

(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2009-527471

(P2009-527471A)

(43) 公表日 平成21年7月30日(2009.7.30)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 31/78 (2006.01)	A 6 1 K 31/78	4 C 0 8 6
A 6 1 K 31/785 (2006.01)	A 6 1 K 31/785	
A 6 1 P 9/00 (2006.01)	A 6 1 P 9/00	
A 6 1 P 9/12 (2006.01)	A 6 1 P 9/12	
A 6 1 P 9/10 (2006.01)	A 6 1 P 9/10 1 0 1	
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 36 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2008-554597 (P2008-554597)	(71) 出願人	508248759 ミブサルス エーピーエス デンマーク王国 ヴィラム ディーケー 2830, フェレソヴェイ 109
(86) (22) 出願日	平成19年2月21日 (2007.2.21)	(74) 代理人	100096024 弁理士 柏原 三枝子
(85) 翻訳文提出日	平成20年10月9日 (2008.10.9)	(74) 代理人	100125520 弁理士 高橋 剛一
(86) 国際出願番号	PCT/DK2007/000083	(74) 代理人	100155310 弁理士 柴田 雅仁
(87) 国際公開番号	W02007/095949	(74) 代理人	100156339 弁理士 米村 道子
(87) 国際公開日	平成19年8月30日 (2007.8.30)	(72) 発明者	クリステンセン, ジェスパー, スベニング デンマーク王国 ヴィラム ディーケー 2830, ヴィラムヴェイ 77ピイ 最終頁に続く
(31) 優先権主張番号	PA200600248		
(32) 優先日	平成18年2月21日 (2006.2.21)		
(33) 優先権主張国	デンマーク (DK)		
(31) 優先権主張番号	60/743,330		
(32) 優先日	平成18年2月21日 (2006.2.21)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

(54) 【発明の名称】 分子インプリントポリマの改良した調製方法

## (57) 【要約】

一の態様は、分子インプリントポリマ(MIP)粒子の改良された調製方法であり、ここで、不溶性MIP粒子を具える開始組成物は、特定標的分子に結合するMIP粒子の濃度を上昇させ、最終的な組成物から結合していない(非結合性)粒子および結合力の弱い粒子を排除する。濃度上昇は、特定の物質を分離することができるクロマトグラフィ法または凝集手段の使用を介して通常達成される。他の態様は、未精製のMIP粒子の拡張された延長の使用によって、改善された不溶性MIPの調製で、MIP粒子の質量単位あたりの多数の結合部位に暴露される。好適な実施例において、二つの態様が組み合わせられる。最終的な改良されたMIPは、診断、分析、治療用に使用され、特に、胃腸管におけるコレステロール、胆汁酸および胆汁酸塩などの物質に結合できる経口投与された薬剤として使用される。

【選択図】なし

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

標的分子に対する高い結合能力および高い特異性を有する分子インプリントポリマ (MIP) を具える組成物の調製方法であって、この方法が、

a) 前記標的分子に結合する不溶性 MIP の懸濁液を得るステップであって、前記不溶性 MIP は、テンプレート分子として標的分子またはその模倣体を用いて調製される、ステップと、

b) 前記懸濁された MIP を親和性精製工程にかけるステップであって、前記テンプレート分子、そのフラグメントまたはその模倣体は捕捉剤として使用される、ステップと、

c) 前記親和性精製工程において前記捕捉剤に結合する MIP を回収し、回収された生成物から前記捕捉剤および前記捕捉剤に結合しない MIP を実質的に排除するステップと、

d) 回収された MIP と、選択的に、キャリア、ビークルまたは希釈剤を混合し、前記組成物を得るステップと、

を具えることを特徴とする方法。

**【請求項 2】**

前記捕捉剤が固相に共有結合的にまたは非共有結合的に結合することを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 3】**

前記固相が、クロスバインドされた炭化水素のマトリックス、合成ポリマまたはこれらの組合せからなる群から選択されることを特徴とする請求項 2 に記載の方法。

**【請求項 4】**

前記捕捉剤が、可溶性化学成分からなるか、または、可溶性化学成分の一部であることを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 5】**

前記捕捉剤が、可溶性化学成分あたり複数の捕捉剤に暴露されるために、 dendrogram、実質的な炭化水素ならびにポリビニルアルコールおよびポリエチレングリコールなどの置換基を有する可溶性ポリマから選択される部分に対して、共有結合的または非共有結合的に結合されることを特徴とする請求項 4 に記載の方法。

**【請求項 6】**

前記捕捉剤のみが、前記テンプレート分子に結合する、ステップ a) の MIP の結合部位のフラクションに結合することを特徴とする請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 7】**

前記捕捉剤が、前記テンプレート分子のフラグメントであることを特徴とする請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 8】**

前記捕捉剤が、前記捕捉剤の一部の MIP に暴露されるのを実質的に避けるために、特定の配位性において、必要に応じて前記固相表面またはその部分に結合したテンプレート分子、その模倣体またはそのフラグメントを具えることを特徴とする請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 9】**

前記捕捉剤は、前記捕捉剤の全ての部分が MIP に暴露されるように非特異的な配位性において、必要に応じて前記固相表面またはその部分に結合したテンプレート分子、その模倣体またはそのフラグメントを具えることを特徴とする請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 10】**

前記親和性精製工程が、膨張ベッド吸収 (EBA)、常時性ピーズ分離、中空ファイバ精製、および、凝集からなる群から選択されることを特徴とする請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 11】**

10

20

30

40

50

標的分子に対して高い結合能力を有するM I Pの調製方法であって、前記方法が、  
前記標的分子またはその模倣体からなるテンプレート分子を具える未精製のM I Pを、  
テンプレート分子を除去できるほど十分に小さいM I Pの粒径を得るように第一段階のミ  
クロ化にかけるステップと、

実質的に全てのテンプレート分子を除去し、このようにして得られたM I Pをミクロ化  
の第2段階にかけるステップと、を具え、

ミクロ化の前記第1段階および選択的な第2段階によって、50 μm未満のM I P平均  
直径が得られることを特徴とする方法。

【請求項12】

ミクロ化の前記第1段階のみを行うことを特徴とする請求項11に記載の方法。

10

【請求項13】

前記ミクロ化が、グリンディング、ミリング、破裂、ハンマリング、ボールミリング、  
クリオグリンディング、または、衝突均質化処理によってなされることを特徴とする請求  
項11または12に記載の方法。

【請求項14】

請求項1～10のいずれか一項の方法に得られたM I Pを適用することを具える請求項  
11～13のいずれか一項に記載の方法。

【請求項15】

前記標的分子が、ヒト胃腸管など、胃腸管にみられる分子であることを特徴とする請求  
項11～14のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項16】

前記標的分子が、病理学的に関連のある分子であることを特徴とする請求項15に記載  
された方法。

【請求項17】

前記標的分子が、コレステロール、胆汁酸または胆汁酸塩から選択されることを特徴と  
する請求項1～16のいずれか一項に記載の方法。

【請求項18】

不溶性M I Pの組成物であって、

1) M I Pの平均直径が20 μm未満であること、

2) 標的分子の平均結合能が、M I Pの10質量単位に対して少なくとも標的分子の1  
質量単位であること、

30

3) 前記組成物中の実質的に全てのM I Pが、同一の標的分子に結合し、選択的に、前  
記組成物が、標的分子に対する結合部位の全てを含まないこと、  
の少なくとも1つの特性を有することを特徴とする不溶性M I Pの組成物。

【請求項19】

特性1)を有することを特徴とする請求項18に記載の組成物。

【請求項20】

特性2)を有することを特徴とする請求項18または19に記載の組成物。

【請求項21】

特性3)を有することを特徴とする請求項18～20に記載の組成物。

40

【請求項22】

請求項1～17のいずれか一項に記載の方法に従って調製される請求項18～21のい  
ずれか一項に記載の組成物。

【請求項23】

前記組成物中の前記M I Pが、コレステロール、胆汁酸または胆汁酸塩に結合すること  
を特徴とする請求項18～22のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項24】

製剤として利用する目的の請求項18～23のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項25】

循環器疾患、高血圧、アステローム硬化症、胆石症、胆汁うっ滞性肝疾患、高コレステ

50

ロール血漿、肥満症、寄生虫、ウイルスあるいは例えばバクテリアおよび真菌など微生物由来の感染症、経口由来の毒による中毒、の治療、予防または回復用の薬学的製剤の調製において、請求項 18 ~ 23 のいずれか一項に記載の組成物の使用。

【請求項 26】

前記薬学的製剤の調製が、経口投与用であることを特徴とする請求項 25 に記載の使用。

【請求項 27】

循環器疾患、高血圧、アステローム硬化症、胆石症、胆汁うっ滞性肝疾患、高コレステロール血漿、肥満症、寄生虫、ウイルスあるいは例えばバクテリアおよび真菌など微生物由来の感染症、経口由来の毒による中毒、からなる群から選択される疾患の治療、予防またはリスクを低減する方法であって、請求項 18 ~ 23 のいずれか一項に記載の組成物の有効量を、これを必要とする対象に投与するステップを具えることを特徴とする方法。

10

【請求項 28】

前記有効量は、1日あたり 40 g 未満であることを特徴とする請求項 27 に記載の方法。

【請求項 29】

前記有効量が、経口投与されることを特徴とする請求項 27 または 28 に記載の方法。

【請求項 30】

サンプル中の標的分子の量的または定性的な決定方法であって、この方法が、請求項 18 ~ 24 のいずれか一項に記載の組成物または請求項 1 ~ 17 のいずれか一項に記載に従って調製された組成物と、サンプルを接触させるステップを具え、組成物中の MIP は、前記標的分子に特異的に結合し、続いて、前記組成物に結合する標的分子の量的または定性的評価を行うことを特徴とする方法。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、分子インプリントポリマ(MIP)の調製における改良に関し、特に、本発明は、製薬学的製剤において捕捉剤として使用可能なように、MIPの結合能力および特異性を増加させる方法に関し、具体的には、このような製薬学的製剤は、例えばコレステロール、胆汁酸および胆汁酸塩など、胃腸管における標的分子に結合する。さらに、MIP製剤の本発明の改良は、前記MIPを特徴化する手段として役立つ。

30

【背景技術】

【0002】

合成ポリマの分子インプリンティングは、官能基を有するクロスリンクモノマが、分子テンプレートとして作用する標的分子の存在下で共重合化されるプロセスである。重合化前に、官能基を有するモノマは、非共有結合性相互作用を介してテンプレートを有する複合体を形成するか、または、テンプレートの重合可能な誘導体を形成するように、共有結合的に結合される。重合化後、これらのモノマの官能基は、高度のクロスリンクポリマ構造によって、配置される。次に、溶媒抽出および/または化学分解によるテンプレート除去によって、寸法および形状において標的分子に相補的な結合部位が明らかになる。このように、分子記憶は、非常に高い特異性で標的に再結合可能であるポリマ(「分子インプリントポリマ」または「MIP」)に導入される。

40

【0003】

MIPは、元来、特にキラル分離に関して、HPLCの固定相として用いられる。これに続き、MIPの使用は、薄層クロマトグラフィ、キャピラリ電気泳動、固相抽出および免疫分析型の結合分析などの他の分析技術に拡大されている。これらの結合部位は、抗体-抗原システムを用いる親和性、および、選択性を有する場合が多い。これらの模倣体(mimic)は、検出技術に対する実際の抗体よりも明らかな優位性を示す。架橋の性質が大きいので、MIPは、本質的に安定で強固であり、酸、塩基または金属イオン、有機溶媒中、あるいは、高温高圧の存在下の過酷な環境における適用を容易にする。さらに、

50

MIPは、生成するのに安価であり、長い時間室温の乾燥状態で貯蔵することができる。

【0004】

従って、原則的に、全てのMIPは、以下のように作製される：モノマおよび標的（もしくはテンプレート）分子は混合され、自己集成が生じ、クロスバイндаが添加され、重合化が開始される。重合化後、ポリマは小さなフラクションに分解され、標的分子が抽出される。MIPが、標的分子の溶液に入れられた場合、これらはMIPに再結合するであろう（Yu Cong; Leif SchweitzおよびIoana Warnmark - Surugiu参照）。

【0005】

MIP製剤の一般的な技術の段階が、図1に概略的に示されている。

10

【0006】

MIPの歴史

MIP製剤の最初の例の1つは、色素を選択的に認識するためにシリカ（珪酸ナトリウム）の一種を使用して、早くも1949年（Dickey）に開示されている。しばらくした後、ネットワークを構築するための他の種類の自己組織化システムが記載されており、ここで、特異的に標的/検体が結合することが可能となった（Ramstrom et al., Schweitz et al., およびVlatakis et al.）。

【0007】

モノマの選択および重合化

20

1970年代および1980年代において（Shea 1986、Shea 1990 および Wulff 1987参照）、プラットフォームを構築するために使用されるポリマに直接、テンプレート/標的分子を共有結合的に結合させるコンセプトが開示されている。これは、直接結合することによって、ポリマに亘り結合部位がより均等に分配されるようになったことを示唆する。しかしながら、これと同時に、重合化後にテンプレートを除去する問題が残った。テンプレートを除去するためには、ポリマのマイクロ化および化学結合の切断の両方が必要である。

【0008】

重合化中に使用されるモノマの1つにテンプレートを拘束（tethering）させずにMIPを調製することによって、優れたMIPとなる。しかしながら、多量の結合部位は、特異性の少ない分子の一部において、テンプレート/検体と結合する傾向がある結合部位を含み、最終的なMIPの所望の特異性を得ることができないことが、文献中の経験としてある。このことは、分子の立体異性体を分けることが目的の場合は特に、分析目的に用いられるMIPには非常に重要であるが、主な目的が、最終的なMIPの全体の結合能力を促進する目的の場合において、重要性は比較的低い。

30

【0009】

所定の分析条件において、テンプレートは、同一性（アイデンティティ）が異ならなくてはならず、すなわち、実際のテンプレートを用いる代わりに、作製されたMIPは、分析されるサンプルに不純物を混入させないために、テンプレートの「模倣体」に構築される。検体とMIPとの間の特異的な結合を確実にすることが可能なテンプレート模倣体を発見することは、非常に難しい仕事であることは明らかである。

40

【0010】

MIPを調製する全く別の方法は、モノマ、クロスバイнда、およびテンプレート（またはテンプレート模倣体）を、エマルジョン状の特定のフォーマットで保持しながら、混合液を重合化することであり、このようにして、分子としての最終的なMIPを直接得る（Funke et al.）。このプロセスで作製されたMIPの粒径は、他の事項、モノマ濃度および攪拌速度（エマルジョン中の液滴の寸法を決定する）に関連するであろう。（1 μm以上の粒径を得るためには、1000 rpm以上で溶液を攪拌する必要がある）。参考文献によると、この種の方法に付随する不利益は、調整期間が長く、収率が低いことである。

50

## 【0011】

一般的に、先行技術は、再現性のあるMIPを調製することの難しさを記載していることが多く、結合能力および特異性の双方は、折り合わない（従って、所望するより低い）。今まで、高い結合能力を有するMIP組成物の、信頼性および実現性のある調製方法は、開示されていない（Sellegren 1998）。

## 【0012】

## 有益な粒径の取得

バルク形成重合化プロセスは、MIPを調製するために使用するとき、高程度のクロス結合は、テンプレート分子の抽出がなされる前に、ポリマを非常に小さい粒径にマイクロ化する必要がある。マイクロ化の方法は、セメント業界（mmサイズの粒子を形成）から小型ボールミル業界（圧膜ペースト調製（電子回路用の $\mu\text{m}$ 粒径の粒子））にわたって、非常に異なる産業で使用されている。このようなマイクロ化プロセスは、MIPの機能性（特異性および能力の両方）の重要な部分であるにも関わらず、選択される実際の方法は、ほとんどのMIP文献において詳細な記載はなく、MIPからのテンプレートの抽出の前に、得られたバルクポリマが研磨され、（分類される粒径で）篩にかけられると記載されているのみである。

10

## 【0013】

## テンプレート除去

ほとんどの文献において、テンプレート分子の除去は、このプロセスが最終的なMIPの機能性に重要であるにもかかわらず、十分に記載されていない。このプロセスは、1つまたはそれ以上の特別に命名された溶媒を用いて、非特異的な洗浄工程としてのみ記載されていることがほとんどである。特に、MIPが、例えば、検体を予め濃縮するツールとして、固相抽出（SPE）用を開発された場合、テンプレートの残量でさえ、MIPの有用性を阻害するであろう。テンプレート除去に使用されるマトリックスからMIPを分類することは、多くの場合、ろ過または遠心分離によってなされる。

20

## 【0014】

## MIPを改良する周知の効果

米国特許第4,111,863号は、「非膨潤性の三次元ポリマが、光学活性を有する化合物の残基である組成を有し、残基は、前記ポリマの物理構造を残すように、前記ポリマから化学的に除去可能であり、ポイドは、光学活性を有する化合物の前記残基の寸法および形状に対応し、前記ポリマのポイド内の特定の立体配置は、光学活性を有する化合物の前記残基の化学構造に対応し、「前記光学活性を有する化合物」は、MIPがその後結合可能であるテンプレートである」ことを開示している。

30

## 【0015】

米国特許第5,110,833号において、「合成酵素または合成抗体の作製方法は、プリント分子の周囲のモノマの配位、クロスリンクの負荷、ポリマへの重合化、これに続くプリント分子の除去を具え、従って、前記プリント分子に対応するポリマにキャビティが形成される」ことが、クレームされており、これにより、テンプレート分子に対するMIPの特異性を上げている。すなわち、米国特許第5,110,833号にクレームされた性能改良は、重合化前に、テンプレート分子とモノマユニットとの間の接触を最適化することに基づいている。

40

## 【0016】

米国特許第6,881,804号において、MIPにおける孔（porosity）を導入することが、テンプレートと相互作用するように意図されたポイドへのアクセスを増加させることによって、MIPの性能を上昇させる手段として開示されている。

## 【0017】

米国特許第6,638,498号において、胆汁酸特異的なMIPの作製する特別に選択されたモノマがクレームされており、米国特許出願公開番号第2004/0157209A1において、重合化前に、支持体材料の上のテンプレート分子を固定することが提案されている。MIPの性能を改良するためのこれらの提案の全ては、MIPの調製前もし

50

くは調整中に行われる、モノマの化学特性または、M I Pの構造について記載している。

【0018】

米国特許第5,994,110号は、テンプレート分子に相補的な構造を含む、小さいポリマ/オリゴマをインサイチュウで形成するように製造されたM I Pを開示している。これらのポリマまたはオリゴマは、生体分子の周囲にコーティングまたはイメージを形成し、コーティングまたはイメージは、生体分子から除去され、分離した構成要素は、生体分子から得られ、例えば治療用薬剤または予防用薬剤、すなわち製剤として使用できる。この種類の作製工程であるため、米国特許第5,994,110号では、従来のM I P粒子の調製のように、マイクロ化ステップを使用しない。米国特許第5,994,110号は、非結合剤からM I Pを分離することを提案しているが、しかしながら、提案された方法は全て、例えば、M I Pが可溶性である場合にのみクロマトグラフィを介して作製された極めて小さいサイズのM I Pに依存している。米国特許第5,994,110号に従う治療的に活性のあるM I Pは、1~200kDa範囲の下端の分子量を示すことが、具体的に示唆されている。さらに、米国特許第5,994,110号は、懸濁された非可溶性M I Pの一方を「優れた結合剤」に、他方を「比較的効果の低いまたは非結合剤」に分ける手段については、一切開示していない。

10

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0019】

十分に高い結合能力を有するM I P組成物を得て、この組成物を可溶性レセプタおよび抗体の代替として薬学的応用に使用可能なように、M I Pを調製する改良方法を提供することを本発明の目的とする。さらに、先行技術のM I P組成物よりも改良された特性を有するM I P組成物を提供することが目的である。

20

【課題を解決するための手段】

【0020】

M I Pの調製に関する従来技術を改良しようとする上述の試みにも関わらず、例えば、特定の標的分子の本体を取り除くことが治療の一部である治療方法において、抗体および可溶性レセプタなどの代替物として、治療に使用され得るM I P組成物を調製する試みは今日まで成功してこなかった。

【0021】

本発明は、M I Pが所定のリガンドに対して極めて高い親和力を有する場合であっても、例えば、マイクロ化/粉碎化したM I Pの組成物が、リガンドに対する結合親和力の大きなばらつきを示し、従って、例えば、臨床的に使用するためには、全体の結合能力が不十分で不安定であり、または換言すると、通常、標的リガンドに対する周知のM I P組成物の結合能力は、M I Pを治療用の可溶性レセプタと抗体の代替とするには非常に低い。

30

【0022】

本発明は、さらに、M I P組成物の全体的な結合能力に関するM I P粒径の影響についての研究は(例えあっても)わずかであることを着目している。

【0023】

従って、本発明は、テンプレートまたはテンプレート類似体に結合する能力獲得後、M I P粒子を分類することによって、M I Pの性能をさらに改良し、これによって、標的に結合するM I Pの濃度を上昇させることを教示している。このような機能的分類または精製プロセスによって、選択されたテンプレートまたはその類似体に適宜に結合する能力を有するポイドまたはキャビティがあるM I P粒子のフラクションが生成され、M I Pとテンプレートとの間の平均親和力を改良し、従って、M I Pの結合能力を改良する。

40

【0024】

さらに、本発明は、M I P組成物の性能が今日まで使用されてきたマイクロ化ステップを改良することによって簡単に改良され、従って、より小さい平均粒径のM I P粒子となり、これによりM I P粒子は、結合部位と結合量の比率が改善されたことを示した。

【0025】

50

従って、第1の態様において、本発明は、標的分子に対する高い結合性能および特異性を有する分子インプリントポリマ(MIP)を具える組成物を調製する方法に関し、当該方法は、

a) 標的分子に結合する不溶性MIPの懸濁液を得るステップであって、当該不溶性MIPは、テンプレート分子としての標的分子またはその模倣体を用いて調製される、ステップと、

b) 懸濁されたMIPを親和性精製工程にかけるステップであって、テンプレート分子、そのフラグメントまたはその模倣体が、捕捉剤として使用される、ステップと、

c) 親和性精製工程において前記捕捉剤に結合するMIPを回収し、一方で、回収された生成物から捕捉剤、および、捕捉剤に結合していないMIPを実質的に排除する、ステップと、

d) 回収されたMIPと任意選択のキャリア、ビークル、または希釈剤を組合せ、前記組成物を得るステップと、を具える。

#### 【0026】

第2の態様において、本発明は、標的分子に対する高い結合能力を有するMIPを調製する方法を提供し、この方法は、標的分子またはその模倣体からなるテンプレート分子を具える未精製のMIPをマイクロ化の第1の段階にかけ、テンプレート分子を除去するのに十分小さいMIP粒径を得る、ステップと、実質的に全てのテンプレート分子を除去するステップと、このようにして得られたMIPをマイクロ化の第2段階にかけるステップと、を具え、マイクロ化の第1段階および第2段階によって、50 $\mu$ m未満の平均直径のMIPが得られる。

#### 【0027】

第3の態様において、本発明は、以下の特性の少なくとも1つを有する不溶性MIPの組成物を与える：

1) MIPの平均直径が20 $\mu$ m未満であること；

2) 平均標的分子結合能力が、MIPの10質量単位に対して少なくとも標的の1質量単位であること；

3) 前記組成物中の実質的に全てのMIPが、同一の標的分子に結合し、選択的に、前記組成物が、標的分子に対する結合部位の全てを含まないこと。

#### 【0028】

第4の態様において、本発明は、循環器疾患、高血圧、アステローム硬化症、胆石症、胆汁うっ滞性肝疾患、高コレステロール血漿、肥満症、寄生虫あるいは例えばバクテリアおよび真菌など微生物由来の感染症、経口由来の毒による中毒、の治療、予防または回復用の治療剤の調製において、本発明の組成物を使用することに関する。

#### 【0029】

最後に、第5の態様において、本発明は、循環器疾患、高血圧、アステローム硬化症、胆石症、胆汁うっ滞性肝疾患、高コレステロール血漿、肥満症、寄生虫あるいは例えばバクテリアおよび真菌など微生物由来の感染症、経口由来の毒による中毒、からなる群から選択される疾患の治療、予防またはリスクを低減する方法に関し、この方法は、治療等を必要とする対象に本発明の組成物の有効量を投与するステップを具える。

#### 【発明を実施するための最良の形態】

#### 【0030】

下記において、多くの用語は、本発明の範囲を確実に正しく理解するために規定されている。

#### 【0031】

「分子インプリントポリマ」(MIP)は、1つまたはそれ以上のテンプレート分子の少なくとも一部に対応するキャビティ(またはポイド)を具えるポリマであり、この1つまたはそれ以上のテンプレート分子は、重合化前にクロスリンクしているモノマを含むモノマトリックスに組み込まれる。重合化後に得られたポリマは、テンプレート分子の形状に対応する多数のキャビティを含む。通常、MIPは、小さな粒子に分離(sequence

10

20

30

40

50

ster)され、従って、テンプレートの除去を促進し、テンプレート分子に類似または同一の標的分子と相互作用する部分的なキャビティが形成される。本明細書および特許請求の範囲において、MIPという用語は、通常、MIPの特定の形状を指し、用語「MIP」および「(複数の)MIP」は、MIP粒子および(複数の)MIP粒子という表現と交換可能に使用される。

#### 【0032】

本発明に使用されるMIPは、不溶性の分子/成分(entities)である。この不溶性は、胃腸管から身体(例えば、循環系)内への経路を制限または阻止するので、特に、胃腸管において使用するため薬剤として好適である。すなわち、経口投与されると、本発明に用いられるMIPは、糞便で排泄されるまで、実質的に胃腸管に閉じ込められたままである。

10

#### 【0033】

「未精製のMIP」は、まだ一度もマイクロ化にかけていないMIPであり、依然としてテンプレート分子、または、少なくともMIP構造中のキャビティのテンプレート分子由来のデブリ、が組み込まれている。

#### 【0034】

「マイクロ化」は、テンプレートを保持しているMIPをより小さな粒子に分離するプロセスのことをいう。この目的に好適な方法を使用することができる。

#### 【0035】

「標的分子」は、本明細書において、MIPが結合可能な分子である。

20

#### 【0036】

「テンプレート分子」は、通常、標的分子と同一であり、しかしながら、標的分子の模倣体でもよい(すなわち、少なくとも部分的に同一の3次元構造、およびプロフィール(断面)を有する分子でもよく、すなわち、模倣体は、例えば、標的分子のフラグメントによって構成される)。このテンプレートは、後に標的分子に結合するようになるMIP構造におけるボイドの「発生装置」として機能する。

#### 【0037】

「親和性精製」は、物質と、結合する相手物質と、の間の特別な結合に使用される物質を精製するあらゆる方法のことをいう。これらの方法の多くは、物質を捕捉する固相支持体(クロマトグラフィマトリックス)に結合される捕捉剤を利用する。当業者に周知の典型的な例は、捕捉剤として抗体を用いる親和性精製であり、この捕捉剤としての抗体は、抗体に結合する抗原を精製するクロマトグラフィ用ビーズに結合する。本発明によって用いられる親和性精製の方法は、本明細書に開示された寸法を有する、懸濁された不溶性MIP粒子を、捕捉可能な方法である。従って、通常のプロtein精製方法は、当業者に周知な膨張ベッド吸着(EBA)に拡張される。

30

#### 【0038】

「固相(solid phase)」は、本明細書において、共有結合または非共有結合の手段で捕捉剤をしっかりと固定するために使用される物質のことである。従って、クロマトグラフィ用材料の調製において従来使用される(可塑性ポリマ、糖、金属、ガラス、シリカ、ゴムなど)あらゆる材料は、固相として使用できる。このような固相物質は、問題となる物質に捕捉剤を結合させる好適な官能基を含有してもよい。このような誘導体化された物質は、タンパク質や他の高分子のクロマトグラフィ精製の技術分野の当業者に周知である。さらに、固相は、MIPなどの(タンパク質など単一生体分子と比較した場合)相対的に大きく不溶性の粒子を捕捉できる物理形状を有することができる。従って、固相は、ファイバ状(好ましくは中空)、クロマトグラフィ用マトリックス状(好ましくは、EBAに適したマトリックス)、ビーズ状(好ましくは、電磁石を用いた手段によって隔離される)、または他の好適な形状でもよく、下記の記載を参照されたい。

40

#### 【0039】

本発明による精製の様態の実施例

上述のように、第1の態様における本発明は、標的分子に対する高い結合能力および特

50

異性を有する分子インプリントポリマを具える組成物の調製方法に関し、この方法は、  
a) 標的分子に結合する不溶性MIPの懸濁液を得るステップであって、この不溶性MIPは、テンプレート分子として標的分子またはその模倣体を用いて調製される、ステップと、

b) 懸濁されたMIPを親和性精製工程にかけるステップであって、テンプレート分子、そのフラグメントまたはその模倣体が、捕捉剤として使用される、ステップと、

c) アフィニティ精製工程において前記捕捉剤に結合するMIPを回収し、回収された生成物から捕捉剤に結合しない捕捉剤およびMIPを実質的に排除する、ステップと、

d) 前記組成物を得るために、回収されたMIPと、選択的に、キャリア、ピークルまたは希釈剤と、を混合するステップと(キャリア、ピークルおよび希釈剤は、通常、小さな寸法の固体粒子を具えた薬剤組成の調製において、薬学的に許容され、当業者に周知なものの中から選択される。)、を具える。

10

#### 【0040】

すなわち、この態様は、標的分子(または標的分子の適切なフラグメントなど標的分子の代替物)に対して所望のような十分に高い親和性を示すMIPの濃度上昇(up-concentration)に依存している。しかしながら、この態様は、さらに、元々の未精製のMIPの非結合性フラグメントが、MIP組成物から除去される効果を有し、このこと自体により、MIP粒子の組成物の質量単位あたりの結合能力を大幅に上昇させる(実験例4および付随する図4参照)。本発明は、当業者に周知な方法によって調製された不溶性MIPの組成物が、非結合性粒子の大きなフラクションを含み、このような組成物の質量単位あたりの結合能力が、結合していない結合剤(非結合性結合剤)を除去することによって劇的に改善されるということを初めて示すものである。従って、不溶性MIPの調製は、精製ステップb)を行ってもよく、従って、本発明の第1の態様は、不溶性MIPを調製する周知の方法を、高い結合能力および/または高い特異性を有する手段を含む周知な方法と組合せてもよい。

20

#### 【0041】

下記において、MIP組成物用に設計された精製スキームの様々な実施例が、詳細に記載される。

#### 【0042】

精製スキームの第1の群は、捕捉剤が、共有結合的または非共有結合的に固相(クロマトグラフィ用マトリックスなど)に結合されることを具える。すなわち、このような精製スキームの群は、典型的なクロマトグラフィ精製方法を含む。従って、クロマトグラフィおよび同様の方法で有用な物質は、有用であり、好適な固相は、クロスバインドされた炭化水素、合成ポリマ、金属粒子またはこれらの組合せである。

30

#### 【0043】

精製スキームの第2の重要な群は、捕捉剤が、可溶性化学成分からなるか、またはその一部である(凝集手段によって精製する)。好適な実施例は、可溶性化学成分毎に複数の捕捉剤を露出するために、デンドリマ、置換基を有する炭化水素、および、ポリビニルアルコールおよびポリエチレングリコールなど置換基を有する可溶性ポリマから選択される部分に、捕捉剤が、共有結合的または非共有結合的に結合することを具える。

40

#### 【0044】

1つまたは他の群の精製スキームのいずれかが選択されるにも関わらず、本発明の第1の態様のいくつかの実施例は、テンプレート分子に結合する能力のある、ステップa)で定義されるMIPの結合部位のフラクションにのみ結合する捕捉剤を有することを具える。換言すると、この実施例においては、確実に、所望の結合特異性または結合親和性を有するMIPだけが精製プロセスに保持され、一方、例えば、非特異性または弱い結合部位を有するMIPは、精製段階で排除される。

#### 【0045】

精製プロセスにおける非特異的結合部位を排除する1つの方法は、親和性精製において、テンプレート分子のフラグメントである捕捉剤を用いることを具える。この方法を選択

50

することによって、捕捉剤において、M I Pへの結合性に関して他の分子と競合することがあるテンプレートの一部を取り除くことができる。これは、M I Pが無関係な標的に結合してしまう推測上のクロス反応結合部位を、標的分子が含むような場合に、特に有効である。例としては、黄体化ホルモンに結合するM I P組成物を調製したい場合、L H、F S H、T S Hおよびh C Gのサブユニットは同一であるので、テンプレートにおける上記ホルモン分子のサブユニットを排除することに関連している。

**【 0 0 4 6 】**

この方法の代替例は、以下の構成を利用することであり、ここで、捕捉剤が、捕捉剤の一部のM I Pへの暴露を実質的に避けるために特定の配位性で、固相支持体またはその部分に捕捉剤を選択された官能基で結合することによって、固相面またはその部分の適用できる方に結合したテンプレート分子、その模倣体またはそのフラグメントを具え、結合された捕捉剤の配向性が、結合する全ての相手分子と実質的に同一となる。捕捉剤の一部は、M I Pへの結合性に関してアクセスできず、従って、このように捕捉剤のアクセス不可能な部分に結合可能なM I Pは、全体の精製工程から排除することが可能となる。このような精製方法の生成物は、従って、M I P粒子の組成物となり、この組成物の実質的に全てのM I P粒子が、特定の標的分子に結合し、標的分子の少なくとも1つの結合部位は、組成物のM I P粒子によって結合されない。

10

**【 0 0 4 7 】**

代替としては、捕捉剤とM I Pとの間の結合性が制限されることを、望まないか、あるいは、そのことが評価可能なほど有利であるか、またはその必要性がある場合、本発明の精製方法の1つは、捕捉剤の実質的に全ての部分がM I Pに暴露されるように、非特異的な配位性において、必要に応じて固相表面またはその部分に固定される捕捉分子がテンプレート分子、その模倣体、または、そのフラグメントを、具えることである。

20

**【 0 0 4 8 】**

捕捉剤は、固相支持体に結合される場合、親和性精製は、固相面への捕捉剤の結合に関連する好適な精製技術から選択することができる。しかしながら、精製工程は、膨張ベッド吸着(E B A)、常時性ピーズ分離、および、中空ファイバ精製からなる群から選択される。

**【 0 0 4 9 】**

膨張ピーズ吸着(E B A)

30

コラム中に入れられたベッドを用いる従来のクロマトグラフィの方法は、通常、ベッドの定位にあるポイド内に非特異的に捕獲される粒子の性質により、特定の物質を単離するのに使用されない。

**【 0 0 5 0 】**

E B A内の主な原理は、クロマトグラフィ用過物質(「固相」)を流動化し続けることであり、それにより、上述したように、粒子がコラムを通過できる。E B A技術を用いる利点は、未精製の原材料をコラムに入れる前に、ろ過または遠心分離などのプレカラム清浄化ステップなしで、未精製の原材料または培養細胞からほとんどの場合タンパク質またはペプチドである可溶性物質を精製可能であることである(van Reis & Zapata; Lihme et al)。このアイデアは、細胞デブリや沈殿物などの不要物または特定の物質が洗浄されると同時に、ベッドの固相に標的分子を結合させることである。このように、これらのプロセスの時間と費用は減少し、従って、E B Aは、非常に多くの分子を精製するための経済的で推奨される価値ある技術である。しかしながら、ベッドが膨張されると、ベッドの定位のポイド量が増加することによって、特定の物質が通過でき、従って、ベッドの固相と適切に接触し、その結果、対象となる特定の物質と、ベッドの固相と、の間の結合親和性が、必要であれば達成される。この場合、E B Aは、細胞と他の特定の物質を選択するのに使用可能であり(Ujam et al)、ここで、抹消血からのモノサイトは、未精製の血球と混合されたビオチン化されたアンチCD14抗体を用いて単離され、続いて、ベッド粒子にストレプトアビジンが供給されるE B Aシステムに適用された。

40

50

## 【0051】

本発明は、EBAシステムの固相またはベッド粒子が、前記MIPを作製するために使用されたテンプレートに類似するか、または同一の化学構造に暴露された場合、MIP技術によって調製された粒子が、同様の方法において、EBAによって分類または精製できると結論づけている。ベッド粒子がEBAシステムの流体の一部の流れとともに輸送されるが、MIP粒子が比較的一定の膨張量で保持されることは重要であるので、比較的に高密度( $> 2 \text{ g/ml}$ )のベッド粒子は、流体化プロセスにおいてベッドに結合したMIPから結合していないMIPを分離するために、優れていることが明らかになるだろう。このように高密度のビーズの例は、Ujamaらによって開示されている。ベッド粒子が非多孔性であるか、制限された多孔率を示すことが好ましい(参照Chase *infra*)。コレステロールや胆汁酸などのテンプレートは、好ましくは、テンプレート分子の構造特性および化学特性に暴露される配向で、ベッド粒子および調製されたMIPにカップリング(結合)され、 $0.2 \sim 50 \mu\text{m}$ (下記参照)の好ましいサイズのものが、流体化ベッドに適用され、適宜な反応時間後、未結合MIPを含む流体相の再循環させ、未結合のMIPは、例えば、流速を増加させることによって、または単純にEBAシステムに洗浄用緩衝液を適用することによって洗浄し、この流れを排出させる。結合したMIPは、可溶性テンプレートを適用すること、熱、イオン強度を増大させること、または、ビーズに物理的ストレスを与えることによって、ベッド粒子から放出される。上述したように、非多孔性または制限された多孔率のベッド粒子を使用することも可能である(Chase参照)。

10

20

## 【0052】

貫流(flow-through)によるベッドの膨張化または流体化に代替して、ベッドは、機械的な攪拌、転倒型混合、振とう、超音波および他の対流/質量輸送方法によって、膨張できる。続いて、ベッド粒子に結合したMIP粒子の分離は、貫流相を介してベッドの適宜な流体化によってなされる。代替として、結合したMIPと、結合していないMIPとは、密度、寸法、形状、光学特性の違いによって、または、遠心分離、半導体、ろ過、捕捉によって分離でき、あるいは、寸法および/または重量、密度、形状、色、光放出、光散乱、膨張係数を利用する他の手段によって分離できる。

## 【0053】

従って、精製の従来技術において記載したように、粒子をEBA手段によって分類または精製可能であり、本発明によれば、このことは、EBAシステムの固相またはベッド粒子がMIPを作製するのに使用されるテンプレートに類似する化学構造に暴露された場合、MIP技術によって調製された粒子に有利に適用することができる。

30

## 【0054】

磁性粒子に結合させることによる分離

Dynal(Invitrogen)および他の会社は、通常タンパク質、ペプチドまたはDNAである可溶性分子を主に精製するために、常時性ビーズを用いる技術を開発し、例えば、常時性ビーズに固定した抗体に特異的に結合することによって、細胞および細胞小器官を単離することも実現した。より大きなビーズM450( $450 \mu\text{m}$ )は、細胞など特定の材料などの単離に推奨される。磁性ビーズが捕捉分子を保持した後、通常、細胞の膜タンパク、および、1つの細胞や他の特定材料などの標的に特異的な抗体を、適宜な時間長さで接触させ、この段階で、抗体を介して細胞に結合している常時性粒子を、磁場をサンプルコンテナにかけることによって、固定する。結合していない細胞は、常時性ビーズが固定され、磁場を常時性ビーズから除くと、洗い流される。これらのビーズは、例えば、トシル、エポキシ、カルボキシおよびアミンなど様々な種類の活性(因子)とともにDynalから商業的に入手可能であり、上記の様々な因子は、抗体、もしくは、MIP合成のテンプレート分子など、他の捕捉分子を結合するのに使用可能である。

40

## 【0055】

コレステロールまたは胆汁酸などテンプレートを、上記の常時性粒子に結合させることによって、テンプレート反応性MIPは、常時性粒子に結合し、特異的な膜タンパク質を

50

保持する細胞を単離するのと同様に、磁場を当てることによって、テンプレートに結合したMIPと結合していないMIPを分けることができる。

【0056】

凝集 (agglutination) による分離

凝集は、分子および粒子や細胞が、溶解度または懸濁特性の変化によるネットワーク形成とともに複数の相互作用が形成される場合に生じる事象であり、ネットワークの形成は、例えば、光学特性または顕微鏡観察における変化によって、検出可能である。凝集は、迅速なポイントオブケア (POCT) 試験における診断目的で主に使用される。例えば赤血球間のクロスリンクを促進するように可溶性成分は、多くの場合、2つの (ジ-) 抗体または複数の抗体 (Plaque et al.)、レクチン、または用途特異的な抗原である (Rogers et al.)。

10

【0057】

例えば、コレステロールまたは胆汁酸などに付与される dendritic 構造体など、複数のテンプレートまたはテンプレート類似分子に暴露される可溶性分子は、MIP 集合体に適用され、MIP 集合体は、例えば、機械的攪拌、転倒混合、振とう、超音波、流体相流などによって、流体化または懸濁液状態を保持する。これらのテンプレート反応性 MIP は、例えば、dendritic の上に露出され、好ましくは、ネットワークを形成するテンプレート分子と相互作用し、ここで、テンプレート分子を露出する dendritic 構造体は、クロスリンク剤として作用する。

20

【0058】

結合していない MIP 粒子は、密度、寸法、形状、光学特性における明確な差異によって、遠心分離、半導体、ろ過、フローサイトメトリ、捕捉によって、または、寸法および/または重量、密度、形状、色、光放出、光散乱、膨張係数を利用して分離する他の手段によって、凝集またはネットワークで統合された MIP 粒子から分離される。続いて、テンプレート反応性 MIP 粒子は、熱、有機溶媒、振とうを凝集またはネットワークに与えることによって、または、過剰に可溶性テンプレートに当てることによって、単一の粒子として抽出される。

【0059】

MIP のマイクロ化に関連した実施例

コレステロール特異的な MIP を調製するための先行技術として既に行われた試みにおいて、能力は、MIP 1 g あたり 17 mg のコレステロールに制限されるが、しかしながら、同様に調製された未インプリント MIP は、MIP 1 g あたり 13 mg のコレステロールに結合した (Sellergren 1998)。他の試みは、MIP 1 g あたり 1 mg のコレステロール未満の能力を得る (Whitcombe 1995)。

30

【0060】

本願の発明者達は、MIP 粒子組成物における有効なバイндаを濃縮しなかった結果として、十分な結合力を得ることについての先行技術の問題点を把握した。

【0061】

MIP のテンプレート結合能力に対する最も単純なモデルは、ピュアエリアである。MIP 粒子表面積の関数としてのテンプレート (例えば、コレステロール) によって占有されるこのエリアは、粒径および結合効率 (1つのテンプレートによって覆われる MIP 表面の割合) に対する要求を決定する基準として使用することができる。

40

【0062】

理論的な観点

下記の結果に示される以下の計算例は、球形ポリマ粒子のテンプレートコレステロールに関する。コレステロールは、分子直径 16 (1.6 nm) を有すると仮定される。

【0063】

標的分子 (コレステロール) によって被覆される面積 A は、円とみなすことができる。この面積は、

$$A_T = \pi \times r_T^2 \quad (r_T \text{ は、標的分子の分子半径である})$$

50

によって与えられる。

【0064】

球形面積（MIP粒子）は、

$$A_{MIP} = \pi \times d_{MIP}^2 \quad (d_{MIP} \text{ は、MIP球面の直径である})$$

によって与えられる。

【0065】

どのくらいのMIP（質量）を、十分な量のコレステロールと結合するのに必要か評価するために、使用されるポリマの密度が必要である。選択される密度は、限界にさらされる。

【0066】

MIPの結合能力は、所定量のMIP（ $m_{MIP}$ ）によって結合可能な標的（ $m_T$ ）の質量である。

$$\frac{m_T}{m_{MIP}} = \frac{n_T \cdot M_w^T}{V_{part} \cdot \rho_{MIP}} = \frac{\frac{A_{MIP}}{A_T} \cdot CA \cdot M_w^T}{V_{MIP} \cdot \rho_{MIP}}$$

【0067】

CAは、標的によりMIP面の被覆された面積（Covered Area）である。これは、さらに

$$\frac{m_T}{m_{MIP}} = \frac{M_w^T \cdot CA}{N_A \cdot r_T^2 \cdot \pi \cdot r_{MIP} \cdot \rho_{MIP}}$$

縮小され：

数学用語において、直感的に予想される結果を提供する。

- ・標的の寸法がより小さくなると、能力が増加する。
- ・MIP粒子がより小さくなると、能力が増加する。
- ・MIP密度がより小さくなると、能力が増加する。

【0068】

結合に関連するMIP粒子の表面の記述は、各々の粒子の同士間に起因する。

【0069】

通常50mMの加えられるテンプレート分子が、重合化前に全容積に均等に分配されると仮定される場合、粒径の関数としてMIP粒子中の理論的なテンプレート分子の数は、計算可能である。テンプレート分子の数、および、従って、所定量における可能性のある結合部位の数（例えば、粉碎された粒子）は、所定の標準偏差を有する標準的な部分によって記述可能である。理論的に、これは、

$$s_x^2 = \frac{\sum (\Delta r - \bar{\Delta r})^2}{n-1}$$

によって、粒子上の2つのサイト間の標準偏差  $s_x$  が与えられる粒子のばらつきに影響を与えないであろう。ここで、 $r$  は、2つのサイトの実際の距離であり、

$\bar{\Delta r}$

は、2つの結合部位の間の所定の中間距離であり、粒子中のテンプレート分子の配置によって決定される。nは、各粒子の結合部位の数を表す。

$\Delta r - \bar{\Delta r}$

およびnの双方が、粒径の減少とともに増加すると、 $s_x$  は、粒子のミクロ化によって変更されない。例えば  $10^{-8}$  m未満（表1参照）など、粒子が極めて小さいときであって、粒子中に大きな相違性（dissimilarity）があれば、平均は粒子あたりの

10

20

30

40

50

1 テンプレート分子未満である。実際には、このような相違性は、おそらく、 $10^{-8}$  m より大きな粒子を含むように「上方に」「拡張」され、また、この相違性は粒径が増大するにつれ減少し、多くの結合部位を有するより大きな粒子の場合、重要になる。

#### 【0070】

一方、テンプレート分子の配向は、相違性を生じさせる。テンプレート分子の長手方向は、粒子の垂直方向に配向される場合、原則として、配向の2つの方向を有し、垂直方向位置のテンプレート分子は、長手方向軸の周りを回転する場合、異なる結合部位を生じさせないと仮定される。しかしながら、テンプレート分子の長手方向が、粒子面と平行に配向される場合、テンプレート分子が自身の長手方向軸の周りを回転するときに、異なる結合部位が生じる。すなわち、この場合の自由度の数（テンプレート分子が湿ることができる可能な位置）は、無限にあり、長手方向軸の周りを回転させる結果として、各々の新しい配向は、原則として、他のサイト全てと異なる結合部位を形成する。全体として、このことは、テンプレート分子の配向が無数の各種結合部位を生じさせることを意味している。

10

#### 【0071】

これらの結合部位は、テンプレート分子に対する結合定数  $K_d$  によって特徴付けられる。いくつかの配向は、異なる場合であっても、同一の  $K_d$  を有する結合部位を明らかに生じさせるが、大幅に異なる  $K_d$  の結合部位もあり、以下の説明により明らかになる。

#### 【0072】

結果と評価

表1は、

- ・ 粒径の関数として、 $0.9$  nmの厚さの球状シェルにテンプレート分子数の計算、
  - ・ 発見されることが予想される結合部位の総数の計算、
  - ・ 予測される高親和性結合部位数の計算、
- を示す。

20

#### 【0073】

2つのコラムにおける数値は、公開された観測値に基づいて計算される (Kemppe and Mosbach 1991, Ramstrom et al 1994, 1996 II, Liu, Mosbach 1997 and 1998, Andersson et al 1995)。球状シェルの厚さは、動的量の半径として選択され、例えば、コレステロール (Davidson and Hayes, 2002) など、 $1.8$  nmの長さを有する分子が有すると仮定される。通常、MIPは、MIP 1gあたり  $20 \mu\text{mol}$ の結合部位を含有するが、結合定数 ( $K_d$ ) のばらつきは、 $10^{-3} \sim 10^{-9}$  Mと非常に大きく、上述した仮定とともに一致し；高親和性結合部位の共有は、結合部位の総数の1%未満を示す (Ramstrom et al 1996 II, Andersson et al 1995)。例えば、異なる副腎皮質ステロイド (例えば、コレステロールに構造的に類似する分子) に対するMIPを記述したRamstrom et al 1996 IIは、高親和性結合部位 ( $< 10^{-6}$  M)の占有率 (share) は、各々、 $0.075\%$  および  $0.28\%$  である。表1の計算において、高親和性結合部位は  $0.5\%$  と仮定される。ここで参照される粒子において、粒径は、通常、 $25 \mu\text{m}$  である。この寸法は、手を使って乳鉢でポリマを処置することによって相対的に容易に結合される。

30

40

表1

粒径の関数として薄球状シェルにおける結合部位の数

粒子直径 (m)	50nmのテンプレート有する 0.9nmの球状シェルの テンプレート分子数	球状シェルの予測される 結合部位数	球状シェルの予測される 高親和性部位数
1.0E-04	847,784,740	373,025,285	1,865,126
1.0E-05	8,476,474	3,729,649	18,648
5.0E-06	2,118,737	932,244	4,661
1.0E-06	84,627	37,236	186
5.0E-07	21,119	9,292	46
1.0E-07	833	366	2
1.0E-08	7	3	0

10

## 【0074】

実際に、 $10\ \mu\text{m}$ となる結合部位の最大数は、 $3,700,000$ であることがわかった(表1)。 $10\ \mu\text{m}$ の粒子を $1\ \mu\text{m}$ の粒子に粉砕する場合、新規な $1\ \mu\text{m}$ 粒子は、 $37,000$ 結合部位を有し、すなわち、もともとの $10\ \mu\text{m}$ 粒子の1%である。原則として、 $10\ \mu\text{m}$ 粒子から結合部位が、 $100$ 個の新しい $1\ \mu\text{m}$ 粒子に分配される。非常に多くの異なる結合部位があるので、新しく作製された $1\ \mu\text{m}$ 粒子においてばらつきが間違いなくあり、 $10\ \mu\text{m}$ 粒子に存在した「異なる」結合部位の1%を含む。同様の結果は、高親和性のある結合部位のフラクションのみ、すなわち総数の0.5%が使用される場合に得られる。しかしながら、結合部位数は少なくなるので、結合部位がほとんどない結果(セクション1に記載)は、各々の粒子間の相違性にさらに役立つと仮定される。

20

## 【0075】

粒子の「ホール」が結合部位として規定されるとき、限界には疑問の余地があるが、 $10^{-5}\ \text{M}$ より大きい $K_d$ を有する結合部位は、治療用途の使用において、関連性をほとんど有しない。アメリカで製薬学的に好ましいモノクロナール抗体は、 $10^{-7}\ \text{M}$ (Carter 2006)未満の $K_d$ 値を有する。

## 【0076】

粒子中のテンプレート分子の分配(所定の対応する標準偏差)は、重合化中の混合物の温度、速度、テンプレート分子の寸法、溶媒および他のモノマとの相互作用の間、などのパラメータにさらに依存するが、これらのパラメータは、位置および配向を記述するために本明細書に使用されるアセスメントと同様に、一般的ではない。これらのプロセスパラメータの使用は、粉砕化された粒子間の相違性を促進する点において、関係性がある。

30

## 【0077】

上記の記載において、自由度の数は、各テンプレート分子の位置のみをいい；テンプレート分子の配向にリンクした自由度の数は、おそらく、低親和性および高親和性結合部位の配置に直接反映される。高い特異性と結合能力の粒子組成物を作製するために計画する際、我々は分離における適宜な高い厳密性(stringency)を使用し、厳密性が、主に、分類され選択される高い親和性結合部位である。関係性の数、すなわち、高親和性結合部位が、ある寸法に達し、このパラメータ(数値)が、言及するのは難しいが、相違性を決定するのに、適宜な予測値は、おそらく約 $1\ \mu\text{m}$ である。

## 【0078】

チャンネルを有する非常に固い粒子を作製する方法が提供され、このチャンネルは十分に広いので、流体は、粒子の外側面ですぐに利用可能なさらなる結合部位に暴露することを望む場合は、分散速度を制限せずに、チャンネルを介して流れる。この方法は、Poros<sup>T</sup>Mマトリックスとして周知なクロマトグラフィシステム(例えば、Applied Biosystemによって提供される)において使用され、粒子を介した流体流は、粒子の周囲の流体の粒子と同じであるので、溶解度に影響がないように流れを速くすることが可能である。

40

## 【0079】

腸管のぜん動を利用し、コレステロールまたは胆汁酸結合MIPとの接触を増加させるように、チャンネルを有する粒子は有利である。ゲルを使用する場合、腸管の「交換」は、

50

ゲルへの拡散速度に限定される可能性がある。グルコースが特異的なサイトに結合すると、ゲルオープニングによって作用するドラッグ放出システム（例えば、インシュリン放出）の主な目的で、MIPゲルを作製した。このことによって、ゲルを有するMIPを作製するのが実際に可能であることが明らかになった（Wizeman and Kofinas 2001, Seong et al 2002）。

#### 【0080】

##### ミクロ化の態様の実際の実施

従って、上記から明らかなように、本発明の第2の態様は、標的分子に対する高い結合能力および特異性を有するMIPを調製する方法を含む。前記方法は、標的分子またはその模倣体からなるテンプレート分子を具える未精製のMIP（すなわち、重合化クロスリンクMIPであり、ここで、テンプレートの実質的な抽出またはMIP構造のミクロ化は、まだ実施されていない）を、ミクロ化の第1段階にかけ、テンプレート分子を除去/抽出可能なほど十分小さいMIP粒子を得るステップと、実質的に全てのテンプレート分子を除去/抽出するステップと、得られたMIP粒子をミクロ化の選択的な第2段階にかけ、ステップと、を具え、ミクロ化の前記第1段階および選択的な第2段階は、ほとんど25  $\mu\text{m}$ のMIPの平均直径を与える。従って、この方法を使用することによって、体積と暴露される結合部位との間の優れた比率を有するMIPが得られる。テンプレート分子を除去可能であるので、所望の小さなMIP粒径を得るために、第1段階のミクロ化のみを使用するので十分である（最も単純）が、しかしながら、MIPからテンプレートの分離は、2つのミクロ化段階を有することによって推進される状況がイメージされ得る。

10

20

#### 【0081】

ミクロ化段階後のMIPの平均直径は、15  $\mu\text{m}$ 未満、10  $\mu\text{m}$ 未満、5  $\mu\text{m}$ 未満、1  $\mu\text{m}$ 未満、900 nm未満、800 nm未満、700 nm未満、600 nm未満、500 nm未満、400 nm、300 nm、200 nmなど、20  $\mu\text{m}$ 未満である。

#### 【0082】

あらゆる比率で、所定の組成物のMIPは、ミクロ化の後、実質的に、直径が50  $\mu\text{m}$ （40、30、20、10または1  $\mu\text{m}$ より大きいなど）より大きい粒子を実質的に含まない。

#### 【0083】

ミクロ化は、MIP寸法を最小化する適宜の方法による手段、すなわち、グリーンディング、ミリング、破裂（explosion）、ハンマ、ボールミリング、クリオグリーンディング（cryo grinding）およびコロイジョンホモジナイズ、ならびに、これらの方法の組合せた方法、によって得られる。

30

#### 【0084】

上述したことから明らかなように、本発明の非常に重要な実施例は、本発明の第1および第2の様態の組合せを具え、すなわち、本発明による小型のMIP粒子のミクロ化を具えるMIPの第1の調製であり、本発明の第1の態様について詳細に説明された親和性精製スキームが続く。

#### 【0085】

ほとんどの場合、MIPは、クロマトグラフィ用システムにおける分析目的に使用されるか、センサにおけるタンパク質置換体として使用される。このような用途におけるMIP粒子の寸法は、通常、25 ~ 100  $\mu\text{m}$ の範囲である。これらのMIP寸法は、上述したように、非常に大きいので、例えば、経口使用などMIP組成物を補助する際に、所望の結合能力を得にくく、さらに、これらの大きなMIPは、従来の細胞精製方法の手段によって、選択/精製できない。

40

#### 【0086】

適宜な能力を得るために、MIP粒子の寸法は重要である。MIPの所定の質量における能力を増加させる方法は、上記のように、容積に対する面積比を増加させることによって、（すなわち、MIP粒子をより小さくする）、および/または、「活性」領域を促進させることによって（所望の検体を結合させることができるMIPの領域）なされる。レ

50

シブロ的な直径、すなわち、直径を半分にし、容積に対する面積比を倍にするように、容積に対する面積を増加させた。これは、M I Pの質量単位あたり粒子直径を25  $\mu\text{m}$ から0.4  $\mu\text{m}$ に縮小することによって、結合能力において64倍の上昇したことを意味する。

表2. 粒子直径の関数として容積に対する面積比の上昇

このような上昇は、25  $\mu\text{m}$ の粒子直径に対する指標である。

粒子直径 ( $\mu\text{m}$ )	指標
25.0	1
12.5	2
6.3	4
3.1	8
1.6	16
0.8	32
0.4	64
0.2	128

10

#### 【0087】

本発明によれば、0.5  $\mu\text{m}$ 範囲の直径を有するM I Pは、テンプレート結合ベッド粒子を用いるE B Aシステムにおいて機能的選択/精製によって能力(フラクシオンを結合する面積)に対して最適化され得ることが考慮される(本発明の第1の態様に関する記述参照)。M I P粒子などは、E B Aシステムにおいて表面特性によって単離されることが知られている細胞と、同様の寸法範囲である。粒径を所望のように小さくするために、様々な寸法間隔に最適とするような各種方法によって、複数の方法でグリーンディング/ミリングすることが必要である(下記参照)。

20

#### 【0088】

バルクポリマから所望の粒径を得るために、多くの場合、1つ以上のグリーンディング方法を用いる必要である。mm程度からサブミクロン程度まで全てのポリマをミリングできる今日の技術は存在しない。

#### 【0089】

ポリマと相性のよい水膨張物質を挿入し、湿潤方法および凍結方法(例えば、Cry o G r i n d <sup>T M</sup>技術)を用いることによる小型化によって、効率的にポリマは200  $\mu\text{m}$ 未満のより小さい粒子に分解(ブレイク)される。このプロセスを容易にするために、ポリマ中の多孔構造は、ファイバ(例えば、セルロース、酢酸セルロース)をポリマ内に加えることによってなされる。

30

#### 【0090】

高濃度テンプレートを用いることは、高い結合能力のポリマおよび容易に小型化できる構造的に脆弱なポリマの両方を提供することができる小さなポリマドメインを形成できる。

#### 【0091】

サブミクロン粒子へのさらなる小型化は、ナノミリング/グリーンディング(例えば、N E T Z S C H ピーズミル)、すなわち、20  $\mu\text{m}$ から40~200 nm程度に粒子をグリーンディングトップダウンするによって実施可能である(このような粒子のタイプは、医薬品に使用される)。

40

#### 【0092】

空気ジェット、液体ジェットまたは同様の方法の助力でM I Pを加速し、この高速流のM I Pおよびその担体を衝突力を用いて固体ターゲットにぶつけ、M I Pをより小さい粒径に分解することによって、M I Pを小型化することが可能である。

#### 【0093】

最終的に、M I Pの物理的なグリーンディングの例示的な利用に示されるように、例えば、単純な乳鉢において、多数のM I Pに対する有効性が証明された。

#### 【0094】

本発明に関連するさらなるポイント

50

### M I P用のポリマの選択

2つの物質間で優れた接着を得るために、ぬれ張力は、低くしなければならない。すなわち、いかなる反発力もポリマ面のリガンド吸収に対して作用してはならない。M I Pに対して正しい物質を選択するために、適宜なポリマに対するモノマを選択しなければならない場合、ハンセン溶解パラメータ(H S P)(H a n s e n C M参照)を考慮する。

#### 【0095】

コレステロールの場合、このH S Pは、化合物に対して決定され、ポリマの配列(テーブル)を研究することによって、強力な疎水性ポリマが、コレステロールに結合可能なM I Pを調製するのに良い選択となることがわかった。コレステロールのH S Pは、(D、P、H、R)=(20.4; 2.8; 9.4; 12.6)であり、コレステロールのH S Pスフェアと重なるM I Pに対するポリマのリストは、高密度ポリエチレン(H D P E) > ポリ塩化ビニル(P V C) > ポリアクリロニトリル(P A N) > ポリプロピレン(P P) > テフロン(登録商標)(P T F E) > ポリ酢酸ビニル(P V A c) > ポリスチレン(P S) > ポリブチルメタアクリレート(P B M A) > ポリカーボネート(P C) > ポリスチレン-ポリメタクリル酸(P S / P M A Aコポリマ) > ポリエチレンテレフタレート(P E T P) > ポリウレタン(P U R) > ポリスチレンアクリロニトリル(S A N) > ポリメチルメタクリレート(P M M A) > ポリアミド(例えばナイロン66) > ポリビニルジフルオライド(P V D F) > ポリビニルアルコール(P V A)である。これらのポリマの全てが、クロスバインダおよびテンプレートとともに容易に重合化されるわけではないが、上記のリストは、最も適したポリマを与えるモノマおよびクロスバインダの選択のための都合の良い開始ポイントである。コポリマ、ブロックポリマおよびコブロックポリマ(など)も、所定の標的リガンドに対してH S Pが適合するように作製可能である。

10

20

#### 【0096】

##### テンプレート抽出

M I Pからのテンプレート除去は、小型化プロセス後で精製段階前に行わなければならない。小型化プロセス中に冷却が必要な場合、テンプレートを十分に溶解する溶媒は、冷媒として優れた選択である。

#### 【0097】

テンプレート除去は、溶媒および溶媒混合液を利用することによって、単独で、または、熱、増大または減少したイオン強度と組合せて行うことが可能である。使用される方法の一般的なものの1つはソックスレー(s o x h l e t)抽出方法であり、M I Pは、半連続的な状態で、新鮮な蒸留した溶媒(または混合液を使用する場合、アゼオトロープ)で洗浄される。最終的な(およびクロス結合される)M I Pは、熱安定的であり(テンプレート分子は熱安定的でない)、抽出前の発熱性の工程は、テンプレートを破壊するように適用することができ、従って、例えば、テンプレートを溶解するために使用されるのに一般的でない溶媒の使用などによって、除去するのが容易になる。

30

#### 【0098】

##### 本発明の調製の様態に関する発見

本願の発明者達は、高能力を有するM I Pを調製するために、M I P調製、ミクロ化、テンプレートの除去、および利用可能なM I Pの選択は、ミクロ化および選択技術に特に集中して、使用される。

40

#### 【0099】

従って、従来 of M I P調製および精製方法を、細胞および/またはタンパク質分野で周知の選択および精製方法と組合せる場合、優れた結果が得られる。

#### 【0100】

例は、M I P技術「モノマの選択」から、ミクロ化、抽出および篩は、E B Aなどの機能的精製と組合せられる。膨張ベッドの官能基を有するマトリックス/表面に結合させる能力に従ってM I P粒子を分類することによって、従来 of 「上流」M I P製品は、「下流」の選択段階および精製段階で捕捉して完全なものとなる。

#### 【0101】

50

上述のように組合せられたプロセスの極めて簡略化した概要は、図2にみられる。

【0102】

本発明のMIP組成物に関する有用な標的分子（もしくはテンプレート分子）の典型的な例は、ヒト胃腸管などの胃腸管で見られる。特に好ましい標的分子は、病理学的に関連したモノである。特に好ましい標的分子は、コレステロール、胆汁酸または胆汁酸塩であり、さらに、毒物、毒素（細菌、ウイルス、真菌および寄生虫の毒素）ならびに細菌、ウイルス、真菌および寄生虫などの病原体にみられる抗原およびレセプタが、本発明によって調製されるMIP組成物用の対象となる標的/テンプレートである。

【0103】

本発明による組成物および薬学的利用

10

本発明の手段によって得られるMIP組成物の少なくともいくつかは、新規な組成物であると考えられる。従って、本発明は、以下の特性の少なくとも1つを有するMIP組成物に関連する。

- 1) MIPの平均直径が20  $\mu\text{m}$ 未満である；
- 2) 標的結合の平均が、MIPの10質量単位に対して少なくとも標的の1質量単位である；
- 3) 組成物中の実質的に全てのMIPは同一標的分子に結合し、組成物は標的分子に対する結合部位の全てを含まない。

【0104】

これらの特徴の1)、2)、または3)は、本発明の組成物によって充填され、特徴1のみ、特徴1および、特徴2または特徴3の一方、特徴2単独、特徴2および特徴3、特徴3単独、特徴1、2および3の3つ全てを有することが望ましい。

20

【0105】

MIPの平均直径は、10  $\mu\text{m}$ 未満、5  $\mu\text{m}$ 未満、1  $\mu\text{m}$ 未満、900 nm未満、800 nm未満、700 nm未満、600 nm未満、さらに500 nm未満、400 nm、300 nm、および200 nmなど15  $\mu\text{m}$ 未満であることが望ましい。

【0106】

あらゆる比率で、本発明の所定の組成物が、50  $\mu\text{m}$ より大きい直径（40、30、20、10または1  $\mu\text{m}$ より大きい直径）を実質的に含まないことが望ましい。

【0107】

30

本発明の好適な組成物は、上述した標的分子、すなわち「有用な標的分子の典型的例」である1つに結合する。

【0108】

本発明の組成物（および本発明によって調製された組成物）は、薬剤として有用であり、抗体組成物を使用するのと同じような多くの方法において使用できる。しかしながら、これらの安定性により、MIP組成物は、経口投与に適しており、組成物は、抗体および多くの可溶性タンパク質レセプタとは違い、小腸におけるタンパク質分解に対して安定である。さらに、胃腸上皮を横切ることができない物質から調製することができるという事実より、胃腸管に制限される病理学関連分子/因子に有用である。適宜な標的は、コレステロール、胆汁酸および胆汁酸塩であり、胃腸管における病原体にみられる各種毒物または抗原/リガンドでも可能である。

40

【0109】

しかしながら、MIPが適宜な生物学的適合性および/または生物学的分解ポリマから調製される場合（例えば、ポリ乳酸（PLA）、ポリグリコール酸（PLG））、これらは、非経口薬剤としても使用でき、この薬剤に対する望まない免疫応答の上昇に関する危険性は、抗体または可溶性レセプタなどの投与と比べた場合減少する。このような実施例において、抗体または可溶性レセプタに対する適宜な標的である実質的に全ての標的分子は、本発明のMIP組成物の標的となり得る。

【0110】

従って、好適な実施例において、本発明は、循環器疾患、高血圧、アステローム硬化症

50

、心臓疾患、胆石症、胆汁うっ滞性肝疾患、高コレステロール血症、肥満、寄生虫、ウイルスまたは微生物（例えば、細菌、真菌）由来の感染、口から入った毒に由来する中毒からなる群から選択される疾患の治療、改善またはそのリスクを低減する方法に関連し、本発明の組成物、または本発明に従って調製された組成物の有効量を必要とする対象に投与することを見える。本発明の実施例は、循環器疾患、高血圧、アステローム硬化症、胆石症、胆汁うっ滞性肝疾患、高コレステロール血症、肥満、肥満、寄生虫、ウイルスまたは微生物（例えば、細菌、真菌）由来の感染、口から入った毒に由来する中毒の治療、予防、改善のための製剤の調製における組成物の使用を見える。通常、経口投与は、ポイントである。

#### 【0111】

本発明の組成物または本発明に従って調製されるMIP組成物の予測される1日量は、1日あたりおおよそ40gであるが、MIPの標的への高い結合能力により、1日あたりおおよそ30g、20g、10g、5g、1gなど、より少ない1日量でもよい。

#### 【0112】

MIPは、当業者に周知な標準的な方法に従って、特に経口用に製剤化されてもよく、MIPは、粉末、エマルジョン、封入化エマルジョン、ピルおよびタブレットの形状、ならびに、食料中の成分として投与され、MIPは、実質的に食品または食料中に分散される。

#### 【0113】

組成物などにおけるMIPの製剤に関して、参照することによって本明細書に組み込まれるMark Gibson、CRC press 2001を参照されたい。

#### 【0114】

もちろん、本発明のMIP組成物および本発明に従って調製されたMIP組成物は、用途の全ての種類において使用され、MIPは、先行技術における特別の結合相手として提案されている。従って、本発明が、本発明のMIP組成物の医学的使用に着目しているが、このことによって、分析装置およびそれ自体は周知な方法において、本発明で開示されたMIP組成物の使用を排除されることはしない。従って、本発明は、その範囲内に、サンプル中の標的分子の量的または定性的な決定方法を含み、この方法は、本発明の組成物または本発明に従って調製される組成物とサンプルを接触させるステップと、組成物中のMIPは、標的分子に特異的に結合し、続いて、前記組成物に結合する標的分子の量的または定性的評価を行うステップと、を見える。MIPの通常の調製および使用に関するこれまでの開示は、参照することによって全て本明細書に組み込まれる。

### 実施例のプレアンブル

#### 【0115】

##### 分子インプリントポリマの通常の作製方法

MIPの調製は、官能基を有するモノマを、適宜な溶媒中でプリント分子および架橋性モノマと混合する一般的な反応方法の後に続く。モノマの選択は、プリント分子が配列されるようにモノマの能力に従ってなされるが、これは、当業者にとってはルーチンである。重合化は、適宜な濃度のイニシエータ（開始剤）を添加することによって始まり、例えば、UV光（UVイニシエータ）または熱（熱分解性イニシエータ）などで攪拌される。

#### 【0116】

重合化後、（多くの場合）、固体および収縮したポリマは、所望の寸法にマイクロ化され、プリント分子、結合していないモノマおよびクロスリンク、開始剤の残りは、抽出によって除去されるか、直接洗浄および/または所定時間で溶媒を還流することによって除去される。

#### 【0117】

##### 実施例1

##### テンプレートとしてのフルオレセインを有するMIP

100mlフラスコに、1.4mlのモノマメタクリル酸（MAA）、9.5mlのエ

10

20

30

40

50

チレングリコールジメタクリル酸 (EGDMA)、50 mg のフルオレセイン、および、10 ml のテトラヒドロフラン (THF) を高温浴 (約 40 ) で 30 分間混合する。2 g の 1, 1 - アゾビス (シクロヘキサン - カルボニトリル) (ACHCN) をゆっくり添加する。溶解後、溶液を Ar (THF 飽和) で 15 分間パージする。48 時間、連続的に UV 光 (365 nm、9 W) をあてることによって重合化を開始する。得られたポリマは、黄色のクリस्प (crisp) であり、手を使って乳鉢で 10 ~ 25 μm の粒径にミクロ化した。粉末を、THF 中で 30 分間還流し、エタノール / THF (75 : 25) で数回洗浄して過する。白色粉末が残り、空気乾燥する。

#### 【0118】

##### 実施例 2

##### テンプレートとしてのコール酸を有する MIP

100 ml フラスコに、1.4 ml のモノマーメタクリル酸 (MAA)、9.5 ml のエチレングリコールジメタクリル酸 (EGDMA)、2 g のコール酸および 12 ml のテトラヒドロフラン (THF) を高温浴で 30 分間混合する。0.2 g の 2, 2' - アゾビスイソプロピロニトリル / 2, 2' - アゾビス (2 - メチルプロピオニトリル) (AIBN) をゆっくり添加する。溶解後、溶液を Ar で 15 分間パージする。氷浴で 24 時間連続的に UV 光をあてることによって重合を開始する。得られたポリマは、黄色で固く、手を使って乳鉢で 25 ~ 50 μm の粒径にミクロ化する。粉末を THF 中で 30 分間 (1 回) 還流し、エタノール / THF (75 : 25) で 4 回洗浄して過した。オフホワイトの粉末が残り、一晚空気乾燥する。

10

20

#### 【0119】

##### 実施例 3

##### テンプレートとしてのコール酸を有する MIP

100 ml のフラスコに、2.8 ml のモノマ 2 - (ジメチルアミノ) - エチルメタアクリル酸 (DMA-EMAA)、9.5 ml のエチレングリコールジメタンアクリル酸 (EGDMA)、2 g のコール酸および 12 ml のテトラヒドロフラン (THF) は、高温浴で 30 分間混合する。0.8 g の 2, 2' - アゾビスイソプロピロニトリル / 2, 2' - アゾビス (2 - メチルプロピオニトリル) (AIBN) をゆっくり添加する。溶解後、溶液を 15 分間 Ar でパージする。氷浴で 24 時間連続的に UV 光 (365 nm、9 W) を当てることによって重合化を開始する。得られたポリマはオフホワイトのクリस्पで、手で乳鉢において 10 ~ 25 μm の粒径にミクロ化する。粉末を 30 ~ 60 分間 THF 中で 2 回還流し、エタノール / THF (75 : 25) で 3 回洗浄して過する。白色粉末が残り、一晚空気乾燥する。

30

#### 【0120】

##### 実施例 4

##### 各 MIP 粒子の結合能力

粉末状の MIP 粒子間の結合能力 / 特性の違いを評価するために、結合試験を最も単純な形態で行った。実施例 1 からの MIP は、フルオレセインに対する結合能力に関して試験した。

40

#### 【0121】

フルオレセインに対する 1.9 mg の MIP を 380 μl エタノール (96%) に懸濁し、5 μl のフルオレセイン溶液 (0.05 mg / μl のエタノール) を追加し、5 分間混合した。懸濁液は、遠心分離され、上澄み液を除去した。次いで、粒子を 300 μl のエタノールで 3 回洗浄した。洗浄した粒子を、顕微鏡ガラスプレートの上で拡散させ、結合能力分析を、白色光の粒子 (全粒子)、および、UV 光 (365 nm) に暴露された場合緑色蛍光を発する粒子 (MIP 結合粒子) を視覚的に粒子を数えることによって行った。UV 光の使用により、エミッションフィルタは、緑色蛍光をみるために必要ではない。

#### 【0122】

図 4 に示される粒子は、白色光および UV 光で撮られる 2 つの写真を重ねたものである。白点は、白色光で照らされた粒子であり、黒点は、UV で照らされた緑色蛍光粒子であ

50

る。図4から、白色光で照らされた粒子(白点)は、UV光に照らされるときに緑色蛍光の粒子(黒点)より数が多いことは明らかである。2つの異なる光源下で視認される粒子数の違いは、MIPをマイクロ化することで、結合MIP粒子の個体群および結合していない(非結合性)MIP粒子(=デブリ)の個体群が生じることを示している。従って、親和性特性に基づいた結合MIP粒子の選択は、使用されるMIP重量単位あたりの使用されるテンプレートへの結合能力として測定される結合能力を効率的に上昇させる。

#### 【0123】

図示された写真は、緑色蛍光粒子は、粒径に関係なく異なる程度(強度)の緑色蛍光を示すという我々の観察を説明することができない。このような観察結果は、異なる結合MIP粒子間の結合能力の違いに対応している。この強度(蛍光)の差は、MIP粒子は異なる結合能力を有しないことを例示しており、従って、MIPの結合能力は、この実施例においては、最も高い蛍光強度を有するMIP粒子を選択することによって増加される。

10

#### 【0124】

このことをまとめると、本実施例は、MIP粒子組成物の結合能力が、結合しない粒子を除去することによって上昇することを示している。結合能力は、高親和性および/または標的分子に結合する複数の露出される結合ポケットを有するMIP粒子の濃度を高めることによって改良可能である。

#### 【0125】

##### 参考文献リスト

- 1) Yu Cong、博士論文：“インプリンティング技術に基づいた分子認識研究”、純正および応用生化学学部、ルンド大学、スウェーデン 1998。
- 2) Leif Schweitz、博士論文：“電気クロマトグラフィ用分子インプリントマトリックス”、Technical Analytical Chemistry、ルンド大学、スウェーデン 2001。
- 3) Ioana Warnmark-Surugiu、博士論文：“結合アッセイにおける抗体および光源模倣体”純正および応用生化学学部、ルンド大学、スウェーデン 2002
- 4) Dickey FH “The preparation of specific absorbent” Proc. Natl. Acad. Sci. 35 (1949) 227 - 229
- 5) Ramstrom O et al J. Mol. Recogn. 9 (1996) 691 - 696
- 6) Schweitz L et al J Chromatog. A 792 (1997) 401 - 409
- 7) Vlatakis G et al “Drug Assay Using Antibody Mimics Made by Molecular Imprinting” Nature 361 (1993) 645 - 647
- 8) Funke, W. et al, Adv. Polym. Sci. 136 (1998) 139 - 243
- 9) Van Reis and Zapata 米国特許第6,027,650号
- 10) Lihme A et al 米国特許第6,620,326号
- 11) Ujam et al Biotechnol Bioeng 83 (2003) 554 - 6、Isolation of monocytes from human peripheral blood。
- 12) Chase J. Mol. Recognit 11 (1998) 217 - 221
- 13) Pla et al Biochem. Biophys. Res. Commun. 277 (2000) 381 - 5
- 14) Rodgers et al Ann. NY. Acad. Sci. 849 (1998) 282 - 92
- 15) Hansen CM、 “Hansen Solubility Paramete

20

30

40

50

- rs、A Users Handbook CRC Press” (ISBN 0 - 84 93 - 1525 - 5)
- 16) Shea KJ and Dogherty TK、J. Am. Chem. Soc. 108 (1986) 1091 - 1093
- 17) Shea KJ、Stoddard GJ、Shavelle DM、Wakui F and Choate RM Macromolecules 23 (1990) 4497 - 4507
- 18) Wulff G and Poll HG Macromol. Chem. 188 (1987) 741 - 748
- 19) Selligren、B. et al、Chem. Mater. 10; 4037 - 46 10
- 20) Whitcombe、MJ. et al (1995) J. Am. Chem. Soc. 117; 7105 - 11
- 21) Pharmaceutical Preformulation and Formulation: A Practical Guide from Candidate Drug Selection to Commercial Dosage Form、Mark Gibson、CRC press、2001
- 22) Kempe and Mosbach (1991)、Anal. Lett. 24、1137 - 45
- 23) Ramstrom et al (1994)、Tetrahedron: Asymmetry 5、649 - 56 20
- 24) Ramstrom et al (1996 I)、J. Mol. Recogn. 9、691 - 6
- 25) Ramstrom et al (1996 II)、Chem. Biol. 3、471 - 7
- 26) Liu and Mosbach (1997)、Macromol. Rapid. Commun. 18、609 - 25
- 27) Liu and Mosbach (1998)、Macromol. Rapid. Commun. 19、671 - 4
- 28) Davidson and Hayes (2002)、Current. Org. Chem. 6、265 - 281 30
- 29) Andersson et al (1995)、Proc. Natl. Acad. Sci. 92、4788 - 92
- 30) Carter (2006)、Nat. Rev. Immunol. 6、343 - 57
- 31) Wizeman and Konfinas (2001)、Biomater. 22、1485 - 91
- 32) Seong et al (2002)、J. Biomater. Sci. Polym. Ed. 13、637 - 49

【図面の簡単な説明】

【0126】

【図1】図1は、MIP調製工程の概略図である。

【図2】図2は、本明細書に記載される本発明の工程の簡単な要約である。

【図3】図3のパートIは、拡張ベッド吸着による精製または分類を示す。結合しないMIPは、通過し、排出される一方、ベッド粒子に結合されたコレステロール様分子など、テンプレートに結合するMIPは、保持される。図3のパートIIは、機能的に精製されたMIPを示す。ベッド粒子のテンプレート分子に結合するMIPは、続いて、抽出することができる。これらの抽出されたMIPは、結合性MIPと非結合性MIPとを含む未精製のMIP集合よりも、より高い結合能力を有する。

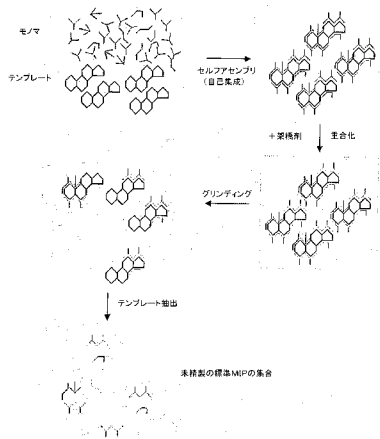
【図4】図4は、重ね合わされた画像における実験例4のMIP粒子を示す。重ね合わされた例画像は、可視光の白色およびUV光で、それぞれ撮影された2つの画像から構成さ

40

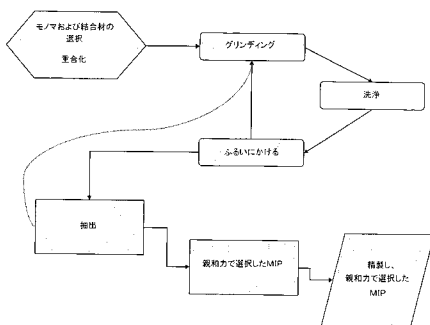
50

れる。白色スポットは、白色光で照射された粒子を示し、黒点は、UVで照射された緑色蛍光粒子を示す。

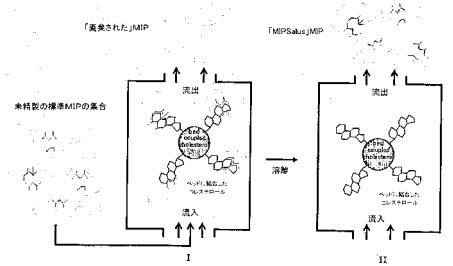
【 図 1 】



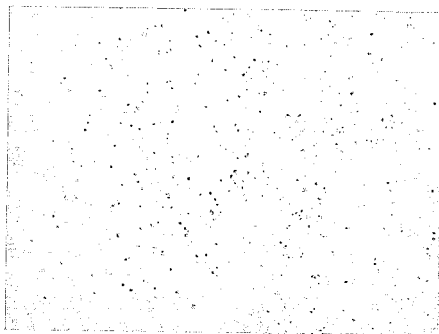
【 図 2 】



【 図 3 】



【 図 4 】



## 【手続補正書】

【提出日】平成20年2月20日(2008.2.20)

## 【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

標的分子に対する高い結合能力および高い特異性を有する分子インプリントポリマ(MIP)を具える組成物の調製方法であって、この方法が、

a) 前記標的分子に結合する不溶性MIPの懸濁液を得るステップであって、前記不溶性MIPは、テンプレート分子として標的分子またはその模倣体を用いて調製される、ステップと、

b) 前記懸濁されたMIPを親和性精製工程にかけるステップであって、前記テンプレート分子、そのフラグメントまたはその模倣体は捕捉剤として使用される、ステップと、

c) 前記親和性精製工程において前記捕捉剤に結合するMIPを回収し、回収された生成物から前記捕捉剤および前記捕捉剤に結合しないMIPを実質的に排除するステップと、

d) 回収されたMIPと、選択的に、キャリア、ビークルまたは希釈剤を混合し、前記組成物を得るステップと、

を具えることを特徴とする方法。

【請求項2】

前記捕捉剤が固相に共有結合的にまたは非共有結合的に結合することを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項3】

前記固相が、クロスバインドされた炭化水素のマトリックス、合成ポリマまたはこれらの組合せからなる群から選択されることを特徴とする請求項2に記載の方法。

【請求項4】

前記捕捉剤が、可溶性化学成分からなるか、または、可溶性化学成分の一部であることを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項5】

前記捕捉剤が、可溶性化学成分あたり複数の捕捉剤に露出されるために、 dendリマ、実質的な炭化水素ならびにポリビニルアルコールおよびポリエチレングリコールなどの置換基を有する可溶性ポリマから選択される部分に対して、共有結合的または非共有結合的に結合されることを特徴とする請求項4に記載の方法。

【請求項6】

前記捕捉剤のみが、前記テンプレート分子に結合する、ステップa)のMIPの結合部位のフラクションに結合することを特徴とする請求項1～5のいずれか一項に記載の方法。

【請求項7】

前記捕捉剤が、前記テンプレート分子のフラグメントであることを特徴とする請求項1～6のいずれか一項に記載の方法。

【請求項8】

前記捕捉剤が、前記捕捉剤の一部のMIPに露出されるのを実質的に避けるために、特定の配位性において、必要に応じて前記固相表面またはその部分に結合したテンプレート分子、その模倣体またはそのフラグメントを具えることを特徴とする請求項1～7のいずれか一項に記載の方法。

【請求項9】

前記捕捉剤は、前記捕捉剤の全ての部分がMIPに露出されるように非特異的な配位性において、必要に応じて前記固相表面またはその部分に結合したテンプレート分子、その

模倣体またはそのフラグメントを具えることを特徴とする請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 10】

前記親和性精製工程が、膨張ベッド吸収 (EBA)、常時性ビーズ分離、中空ファイバ精製、および、凝集からなる群から選択されることを特徴とする請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 11】

標的分子に対して高い結合能力を有する MIP の調製方法であって、前記方法が、前記標的分子またはその模倣体からなるテンプレート分子を具える未精製の MIP を、テンプレート分子を除去できるほど十分に小さい MIP の粒径を得るように第一段階のミクロ化にかけるステップと、

実質的に全てのテンプレート分子を除去し、このようにして得られた MIP をミクロ化の第 2 段階にかけるステップと、を具え、

ミクロ化の前記第 1 段階および選択的な第 2 段階によって、50 μm 未満の MIP 平均直径が得られ、続いて、得られた前記 MIP を請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載の方法にかけることを特徴とする方法。

【請求項 12】

ミクロ化の前記第 1 段階のみを行うことを特徴とする請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

前記ミクロ化が、グリーンディング、ミリング、破裂、ハンマリング、ボールミリング、クリオグリーンディング、または、衝突均質化処理によってなされることを特徴とする請求項 11 または 12 に記載の方法。

【請求項 14】

前記標的分子が、ヒト胃腸管など、胃腸管にみられる分子であることを特徴とする請求項 1 ~ 13 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 15】

前記標的分子が、病理学的に関連のある分子であることを特徴とする請求項 14 に記載の方法。

【請求項 16】

前記標的分子が、コレステロール、胆汁酸または胆汁酸塩から選択されることを特徴とする請求項 1 ~ 15 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 17】

組成物中の実質的に全ての MIP が、同一の標的分子に結合し、選択的に、前記組成物が、標的分子に対する結合部位の全てを含まないことを特徴とする不溶性 MIP の組成物。

【請求項 18】

MIP の平均直径が 20 μm 未満であることを特徴とする請求項 17 に記載の組成物。

【請求項 19】

標的分子の平均結合能が、MIP の 10 質量単位に対して少なくとも標的分子の 1 質量単位であることを特徴とする請求項 17 または 18 に記載の組成物。

【請求項 20】

請求項 1 ~ 16 のいずれか一項に記載の方法に従って調製される請求項 17 ~ 19 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 21】

前記組成物中の前記 MIP が、コレステロール、胆汁酸または胆汁酸塩に結合することを特徴とする請求項 17 ~ 20 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 22】

製剤として利用する目的の請求項 17 ~ 21 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 23】

循環器疾患、高血圧、アステローム硬化症、胆石症、胆汁うっ滞性肝疾患、高コレステ

ロール血漿、肥満症、寄生虫、ウイルスあるいは例えばバクテリアおよび真菌など微生物由来の感染症、経口由来の毒による中毒、の治療、予防または回復用の薬学的製剤の調製において、請求項 17 ~ 21 のいずれか一項に記載の組成物の使用。

【請求項 24】

前記薬学的製剤の調製が、経口投与用であることを特徴とする請求項 23 に記載の使用。

【請求項 25】

循環器疾患、高血圧、アステローム硬化症、胆石症、胆汁うっ滞性肝疾患、高コレステロール血漿、肥満症、寄生虫、ウイルスあるいは例えばバクテリアおよび真菌など微生物由来の感染症、経口由来の毒による中毒、からなる群から選択される疾患の治療、予防またはリスクを低減する方法であって、請求項 17 ~ 21 のいずれか一項に記載の組成物の有効量を、これを必要とする対象に投与するステップを具えることを特徴とする方法。

【請求項 26】

前記有効量は、1日あたり 40 g 未満であることを特徴とする請求項 25 に記載の方法。

【請求項 27】

前記有効量が、経口投与されることを特徴とする請求項 25 または 26 に記載の方法。

【請求項 28】

サンプル中の標的分子の量的または定性的な決定方法であって、この方法が、請求項 17 ~ 22 のいずれか一項に記載の組成物または請求項 1 ~ 16 のいずれか一項に記載に従って調製された組成物と、サンプルを接触させるステップを具え、組成物中の MIP は、前記標的分子に特異的に結合し、続いて、前記組成物に結合する標的分子の量的または定性的評価を行うことを特徴とする方法。

## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No PCT/DK2007/000083
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> INV. B01J20/26 A61K31/74 C08J9/00		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) B01J A61K C08J B01D		
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		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5 994 110 A (MOSBACH KLAUS [SE] ET AL) 30 November 1999 (1999-11-30) cited in the application column 13, line 21 - line 43; figure 12; example 8	1-3,8
X	WO 03/101580 A (WEISS ROBERT [AT]; MIZAIKOFF BORIS [US]; AUSTRIA WIRTSCHAFTSSERVICE GE) 11 December 2003 (2003-12-11) page 37, line 20 - page 38, line 19  -/--	11-13
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> 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  6 November 2007		Date of mailing of the international search report  19/11/2007
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax. (+31-70) 340-3016		Authorized officer  Hilgenga, Klaas

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/DK2007/000083

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	TAN Y ET AL: "A study of a new TSM bio-mimetic sensor using a molecularly imprinted polymer coating and its application for the determination of nicotine in human serum and urine." BIOELECTROCHEMISTRY (AMSTERDAM, NETHERLANDS) MAR 2001, vol. 53, no. 2, March 2001 (2001-03), pages 141-148, XP002456928 ISSN: 1567-5394 page 143, paragraph 2.3	11-13, 18,19, 21,22,30
X	WO 02/084292 A (ASPIRA BIOSYSTEMS INC [US]) 24 October 2002 (2002-10-24) page 18, line 16; claim 31 page 6, line 4	18-21
X	WO 00/41723 A (MOSBACH KLAUS [SE]; YE LEI [SE]; CORMACK PETER A G [GB]) 20 July 2000 (2000-07-20) page 8, line 22; claim 18	18,19, 25,26,30
X	WO 94/11403 A (MOSBACH KLAUS [SE]; VLATAKIS GEORG [GR]; ANDERSON LARS I [SE]; MUELLER) 26 May 1994 (1994-05-26) page 4, line 26 - line 31; claims 1,2,7,11,15,23 page 11, line 20 - line 35 page 4, line 21 - line 25 page 11, line 11	11-13, 18,19, 24-27, 29,30
X	WO 02/068958 A1 (MOSBACH KLAUS [SE]; YE LEI [SE]) 6 September 2002 (2002-09-06) page 13, line 20 - line 26	18
X	JP 2003 147025 A (SEKISUI CHEMICAL CO LTD) 21 May 2003 (2003-05-21) paragraphs [0001], [0011], [0018] - [0023], [0052], [0055], [0066], [0074] abstract	11-13, 15-19, 22-29
X A	US 2002/015690 A1 (GREEN BERNARD S [IL] ET AL) 7 February 2002 (2002-02-07) page 4, paragraph 48; claims 17,21	11-13, 15-17, 25-29
X	WO 02/059184 A2 (UNIV VIRGINIA COMMONWEALTH [US]) 1 August 2002 (2002-08-01) claims 43,45	18

-/-

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No  
PCT/DK2007/000083

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 01/30856 A (UNIV CRANFIELD [GB];) 3 May 2001 (2001-05-03)  page 5, line 20 - page 7, line 22; claim 1 page 13, line 16 - page 14, line 15 claim 15  -----	1-10, 25-27, 29, 30

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/DK2007/000083**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
  
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This international Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/DK2007/000083

## FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

## 1. claims: 1-10

a method of preparing a composition comprising molecular imprinted polymers (MIPs) having high binding capacity and specificity for a target molecule, said method comprising:  
 a) obtaining a suspension of insoluble MIPs, which bind the target molecule, and which have been prepared using the target molecule or a mimic thereof as template molecule,.....d) combining the MIP's recovered and optionally a carrier, vehicle or diluent to obtain said composition.

---

## 2. claims: 11-17

a method of preparing MIPs having high binding capacity for a target molecule, said method comprising subjecting a raw MIP.....wherein said first and optionally second steps of micronization provides for a MIP average diameter of at most 50 micrometers.

---

## 3. claims: 18-24

a composition of insoluble MIP's having at least one of the following characteristics: 1) the average MIP diameter is less than 20 micrometers;  
 the average target binding is at least 1 mass unit of target to 10 mass units of MIP;  
 3) substantially all MIPs in the composition bind the same target molecule, and optionally the composition does not include all binding sites for the target molecule.

---

## 4. claims: 25-29

use of a composition according to claim 18-23 in the preparation of a pharmaceutical preparation for the treatment, prophylaxis or amelioration of cardiovascular disease....., or poisoning originating from orally received toxins.  
 a method for treating, ameliorating or reducing the risk of a disease selected from the group consisting of cardiovascular disease....., comprising administering an effective amount of a composition according to any one of claims 18-23 to a subject in need thereof.

---

## 5. claim: 30

International Application No. PCT/DK2007 /000083

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ASA/ 210

a method for the quantitative or qualitative determination of a target molecule in a sample, the method comprising contacting the sample with a composition according to any one of claims 18-24 or a composition prepared according to any one of the claims 1-17....., and subsequently performing a quantitative or qualitative assesment of target molecule binding said composition.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/DK2007/000083

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5994110	A	30-11-1999	NONE	
WO 03101580	A	11-12-2003	AU 2003242600 A1 EP 1509302 A1	19-12-2003 02-03-2005
WO 02084292	A	24-10-2002	NONE	
WO 0041723	A	20-07-2000	AT 339967 T AU 2141700 A DE 60030837 T2 EP 1144007 A1	15-10-2006 01-08-2000 16-05-2007 17-10-2001
WO 9411403	A	26-05-1994	AU 5439794 A AU 5641798 A CA 2149043 A1 EP 0669942 A1 JP 8506320 T	08-06-1994 04-06-1998 26-05-1994 06-09-1995 09-07-1996
WO 02068958	A1	06-09-2002	NONE	
JP 2003147025	A	21-05-2003	NONE	
US 2002015690	A1	07-02-2002	US 2004062745 A1	01-04-2004
WO 02059184	A2	01-08-2002	AU 2002247016 A1	06-08-2002
WO 0130856	A	03-05-2001	AT 292642 T AU 773252 B2 AU 1039701 A CA 2388130 A1 DE 60019333 D1 DE 60019333 T2 EP 1237936 A1 ES 2240185 T3 JP 2003513112 T US 6852818 B1	15-04-2005 20-05-2004 08-05-2001 03-05-2001 12-05-2005 09-03-2006 11-09-2002 16-10-2005 08-04-2003 08-02-2005

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 P 1/16 (2006.01)	A 6 1 P 1/16	1 0 1
A 6 1 P 3/06 (2006.01)	A 6 1 P 1/16	1 0 5
A 6 1 P 3/04 (2006.01)	A 6 1 P 3/06	
A 6 1 P 33/00 (2006.01)	A 6 1 P 3/04	
A 6 1 P 31/12 (2006.01)	A 6 1 P 33/00	
A 6 1 P 31/04 (2006.01)	A 6 1 P 31/12	
A 6 1 P 31/10 (2006.01)	A 6 1 P 31/04	
A 6 1 P 39/02 (2006.01)	A 6 1 P 31/10	
	A 6 1 P 39/02	

(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, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, 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, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, 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, LV, LY, MA, MD, 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 ニールセン, クラウス, グレゴリウス

デンマーク王国 ソボルグ ディーケイ - 2 8 6 0, リッケスボルグアレー 1 5

(72) 発明者 クログ, ニコラス オット

デンマーク王国 ヴィラム ディーケイ - 2 8 3 0, フュレソヴェイ 1 0 9

F ターム(参考) 4C086 AA01 AA02 AA04 FA02 FA03 MA01 MA04 MA22 MA43 MA52  
NA14 ZA36 ZA37 ZA42 ZA70 ZA76 ZA77 ZB33 ZB35 ZB37  
ZC33