉内、結腸、直腸、鼻腔、または腹腔内投与も含めた様々な方法で、哺乳動物に投与することができる。そのような方法は、化学物質活性の *in vivo* 試験に利用することもできる。

40

【0118】

当業者に容易に明らかにされるように、投与される有用な *in vivo* 用量および特定の投与形態は、年齢、体重、および治療する哺乳類の種、使用される特定の化合物、およびこれらの化合物が使用される特定の用途によって、様々に異なる。有効な投薬レベル、すなわち所望の結果を得るのに必要な投薬レベルは、定常的な薬理学的方法を使用して当

50

業者により実現することができる。一般に、ヒト臨床試験での産物の施与は、より低い投薬レベルで開始され、所望の効果が得られるまで投薬レベルを増大させる。あるいは、確立された薬理学的方法を使用して本発明の方法により同定された組成物の有用な用量および投与経路を確立するために、許容可能な *in vitro* 研究を使用することができる。

【0119】

ヒトではない動物の研究では、効力のある産物の施与がより高い投薬レベルで開始され、所望の効果がもはや得られなくなるまで、または有害な副作用が消えるまで、投薬量を減少させる。本発明の産物の投薬量は、所望の影響および治療の適応に応じて広い範囲に及んでよい。一般に投薬量は、約 10 mg / kg から 100 mg / kg 体重の間でよく、好ましくは約 100 g / kg から 10 mg / kg 体重である。投与は、経口で毎日行われることが好ましい。

10

【0120】

正確な処方、投与経路、および投薬量は、患者の状態を考慮して、それぞれの医師によって選択することができる。(例えば *Fingl* 他、*The Pharmacological Basis of Therapeutics*、1975 中を参照)。主治医は、毒性または器官の機能不全に起因して、投与をどのように、いつ終了し、中断し、または調整するかを知っていることに留意されたい。逆に、主治医は、臨床応答が十分ではない場合、治療をより高いレベルに調整することも知っている(毒性は予め排除)。問題の障害の環理において投与された用量の大きさは、治療する状態の重さによって、また投与経路によって、様々に異なる。状態の重さは、例えば、部分的には標準的な予後評価方法によって評価することができる。さらに、用量およびおそらくは用量の頻度も、年齢、体重、およびそれぞれの患者の応答に応じて様々になる。上記論じたものに匹敵するプログラムは、獣医学にも使用することができる。

20

【0121】

治療する特定の状態に応じ、そのような薬剤を処方し、全身にまたは局所的に投与することができる。処方および投与に関する技法は、*Remington's Pharmaceutical Sciences*、第18版、Pack Publishing Co.、Easton, PA (1990)に見出すことができる。適切な経路には、経口、直腸、経皮、腔、経粘膜、または腸管投与；筋肉内、皮下、脊髄注射、ならびにクモ膜下、直接心室内、静脈内、腹膜内、鼻腔内、または眼内注射を含んだ非経口送達を含めることができる。

30

【0122】

注射の場合、本発明の薬剤は水溶液に処方することができ、好ましくはハックス溶液、リンガー溶液、または生理食塩緩衝液など生理学的に適合性ある緩衝液に処方することができる。そのような経粘膜投与では、バリアに浸透するのに適した浸透剤を製剤として使用する。そのような浸透剤は、当技術分野で一般的に知られている。本発明を実施するために本明細書に開示された化合物を処方する、医薬品として許容されるキャリアを、全身投与に適する投薬量で使用することは、本発明の範囲内である。キャリアの適正な選択および適切な製造の実践により、本発明の組成物、特に溶液として処方された組成物は、静脈内注射など、非経口的に処方することができる。化合物は、当技術分野で周知の医薬品として許容されるキャリアを経口投与に適する投薬量で使用して、容易に処方することができる。そのようなキャリアによれば、本発明の化合物は、治療を受ける患者が経口摂取するための錠剤、ピル、カプセル、液体、ゲル、シロップ、スラリー、懸濁液などとして処方することができる。

40

【0123】

細胞内投与が企図される薬剤は、当業者に周知の技法を使用して投与することができる。例えばそのような薬剤は、リポソーム内に封入して、上述のように投与することができる。リポソーム形成時に水溶液中に存在する全ての分子は、水性の内部に取り込まれる。リポソームの内容物は、いずれも外部のミクロ環境から保護され、またリポソームは細胞膜

50

と融合するので、細胞質内に効果的に送達される。さらに、それらの疎水性が原因で、小さい有機分子を細胞内に直接投与することができる。

【0124】

本発明での使用に適する医薬品組成物は、組成物、すなわち活性成分が有効な量で含有されてその意図する目的が達成される組成物を含んでいる。有効な量の決定は、特に本明細書に記載されている詳細な開示に照らし、当業者なら十分に実現することができる。活性成分のほか、これらの医薬品組成物は、適切な医薬品として許容されるキャリアを含有することができる。このキャリアは、活性化化合物を医薬品として使用することができる製剤にするための処理を容易にする医薬品添加物および補助剤を含んでいる。経口投与向けに処方された製剤は、錠剤、糖衣錠、カプセル、または溶液の形でよい。本発明の医薬品組成物は、それ自体が知られている方法で製造することができ、例えば従来の混合、溶解、造粒、糖衣錠形成、浮揚、乳化、カプセル化、エントラップ、または凍結乾燥プロセスで製造することができる。非経口投与向けの医薬品製剤には、水溶性の形をとる活性成分の水溶液が含まれる。さらに、活性化化合物の懸濁液は、適切な油性注射用懸濁液として調製することができる。適切な脂肪親和性溶媒または賦形剤には、ゴマ油などの脂肪油、またはオレイン酸エチルやトリグリセリドなどの合成脂肪酸エステル、またはリポソームが含まれる。水性注射用懸濁液は、カルボキシメチルセルロースナトリウムやソルビトール、デキストランなど、懸濁液の粘度を増大させる物質を含有することができる。任意選択で懸濁液は、高度に濃縮された溶液が調製されるように、適切な安定剤または化合物の溶解度を高める薬剤を含有することもできる。

10

20

【0125】

経口用途の医薬品調剤は、錠剤または糖衣錠のコア部を得るために、活性化化合物と固体の医薬品添加物とを合わせ、任意選択で得られた混合物を磨砕し、この顆粒の混合物を、望む場合は補助剤を添加した後に処理することによって得ることができる。適切な医薬品添加物は、特に、ラクトースやスクロース、マンニトール、ソルビトールをふくめた糖などの充填剤；例えばトウモロコシのデンプン、小麦のデンプン、米のデンプン、ジャガイモのデンプン、ゼラチン、トラガカント、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウム、および/またはポリビニルピロリドン(PVP)などのセルロース調剤である。望むなら、架橋ポリビニルピロリドンや、寒天、アルギン酸、あるいはアルギン酸ナトリウムのようなこれらの塩などの、崩壊剤を添加することができる。糖衣錠のコア部には、適切なコーティングを施すことができる。このため、濃縮した糖溶液を使用することができ、この溶液は、任意選択でアラビアゴム、タルク、ポリビニルピロリドン、カルボポールゲル、ポリエチレングリコール、および/または二酸化チタン、ラッカー溶液、および適切な有機溶媒または溶媒混合物を含有できるものである。同定のため、または活性化化合物用量の種々の組合せを特徴付けるために、錠剤または糖衣コーティングに染料または顔料を添加することができる。

30

【0126】

本願で参照される特許文献および科学論文を含む全ての刊行物は、個々の刊行物がそれぞれ個別に参照により組み込まれるかのように、それらが教示する全てのことにあらずる目的で、その全体がそのまま参照により組み込まれる。

40

【0127】

以上の記述は、本発明の特定の実施形態を詳しく述べている。しかし、以上の記述がどんなに詳細に文中に著されているようとも、本発明は、多くの方法で実施できることが理解されよう。また上述のように、本発明のある特徴または態様について記述する際に特定の用語を使用していたとしても、その用語がそれが関連している本発明の特徴および態様の任意の特定の特徴を含むことのみで限定されるように本明細書で定義付けされることを意味するものと理解すべきではないことに留意されたい。したがって本発明の範囲は、上述の特許請求の範囲およびその任意の均等物に従って解釈される。

【図面の簡単な説明】

【図1】 本発明による高処理能力化学スクリーニングシステムのブロック図である。

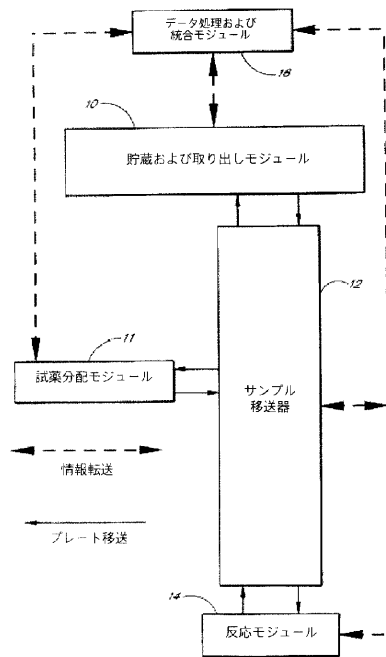
50

- 【図 2】 本発明による別の高処理能力化学スクリーニングシステムのブロック図である。
- 【図 3】 図 1 のシステムの反応モジュールの一部または図 2 のシステムの読取り装置の一部である蛍光励起および放射検出システムの概略図である。
- 【図 4】 図 3 の三叉型光ファイバ束の概略図である。
- 【図 5】 本発明による光検出器走査経路の一実施形態を示す図である。
- 【図 6】 本発明の一実施形態におけるデータ収集制御電子回路の概略図である。
- 【図 7】 蛍光種を含んだ化学水溶液が入っているウェルの走査が一部行われている間、収集された光の強さを位置に対してプロットしたグラフである。
- 【図 8】 蛍光細胞懸濁液が入っているウェルの走査中、収集された光の強さを位置に対してプロットしたグラフである。 10
- 【図 9】 図 1 のシステムの反応モジュールの一部または図 2 のシステムの読取り装置の一部である蛍光励起および放射検出システムの別の実施形態を示す概略図である。
- 【図 10】 マルチウェルプレートの底面をマッピングするための走査パターンの一実施形態を示す図である。
- 【図 11】 図 10 の部分拡大図である。
- 【図 12】 図 10 の別の部分拡大図である。
- 【図 13】 マルチウェルプレートの底面に高度点の行列を有するマルチウェルプレートの図である。
- 【図 14】 マルチウェルプレートの底面の例示的な等高線図である。 20
- 【図 15】 マルチウェルプレートの第 0 列に沿って、底面の高度の例示的な 6 次多項式フィットをプロットした図である。
- 【図 16】 マルチウェルプレートの第 2 3 列に沿って、底面の高度の例示的な 6 次多項式フィットをプロットした図である。
- 【図 17】 マルチウェルプレートの第 4 7 列に沿って、底面の高度の例示的な 6 次多項式フィットをプロットした図である。
- 【図 18】 本発明による検出システムを校正するシステムを示す図である。
- 【図 19】 本発明による検出システムを校正するシステムを示す別の図である。
- 【図 20】 マルチウェルプレートの走査線に沿って、検出器の光学系を垂直方向に調節した量を表すプロファイルデータをプロットしたグラフである。 30
- 【図 21】 光学系の垂直方向のプロファイリングを非活動化した状態で 3 4 5 6 ウェルプレートの 4 8 列のそれぞれの 7 2 個のウェル全てを走査した場合に収集された光の強さをプロットした図である。
- 【図 22】 光学系の垂直方向のプロファイリングを活動化した状態で 3 4 5 6 ウェルプレートの 4 8 列のそれぞれの 7 2 個のウェル全てを走査した場合に収集された光の強さをプロットした図である。
- 【図 23】 光学系の垂直方向のプロファイリングを非活動化した状態で 3 4 5 6 ウェルプレートの第 0 列の 7 2 個のウェル全てを走査した場合に収集された光の強さをプロットした図である。
- 【図 24】 光学系の垂直方向のプロファイリングを活動化した状態で 3 4 5 6 ウェルプレートの第 0 列の 7 2 個のウェル全てを走査した場合に収集された光の強さをプロットした図である。 40
- 【図 25】 光学系の垂直方向のプロファイリングを非活動化した状態で 3 4 5 6 ウェルプレートの第 2 3 列の 7 2 個のウェル全てを走査した場合に収集された光の強さをプロットした図である。
- 【図 26】 光学系の垂直方向のプロファイリングを活動化した状態で 3 4 5 6 ウェルプレートの第 2 3 列の 7 2 個のウェル全てを走査した場合に収集された光の強さをプロットした図である。
- 【図 27】 光学系の垂直方向のプロファイリングを非活動化した状態で 3 4 5 6 ウェルプレートの第 4 7 列の 7 2 個のウェル全てを走査した場合に収集された光の強さをプロッ 50

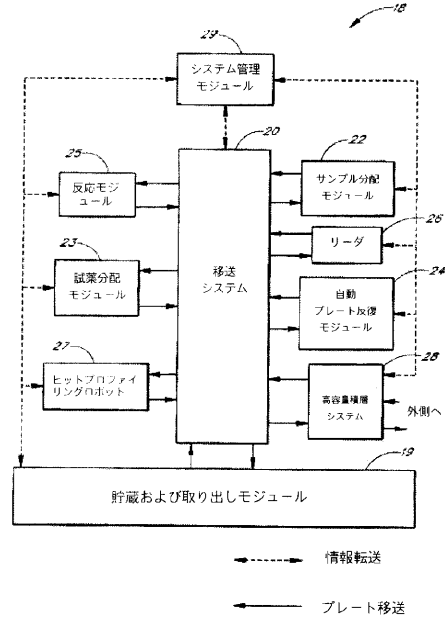
トした図である。

【図28】 光学系の垂直方向のプロファイリングを活動化した状態で3456ウェルプレートの第47列の72個のウェル全てを走査した場合に収集された光の強さをプロットした図である。

【図1】



【図2】



【図3】

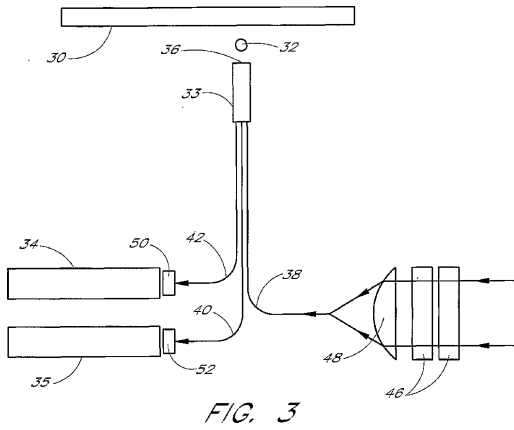


FIG. 3

【図4】

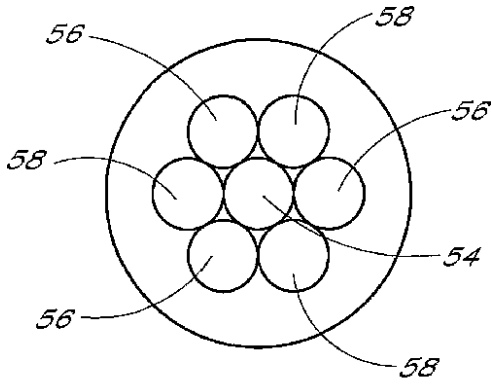
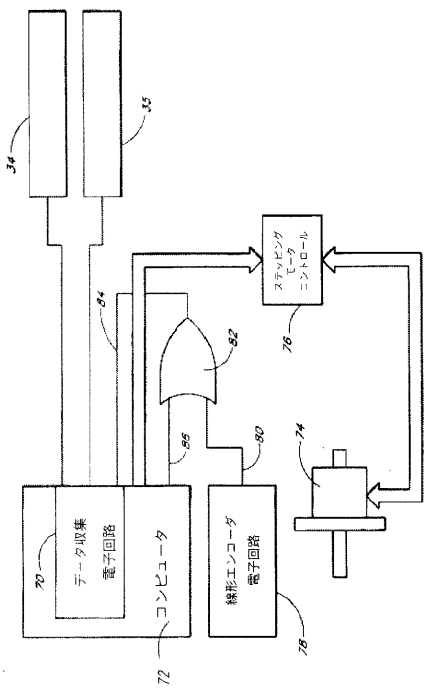


FIG. 4

【図6】



【図5】

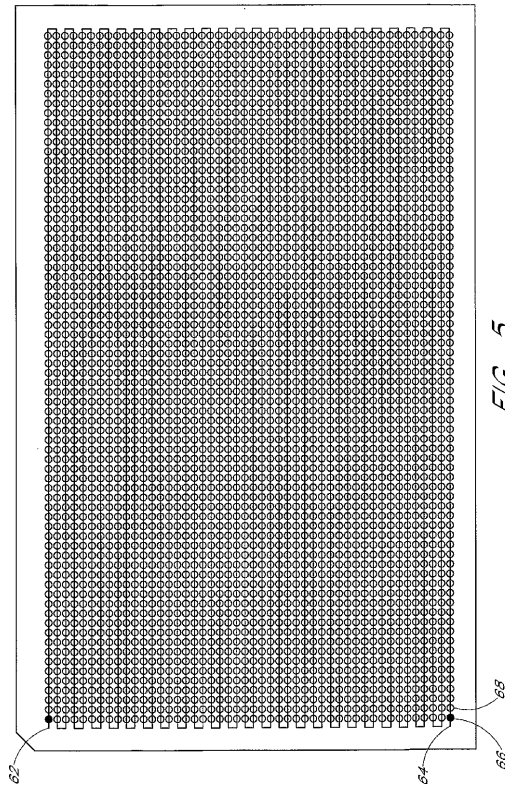
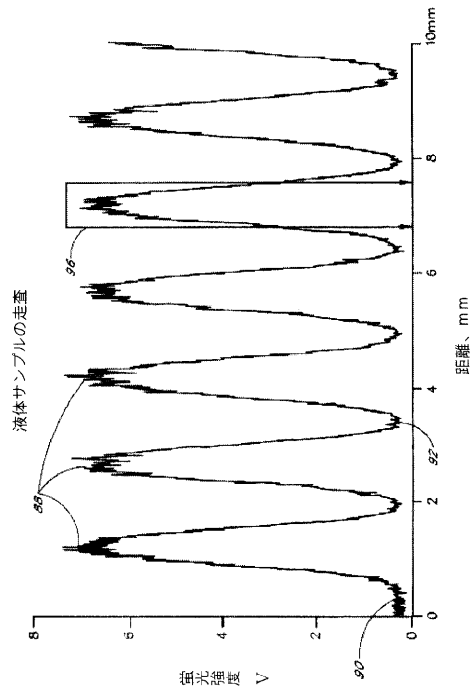
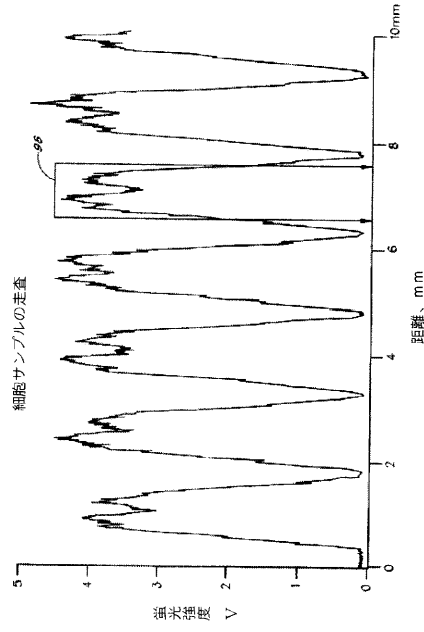


FIG. 5

【図7】



【図8】



【図9】

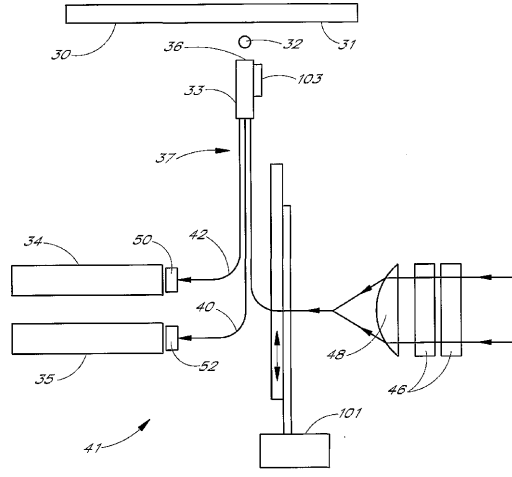
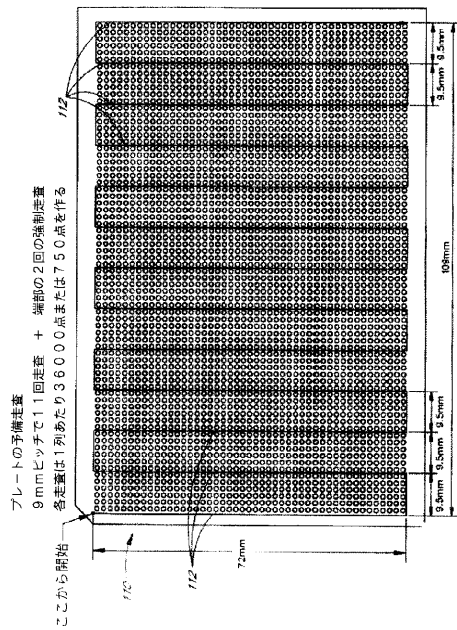


FIG. 9

【図10】



【図11】

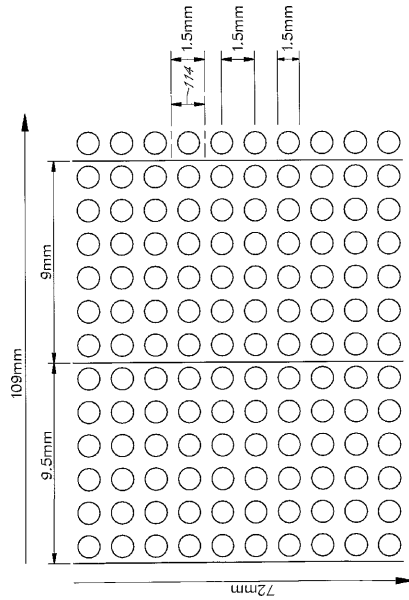


FIG. 11

【図 12】

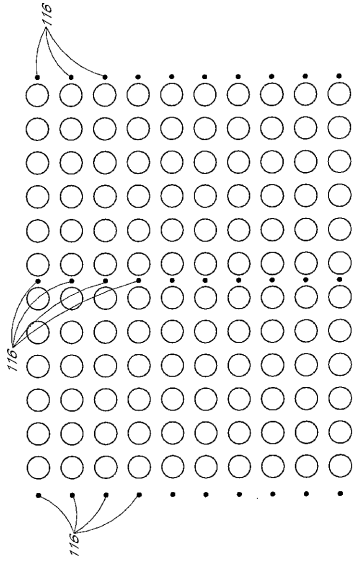


FIG. 12

【図 13】

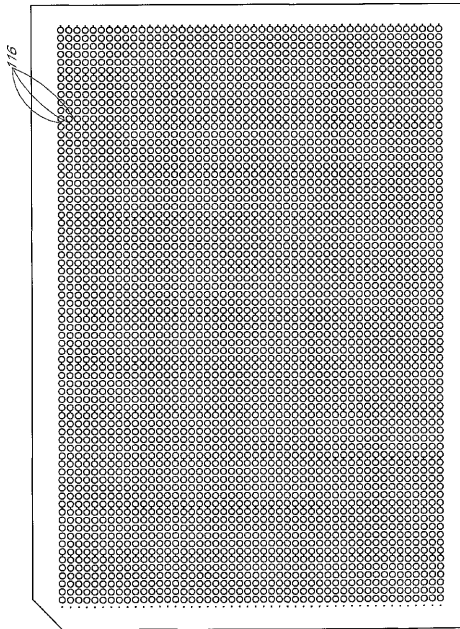
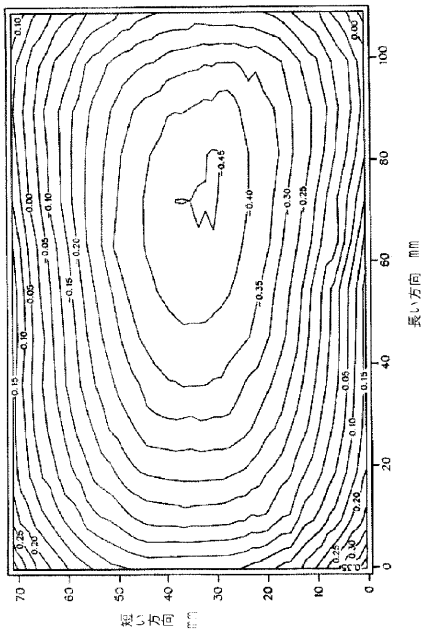
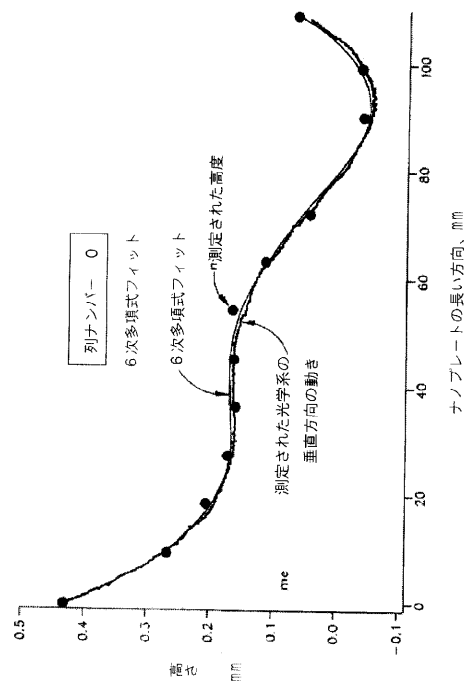


FIG. 13

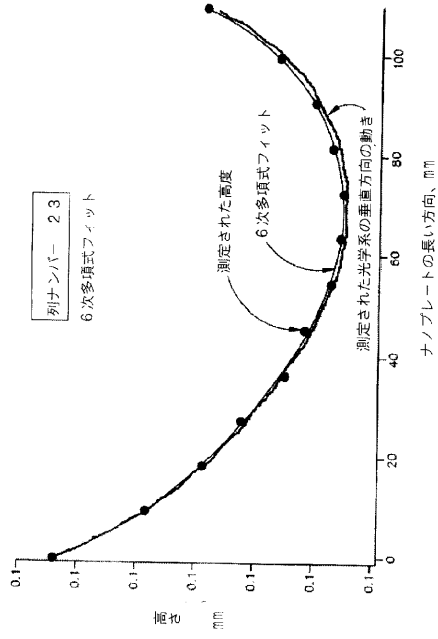
【図 14】



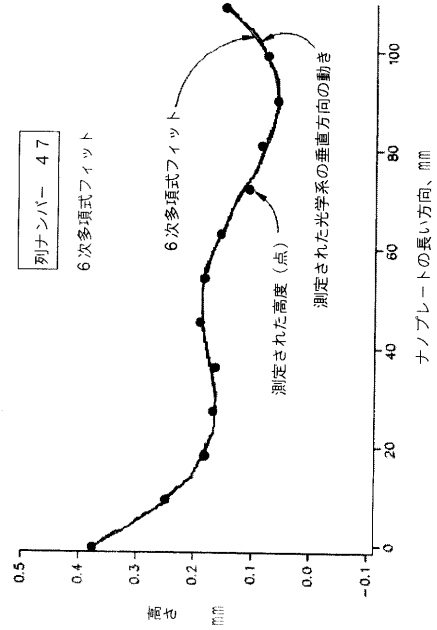
【図 15】



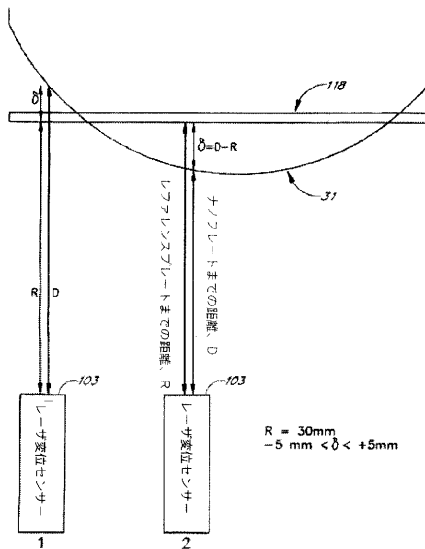
【図16】



【図17】

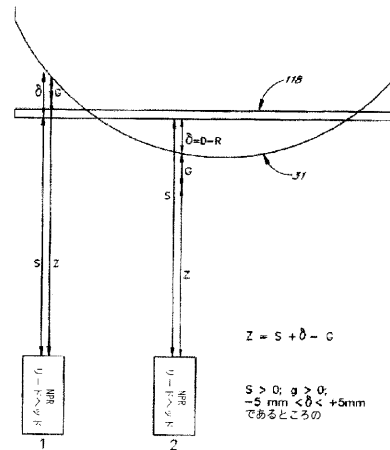


【図18】



曲がったナノビームの位相の決定

【図19】

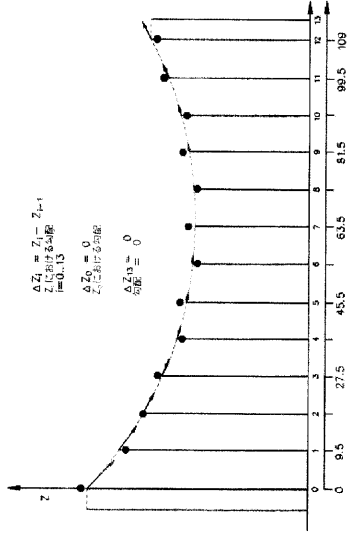


リードヘッドのZ-位置の決定

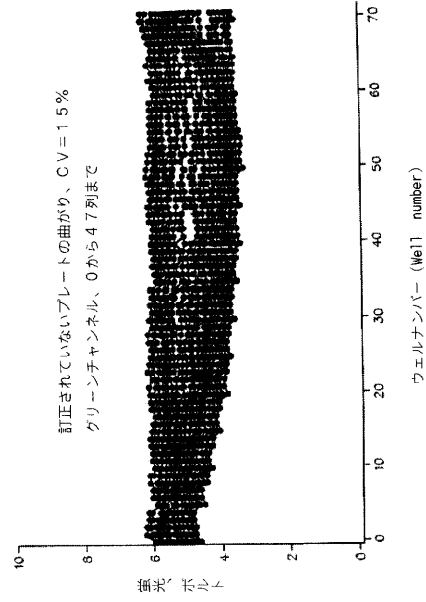
$$Z = S + \delta - c$$

$S > 0; \delta > 0;$
 $-5 \text{ mm} < \delta < +5 \text{ mm}$
 であるところの

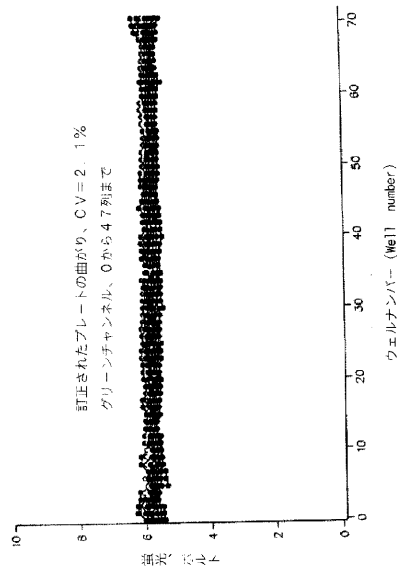
【図20】



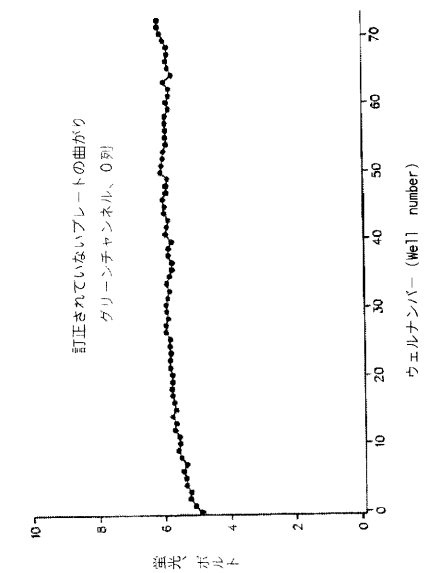
【図21】



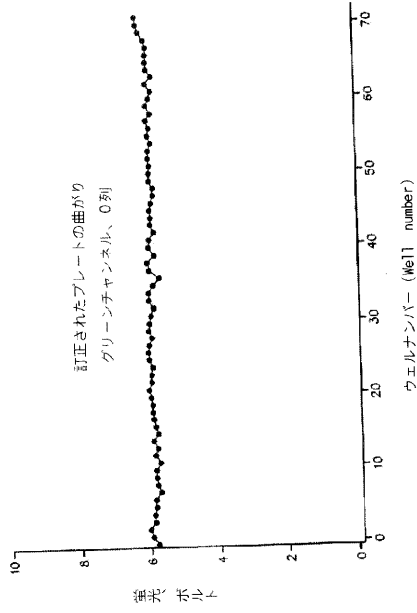
【図22】



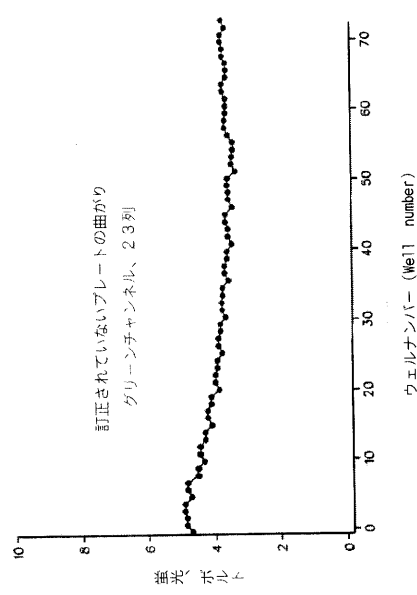
【図23】



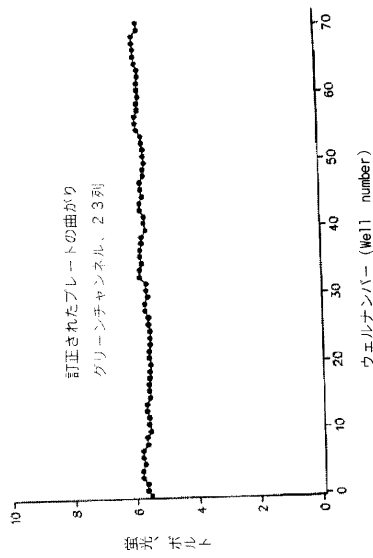
【図24】



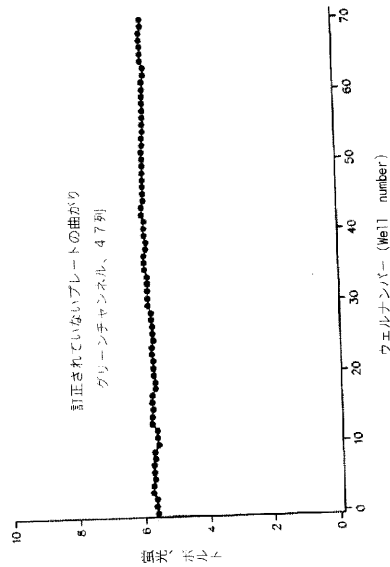
【図25】



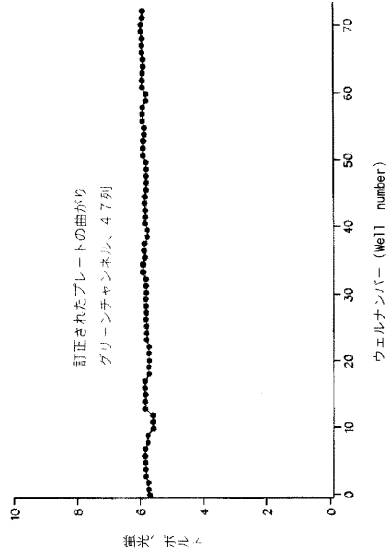
【図26】



【図27】



【 図 28 】



フロントページの続き

(51) Int.Cl.		F I	
C 1 2 Q 1/42 (2006.01)		C 1 2 Q 1/37	Z N A
C 1 2 Q 1/48 (2006.01)		C 1 2 Q 1/42	
G 0 1 N 21/64 (2006.01)		C 1 2 Q 1/48	Z
G 0 1 N 33/15 (2006.01)		G 0 1 N 21/64	F
G 0 1 N 33/483 (2006.01)		G 0 1 N 33/15	Z
G 0 1 N 33/50 (2006.01)		G 0 1 N 33/483	C
G 0 1 N 33/566 (2006.01)		G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N 37/00 (2006.01)		G 0 1 N 33/566	
		G 0 1 N 37/00	1 0 3

(72)発明者 ヴォング、 ティー .、 ミン
 アメリカ合衆国 9 2 1 2 2 カリフォルニア州 サン ディエゴ 5 2 2 5 フィオレ テレー
 ス 3 1 4 番

審査官 森 竜介

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

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

G01N 35/02
 A61K 45/00
 A61P 43/00
 C12M 1/34
 C12Q 1/37
 C12Q 1/42
 C12Q 1/48
 G01N 21/64
 G01N 33/15
 G01N 33/483
 G01N 33/50
 G01N 33/566
 G01N 37/00