

(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2005-537459

(P2005-537459A)

(43) 公表日 平成17年12月8日(2005.12.8)

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/48	GO 1 N 33/48 A	2 GO 4 5
GO 1 N 33/53	GO 1 N 33/53 D	
GO 1 N 33/543	GO 1 N 33/543 5 2 1	
GO 1 N 33/566	GO 1 N 33/566	

審査請求 有 予備審査請求 有 (全 19 頁)

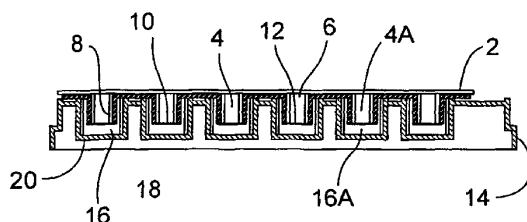
(21) 出願番号	特願2003-568410 (P2003-568410)	(71) 出願人	390019585
(86) (22) 出願日	平成15年2月12日 (2003. 2. 12)		ミリポア・コーポレーション
(85) 翻訳文提出日	平成15年10月22日 (2003. 10. 22)		MILLIPORE CORPORATION
(86) 国際出願番号	PCT/US2003/004329		アメリカ合衆国、マサチューセッツ・O 1
(87) 国際公開番号	W02003/069340		8 2 1、ビレリカ、コンコード・ロード・
(87) 国際公開日	平成15年8月21日 (2003. 8. 21)		2 9 0
(31) 優先権主張番号	60/356, 789	(74) 代理人	100062007
(32) 優先日	平成14年2月14日 (2002. 2. 14)		弁理士 川口 義雄
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100113332
			弁理士 一入 章夫
		(74) 代理人	100114188
			弁理士 小野 誠
		(74) 代理人	100103920
			弁理士 大崎 勝真

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 希釈剤の製造方法および使用

(57) 【要約】

非特異的薬物結合 (NBS) を低下させるための希釈剤の使用は、バイオアッセイの結果が *in vivo* でのこれらの化合物の挙動をより正確に予測できるように、化学物質 (たとえば薬物、薬物候補、および他の小分子) の NBS を低下させる、単純で柔軟な生体適合性のある方法を提供する。さらに、化学物質希釈剤としての希釈剤の使用により、高スループット薬物アッセイ、たとえば Caco-2 薬物輸送アッセイ、血漿タンパク質薬物結合アッセイ、PAMPA アッセイ、透過性アッセイ、および薬物溶解性アッセイから生じるデータの予測的な性質を高める。この希釈剤は、選択した血漿を、30 kD の、好ましくは約 10 kD 以下の公称排除限界分子量を有する限外濾過膜で濾過すること、または非特異的結合に寄与しない血漿または血清の個々の成分を選択的に加えることのいずれかによって作成する。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

50 kD 未満の公称分子量を有し、および 50 kD の公称排除限界分子量を有する膜で濾過した、血漿、血清およびそれらの混合物、または血漿、血清およびそれらの混合物の個々の成分の緩衝生理食塩溶液中の混合物からなる群から選択された材料源から形成される希釈剤を含む、細胞増殖用の生体適合希釈剤。

【請求項 2】

血漿、血清、およびその混合物からなる群から選択される材料源を選択するステップと、材料源を約 50 kD の公称排除限界分子量を有する限外濾過膜で濾過するステップと、濾過ステップから濾液を回収するステップとを含む、希釈剤を形成する方法。

10

【請求項 3】

材料源が、ウシ、ヒツジ、ヤギ、ヒト、およびそれらの混合物からなる群から選択された源に由来する請求項 1 に記載の希釈剤。

【請求項 4】

材料源が、ウシ、ヒツジ、ヤギ、ヒト、およびそれらの混合物からなる群から選択された源に由来する請求項 2 に記載の方法。

【請求項 5】

材料源がウシ胎児血清である請求項 1 に記載の希釈剤。

【請求項 6】

材料源がウシ胎児血清である請求項 2 に記載の方法。

20

【請求項 7】

材料源がヒト血漿である請求項 1 に記載の希釈剤。

【請求項 8】

材料源がヒト血漿である請求項 2 に記載の方法。

【請求項 9】

希釈剤が 30 kD 未満の公称分子量を有する請求項 1 に記載の希釈剤。

【請求項 10】

希釈剤が 10 kD 未満の公称分子量を有する請求項 1 に記載の希釈剤。

【請求項 11】

限外濾過膜が約 30 kD の公称排除限界分子量を有する請求項 2 に記載の方法。

30

【請求項 12】

限外濾過膜が約 10 kD の公称排除限界分子量を有する請求項 2 に記載の方法。

【請求項 13】

希釈剤が 5 kD 未満の公称分子量を有する請求項 1 に記載の希釈剤。

【請求項 14】

材料源が、タンパク質を含まない血清製品およびタンパク質を含まない非動物性の血清製品からなる群から選択される請求項 1 に記載の希釈剤。

【請求項 15】

材料源が、タンパク質を含まない血清製品およびタンパク質を含まない非動物性の血清製品からなる群から選択される請求項 2 に記載の方法。

40

【請求項 16】

試験する化学物質を選択すること、1 個または複数のウェルを有する試験装置を選択すること、希釈剤を用いて化学物質を所望の濃度に希釈し、希釈した化学物質を試験装置の 1 個または複数のウェルに施用すること、および材料を回収して分析することを含み、前記希釈剤は、血漿、血清、その混合物からなる群から選択される材料源から形成され、材料源を約 50 kD より小さい公称排除限界分子量を有するフィルターで濾過することからなる群から選択されるプロセスによって、または緩衝生理食塩溶液中で約 50 kD より小さい公称分子量を有する材料源の個々の成分を混ぜ合わせることによって形成される、化学物質の非特異的結合を低下させた化学物質を試験する方法。

【請求項 17】

50

各ウェルが多孔性構造体によって閉じられた底を有し、各ウェルが、受けプレートの1個または複数のウェルが試験装置の1個または複数のウェルと位置が合うように、試験装置の下方に配置された受けプレートをさらに備え、試験装置の1個または複数のウェルからの濾液を受けプレートの1個または複数のウェルで受けるため受けプレートの上方に試験装置を配置すること、試験装置の濾液を受けプレートの1個または複数のウェルで捕捉すること、および濾液を回収し分析することを含む請求項16に記載の化学物質の非特異的結合を低下させる方法。

【請求項18】

各ウェルが多孔性構造体によって閉じられた底を有し、各ウェルが、試験装置の1個または複数のウェルと、試験装置の1個または複数のウェルと位置を合わせた、試験装置の下方に配置した受けプレートの1個または複数のウェルとの、内側の多孔性構造体上に形成した、化学物質を試験する細胞株をさらに備え、試験装置の1個または複数のウェルからの濾液を受けプレートの1個または複数のウェルで受けるため受けプレートの上方に試験装置を配置すること、試験装置の濾液を受けプレートの1個または複数のウェルで捕捉すること、および濾液を回収し分析することを含む請求項11に記載の化学物質の非特異的結合を低下させる方法。

10

【請求項19】

試験が、Caco-2薬物輸送アッセイ、血漿タンパク質薬物結合アッセイ、PAMPAアッセイ、透過性アッセイ、薬物溶解性アッセイからなる群から選択される請求項16に記載の方法。

20

【請求項20】

血漿、血清、およびその混合物からなる群から選択された材料源に由来し、材料源を約50kDより小さい公称排除限界分子量を有するフィルターで濾過することからなる群から選択された方法によって、または緩衝生理食塩溶液中で約50kDより小さい公称分子量を有する材料源の個々の成分を混ぜ合わせることで、希釈剤を化学物質に加えてin vivo希釈剤を得ること、および希釈した化学物質を試験アッセイに施用することによって形成される希釈剤の使用を含む、化学物質の非特異的結合を低下させる方法。

【請求項21】

希釈剤が、50kD未満の公称分子量を有し、血漿、血清、およびその混合物からなる群から選択させた材料源から形成され、材料源を約50kDより小さい公称排除限界分子量を有するフィルターで濾過することからなる群から選択された方法によって、または約50kDより小さい公称分子量を有する材料源の個々の成分を混ぜ合わせることで形成され、希釈剤が生体適合性であり、薬物または小分子の溶解性および生体利用特性を維持する、希釈剤を含む生物試験システム内で化学物質の非特異的結合を低下させるための希釈剤。

30

【請求項22】

血漿、血清の個々の成分およびその混合物からなる群から選択された材料源を選択するステップと、個々の成分を緩衝生理食塩溶液中で混合して希釈剤を形成するステップとを含む、希釈剤を形成する方法。

【発明の詳細な説明】

40

【技術分野】

【0001】

本発明は、生体適合希釈剤ならびにその製造方法および使用に関する。より詳細には、本発明はin vivoの化学物質試験における小分子の非特異的結合を防ぐ希釈剤に関する。

【背景技術】

【0002】

高スループットのスクリーニングアッセイ（たとえばCaco-2薬物輸送、並行人工膜透過性アッセイ（Parallel Artificial Membrane Permeability Assay、PAMPA）、血漿タンパク質薬物結合、溶解性試

50

験など)は、12~1536個のうち任意の数の分離した複数のウェルからなる装置内で実施する。これらは、ある程度の製薬的用途がある、またはあると考えられている、様々な低分子量有機分子(化学物質(chemical entity)すなわち「CE」)を同定し特徴付けるのに使用される。一般的にCEは、有効となる可能性がある薬物候補であるかどうかを判断するために、創薬(drug discovery)手順において調査される。

【0003】

しばしば、これらのプレートたとえばCaco-2 Multiscreen(登録商標)プレートのウェルの底は、スクリーニングアッセイの一部の面を助長または可能にするために、膜やフィルターを有する。フィルターまたは膜を有する底のプレートを使用する場合は、複数ウェルのプレートの下にはめる受け皿を用いることもでき、この中に試料を濾過させるまたはフィルタープレートの内容物を拡散させることができる。CEはこれらプレート内に非常に低い濃度(<<1マイクロモル濃度)で導入され、あるいは最終的に受けプレートボリューム中で非常に低い濃度(<<1マイクロモル濃度)となる可能性がある。これら希釈液中のCEの絶対濃度が測定可能であることは決定的に重要であり、プラスチック表面、膜、および試験液の他の成分たとえばタンパク質にCEが非特異的結合することによる損失があると、これら装置の有用性が潜在的に制限される可能性がある。

10

【0004】

溶液中に低濃度(<<1μM)で存在することに加えて、多くのCEは親油性なので、プラスチック表面、たとえば複数ウェルプレート、膜、受けプレート、あるいはタンパク質など試験液の他の成分に非特異的に吸着または結合(より一般的には非特異的薬物結合と呼ばれる、以降「NSB」)する傾向があり、試験液から消失するように見える。このCEの消失は、アッセイの成果や解釈に有意な影響を及ぼす可能性があり、不正確な誤解を招く結果をもたらす。表面積と体積の比が増大し、濃度が低下するにつれて、NSB問題が起こる可能性が高くなる。

20

【0005】

NSBを減少させるためにいくつかの試みがなされてきた。

【0006】

一般的に、NSBを抑制するには、受けプレートに使用するプラスチックの選択が重要であると考えられている。NSBをなくす手段として、プラスチック表面を覆う様々な種類の機構が試されてきた。

30

【0007】

比較的少量の有機溶媒(たとえばDMSO、メタノール、DMF、THFなど)の添加により、一部の場合でCEのNSBレベルが有意に低下することが見出されたが、これらの溶媒は、血漿タンパク質に対するこれらCEの結合の挙動を変化させる潜在的可能性がある、またその明らかな透過性により一般的に受け入れられない。

【0008】

受けプレートに対するNSBを低下させる別の方法は、プラスチックをブロック剤でプレコートすることである。BSAなどのタンパク質が一部のCEに有効であることが見出されたが、これらがCEと結合してアッセイ系から取り除き、間違った結果をもたらす危険性がある。

40

【0009】

NSBを最小限にする別の解決法は、少量のPTFEまたは他の低NSBポリマーと混合したポリオレフィンを使用することであった。このような受けプレートの1つは、Microcon(登録商標)フィルター装置と一緒に使用されるPTFE/ポリプロピレン受けプレートであり、これらはいずれもマサチューセッツ州ベッドフォードのMillipore Corporationから入手可能である。2000年3月31日出願の米国特許出願第09/540,030号および2000年7月14日出願の米国特許出願第09/616,597号参照。

50

【0010】

この受けプレートは大部分のCEおよび薬物に効果があり、従来技術の受けプレートに比べて大幅な改善を示す。しかし、溶解性が低いまたは親油性のCEでは、この受けプレートでも、多数の低溶解性CEおよび/または親油性CEで有意なレベルのNSBがあることが示された。

【0011】

あるいは、NSBを低下させるために親水性ポリマーでプレコートしたプラスチック受けプレートを使用することもできる。この解決法は基本的に信頼できるように思えるが、これには少なくとも2つの重大な制限がある。第1には、これらの表面処理した受けプレートは、少なくとも現在供給されている状態では、深刻な寸法の制約がある。受けプレートは、いくつかの変数、たとえばトッププレートの設計や形式、行う試験、個々の製造者の設計および優先事項などに応じて、大きさおよび形式が異なる。したがって、これらは、ロボット式の実験室装置によって処理することができず、自動高スループットスクリーニング技術に適合していない。第2には、これらのコーティングした受けプレートでは、装置内の他の表面上（たとえばトッププレート、膜、フローダイレクター（flow director）など）または試験溶液自体のNSBに対する保護が全く提供されない。

10

【0012】

これらのタイプのアッセイを、in vivo挙動をより予測可能なものにするために、NSBを防ぐまたは低下させる、より普遍的な方法が必要とされている。

【発明の開示】

20

【発明が解決しようとする課題】

【0013】

非特異的薬物結合（NSB）を低下させるための希釈剤の使用は、薬物および薬物候補（および他の小分子）の試験中などでのCEの非特異的結合（NSB）を低下させて、バイオアッセイの結果がこれら化合物のin vivo挙動をより正確に予測できるようにする、単純で、柔軟な生体適合性のある方法を提供する。さらに、これは、部品の1つだけではなく、試験装置の全体にわたりNSBに対する利点を提供する。これは、NSB問題の普遍的な解決法を提供し、所望する任意の試験で任意のプレート設計を用いることを可能にする。本発明が教示する血漿希釈剤、血清希釈剤、または合成希釈剤の、CE希釈剤としての使用は、高スループットCEアッセイ、たとえばCaco-2薬物輸送アッセイ、血漿タンパク質薬物結合アッセイ、PAMPAアッセイ、透過性アッセイ、薬物溶解性アッセイから生じるデータの予測的な性質を高める。

30

【0014】

本発明の目的は、50kD、好ましくは30kD以下の公称排除限界分子量を有する膜で血清または血漿を濾過することによって生成した希釈剤を利用する、細胞に基づくアッセイおよび細胞に基づかないアッセイを含めて様々な化学物質（CE）アッセイを実施するための生体適合希釈剤を提供することである。

【0015】

本発明のさらなる目的は、血漿、血清の個々の成分およびその混合物からなる群から選択された材料源を選択するステップと、個々の成分を緩衝生理食塩溶液中で混合して希釈剤を形成するステップとを含む、希釈剤を形成する方法を提供することである。

40

【0016】

本発明の別の目的は、希釈剤が50kD未満の公称分子量を有し、血漿、血清、またはその混合物からなる群から選択された材料源から形成され、材料源を約50kD未満の公称分子量を有するフィルターで濾過することからなる群から選択された方法によって、または約50kDの公称分子量を有する材料源の個々の成分を緩衝生理食塩溶液中で混ぜ合わせるによって形成され、希釈剤が生体適合性であり、薬物または小分子の溶解性および生体利用特性を維持する、希釈剤を含む生物試験システム中の化学物質の非特異的結合を低下させるための希釈剤を提供することである。

【0017】

50

本発明のさらなる目的は、1つまたは複数の血漿、血清、またはその混合物からなる材料源から選択するステップと、約30kD、好ましくは約10kDの公称排除限界分子量を有する限外濾過膜で材料源を濾過するステップと、濾過ステップから濾液を回収するステップとを含む、希釈剤を形成する方法を提供することである。

【0018】

本発明の別の目的は、試験するCEおよびCEを試験する方法を選択すること、1個または複数のウェルを有する複数ウェルプレートを選択すること、複数ウェルプレートの1個または複数のウェルでアッセイを実施すること、非特異的CE結合が低い希釈剤を用いてCEを所望の濃度に希釈すること、複数ウェルプレートの1個または複数のウェルのプレートに希釈したCEを施用すること、および、CEを回収して分析することを含む、化学物質(CE)の非特異的結合を低下させる方法を提供することである。

10

【0019】

本発明のさらなる目的は、試験するCEを選択すること、各ウェルが多孔性構造体によって閉じられている底を有する、1個または複数のウェルを有する試験装置を選択すること、各ウェルが、試験装置の1個または複数のウェルから濾液を受けられるように、試験装置のウェルと位置を合わせた、開いた上部と閉じられた底を有する1個または複数のウェルからなる装置を回収装置の上方に置くこと、希釈剤でCEを所望の濃度に希釈し、希釈したCEを試験装置の1個または複数のウェルに施用すること、受け装置の1個または複数のウェルで試験装置の濾液を捕捉すること、および濾液を回収して薬物活性を分析することを含む、CEたとえば薬物候補を試験するプロセスを提供することである。

20

【0020】

本発明のさらなる目的は、希釈剤が30kD未満、好ましくは10kD未満の公称分子量を有し、血漿、血清およびその混合物からなる群から選択された材料源から形成され、希釈剤が生体適合性であり、薬物または小分子の溶解性および生体利用特性を維持する、希釈剤を含む生物試験システム中のCEたとえば薬物や他の小分子の非特異的結合を低下させるための希釈剤を提供することである。

【0021】

本発明の別の目的は、希釈剤が血漿および血清の個々の滅菌成分、およびその混合物から形成され、希釈剤が生体適合性であり、CEの溶解性および生体利用特性を維持する、希釈剤を含む生物試験システム中のCEたとえば薬物や他の小分子の非特異的結合を低下させるための希釈剤を提供することである。

30

【課題を解決するための手段】

【0022】

本発明は、化学物質(CE)の希釈剤に関する。より詳細には、本発明は、この希釈剤に関し、ならびに、*in vivo*での化合物の挙動に予測的なアッセイにおいて、試験装置表面に対する非特異的結合(NBS)、および化合物の輸送、溶解性、吸着、拡散、結合および化学物質の他の化合物特性を測定するのに使用する流体に対するNSBを低下またはなくすための、好ましい希釈剤としてのその使用に関する。

【発明を実施するための最良の形態】

【0023】

この希釈剤は、化学物質のNSBに寄与しないか、あるいはNSBをなくし、CEの分析にほとんどまたは全く悪影響を与えず、このようなCEの決定および定量用の方法やアッセイを妨害しない、低分子量成分からなる水性溶液である。

40

【0024】

この希釈剤は、血漿、血清などの自然源を選択的に濾過してNSBを増大させる成分を取り除いて形成するか、または自然源の個々の成分を混合することによって作成することができる。

【0025】

この希釈剤は通常、血漿または血清が化学物質(CE)の非特異的結合に寄与するタンパク質および他の成分をほとんど含まないように、1つまたは複数の濾過ステップ、主に

50

限外濾過ステップにかけた血漿または血清から形成される。好ましくは、これは、実質的にすべての成分が約50キロダルトン(kD)未満の公称分子量である流体であり、より好ましくは、これは、30キロダルトン(kD)未満の公称分子量を有する成分を含み、さらに好ましくは、これは、10キロダルトン(kD)未満の公称分子量を有する成分を含み、実質的にタンパク質を含まない。所望する場合は、より細かい範囲たとえば5kD以下の公称分子量の希釈剤を用いることもできる。しかし、大部分の用途では、30kD未満の公称分子量を有する希釈剤が許容でき、期待されるすべての利点を提供する。

【0026】

あるいは、血清または血漿の様々な低分子量成分、たとえば塩、トリグリセリド、コレステロール、糖など(50未満のkD、好ましくは30kD未満、より好ましくは10未満)を緩衝生理食塩溶液に混合して希釈剤を形成することによって、溶液を作成することができる。これらの成分は当分野でよく知られており、様々な市販源から入手することができ、また当分野の技術者によって実験室内で通常の技術および装置を用いて容易に分離することもできる(たとえば表1参照)。

【0027】

【表1】

表1

成分	システム	通常単位	割合	推奨SI単位
アセト酢酸				
定性	血清	陰性	—	陰性
定量	血清	0.2~1.0 mg/dL	97.95	20~100 μmol/L
アセトン				
定性	血清	陰性	—	陰性
定量	血清	0.3~2.0 mg/dL	172.95	20~340 μmol/L
アルコール、エチル	血清	陰性だが、mg/dLとして	0.2171	陰性だが、mmol/Lとして表す
	または全血液	表す		
δ-アミノレブリン酸	血清	0.01~0.03 mg/dL	76.26	0.8~2.3 μmol/L
アンモニア	血漿	20~120 μg/dL (拡散)	0.5872	12~70 μmol/L
		40~80 μ/dL (酵素法)		23~47 μmol/L
		12~48 μg/dL (樹脂法)		7~28 μmol/L
ヒ素++	全血液	< 7 μg/dL	0.05055	< 0.4 μmol/L
アスコルビン酸 (ビタミンC)	血漿	0.6~1.6 mg/dL	56.78	34~91 μmol/L
	全血液	0.7~2.0 mg/dL		40~114 μmol/L
炭酸水素塩	血漿	21~28 mmol/L	1	21~28 mmol/L
ビリルビン				
直接 (結合)	血清	< 0.3 mg/dL	17.10	< 5 μmol/L
間接 (非結合)		0.1~1.0 mg/dL		2~17 μmol/L
合計		0.1~1.2 mg/dL		2~21 μmol/L
全新生児		1.0~12.0 mg/dL		17~205 μmol/L
血液ガス	全血液	7.38~7.44 (動脈性)	1	7.38~7.44
PH	全血液	7.36~7.41 (静脈性)	0.1333	7.36~7.41
Pco2	全血液	35~40 mm Hg (動脈性)	0.1333	4.7~5.3 kPa
Po2		40~45 mm Hg (静脈性)		5.3~6.0 kPa
		95~100 mm Hg (動脈性)		12.7~13.3 kPa
臭化物	血清	< 5 mg/dL	0.125	< 0.63 mmol/L
カルシウム	血清	4.0~4.8 mg/dL	0.2500	1.00~1.20 mmol/L

10

20

30

40

イオン化	血清	2.0~2.4 mEq/L	0.5000	合計の 0.30~1.58	
合計		合計の 30~58%	0.01	2.30~2.74 mmol/L	
		9.2~11.0 mg/dL	0.2500		
		4.6~5.5 mEq/L	0.5000		
二酸化炭素 (CO2 含量)	全血液	19~24 mmol/L	1	19~24 mmol/L	
	(動脈性)	21~28 mmol/L		21~28 mmol/L	
	血清または血漿				
	(動脈性)				
二酸化炭素	全血液	22~26 mmol/L	1	22~26 mmol/L	
	(静脈性)	24~30 mmol/L		24~30 mmol/L	10
	血清または血漿				
	(静脈性)				
CO2 結合力	血清または血漿	24~30 mmol/L	1	24~30 mmol/L	
	(静脈性)				
CO2 分圧 (Pco2)	全血液	35~40 mm Hg	0.1333	4.7~5.3 kPa	
	(動脈性)	40~45 mm Hg		5.3~6.0 kPa	
	全血液				
	(静脈性)				
炭酸 (H2CO3)	全血液	1.05~1.45 mmol/L	1	1.05~1.45 mmol/L	20
	(動脈性)	1.15~1.50 mmol/L		1.15~1.50 mmol/L	
				1.02~1.38 mmol/L	
	全血液	1.02~1.38 mmol/L			
	(静脈性)				
	血漿				
	(静脈性)				
カロテンベータ	血清	40~200 Fg/dL	0.01863	0.73.7 μmol/L	
塩化物	血清	95~103 mEq/L	1	95~103 mmol/L	
コレステロール	血清	150~250mg/dL (食事、性	0.02586	3.88~6.47 mmol/L	
合計	血清	別、年齢によって異なる)	0.01	全コレステロールの	
エステル		全コレステロールの		割合: 0.65~0.75	30
		65~75%			
クエン酸塩	血清または血漿	1.7~3.0 mg/dL	52.05	88~156 μmol/L	
銅	血清または血漿	70~140 Fg/dL	0.1574	11~22 μmol/L	
		80~155 Fg/dL		13~24 μmol/L	
	男性				
	女性				

コルチゾール	血漿	5~23 Fg/dL	27.59	138~635 nmol/L	
	8 am~	3~13 Fg/dL		83~359 nmol/L	
	10 am				
	4 am~				
クレアチン	6 am				
	血清または血漿	0.1~0.4 mg/dL	76.25	8~31 μmol/L	
	男性	0.2~0.7 mg/dL		15~53 μmol/L	
	女性				
クレアチンキナーゼ(CK)	血清	37EC で 55~170 U/L	1	37EC で 55~170 U/L	10
	男性	37EC で 30~135 U/L	1	37EC で 30~135 U/L	
	女性				
クレアチニン	血清または血漿	0.6~1.2 mg/dL (成人) 0.3~0.6 mg/dL (< 2 歳の小児)	88.40	53~106 μmol/L 27~53 μmol/L	
脂肪、中性 (トリグリセリド参照)					
脂肪酸	血清	9~15 mmol/L	1	9~15 mmol/L	20
合計 (遊離、エステル化)	血漿	300~480 FEq/L	1	300~480 μmol/L	
遊離 (エステル化されていない)					
フッ化物	全血液	< 0.05 mg/dL	0.5263	< 0.027 mmol/L	
葉酸塩	血清	5~25 ng/mL (バイオアッセイ)	2.266	11~57 nmol/L	
	赤血球	> 2.3 ng/mL (ラジオアッセイ)		> 5 nmol/L	
		166~640 ng/mL (バイオアッセイ)		376~1450 nmol/L	
		> 140 ng/mL (ラジオアッセイ)		> 317 nmol/L	
ガラクトース	全血液	なし	0.05551	なし	30
	成人	< 20 mg/dL		< 1.11 mmol/L	
	小児				
グルコース、絶食	血清または血漿	70~110 mg/dL	0.05551	3.9~6.1 mmol/L	
		60~100 mg/dL		3.3~5.6 mmol/L	
	全血液				
グルタチオン	全血液	24~37 mg/dL	0.03254	0.78~1.20 mmol/L	
	血清	< 10 ng/mL	1	< 10 μg/L	
成長ホルモン					

17-ヒドロキシコルチコステロイド	血漿		25.591		
	男性	7~19 Fg/dL		193~524 nmol/L	
	女性	9~21 Fg/dL		248~579 nmol/L	
	24 USP 単位の筋肉内 ACTH 後	35~55 Fg/dL		966~1517 nmol/L	
鉄、合計	血清	60~150 Fg/dL	0.1719	10.7~26.9 μmol/L	
17-ケトステロイド	血漿	25~125 Fg/dL	34.67W	866~4334 nmol/L	
乳酸 (乳酸塩として)	全血液		0.1110		10
	静脈性	5~20 mg/dL		0.6~2.2 mmol/L	
	動脈性	3~7 mg/dL		0.3~0.8 mmol/L	
鉛	全血液	< 50 Fg/dL	0.04826	< 2.41 μmol/L	
脂質、合計	血清	400~800 mg/dL	0.01	4.00~8.00 g/L	
コレステロール		150~250 mg/dL	0.02586	3.88~6.47 mmol/L	
トリグリセリド		10~90 mg/dL	0.01129**	0.11~2.15 mmol/L	
リン脂質		150~380 mg/dL	0.01	1.50~3.80 g/L	
脂肪酸 (遊離)		9.0~15.0 mmol/L	1	9.0~15.0 mmol/L	
リン脂質リン		8.0~11.0 mg/dL	0.3229	2.58~3.55 mmol/L	
酸素	全血液	95~100 mm Hg	0.1333	12.7~13.3 kPa	
圧力 (Po2)	(動脈性)	15~23 体積%	0.01	体積率: 0.15~0.23	20
含量	全血液	94~100%			
飽和	(動脈性) 全血液			飽和率: 0.94~1.00	
フェニルアラニン	血清		60.54		
	成人	< 3.0 mg/dL		< 182 μmmol/L	
	新生児 (満期出産)	1.2~3.5 mg/dL		73~212 μmmol/L	
リン、無機	血清		0.3229		
	成人	2.3~4.7 mg/dL		0.74~1.52 mmol/L	30
	小児	4.0~7.0 mg/dL		1.29~2.26 mmol/L	
カリウム	血漿	3.8~5.0 mEq/L	1	3.8~5.0 mmol/L	
プロトポルフィリン	赤血球	15~50 mg/dL	0.01777	0.27~0.89 μmol/L	
ビルビン酸塩	全血液	0.3~0.9 mg/dL	113.6	34~102 μmol/L	
サリチル酸塩	血清	陰性	—	陰性	
治療間隔		15~30 mg/dL	0.07240	1.08~2.17 mmol/L	
ナトリウム	血漿	136~142 mEq/L	1	136~142 mmol/L	
硫酸塩、無機	血清	0.2~1.3 mEq/L	0.5	0.10~0.65 mmol/L	
	SO4 として		0.1042	SO4 として	
		0.9~6.0 mg/dL		0.09~0.63 mmol/L	

テストステロン	血清または血漿	300~1200 ng/dL	0.03467	10.4~41.6 nmol/L
	男性	30~95 ng/dL		1.0~3.3 nmol/L
	女性			
トリグリセリド	血清	10~190 mg/dL	0.01129**	0.11~2.15 mmol/L
尿素窒素	血清	8~23 mg/dL	0.357	2.9~8.2 mmol/L
尿酸	血清	4.0~8.5 mg/dL	0.05948	0.24~0.51 mmol/L
	男性	2.7~7.3 mg/dL		0.16~0.43 mmol/L
	女性			
ビタミンA	血清	15~60 Fg/dL	0.03491	0.52~2.09 μ mol/L
ビタミンB12	血清	160~950 pg/ml	0.7378	118~701 pmol/L
ビタミンC	血漿	0.6~1.6 mg/dL	56.78	34~91 μ mol/L
亜鉛	血清	50~150 Fg/dL	0.1530	7.7~23.0 μ mol/L

10

【0028】

血漿、血清、または選択される個々の成分は、ウシ (bovine) たとえば蓄牛 (cattle) や子ウシ胎児の血清、ヒツジ、ヤギ、ヒトの血漿および血清、タンパク質を含まない血清製品、タンパク質を含まない非動物性の (animal-free) 血清製品などを含むがそれだけには限定されない様々な源に由来するものでよい。これらは、様々な製造者たとえば Sigma Aldrich、Hyclone Inc.、Gibco / Invitrogen から入手可能である。

20

【0029】

自然源の希釈剤は、1つまたは複数の血漿源や血清源であれ1つまたは複数の血漿、血清、または両方の混合物であれ、所望の材料源を選択すること、および、少なくとも1つのステップが約50kD、30kD、または10kDの公称排除限界分子量を有する限外濾過膜で材料源を濾過することである、1つまたは複数回の濾過ステップに所望の材料源をかけることによって作成する。特に普通なら限外濾過膜を詰まらせるまたは汚してしまう、血漿または血清が大量の大きな分子量の成分を有する場合に、この限外濾過ステップの前により粗いプレフィルターを使用してもよい。さらに、所望する場合は、特定の用途に望まれるまたは必要であるならば、より細かい生成物を作成するために追加の限外濾過ステップを用いることもできる。

30

【0030】

限外濾過ステップは、ステンレス鋼フィルターホルダーまたは SWINNEX (登録商標) フィルターホルダーに収容した、Centricon (登録商標) 遠心濾過装置内など通常のフローフィルター、PLGC UF膜 (10kD N.M.W.C.O.)、YMT10膜 (N.M.W.C.O.の10kD)、PLTK UF膜 (30kD N.M.W.C.O.) などの限外濾過膜、攪拌セル、PLTKまたはPLGC UF膜を収容した Pellicon (登録商標) UFカセットなどの接線方向フローフィルター装置、あるいは米国特許第5,626,758号に示すような中空糸装置で行うことができる。どのシステムを選択するかはこの用途には重要でなく、それよりも濾過する材料源のスケール/体積および手近にある既存装置に関係する所が多い。

40

【0031】

好ましい方法は、ウシ胎児血清を材料源として使用し、マサチューセッツ州ベッドフォードの Millipore Corporation の Stericup (登録商標) フィルター装置で浄化するものである。マサチューセッツ州ベッドフォードの Millipore Corporation からいずれも入手可能な Ultracel (登録商標) PLGC または YMT10膜 (10kDのN.M.W.C.O.) をはめた Millipore 攪拌セルを使用して、浄化した血清を分離して希釈剤を調製した。

【0032】

CEを薬物候補などとして調査および/または開発するために、いくつかの異なるアッセイが使用される。Caco2細胞などの試験細胞の使用を用いて、CEの腸管輸送特性

50

を試験することができる。血漿タンパク質結合、溶解性試験、PAMP A、他の「人工」膜輸送（または透過性）アッセイなど他の方法では細胞の使用が必要とされない。本発明は、いずれの試験タイプでも使用できる希釈剤を提供することを意図する。

【0033】

典型的なアッセイは、図1に示す装置に類似した装置を使用することを含む。本実施形態は、細胞に基づくアッセイで使用するすることができる。細胞に基づかないアッセイでは、システム内に細胞を含まない同様のシステムを使用することができる。このシステムは、通常は12、24、48、96個であるがより少ないまたは多い数（たとえば384または1536個のウェル）を使用してもよい、一連のウェル4を有するトッププレートすなわち細胞プレート2を備える。

10

【0034】

ウェルの上部6は開いており、底8は中実の底または多孔性構造体10のいずれか、通常は微小孔性膜またはガラスフィルターによって閉じられている。多孔性構造体10は、大きさが膜またはフィルターの最大孔より大きい細胞および/または添加成分、あるいは濾過の駆動力を欠く場合に表面張力によって保持される細胞および/または添加成分はウェル内に保持され、液体のみが拡散によってまたは圧力下で多孔性構造体10を通るように、プレートウェルの底に密閉されている。多孔性構造体10の上側表面上で細胞12を増殖させて、多孔性構造体10の上側表面全体にわたって一体の層Iを形成させる。

【0035】

フィルタープレートの使用では、受けプレート14を細胞プレート2の下方に配置する。受けプレート14は、開いた上部18と閉じられた底20とを有する一連のウェル16を有する。ウェルの数、大きさ、構成は、細胞プレート2のウェル4Aを出すすべての液体が受けプレート14の対応するウェル16Aに流れ込むように、細胞プレートのウェルの数、大きさ、構成と位置が合うように設計されている。細胞を用いないアッセイの一部では、受けプレートは必要ない。

20

【0036】

本発明の希釈剤中で、*in vivo*投与に適切と考えられる濃度に化学物質を希釈する。通常、CEは、アッセイおよび試験するCEに応じて、希釈剤中で約10マイクロモル濃度(μM)~約0.1ナノモル濃度(nM)のレベルに希釈する。

【0037】

その後、希釈剤中のCEを、細胞プレートのウェル4の開いた上部に、好ましくは細胞を乱さないようにウェル4の側面に沿って加え、細胞と相互作用させる。好ましくは、受けプレート14のウェル16も(CEを含まない)希釈剤で満たす。

30

【0038】

一定時間後、通常は約1時間後に、2つのプレート2、14を分離し、受けプレート14のウェル16中の液体を分析する。

【0039】

この希釈剤は、あらゆる試験表面または流体に対する、CEのどのようなNSBの可能性も低減させる。さらに、これは自然の産物であり細胞を増殖させる液体と類似しているので、従来技術の他の方法たとえば溶媒の使用とは異なり、細胞やCEの挙動にわずかし
か悪影響を与えない。また、試験システム全体から分かるように、これは、受けプレートウェルのみならず、細胞プレート2、希釈容器(図示せず)、施用具たとえばシリンジまたはピペット、多孔性構造体などにおけるNSBも低下させる。本発明は、ガラスであれプラスチックであれ、あるいはプラスチックの混合物や親水性コーティングでコーティングしたプラスチックであれ、システムで使用する材料に関わらず機能し、低NSBプレートとみなされていたプレートでもNSBを低下させることが分かった。最後に、この希釈剤は溶液中のCEと全く結合せず、これは、CEの生体利用に全く悪影響を及ぼさないことを意味する。

40

【0040】

本発明の発明は、*in vivo*環境に最もよく似ているので、幅広いアッセイで使用

50

される材料の好ましい希釈剤であることが見出された。本発明を緩衝液、培養基、または生物アッセイやバイオ予測的 (biopredictable) アッセイで化合物の挙動を評価するのに使用する様々な化合物の希釈剤として使用することができる。

【実施例】

【0041】

放射標識した様々な薬物 (リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) 中 10 nM の濃度) の NSB を、Microcon (登録商標) の 96 穴受けプレート (PTFE 樹脂ポリプロピレン混合物により形成) に加え、60 分間プレート内に放置した。NSB で失われた薬物量を測定し、図 2 にまとめて示す。

【0042】

様々なプラスチックから作成された他の 96 ウェルプレートに対する薬物 NSB (リン酸緩衝液中 10 nM の薬物) も試験した。PTFE を含めたこれらプレートのすべてで結合が有意であり、損失の程度は薬物の溶解性に関連していた (すなわち、薬物が親油性であるほど、NSB による損失が大きかった)。実際、タキソールおよびテストステロンの PP および PTFE プレート上での LC-MS を用いた時間経過研究では、薬物 NSB はプレート材料に依存しないように思えた (データ示さず)。

【0043】

本発明で請求する希釈剤中の薬物の希釈液を、Microcon (登録商標) 96 穴受けプレート (PTFE 樹脂 / ポリプロピレン混合物)、ポリプロピレンから形成した 96 ウェルプレート、および PTFE 樹脂から形成した 96 ウェルプレート中で様々な薬物を用いて試験し、すべてにおいて NSB が有意に低下したことが示された。結果を図 3 に示す。

【0044】

希釈剤中で希釈した結果として観察された薬物 NSB の劇的な低下に加えて、この希釈剤は in vivo 「移動相」に最もよく似ているので、幅広いアッセイにおける理想的な希釈剤であると考えられる。

【図面の簡単な説明】

【0045】

【図 1】本発明の一実施形態で有用な装置の横断面を示す図である。

【図 2】実施例のデータを示すグラフである。

【図 3】実施例のデータを示すグラフである。

10

20

30

【 図 1 】

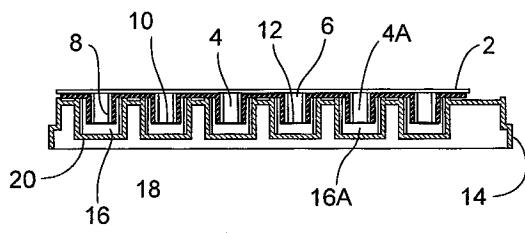
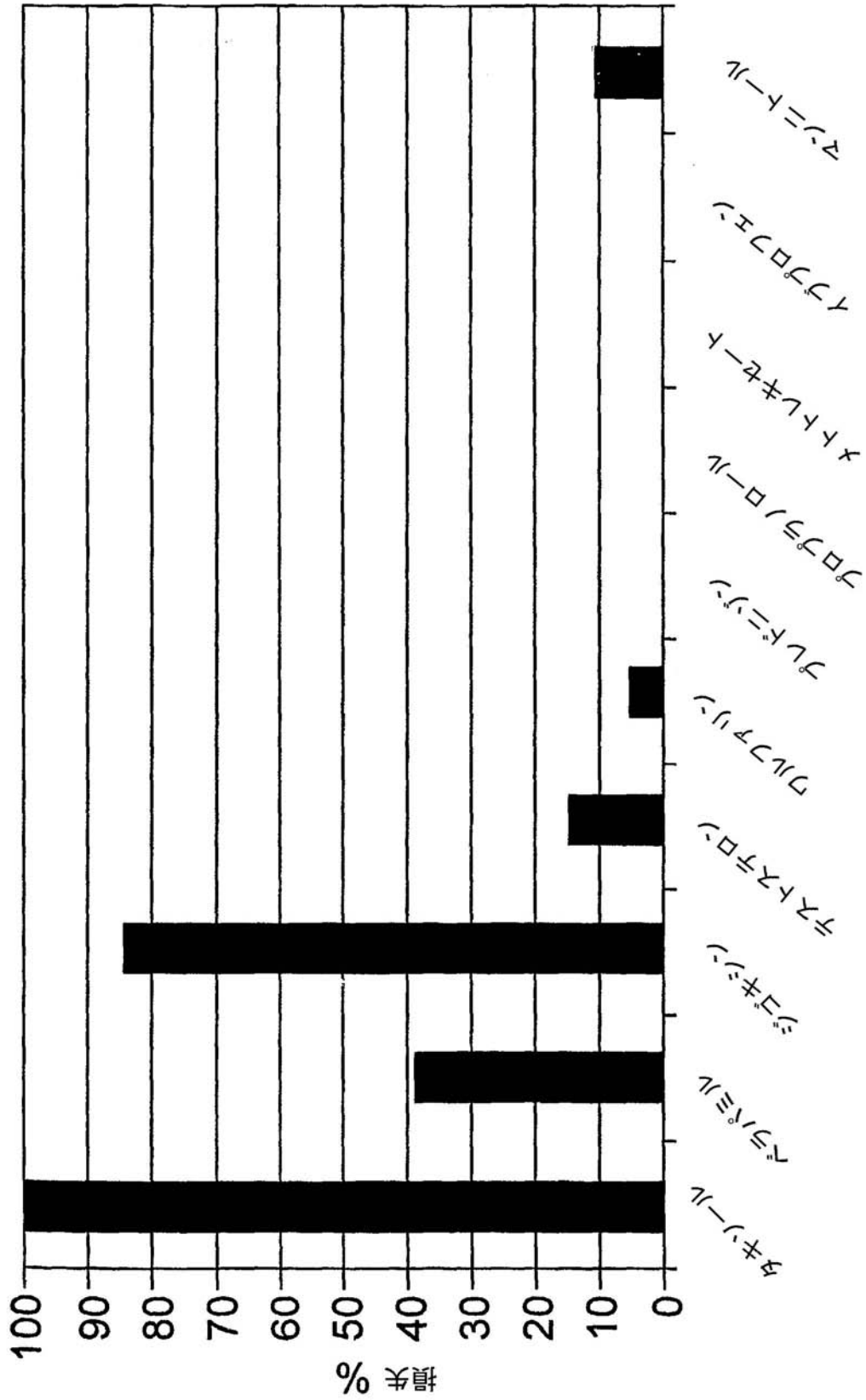


Figure 1

【 図 2 】



【 図 3 】

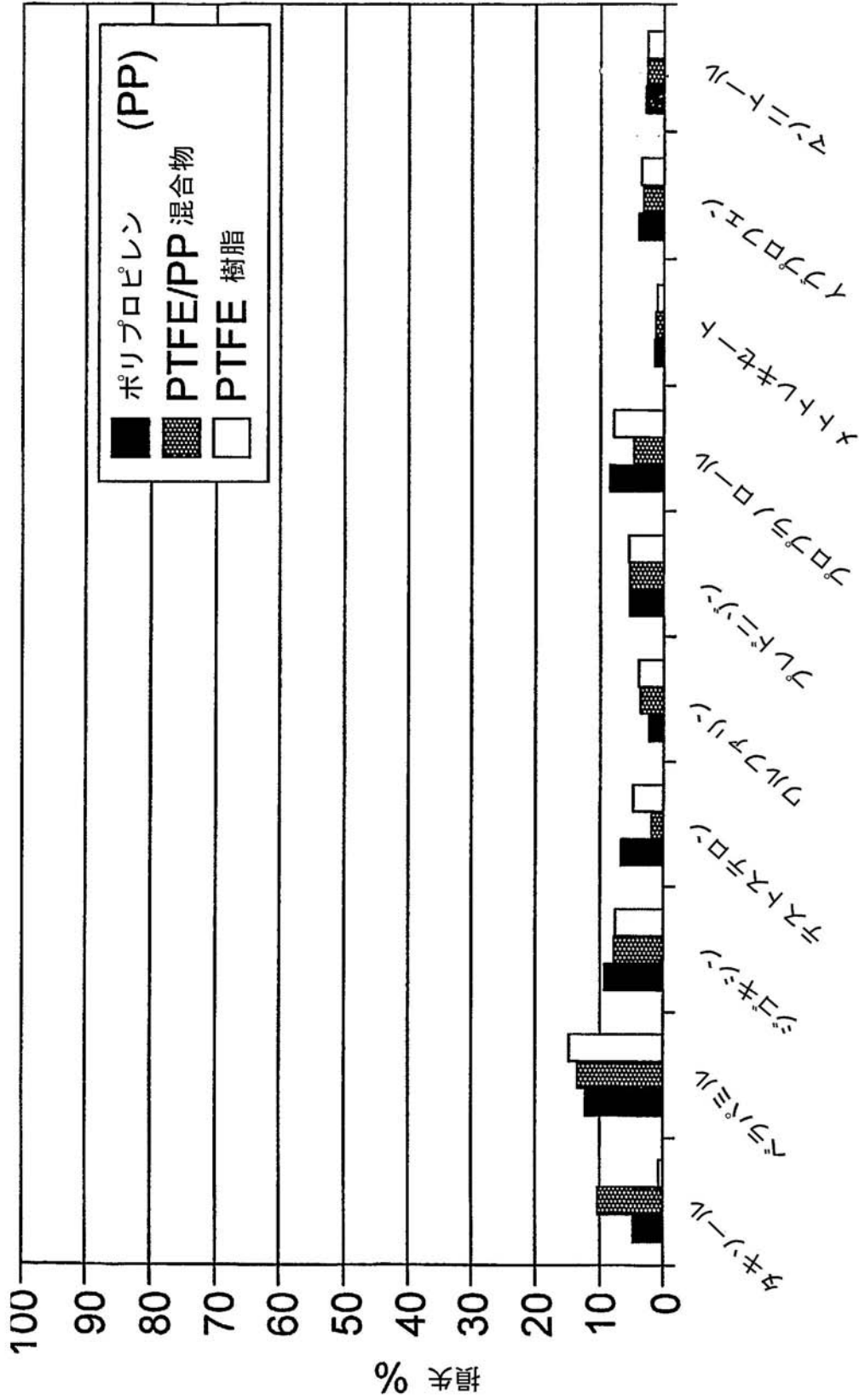


Figure 3

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Internal Application No PCT/US 03/04329
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 G01N33/543 A61K47/00		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 0 337 785 A (EASTMAN KODAK COMPANY) 18 October 1989 (1989-10-18) page 10, line 11-17; claims 1-6	1-22
Y	WO 93 21529 A (DUKE UNIVERSITY) 28 October 1993 (1993-10-28) page 23, line 10-23	1-22
Y	US 6 156 495 A (ABBOTT LABORATORIES) 5 December 2000 (2000-12-05) example 5	1-22
☐ Further documents are listed in the continuation of box C. ☒ Patent family members are listed in 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 28 May 2003		Date of mailing of the international search report 10/06/2003
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5018 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel (+31-70) 340-2340, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016		Authorized officer Moreno de Vega, C

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Internat
pplication No
PCT/US 03/04329

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0337785	A	18-10-1989	US 5077198 A	31-12-1991
			AT 91180 T	15-07-1993
			DE 68907372 D1	05-08-1993
			DE 68907372 T2	27-01-1994
			DK 630189 A	13-02-1990
			EP 0337785 A1	18-10-1989
			EP 0525916 A1	03-02-1993
			HK 124293 A	19-11-1993
			IE 891182 L	14-10-1989
			JP 1305357 A	08-12-1989
			JP 1980522 C	17-10-1995
			JP 7006983 B	30-01-1995
			MX 170088 B	06-08-1993
			WO 8909939 A1	19-10-1989
			US 5268299 A	07-12-1993
WO 9321529	A	28-10-1993	AU 4024593 A	18-11-1993
			EP 0636248 A1	01-02-1995
			JP 7505719 T	22-06-1995
			WO 9321529 A1	28-10-1993
			US 5652115 A	29-07-1997
US 6156495	A	05-12-2000	US 5981172 A	09-11-1999
			CA 2178537 A1	08-12-1996
			EP 0747482 A2	11-12-1996
			JP 9117287 A	06-05-1997
			WO 9829747 A1	09-07-1998
			CA 2170073 A1	07-10-1996
			EP 0736601 A2	09-10-1996
			JP 3061258 B2	10-07-2000
			JP 9028386 A	04-02-1997
			US 5843450 A	01-12-1998
			EP 0745129 A1	04-12-1996
			US 6451578 B1	17-09-2002
			US 6051374 A	18-04-2000
			US 6558898 B1	06-05-2003
			CA 2166313 A1	17-08-1995
			WO 9521922 A2	17-08-1995
			JP 10337193 A	22-12-1998
			JP 9511137 T	11-11-1997

フロントページの続き

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,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,IT,LU,MC,NL,PT,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,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC, EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,M X,MZ,NO,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SC,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(74)代理人 100124855

弁理士 坪倉 道明

(72)発明者 リンチ, ジョン

アメリカ合衆国、マサチューセッツ・01821、ピレリカ、ピーチ・アベニユー・2

(72)発明者 ワイス, アラン

アメリカ合衆国、マサチューセッツ・01720、アクトン、ストーニーミード・ウェイ・25

Fターム(参考) 2G045 BA01 BB04 BB42 CA26 CB17 DA36 FB03 FB15 HA16

专利名称(译)	生产和使用方法		
公开(公告)号	JP2005537459A	公开(公告)日	2005-12-08
申请号	JP2003568410	申请日	2003-02-12
[标]申请(专利权)人(译)	EMD密理博公司		
申请(专利权)人(译)	Millipore公司		
[标]发明人	リンチジョン ワイスアラン		
发明人	リンチ,ジョン ワイス,アラン		
IPC分类号	G01N33/48 G01N33/53 G01N33/543 G01N33/566		
CPC分类号	G01N33/54393		
FI分类号	G01N33/48.A G01N33/53.D G01N33/543.521 G01N33/566		
F-TERM分类号	2G045/BA01 2G045/BB04 2G045/BB42 2G045/CA26 2G045/CB17 2G045/DA36 2G045/FB03 2G045/FB15 2G045/HA16		
代理人(译)	小野 诚 Masarushin大崎		
优先权	60/356789 2002-02-14 US		
其他公开文献	JP4057534B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

使用稀释剂来减少非特异性药物结合 (NBS) 是基于生物测定结果在提供简单灵活的生物相容性方法, 减少化学品的NSB (例如药物, 候选药物和其他小分子), 从而更准确地预测这些化合物在体内的行为到。另外, 使用的稀释剂的化学稀释剂, 高通量药物测定, 例如的Caco-2药物转运测定, 血浆蛋白药物结合测定, 测定PAMPA, 渗透率测定和预测数据从药物溶解度测定法得到的增加特征性。选择稀释剂等离子体时, 30 kD的, 优选地具有小于或等于标称排除极限分子量的超滤膜至约10kD的, 或血浆或血清的各个组件并不有助于非特异性结合过滤无论是通过有选择地做应用它。

