200912312

發明專利說明書

（本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫）

※ 申請案號：97119819

※ 申請日期：97.5.29　　※IPC 分類：B01J13/00 (2006.01)
G01N33/543 (2006.01)
G01N33/58

一、發明名稱：（中文/英文）

用於檢測新化學品及候選藥物之 PK/ADME-Tox 特性的試劑及方法

REAGENTS AND METHODS FOR THE DETERMINATION OF PK/ADME-TOX CHARACTERISTICS OF NEW CHEMICAL ENTITIES AND OF DRUG CANDIDATES

二、申請人：（共 1 人）

姓名或名稱：（中文/英文）

製藥診斷股份有限公司

PHARMADIAGNOSTICS NV

代表人：（中文/英文）

范艾斯比克/VAN EESBEECK, BRUNO

住居所或營業所地址：（中文/英文）

比利時辛津市史翠普街 21 號

Strijpstraat 21, B-9750 Zingem, Belgium

國　籍：（中文/英文）

比利時/Belgium

三、發明人：（共 4 人）

姓　名：（中文/英文）

1. 派翠克/ENGLEBIENNE, PATRICK
2. 凡安妮/VAN HOONACKER, ANNE
3. 羅伯托/MARTINEZ-NEIRA, ROBERTO
4. 派翠西亞/DE PRIL, PATRICIA

國　籍：(中文/英文)

1.、2.及 4.均為比利時/Belgium

3.為西班牙/Spain

四、聲明事項：

☐ 主張專利法第二十二條第二項☐第一款或☐第二款規定之事實，其事實發生日期為：　年　月　日。

☑ 申請前已向下列國家（地區）申請專利：

【格式請依：受理國家（地區）、申請日、申請案號　順序註記】

☑ 有主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

美國；西元 2007 年 5 月 29 日；60/940,641

☐ 無主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

☐ 主張專利法第二十九條第一項國內優先權：

【格式請依：申請日、申請案號　順序註記】

☐ 主張專利法第三十條生物材料：

☐ 須寄存生物材料者：

國內生物材料　【格式請依：寄存機構、日期、號碼　順序註記】

國外生物材料　【格式請依：寄存國家、機構、日期、號碼　順序註記】

☐ 不須寄存生物材料者：

所屬技術領域中具有通常知識者易於獲得時，不須寄存。

國　籍：(中文/英文)

1.、2.及 4.均為比利時/Belgium

3.為西班牙/Spain

四、聲明事項：

☐ 主張專利法第二十二條第二項☐第一款或☐第二款規定之事實，其事實發生日期為：　年　月　日。

☑ 申請前已向下列國家（地區）申請專利：

【格式請依：受理國家（地區）、申請日、申請案號　順序註記】

☑ 有主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

美國；西元 2007 年 5 月 29 日；60/940,641

☐ 無主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

☐ 主張專利法第二十九條第一項國內優先權：

【格式請依：申請日、申請案號　順序註記】

☐ 主張專利法第三十條生物材料：

☐ 須寄存生物材料者：

國內生物材料　【格式請依：寄存機構、日期、號碼　順序註記】

國外生物材料　【格式請依：寄存國家、機構、日期、號碼　順序註記】

☐ 不須寄存生物材料者：

所屬技術領域中具有通常知識者易於獲得時，不須寄存。

九、發明說明：

相關申請案的交叉引述

本申請案主張於 2007 年 5 月 29 日提申的美國臨時申請案序號 60/940,641 的優惠，其申請被併入此處以作為參考資料。

【發明所屬之技術領域】

提供使用膠體導電聚合物、貴金屬奈米粒子或穩定金屬/導電聚合物複合膠體作為試劑供至少活體外預測(若不是檢測)新化學品(NCEs)的 PK/ADME-tox 特性的方法。亦提供其應用之包括本發明方法以及試劑的套組。這些有關於本發明之方法以及試劑的突出特性在於它們所涉及的反應是均質的、快速的，以及如同"混合以及讀取"過程被進行的事實。

【先前技術】

目前已廣為被接受的是：將新化學品(new chemical entities, NCEs)轉換成銷售藥物(marketed drugs)並非有效率的。對於每個上市的新藥物來說，製藥公司必須篩選 5-10,000 個化合物。最常被舉出的估算量暗示其耗費八億元 R&D 經費來投入一個新藥物，大多數花費的費用仍失敗(Bains, W. (2004) Failure rates in drug discovery and development: Will we ever get any better? Drug Discovery World 5(4), 9-18)。

習知地，藥物每次一個地從天然來源被獲得或被合

成。在習知的藥物發展步驟中，新化合物的合成被認為是藥物開發以及發展過程的速率限制步驟(rate limiting step)。自動化的組合式化學(automated combinatorial chemistry)的出現已透過可以在一天內合成數千個化合物而克服這個速率限制步驟。

這個有機合成的技術改良很快地召來高通量篩選(high-throughput screening, HTS)方法的實施，給予藥學科學家機會在大約數天之內測試這麼多針對藥學標的之化合物(即細胞受體，離子通道或酵素)的生物活性(Englebienne, P. (2005) High-Throughput Screening: Will the past meet the future? In: Frontiers in Drug Design and Discovery, Vol. 1 (G.W. Caldwell, Atta-Uhr-Rahman and B.A. Springer, eds.) Bentham Science Publishers, Ltd, Hilversum, pp. 69-86)。然而，儘管這個在合成以及生物評估速度上的戲劇性增加，整個藥物發展過程倖存的化合物的數目維持極低。每年上市的新藥物實際上從 1963 至 1999 維持伏平(Service, R.F. (2004) Surviving the blockbuster syndrome. Science 303, 1796-1799)。

有關於許多 NCEs 失敗的主要原因是不良的藥物動力學(pharmacokinetic, PK)、ADME (吸收、分布、代謝以及分泌)以及 Tox (毒物學)特徵。在藥物發展過程期間，單是這些原因就要為新候選藥物高達 50%的損耗率負責。耗損的其他原因為缺乏效力(30%)、人的負作用(10%)、商業上或各種原因(10%)(Wang, J. and Urban, L. (2004) The impact

of early ADME profiling on drug discovery and development strategy. Drug Discovery World 5(4), 73-86)。

藥物開發以及發展過程可以被分為三期：開發、發展及登記註冊。開發期(合成、前導尋找(lead finding)、前導最佳化(lead optimization))可以持續 3 至 4 年。發展期包括臨床期 I-III。在開發晚期以及發展早期(臨床期 I)，PK/ADME-Tox 特徵在細胞培養模型以及動物中被個別地評估(Englebienne，2005，上文)。考量臨床期 I 通常持續大約 2 年，大多數的失敗發生花費在研究努力 NCE 之後的 2 至 6 年。因此，在藥物開發過程中盡可能地早點獲得有關於一候選藥物的 PK/ADME-Tox 特性是所企求的。

在藥物開發以及發展過程期間在協助下快速地獲得此資訊，許多定量結構-活性關係 (quantitative structure-activity relationship, QSAR) 模型已被提出 (Yoshida, F. and Topliss, J.G. (2000) QSAR model for drug human oral bioavailability. J. Med. Chem. 43, 2575-2585; Bergström, C.A.S., Strafford, M. et al. (2003) Absorption classification of oral drugs based on molecular surface properties. J. Med. Chem., 46, 558-570; Sköld, C., Winiwater, S. et al. (2006) Presentation of a structurally diverse and commercially available drug data set for correlation and benchmarking studies. J. Med. Chem., 49. 6660-6671)。QSAR 模型是一種電腦程式，允許吾人將化學結構特徵與帶有此分子特徵的分子將展現出對應的 ADME 特性之預

設機率於電腦(in silico)(亦即，透過電腦-協助的計算)中作出關聯。許多描述此電腦技術的專利案以及專利申請案已被申請。參見，例如美國公開申請案號 2004009536 以及 2005119832。

活體外方法亦已被發展並且公開，允許吾人推想候選藥物的親脂性(lipophilicity)(Lombardo, F., Obach, R.S. et al. (2004) Prediction of human volume of distribution values for neutral and basic drugs. 2. Extended data set and leave-class-out statistics. J. Med. Chem. 41, 1242-1250; Wilson, D.M., Wang, X. Et al. (2001) High-throughput Log D determination using liquid chromatography-mass spectrometry. Combinatorial Chem. High Throughput Screen. 4. 511-519)、細胞膜穿透電位(Taillardat-Bertschinger, A., Carrupt, P.A. et al. (2003) Immobilized artificial membrane HPLC in drug research. J. Med. Chem. 46, 655-665)，或血漿蛋白-結合(Cimitan, S. Lindgren, M.T. et al. (2005) Early absorption and distribution analysis of antitumor and anti-AIDS drugs: lipid membrane and plasma protein interactions. J. Med. Chem. 48, 3536-3546)，所有決定它們的 ADME-Tox 特性的特徵。亦參見國際專利公開案號 WO9942511；WO03027656；以及 WO2005034915，還有美國專利案號 US 6,868,343。

儘管該等活體外方法已被列為具有高通量篩選特性的事實，它們的性能以及時間的安排(timing)卻是差的。許多

該等方法需要長的培育時間並且在結合至固相試劑，或在測量溶液中游離的藥物濃度可個別地發生之前，從游離藥物分離出結合的必須被施行(例如，藉由離心)。再者，藥物濃度是從複雜的技術(包括高效液相層析法(HPLC)、放射性同位素計數和/或質譜分析法)所獲得的資料所推論的。

【發明內容】

本發明的具體例藉由提供一供檢測 NCEs 之 ADME 特徵用之利用貴金屬膠體的、導電聚合物膠體的，或其複合材料的光子反應性之"混合以及讀取(mix and read)"的技術為主的活體外方法來克服這些缺點，如同下面更為詳細地被描述。

貴金屬(諸如金或銀)的奈米粒子可被製備成各種不同的幾何形狀(諸如球、桿或錐體)。這些小物體含有呈化學還原形式並且視它們被製備的方式而定的金屬元素，它們可以像是還原的粉末固體來被貯存，或被維持在配於溶劑(諸如水或各種不同的有機溶劑，例如像是一膠體)中的穩定懸浮液。因為該等粒子的奈米尺寸，肉眼無法從真溶液分辨出這些懸浮液，雖然顯微鏡可以，但是這些懸浮液因而被稱為膠體溶液(colloidal solutions)。該等粒子因此易於鑄造在各種不同的撐體(supports)上以形成明確的結構。

這些金屬奈米粒子的研究在近年來因為它們獨特的電子、光學以及催化特性已是一個極為活躍的領域。因為光是與電磁領域相關聯的，奈米粒子的光電子學特性是特別

有趣的。更確切地，因為它們是金屬並且能夠導電，貴金屬奈米粒子在它們的表面被圍繞以導電電子的一緻密雲。當這些電子被光所激發，電磁輻射與這些電子結合以形成從粒子表面輻射出的集體振盪(collective oscillation)。結果，粒子展現出可以被成功地應用在分析技術中的特異性光吸收、反射、發射以及散射特性。更進一步地，一配位子結合到一被固定在奈米粒子表面上的受體誘發粒子周圍之折射率的一個變化，其直接地由在其光子特性上的特異性變化說明(Englebienne, P. et al. (2003) Surface Plasmon resonance: Principles, methods and applications in biomedical sciences. Spectroscopy 17, 255-278)。目前被研究的大多數粒子是由相同金屬均質地製成的。然而，近來已顯示建構由不同金屬在結構中交替所製成的奈米物體是可行的。這個新進展為它們在許多應用中作為條碼(bar-codes)的應用開啟了新頁，包括生物分子交互作用的定量偵測(Bao, Y.P., Wei, T.F., Lefebvre, P.A. et al. (2006) Detection of protein analytes via nanaparticle-based bio bar code technology. Anal. Chem. 78, 2055-2059)。

相同地，導電聚合物或由導電聚合物與貴金屬所製成的複合材料(composite)也可以呈含有奈米粒子的膠體形式被獲得。導電聚合物為由個別地具有炔、苯基或雜環單體的重複序列所構成之大規模共軛之巨分子。這些聚合物可以藉由氧化(p-摻雜)(p-doping)或還原(n-摻雜)而從它們的絕緣態獲得近-金屬導電性(near-metallic conductivity)。對

導電聚合物來說另一個常見的重要特徵是它們因為它們的氧化態改變而歷經色轉換(chromic transitions)的能力(Englebienne, P. (1999) Synthetic materials capable of reporting biomolecular recognition events by chromic transition. J. Mater. Chem. 9, 1043-1054)。使用由一貴金屬被包圍以一層導電聚合物所製的複合材料奈米粒子誘發兩種材料的導電電子的交互作用，其允許奈米材料對於各種不同在它們環境中之變化的在光子反應性上的一個增加，包括折射率(refractive index)以及氧化還原電位(redox potential)(Englebienne, P. and Van Hoonacker, A. (2005) Gold-conductive polymer nanoparticles: A hybrid material with enhanced photonic reactivity to environmental stimuli. J. Coll. Interface Sci. 292, 445-454)。亦參見公開的美國專利申請案號 2007-0172834；其揭示內容被併入此處以作為參考資料。

因為該等奈米粒子對它們環境的特異性光子敏感度，它們已在各種不同的均質分析技術(包括用於各種不同分析物的定量免疫分析)中被用作為標記(label)(Englebienne, P. (2000) Immune and Receptor Assays in Theory and Practice. CRC Press, Boca Raton, 392pp)。一含有一特異性受體、共價地被標記以一導電聚合物並且被鑄造在一固體載體上的脂質雙層膜已被提議用於透過分光光度測定法直接地監測其與特異性配位子的交互作用(諸如被描述於 US 6,395,561 中)。

本發明證實並且主張由導電聚合物、貴金屬或其複合材料所製成的膠體奈米粒子被使用於溶液中或一固體撐體上以快速檢測 NCEs 的 PK/ADME-Tox 特性的有利應用。

因此，使用奈米粒子膠體(諸如膠體導電聚合物、貴金屬奈米粒子或穩定金屬/導電聚合物複合膠體)作為試劑，不論在溶液中或鑄造在一固體載體上，供活體外 NCEs (例如，候選藥物或前導化合物)的 PK/ADME-tox 特性的至少預測，以及在某些具體例中檢測的方法被提供。亦被提供的是有關其應用之包括該方法以及試劑還有供實施該等方法的裝置。這些方法以及試劑的具體例的所有方面包括它們涉及的反應為均質、快速的並且像是"混合以及讀取"過程被進行的事實。

定義

除非另有定義，此處所使用的所有技術與科學術語具有如同為該領域(針對本發明所屬)中具有通常技藝者所理解的相同意思。仍然，某些元素在下面為了明白以及易於參考之目的而被定義。

術語"膠體"意指一種被懸浮在一液體介質(liquid medium)中之具有微粒子的流體組成物。在代表性的膠體中，其中的粒子是大小介於 1 奈米以及 1 微米。

術語金屬膠體(metal colloid)意指一種膠體，其中被懸浮的微粒子為金屬粒子。

術語"貴金屬(noble metal)"意指週期表的第 VIII 族金屬，包括但不限於：鉑、銥、鈀以及類似物，還有金、銀

等等。

術語"導電聚合物(conductive polymer)"或"導電聚合物(conducting polymer)"表示一種導電性聚合材料。在代表性具體例中，導電聚合物是有機聚合物，諸如π-共軛的有機聚合物。例如，被採用的可以是聚吡咯(polypyrrole)、聚噻吩(polythiophene)、聚苯并噻吩(polybenzothiophene)、聚異苯并萘吩(polyisothianaphthene)、聚噻吩乙炔(polythienylenevinylene)、聚苯胺(polyaniline)、聚乙炔(polyacetylene)、聚聯乙炔(polydiacetylene)、聚薁(polyazulene)、聚芘(polypyrene)、聚咔唑(polycarbazole)、聚硒吩(polyselenophene)、聚呋喃(polyfuran)以及聚苯并呋喃(polybenzofuran)、聚(p-伸苯)(poly(p-phenylene))、聚吲哚(polyindole)、聚嗒吡(polypyridazine)，以及聚萘(polyacenes)，諸如稠四苯(naphthacene)、稠五苯(pentacene)、稠六苯(hexacene)、七苯(heptacene)、二苯并稠五苯(dibenzopentacene)、四苯并稠五苯(tetrabenzopentacene)、芘(pyrene)、二苯并芘(dibenzopyrene)、(chrysene)、苝(perylene)、蒄(coronene)、滌綸(terylene)、卵苯(ovalene)、quoterylene，與環蒽(circumanthracene)以及它們的衍生物。

如同在該技藝中已知的，導電聚合物可以藉由將材料(諸如對苯并苯醌衍生物以及四氰基乙烯還有四氰基喹啉二甲烷，以及其衍生物，其作為接受電子的受體)，或例如具有官能基團(諸如胺基基團、三苯基基團、烷基基團、羥

基基團、烷氧基基團，以及苯基基團；經取代的胺(諸如苯二胺、蒽、苯并蒽、經取代的苯并蒽、芘、經取代的芘，咔唑及其衍生物，以及四硫富瓦烯及其衍生物))的材料(其作為電子供體的供體)，併入具有官能基團(諸如二甲胺基基團、氰基基團、羥基基團以及硝基基團)的聚合物材料而被摻雜。摻雜，如此處所述的，代表電子接受分子(受體)或電子貢獻分子(供體)被併入該採用摻雜的聚合物。被採用來在本發明中用作為摻雜劑(dopants)的可以是受體或供體。

術語"膠體導電聚合物"意指一種由導電聚合物粒子所製成的膠體。

術語"金屬/導電聚合物複合材料膠體"意指一種由具有一導電聚合物存在於其一表面的金屬粒子所構成的膠體。

術語"膠體綴合物(colloid conjugate)"或"綴合的奈米粒子(conjugated nanoparticle)"意指一種參與膠體的奈米粒子，其中分子被展現在該膠體的表面以給予反應性，諸如但不限於受體、核酸、硫醇化的烷基鏈等等。反應分子在奈米粒子表面上的接附可藉由物理或化學方法而發生。

術語"固體撐體(solid support)"以及"固體基質(solid substrate)"表示任何透光的固-相，諸如但不限於玻璃或石英，該等膠體被沉積在其上以形成一要被用作為一感應器的光-反應性薄膜。

術語"吸附"意指在分子(例如受體、膜或配位子)的薄

膜對於它們所接觸的固體本體(例如金屬或複合材料粒子)之表面的附著。

如此處所用的，術語"接觸"表示帶或放在一起。就其本身而論，當兩個物件被帶或放在一起，一第一物件被接觸以一第二物件，亦即透過使它們彼此接觸。術語"結合"意指使兩個不同的組成物以使得它們變成一個單一組成物的方式接觸。

術語"攪拌(agitation)"意指對一組成物施予物理移動，以使得其組分相對彼此移動。就其本身而論，術語攪拌被廣泛地採用來意指混合、攪拌，以及類似者。

術語"配位子"如此處所用的意指是一特異性結合對(specific binding pair)的一個成員的任何類型的分子。感興趣的配位子包括，但不限於生物分子，其中術語"生物分子"表示任何感興趣的無機、有機或生化分子，群組或物種，例如可特異性地結合至或與一感興趣的受體(諸如抗體、細胞受體、離子通道、血漿蛋白質、酵素或脂質結構)交互作用。配位子也可以諸如藉由一硫氫基基團(sulfhydryl group)的氧化攻擊而形成一帶有對應結合分子的共價加成物。示範性生物分子包括肽、蛋白質、胺基酸以及核酸。對於本發明的某些具體例來說，配位子可以是一種在藥物開發與發展過程中由藥學化學家所合成或分離之要被發展成一前導化合物的候選藥物，或任何新化學品(NCE)。

術語"肽"如此處所用的意指任何由一胺基酸的一羥基基團與另一基團的胺基基團間形成之醯胺所生成的化合

物。

術語"寡肽"如此處所用的意指具有少於大約 10 至 20 個殘基(亦即胺基酸單體單元)的肽。

術語"多肽"如此處所用的意指具有超過大約 10 至 20 個殘基的肽。術語"多肽"以及"蛋白質"可被交替地使用。

術語"蛋白質"如此處所用的意指具有超過大約 50 個殘基並且包括 D 與 L 形式、修飾形式等等之特定序列的多肽。

術語"核酸"如此處所用的表示一由核苷酸(例如去氧核糖核酸或核糖核酸)所組成的聚合物，或合成地被生成的化合物(例如，如被描述於美國專利號 5,948,902 中的 PNA 以及其中所引用的參考文獻)，其可與天然存在的核酸以一類似於那個兩個天然存在之核酸所具有者的序列特異性的方式(例如可參與瓦生-克立克鹼基配對交互作用)來雜交。

術語"核苷"以及"核苷酸"被意欲來包括那些不止含有嘌呤以及嘧啶鹼基部份，還有經修飾之其他雜環鹼基部分的部分。該等修飾包括甲基化的嘌呤或嘧啶、醯化的嘌呤或嘧啶，或其他雜環。此外，術語"核苷"以及"核苷酸"包括那些不止含有習知核糖以及去氧核糖糖，還有其他糖的部分。經修飾的核苷或核苷酸也包括在糖部分上的修飾，例如，其中一或多個羥基基團被取代以鹵素原子或脂肪族基團，或被官能化(functionalized)為醚、胺，或類似者。

術語"核糖核酸"以及"RNA"如此處所用的意指一種由核糖核苷酸所構成的聚合物。

術語"新化學品"、"候選藥物"以及"前導化合物"如此處所用的意指無機或有機化合物，包括要被發展成作為一供人類或動物使用的藥物之分離自天然來源或重新合成的金屬鹽、具有氧、氫、氮、磷、矽、肽、蛋白質以及核酸的碳複合物所作出的小分子。

有關"均質的"被表示在一所有方面具有相同或類似種類或特性的組成物，亦即在所有方面具有均勻結構或組成。

術語"均質分析"意指一種以"混合以及讀取"原則為基礎的解析分析系統(analytical assay system)，亦即其不需要任何物理分離結合的或游離的配位子並且其結果是從完整反應混合物被直接地測量。

術語"去氧核糖核酸"以及"DNA"如此處所用的表示一由去氧核糖核苷酸所構成的聚合物。

術語"寡核苷酸"如此處所用的表示具有長度從大約10至100個核苷酸以及高至200個核苷酸的單股核苷酸集合體(multimer)。

"生物聚合物(biopolymer)"是一種具有一或多種重複單元的聚合物。生物聚合物在生物系統(雖然他們可以是合成地被作出)中被發現並且可包括肽、蛋白質或多核苷酸，還有由胺基酸類似物或非胺基酸基團，或核苷酸類似物或非核苷酸基團所組成或含有胺基酸類似物或非胺基酸基團，或核苷酸類似物或非核苷酸基團。這包括多核苷酸，其中習知的骨架已被取代以一非天然存在或合成的骨架，以及核酸(或合成的或天然存在的類似物)(其中一或多個習

知鹼基被取代以可參與瓦生-克立克型氫鍵結交互作用的基團(天然或合成的))。多核苷酸包括單或多股組態，其中一或多股可以或無法完全地與另一者排列。例如，一"生物聚分子"可包括受體、抗體、結合-蛋白質、DNA (包括cDNA)、RNA、寡核苷酸，以及 PNA 與其他如同被描述在美國專利案號 5,948,902 與其中所引用的參考文獻的多核苷酸(其所有被併入此處以作為參考資料)，不論其來源。

用語"光學特性(optical property)"意指一種光學參數，亦即一種特性，其數值決定某物的特徵或行為(behavior)，其中代表性的光學特性包括，但不限於：光吸收、光發射、光反射以及光散射。

術語"定域表面電漿共振(localized surface plasmon resonance)"意指在貴金屬奈米粒子的或其導電聚合物複合材料的可見光譜之特異性光吸收帶(light absorption band)。如同為一具有該技藝中的通常技藝者所知的，當周圍介質的折射率(亦即介電(dielectric)的平方根)被改變時，該特異性吸收帶的波長與高度是各自地被轉移並且增加。

有關"表面電漿共振偶合"被表示當至少二，或多個貴金屬奈米粒子被帶到接近相同於至多它們平均直徑的 2.5 倍的距離內發生在定域表面電漿共振效應上的增加。

術語"藥物動力學"(PK)、"ADME"以及"毒物學"(Tox)如此處所用的意指藥物在一動物(包括哺乳動物，諸如人類)中的吸收、分布、代謝、分泌以及毒性效應(toxicological

effects)，它們可能如同一藥劑般影響它們的效用。特別地，這些術語意指一藥物、候選藥物、前導化合物或NCE於一預定時間框架內平均或不平均地分布在該一動物或人類體內的能力，以評估生物體的細胞或部分(諸如腦)是否被快速代謝，以更高或更低的親和力結合至血清或血漿蛋白質或特定代謝酵素(諸如，但不限於細胞色素家族的成員)、與生物或合成的膜或層(layers)交互作用，或與涉及代謝的分子或衍生物(諸如葡萄糖醛酸苷、半胱胺酸或麩胺硫)形成共價加成物。

術語"參考(reference)"以及"對照(control)"被交替使用來意指一已知數值或一組已知數值，一被觀察到的數值可以相對於它而被比較。如此處所用的，已知表示代表一已知參數的數值，例如親和力、結合百分率、分布體積、光吸收、光發射等等。

術語"評估(assessing)"以及"評估(evaluating)"被交替地使用來意指任何形式的評估法，並且包括檢測一存在於介質中的元素是否與該膠體或其一綴合物交互作用。術語"檢測(determining)"、"測量"、"評估(assessing)"以及"分析(assaying)"被交替地使用並且皆包括定量以及定性檢測。評估可以是相對的或絕對的。"評估反應性"包括檢測一對配位子之間，還有一配位子以及一奈米粒子或其一綴合物之間的交互作用水準。

如此處所用的，術語"偵測"表示定性地或定量地確認一訊號。

術語"結合(binding)"意指兩個物體彼此締合以生成一穩定的組成物結構。在某些具體例中，兩個互補性核酸間的結合被意指為特異性雜交(specifically hybridizing)。術語"特異性雜交(specifically hybridizing)"、"特異性雜交至(hybridizing specifically to)"與"特異性雜交(specific hybridization)"以及"選擇性地雜交至(selectively hybridize to)"被交替地使用並且意指一核酸分子在嚴苛條件下優先地結合、複合(duplexing)，或雜交至一特定核苷酸序列。在某些具體例中，一配位子以及一受體間的結合可以被意指為帶有一預定親和力或結合性(avidity)的特異性地交互作用。在其他具體例中，一配位子對一分子的結合可以意指為配位子的一反應結構以及標的分子的一特定基團間的一共價鍵形成。

關於"競爭性"或"競爭"在此處被表示在一預定分析中一配位子與另一個或其一蛋白質-綴合物競爭結合一受體或一酵素。

術語"親和力"以及"結合性"意指一對結合配位子彼此締和的強度。

術語"篩選"意指檢測感興趣的某物(例如，一分析物、一事件等等)的存在。如此處所用的，術語"檢測(determining)"表示鑑定，亦即建立、確認，評估或測量有關感興趣之一特定參數的一數值，例如一雜交參數。該數值的偵測可以是定性(例如，存在或不存在)或定量，其中一定量檢測可以是相對的(亦即，一數值，其單位是相對於

一對照或一已知數值(亦即參考數值))或絕對的(例如，當實際分子的一數目被檢測)。

術語"樣品"如此處所用的意指一種流體組成物，其中在某些具體例中該流體組成物是一種水性組成物。

詳細說明

使用奈米粒子膠體(諸如膠體導電聚合物、貴金屬奈米粒子或金屬/導電聚合物複合材料膠體)作為試劑供至少預測(若不是檢測)活體外 NCEs、候選藥物或前導化合物之 PK/ADME-Tox 特性的方法被提供。亦被提供的是用來實施本發明之具體例的套組及裝置。

在本發明更為詳細地被描述之前，要被了解的是：本發明不被限定於所描述的某些具體例，當然因此可以變化。也要被了解的是：此處所用的術語只是為了描述某些具體例之用，而且不被意欲為限制性的，因為本發明的範疇僅受到隨附的申請專利範圍所限。

當數值的一範圍被提供時，被了解的是：各個其間的數值，除非上下文另有清楚地指明，至下限單位的十分之一，介於那個範圍的上與下限並且任何其他指定的或在那個指定範圍其間的數值被涵括在本發明中。這些較小範圍的上與下限可獨立地被涵括在較小的範圍內並且也被涵括在本發明中，適用於該指定範圍中任何特定的排除限制。當該指定的範圍包括界限的一或兩者，排除這些被涵括之界限的其一或兩者的範圍亦被包括在本發明中。

此處某些範圍以數字數值(被前置以術語"大約")呈

現。術語"大約"如此處被用來提供有關它在之前的確切數目的字面支持，還有一接近於或大約該術語在之前的數目的數目。在決定一數目是接近於或大約是一特定地被列舉的數目，接近或大約非列舉的數目可以是一個數目，其在它出現的上下文中提供該特定地被列舉之數目的本質同義字。

除非另有定義，此處所使用的所有技術與科學術語具有如同一具有該領域(針對本發明所屬)中的通常技藝者所理解的相同意思。雖然任何類似於或相同於那些此處所描述的方法以及材料可以被用於本發明的實施或測試，代表性例示方法以及材料現在被說明。

在本說明書中所引用的所有公開資料以及專利案被併入此處作為參考資料，如同像是各個獨立的公開資料或專利案被特定地並且獨立地被指名要被併入作為參考資料並且被併入此處作為參考資料以揭示並且描述與該公開資料所引用者相關之方法和/或材料。任何公開資料的引用是有關於在申請日之前的揭露內容並且不應被認為是承認本發明因為先前發明而被認為早於該公開資料。再者，所提供之公開資料的日期可以是不同於實際公開日期，該公開資料的公開日期可能需要被個別地確認。

要被注意的是，如此處以及在隨附申請專利範圍中所用的，除非在上下文中另有清楚地指明，單數形式"一(a)"、"一(an)"，以及"該(the)"包括複數的指示對象(referents)。更要被注意的是，申請專利範圍可能被起草(drafted)以排除

任何選擇要素。就其本身而論，此說明意欲作為有關於使用與申請專利範圍要件的描述的排除術語(諸如"僅僅(solely)"、"僅(only)"以及類似詞)，或使用一"否定(negative)"限制的前置基礎。

一旦閱讀本揭露內容，對於那些習於該技藝者來說是明白的：此處所描述以及說明的各個獨立具體例具有分離的組分以及特徵，它們可不偏離本發明的範疇或精神地從任何其他數個具體例的任一者之特徵被分離或與任何其他數個具體例的任一者之特徵組合。任何列舉的方法可以按照所列舉的事件順序或可以是邏輯上可行的任何其他順序來施行。

如上面所歸納的，本發明提供方法、試劑，套組以及裝置供活體外 NCEs、候選藥物或前導化合物(其可以在此處被整體地意指為"候選化合物")之 PK/ADME-Tox 特性的至少預測(若不是檢測)。就其本身而論，檢測一候選化合物的至少一預定之 PK/ADME-Tox 特性的方法被提供。在本發明及其某些具體例的進一步描述方面，所使用的膠體之代表性實例以及光子特性首先詳細地被回顧，接著在本發明的範疇內討論有關使用該膠體的一代表性製造操作步驟與方法。此外，一個包括該膠體作為試劑的套組以及裝置的回顧以及實施本發明之方法的用途被提供。

導電聚合物、金屬以及金屬/導電聚合物複合材料膠體

如同上面所歸納的，本發明使用導電聚合物、金屬或金屬/導電聚合物複合材料膠體的光子特性來報導(在一活

體外均質分析系統中)一配位子與一結合夥伴(binding partner)的交互作用、一交互作用結構(諸如一膜)，或一電荷或一氧化還原-敏感性奈米粒子，以提供一或一些它的PK/ADME-Tox特徵，亦即，要活體外地預測一候選化合物的一或多個PK/ADME特性。

用在本發明之具體例中的膠體是穩定的。如此處所用的，術語穩定意指膠體的粒子在膠體的載體介質(carrier medium)中維持懸浮的能力，例如，粒子不會由懸浮液沉澱達至任何明顯的程度。膠體用在本發明的方法中的另一方面是它們報導在它們物理環境上的一個改變(透過在它們的光子特性上的一個顯著變化，諸如折射率、電荷或氧化還原電位)。如此處所用的以及為一習於該技藝者所知悉的，術語光子特性意指這些奈米材料吸收或散射紫外光或可見光、發射磷光(phosphorescence)、螢光或發光(luminescence)等等的能力。

因為該膠體可以由導電聚合物、金屬或其複合材料所製成，它們包括一導電聚合物組分、一金屬組分或一金屬組分以及一傳導聚合物組分兩者。當存在時，膠體的金屬組分可以是一貴金屬。感興趣的貴金屬包括，但不限於：週期表的第VIII族金屬，包括但不限於：鉑、銥、鈀以及類似物，還有金、銀等等。

術語"導電聚合物"代表一種導電性聚合材料。在某些具體例中，導電聚合物是有機聚合物，諸如p-或π-綴合的有機聚合物。例如，被採用的可以是聚吡咯，諸如聚吡咯、

聚(N-取代的吡咯)、聚(3-取代的吡咯)，以及聚(3,4-雙取代的吡咯)；聚噻吩，諸如聚噻吩、聚(3-取代的噻吩)、聚(3,4-雙取代的噻吩)，以及聚苯并噻吩；聚異苯并萘吩，諸如聚異苯并萘吩；聚噻吩乙炔，諸如聚噻吩乙炔；聚(p-伸苯乙炔)，諸如聚(p-伸苯乙炔)；聚苯胺，諸如聚苯胺、聚(N-取代的苯胺)、聚(3-取代的苯胺)，以及聚(2,3-雙取代的苯胺)；聚乙炔，諸如聚乙炔；聚聯乙炔，諸如聚聯乙炔；聚薁，諸如聚薁；聚芴，諸如聚芴；聚咔唑，諸如聚咔唑以及聚(N-取代的咔唑)、聚硒吩，諸如聚硒吩；聚呋喃，諸如聚呋喃以及聚苯并呋喃；聚(p-伸苯)，諸如聚(p-伸苯)；聚吲哚，諸如聚吲哚；聚嗒吩，諸如聚嗒吩；聚苝，諸如稠四苯、稠五苯、稠六苯、七苝、二苯并稠五苯、四苯并稠五苯、芘、二苯并芘、蒀、苉、蔻、滌綸(terulenl)、卵苯、quoterylene，與環蒽；衍生物(諸如三苯二吩(triphenodioxazine)、三苯二噻吩(triphenodithiazine)、六氯蒽-6,15-苯醌(hexacene-6,15-quinone))，其藉由將聚苝的某些碳原子取代以諸如 N、S，以及 O 的原子，或一官能基團(諸如羰基基團)；聚合物，諸如聚乙烯咔唑(polyvinylcarbazoles)、聚苯硫(polyphenylenesulfide)，以及聚乙烯硫(polyvinylenesulfide)。在代表性具體例中特別感興趣的是聚吡咯、聚噻吩、聚苯胺或它們的衍生物。

在複合材料膠體中，金屬粒子是表面被包覆以一傳導聚合物並且被懸浮於一液體介質中，包括但不限於一水性介質，如同被描述在公開的美國專利申請案號

20070172834 以及公開的國際申請案號 WO2006047371 (Englebienne and Van Hoonacker, 2006)，其被併入此處以作為參考資料。有關"被包覆的表面"表示該等粒子的表面的至少一部分，若不是該等粒子的整個表面，被覆蓋以一層的傳導聚合物分子。

該等粒子的尺寸可以改變，但是在某些具體例中範圍從大約 1 nm 至大約 1 微米，諸如從大約 1 nm 至大約 100 nm，包括從大約 30 nm 至大約 60 nm。在某些具體例中，粒子具有一窄的粒徑分布。有關窄的粒徑分布被表示粒子的相對標準偏差為平均直徑的 30%或更低，並且在某些具體例中為 20%或更低，例如是 17%或更低，包括 10%或更低。

在某些具體例中，該等粒子被用作為一膠體溶液，或作為一鑄造在一固體基質(諸如玻璃或其他適合的固體材料)上的感測膜(sensing film)。

在某些具體例中，該等粒子展現一受體或一親水性、疏水性或混合的膜，例如在它們的表面特異性地或非特異性地結合至一感興趣的配位子。有關展現被表示該受體或該膜被固定在該粒子的表面上，其中該受體或膜可以是共價地或非共價地被結合至該粒子的表面。造成該粒子表面上的膜之受體分子或分子的密度可以改變，但是範圍從每個粒子大約 2 至大約 50，諸如從大約 5 至大約 25 分子。

如上面所指明的，各種不同類型的受體或膜層可以被展現在膠體的粒子表面上。在某些具體例中，特定受體視

在一預定應用(諸如下面所討論的應用)上至少要被預測或檢測的 PK/ADME-Tox 特性而存在。感興趣的代表性受體包括，但不限於上面所討論的受體，諸如血漿結合蛋白質、細胞色素家族的酵素、親水性或疏水性膜、清潔劑、核酸、肽等等。

膠體的 pH 可以改變，並且在某些具體例中範圍從大約 2 至大約 12，諸如從大約 4.5 至大約 9.0。膠體可包括一些不同於被塗覆以金屬粒子之聚合物的各種不同額外組分，其中感興趣的額外組分包括，但不限於：鹽、緩衝劑、清潔劑、安定劑以及類似物。

製造方法

該膠體可以使用造成本發明的一膠體生成的任何便利之操作程序被製備，例如，如上面所描述的。在一具體例中，一膠體導電聚合物是在一安定劑(諸如像是聚乙烯咯啶酮(poly(vinylpyrrolidone))或乙烯醇(vinylalcohol))的存在下，藉由在一適當單體的一水性酸(aqueous acid)的氧化而被生成。膠體導電聚合物可以藉由層析法在進一步衍生化(derivatization)之前被純化。在另一個具體例中，一貴金屬膠體透過在一適當溫度下，於水中還原一金屬鹽而被製備。有關於製造該等膠體奈米粒子的操作步驟的代表性實例被分別提供在書籍 Immune and Receptor Assays in Theory and Practice (Englebienne, P. (2000) Immune and Receptor Assays in Theory and Practice. CRC Press, Boca Raton, 392pp)在第 243 與 234 頁。在另一個具體例中，一

起始或前驅物金屬膠體以及一水溶性導電聚合物是以一對水溶性導電聚合物來說足以吸收金屬膠體的粒子表面的方式彼此結合並且藉此生成被用於發明中的產物複合材料膠體。有關製造該等安定的複合材料奈米膠體的操作步驟被提供在公開的美國專利申請案號 20070172834 以及公開的國際申請案號 WO2006047371 (Englebienne and Van Hoonacker, 2006)，其被併入此處作為參考資料。

在有關於本發明的某些具體例中，該膠體更展現與感興趣的候選化合物交互作用的一試劑，其中該試劑可以是各種不同的個體(entities)(如上面所指明的)，包括但不限於：受體、酵素、天然或合成的膜、核苷酸、抗體、配位子，或其衍生物，例如用於生物感測(biosensing)之目的。這些被展現的分子可以如同習知般透過電荷吸收(charge adsorption)或藉由共價鍵結而被接附至粒子表面。任何適當的偶合操作步驟可以被採用。

實用性

該膠體，如上面所述的，可以被採用在各種不同意欲預測或推論一候選化合物(例如 NCEs、候選藥物或前導化合物)之 PK/ADME-Tox 特徵的應用中。該等方法可以被用來至少預測(若不檢測的話)一候選化合物的一或多個不同 PK/ADME-Tox 特性。

在某些具體例中，感興趣的特性是吸收。在一化合物可以在組織中展現一藥理學效用之前，它已被攝入血流中-通常經由黏膜表面(類似消化道(腸吸收))。攝入標的器官或

細胞也需要被確認。這在某些像是血腦障壁的天然障壁中可能是一個嚴肅的問題。諸如不良的化合物溶解度、胃中的化學不安定性，以及穿透腸壁的無能的因素全部可以在一藥物經口投藥之後被吸收降低至一程度。吸收關鍵性地決定化合物的生物可利用性。當口服地被攝取時，吸收不良的藥物必須以某些較為非所欲的方式被投藥，像是靜脈內地或透過吸入。

在某些具體例中，感興趣的特性是分布。化合物需要被攜帶到它的效應位址，大多數通常經由血流。從那裡，化合物可以分布入組織與器官，通常至不同程度。

在某些具體例中，該特性為代謝。化合物一旦進入體內就開始崩解。大多數的小分子藥物代謝是在肝臟中透過氧化還原酵素(被稱為細胞色素 P450 酵素)而被施行。當代謝發生，起始(母)化合物被轉化為被稱為代謝物的新化合物。當代謝物是藥理學上惰性，代謝去活化母藥物被投藥的劑量且這通常降低在身體上的效用。代謝物也可以是藥理學上有活性的，有時候更甚於母藥物。

在某些具體例中，該特性是排泄。化合物以及它們的代謝物需要從身體經由排泄被移除，通常經由腎臟(尿液)或在糞便中。除非排泄是完全的，外來物質的累積可以反向地影響正常代謝。

在某些具體例中，感興趣的特性是 p*K*a。一化合物的 p*K*a 數值影響化合物的許多特徵，諸如其反應性，以及光譜特性(顏色)。在生化學中，蛋白質以及胺基酸側鏈的 p*K*a

數值對於酵素的反應性以及蛋白質的安定性來說有關鍵的重要性。這個特性在化學中是普遍重要的，因為一化合物的離子化改變它的物理行為以及巨觀特性(諸如溶解度以及親脂性)。例如，任何化合物的離子化會可以增加水性溶解度，但降低親脂性。這可以在藥物開發中被利用來透過調整一離子基團在一相關 pH 下的 p*K*a 以增加一化合物在血液中的濃度，然而這必須十分小心地被完成，因為一離子化的化合物將較差地穿透過細胞膜。

在某些具體例中，該特性是毒性。毒性是某物為毒性或有毒的程度的測量。毒性可意指在一整個生物體上的效用，諸如一人類，或對一次結構，諸如一細胞(細胞毒性)或一器官(器官毒性)(諸如肝臟(肝毒性)。

在有關於本發明的某些具體例中，該膠體可以被用篩選一含有此一用於結合至一血漿蛋白質之配位子的樣品、與一天然或合成的膜交互作用，或一酵素(諸如細胞色素 P450 家族的成員)、一細胞膜通道(諸如 ATP-結合卡匣運輸蛋白的一個成員，諸如多重抗藥性蛋白-1 等等)，其中這些受體被展現在奈米粒子上。在其他具體例中，以一清潔劑被安定在一適當 pH 的奈米粒子可以與含有該配位子的樣品接觸以檢測它的電荷或氧化還原電位。該等奈米粒子也可以在它們的表面展現與配位子形成一共價加成物的分子。在某些具體例中，感興趣的配位子可以加入與另一個配位子競爭結合一受體、一酵素等等。

在該等應用中，一體積的膠體或一固定的膠體量鑄造

在一固體撐體上，例如一為裸露的或包括對於配位子為專一性的一受體或一酵素之膠體，一天然的或合成的膜分別地與要被篩選的樣品接觸，以及該膠體的一光學參數被監視以偵測交互作用開始後其中的一個變化，例如於一預定波長下在膠體的吸收上的一個變化。任何習知的光學參數可以在此步驟中被評估或監視，其中代表性參數包括，但不限於：吸收、散射、螢光、發光以及類似者。光學參數可以使用任何習知裝置以及操作步驟而被監視，其中適當的操作步驟對於那些習於該技藝者來說是熟知的且代表性操作步驟在下面實驗段被更為詳細地描述。

一個在光學參數上的變化的存在或不存在接著被用來作出一個該感興趣的配位子是否與一受體交互作用、與另一個配位子競爭一個受體，或奈米粒子以及至何種程度的決定。

透過參考一對照組，例如，得自於使用一對照組已知藥物(已廣泛地由藥學科學家所研究且其 PK/ADME-Tox 特徵已在文獻中被公開)之相同系統的數據，分析的結果是有關於特定 PK/ADME-Tox 特徵(諸如 logP、logD、電荷、氧化還原電位、分布體積、細胞或血腦障壁穿透、代謝轉變以及可能的毒性等等)。在某些具體例中，一經計算的參數，例如配位子對於一受體的親和力，可以從光學結果被獲得並且吾人可以從任何習知方程式(諸如那些現有對於習於該技藝者來說已知者)直接地計算 PK/ADME-Tox 參數。

一化合物的*pKa*允許吾人根據下列關係式計算其在一預定pH下被離子化的百分率(例如，在不同的身體器中諸如血液、十二指腸(duodenum)、迴腸(ileum)等等)：

$$\%\text{離子化的} = 100\frac{1}{1+10^{\pm(pH-pKa)}}$$

其中指數符號(exponent sign)對於鹼為+且對於酸-。

相同地，一分子的被離子化的物種之log分布係數(D)，其於pH 7.4下與清除(clearance, C_L)直接地相關聯，可以根據謝樂關係式(Scherrer's relationship)從辛醇/水分離係數(*Po/w*)以及*pKa*被計算出：

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

對於單質子酸來說，雖然對於單質子鹼指數被寫成*pKa*-pH。在更為複雜的情況下，其中一多質子分子涉入，上面方程式的第二項變成：

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

當一奈米粒子被一膜或一細胞層所圍繞，來自一分子與該奈米粒子交互作用的訊號(在時間期間通過該層)是直接地相關於該藥物的轉移率(transfer rate)(dQ/dt)並且因此允許計算一穿過組織的表關穿透性係數(P_{app})。

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

其中A是該層表面積且C_0起始濃度。這個關係式進一步允許近似在組織中未結合的藥物之部分(fu_T)。相同地，親和力常數(K_A)(其決定一分子對血清蛋白質(諸如白蛋白與α1-酸糖蛋白)之n獨立性結合位址的結合)允許吾人

計算在血漿中未結合之藥物的部分(fu_P)：

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

依序，Oie-Tozer 方程式更允許吾人提供在穩態下分布體積的推測(idea)(V_{DSS})：

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

V_P 以及 V_E 血漿與細胞外流量容量(fluid volumes)(分別 0.0436 以及 0.151 L/Kg 體重)，$R_{E/I}$ 是血管外相對於血管內蛋白質的比率(視為 1.4)且 V_R 是藥物被分佈的物理體積減去細胞外空間(0.380 L/Kg 體重)。

一分子與細胞色素 P450 同功酶(isozyme)的交互作用等溫線提供一對應於其內生性清除(CL_{int})的 V_{max}/K_m 比率的近似值，其進一步容許吾人逼近總清除(CL_{tot})(其等同於 CL_{int} 除以 fu_T 的產物)。這些相配的關係最後允許吾人推論出某些藥物動力學參數，諸如在口服投藥之後的半衰期($t_{1/2}$)：

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

在最廣的意思中，該等方法可以是定性或定量。就其本身而論，當偵測為定量，該等方法提供一種要被分析的存在於樣品中之標的配位子是否與該奈米粒子交互作用的解釋(reading)或評估，例如評估(assessment)。在又其他的具體例中，該等方法提供一種要被分析的存在於樣品中之標的配位子是否呈漸增濃度地與該等膠體交互作用的定量偵測，亦即，一種要被分析之存在於樣品中的標的配位子

與一固定數量的膠體交互作用的評估(evaluation)或評估(assessment)。在該等具體例中，定量偵測可以是絕對的，或相對的(若要被研究的參數是已知的或已被其他方法所評估)。就其本身而論，術語"量化(quantifying)"當被使用在量化一參數(諸如一標的配位子在一樣品中的親和力)的上下文時，可以意指絕對或相對的定量。絕對定量可以透過包括在分析中配位子的已知濃度並且分析結合等溫線而被達成。另擇地，相對定量可以透過比較由標的配位子以及由參考配位子(全部與相同的膠體交互作用)所產生的光學訊號以提供兩個或多個不同配位子的各者一相對定量，例如相對於彼此。

該等方法可以被採用來偵測一或多個標的配位子與該膠體在各種不同類型的樣品中的交互作用，包括複雜樣品(包括有機溶劑混合以一水溶液，諸如二甲基亞碸、二甲基甲醯胺、乙醇或甲醇以及類似物)，其中該等方法提供用於偵測具有高敏感度之標的配位子交互作用。

本發明的方法可被用來偵測一廣泛不同的配位子與奈米粒子的交互作用。感興趣的配位子可以是一種有機或無機分子，包括無機或有機鹽、蛋白類分子(proteinacious molecules)(諸如但不限於蛋白類配位子，包括肽以及蛋白質及其片段)，還有核酸以及其他種類的配位子，其中該等配位子可以是一個單一分子、一個複合物(包括二或多個分子次單位，其可以是或可以不是共價地彼此結合)、一微生物(例如病毒或單細胞病原菌、一細胞、一多細胞生物或其

部分，以及類似者)。

此外，該等方法也可以被用來篩選有關調節一預定特異性結合成員對(specific binding member pair)的交互作用之化合物。術語調節(modulating)包括降低(例如抑制)以及增強兩分子間的交互作用。例如，當該膠體展現一結合對的一第一成員而膠體在一候選試劑的存在下被接觸以該第二成員，該候選試劑針對結合成員對的交互作用的效用可以被評估(evaluated)或評估(assessed)。

各種不同的配位子以及候選試劑可以透過上面的方法被篩選。這些配位子以及候選試劑含括許多化學種類，包括但不限於有機分子(諸如具有一分子量超過 50 並且少於大約 2,500 道耳吞的有機化合物)。配位子以及候選試劑包含有與蛋白質或其他受體(被奈米粒子所展現的)的結構性交互作用所需之官能基，特別地氫或疏水性鍵結，並且可包括至少一胺、羰基、醯基、一鹵素、羥基或羧基基團，諸如至少兩個官能化學基團。該等配位子以及候選試劑通常包含有環狀碳(cyclical carbon)或雜環結構和/或芳族或聚芳族結構被取代以一或多個上面的官能基團。配位子以及候選試劑在生物分子中被發現包括肽、醣、脂肪酸、類固醇、嘌呤、嘧啶、衍生物、結構類似物或其組合。

配位子以及候選試劑得自於一廣泛多樣的來源，包括合成的或天然化合物的存庫。例如，許多方法是可用於一廣泛不同有機化合物以及生物分子之隨機或指引的合成，包括隨機化的寡核苷以及寡肽的表現。另擇地，呈細菌、

真菌、植物以及動物萃取物的天然化合物的存庫是可得到的或易於被製造。此外，天然的或合成地被生成的存庫以及化合物是易於透過習知化合、物理以及生化手段而被修飾，並且可以被用來製造組合式存庫。已知的藥劑可以經過指引的或隨機化學修飾，諸如醯化、烷化、酯化、醯胺化等等以生成結構類似物。

在某些具體例中，該等方法呈一高通量(HT)形式被施行。在該發明的 HT 具體例中，複數的不同化合物同時地被測試。有關同時地被測試是表示多數化合物的各者在基本上相同時間之時被測試。因此，至少某些，不是全部的複數化合物被平行地分析它們的效用。被同時地測試之複數化合物的數目可以是 5 或更多，諸如 10 或更多，其中在某些具體例中數目可以是 100 或更多或 1000 或更多，其中被測試的化合物的數目可以是更高。在 HT 具體例中被同時地測試的化合物可以從範圍 10 至 10,000，諸如從 100 至 10,000 並且包括從 1000 至 5000。一裝置可具有像是要被測試之化合物般多的容器，例如 5 或更多、10 或更多、100 或更多、1000 或更多、5000 或更多、10,000 或更多等等。在某些具體例中感興趣的是 96 井平盤、384 井平盤 1536 井平盤等等。用於檢測候選試劑之活性的各種不同的高通量篩選分析在該技藝中是已知的並且容易地適用於本發明，包括那些被描述在已發證的美國專利案號 6,127,133；其揭示內容被併入此處以作為參考資料。

在上面篩選分析中被鑑定的試劑用在各種不同的方法

中，包括調節該標的配位子在一預定受體的活性之方法，以及有關於其活性的條件。

該等方法可以被用來預測或檢測一候選化合物的(例如 NCEs、候選藥物或前導化合物)可活性作為一有潛力的暢銷治療劑。如上面所討論的，可接受的 pK/ADME-Tox 特徵可以促進一候選化合物的治療效用。為了檢測一候選化合物具有可接受的 pK/ADME-Tox 特徵，本發明的方法可以被施行以獲得對應於感興趣之特性的結果，諸如但不限於 p*K*a、吸收、分布、代謝、排泄以及毒性。這些結果可以與一對照組數值相比較。在某些具體例中，對照組數值是一個使用一根據本發明之分析用於具有已知 pK/ADME-Tox 特性之已知化合物而被獲得的數值。在某些具體例中，對照組數值可以是相同於或基本上相同於一已知化學化合物(具有可接受的 pK/ADME-Tox 特徵)的對應數值。在某些具體例中，對照組數值可以相同或基本上相同於兩或多種已知化學化合物(具有可接受的 pK/ADME-Tox 特徵)的對應數值的平均。如此處所用的，術語"基本上相同"或"基本上類似的"意指相等於另一個在一數值的指明範圍中的數值之數值，例如±40%，包括±20%，諸如±10%或±5%。

在某些例子中，從本方法所獲得之有關於一候選化合物的結果可以與對照組數值相比較一感興趣的特性，如上面所述。若從本方法所獲得的結果本質上是相同的，亦即，落在數值的一特定範圍之內，例如±40%，包括±20%，諸

如±10%或±5%，如同對照組數值，所以該候選化合物具有一有關感興趣之特性的可接受數值。若該候選化合物具有一有關感興趣之特性的可接受數值，那麼很有可能該候選化合物作為一要是可行之潛在銷售的治療劑。上面由本方法所得到的結果與對照組數值的比較可以針對一或多個感興趣的特性而被施行。有關於一或多個感興趣之特性的可接受數值表示該候選化合物適於進一步的測試，諸如但不限於進一步的活體外研究、動物的活體內研究，或人類臨床試驗。就其本身而論，某些具體例更包括檢測一候選化合物是否具有一可接受的數值，以及若是，實施一或多個後續的測試，例如更進一步的活體外研究、動物的活體內研究，或人類臨床試驗。

相反地，若從本方法所獲得的結果本質上不是相同於對照組數值，所以該候選化合物不具有有關感興趣之特性的一可接受數值。若該候選化合物不具有有關感興趣之特性的一可接受數值，那麼這可能指明該候選化合物較無可能作為一要是可行之潛在銷售的治療劑。有關於一或多個感興趣之特性的無法接受數值表示該候選化合物不適合進一步的測試。一決定接著可以被作出不要進一步來測試該化合物。

套組&系統

如上面所歸納的，亦被提供的是供用於實施本方法的套組以及系統。該套組以及系統至少包括該呈液體或固體形式的膠體，或其組分，如上面所述的。該等套組以及系

統也可以包括一些用在該方法中的選擇性組分。感興趣的選擇性組分包括緩衝劑，以及類似物。

在該等套組的某些具體例中，該等套組將進一步包括用於實施本方法或用於獲得同一者之裝置的操作指南(例如指引使用者至一提供操作指南之網頁的網站 URL)，其中這些操作指南可以被印刷在一基質(substrate)上，該基質可以是下列的一或多者：一包裝插頁、該包裝、試劑容器以及類似物。在該等套組中，一或多個組分可以存在於相同或不同的容器中，如同可以是方便的或所企求的。

裝置

亦被提供的是用在實施該方法(尤其是其 HT 具體例)的高通量(HT)裝置。該等高通量裝置可以具有任何習知的型態，並且一般來說包括複數個兩個或多個分析可以發生的流體容器元件，試劑施用元件以及訊號偵測元件。例如，本發明的 HT 裝置可包括一片具有複數含有流體的井(wells)(例如 96、384、1536 等等)、回應電腦之用於添加試劑(例如，候選試劑)至井之添加試劑儀器、用於測量至少一屬性(attribute)(例如由井所含有之樣品以及膠體的光學特性)的測量儀器，以及回應電腦之用於先將該等井的一者與添加試劑組分排列，接著與測量裝置排列的移動裝置，如同進一步被描述在美國專利案號 6,468,736 以及 5,989,835 中；其整體內容被併入此處以作為參考資料。本發明的 HT 裝置包括至少一含有一如上述之含有奈米粒子膠體的流體容器元件。

下面的實例將以說明的方式而非限制的方式被提供。

【實施方式】

實施例 1

一具有一平均直徑為 40 nm 的金奈米粒子的溶液藉由在 1 升錐形瓶(Erlenmeyer)中將 200 mg 的四氯金酸(III)(Hydrogen tetrachloroaurate (III))(Acros 22362-0010)溶解於 500 ml 的蒸餾水。一磁棒被加入且容器被置放在一磁攪拌器上。該溶液被加熱至沸騰並且被劇烈地攪拌。當沸騰之時，30 ml 的 1%檸檬酸鈉(藉由中和一 1%檸檬酸-無水，sigma C-0759 而被製備)被快速地注入容器中。沸騰以及攪拌被持續直到溶液逐漸地轉成黑色並且接著暗紅色，表示奈米粒子的形成。該溶液接著被冷卻至室溫。該溶液的特徵為於 524 nm 的一個吸收吸收帶以及一為 4 的光密度(1 cm)。

一 10 ml 部分的膠體金溶液接著被倒入一具有一磁攪拌棒的燒杯並且在磁性攪拌下使用 10 mM 氫氧化鈉被逐漸地中和至 pH 6.5。一牛血清白蛋白的水溶液(脫脂 BSA，Equitech Inc.，750 mg/ml，2ml)在磁性攪拌下被快速地加入。該混合物被允許於室溫下在 10 分鐘期間反應並且接著藉由加入 228 mg 的十水四硼酸鈉(sodium tetraborate decahydrate)(Fluka 72000)而被緩衝。pH 被調整至 9±0.1 且該溶液被貯存於一棕色玻璃瓶且被用作為在其表面展現白蛋白受體的膠體。在藥學研究中 BSA 經常取代人類血清白蛋白，因為兩種蛋白質對於藥物展現出一個非常類似的行

為。

茶鹼(theophylline)(Fluka 88308)的溶液(100 mM)以及膽紅素(bilirubin)(Aldrich R750972)被製備在二甲基亞碸(DMSO, Fluka 41640)中。這些溶液接著在硼酸鹽緩衝液 pH 9 (50 mM，含有 10 mM 硫酸鎂)中被稀釋 100 倍藉以產生 1 mM 的緩衝液(含有 1% DMSO)。這些溶液接著在相同的硼酸鹽緩衝液(含有 1% DMSO)中被連續稀釋以生成較低濃度的配位子樣品。

這些配位子溶液(30 μl)還有一空白溶液(具有 1% DMSO 但缺乏配位子的緩衝液)接著被二重複地吸取到一個 96 井平盤中。硼酸鹽緩衝液(具有 50 mM pH 9 的 120 μl，含有 10 mM 硫酸鎂以及 40g/l 聚(乙二醇) 6,000 – Fluka 81260)接著連同 50 μl 的 BSA-金膠體綴合物被加入。平盤內含物被充分地混合並且於室溫下在 4 小時的期間被培育。個別井於 525 nm 的光學密度接而在一 Spectramax Plus plate reader (Molecular Devices)中被讀取。空白溶液的 O.D. 從各個結果被減去。個別的 O.D.相對於配位子濃度被作圖以產生被個別地顯示於第 1 圖(茶鹼)以及第 2 圖(膽紅素)中的結合等溫線。在各圖中，O.D.訊號被顯示為二重複的平均± s.d.。第 2 圖更顯示兩個個別實驗的結果。

被顯示於第 1 圖中的結合等溫線允許吾人估算茶鹼對 BSA 的親和力為每莫耳 $5.1.10^4$ 升具有一為 0.82 的 r^2。相同地，展現在第 2 圖中的結合等溫線允許吾人估算膽紅素對 BSA 的親和力為每莫耳 $1.2.10^8$ 升具有一為 0.73 的 r^2。

這兩個配位子實例因為它們對白蛋白的差異性結合親和力而被選定。膽紅素是白蛋白之單一最為被研究的配位子，它被估計以一每莫耳 $9.5.10^7$ 升的平均親和力結合(Peeters, T.Jr. (1996) All about Albumin. Academic Press, San Diego, 432pp p.97)。相反地，茶鹼被白蛋白以一非常低的親和力被結合，其使得前者要被接近 100%被結合至血清白蛋白，雖然只有 56±4%的後者被血漿中的蛋白質所結合(Goodman and Gillman (1996) The Pharmacological Basis of Therapeutics, 9th ed. (Hardman, J.G. et al. eds). McGraw-Hill, New York)。從本技術所獲得之茶鹼的親和力，可以推論在血漿中被結合的部分(0.558，它非常接近於如上面所給已知實驗上被獲得的 0.56 平均值)並且因此其藉由使用公開之方程式(Lombardo, F., Shalaeva, M.Y. et al. (2000) ElogPoct: A tool for lipophilicity determination in drug discovery. J. Med. Chem. 43, 2922-2928)的分布體積。透過將這些數據引入該等方程式，一為每 kg 0.551 升之有關於人類的茶鹼分布體積被獲得，其落入實驗上所觀察到之每 kg 0.50±0.16 升的範圍中(Goodman and Gillman，1996，上文)。一藥物的分布體積是一個重要參數，允許進一步計算有一預定劑量在藥物動力學的曲線(AUC)下的面積。

實施例 2

膠體聚(苯胺)如下面被獲得：1 為 10g 部分的聚乙烯醇盡可能地被溶解在 200 ml 沸水中。熱的溶液接著被過濾並

且被冷卻至室溫。該溶液繼而藉由添加 16.8 ml 的 HCl 12N 而被酸化。此溶液的一部分(100 ml)被轉移到一具有一磁棒的乾淨燒杯，該燒杯於 4℃下被置放在一磁攪拌器上。該溶液被攪拌且 0.25 ml 的苯胺(Aldrich 24,861-4)被注入。在注入之後，被新鮮地溶解在 5 ml 水中的 658 mg 過氧二硫酸銨(ammonium peroxidisulfate)(Aldrich 24,861-4)立刻被加入。該溶液於 4℃下在攪拌被維持歷時 48 小時。該膠體接著藉由層析法在一 Sephacryl S-1000 管柱中被洗提以 0.1 M 磷酸鹽緩衝液 pH 8 (含有 0.5%的 tween 20)而被純化。

經緩衝的溶液接著以 HCl 或 NaOH 被滴定並且一光譜於在滴定期間所紀錄的各個 pH 值被取得(Ultrospec 2000, Pharmacia)。在這個 pH 範圍內對應於苯胺綠鹼(emeraldine base)(800 nm)形成的波峰的吸光值允許鑑定出磷酸陰離子的 pKa (理論的：7.21；從曲線所計算的：6.80)。這在第 3 圖中被說明。

因此，如同由此實施例所顯示的，該分析系統可以被用來測量分子(包括候選藥物)的 pKa，它是在藥物動力學上具有一明顯效用的一種參數(吸收以及膜穿透)。

實施例 3

一膠體金溶液如上面在實施例 1 中所述的被製備。該膠體接著如上述被塗覆以人類血清白蛋白(HSA, Sigma A-1653)，除了該金膠體被設定在 pH 5.5。該試劑接著被緩衝以如上的 50mM 硼酸鹽以及 150mM 氯化鈉，Tween 20 (0.2%)以及魚膠(Fish gelatin)(0.1%)被個別地加入供進一步

的安定化。

地谷新(digoxin)(Fluka 37100)被溶解在甲醇(100 mg/升，128 μM)中並且更被稀釋於 PBS 中以產生樣品溶液(分別含有 256、128、64、25.8 以及 12.8 nM)。這些樣品(30 μl)被混和以一加速緩衝液(accelerating buffer)(120 μl; 200 mM Tris-HCl pH 8 含有 250 mM 氯化鎂，70g/l 聚(乙二醇) 6000、15g/l 聚(乙二醇) 35,000 以及 Triton X-100 10ml/l)。混合以及反應於一臨床化學分析儀(恆溫在 37℃)在拋棄式比色管中被實施(Cobas Mira Plus, ABX Diagnostics, Montpellier, France)。在樣品以及緩衝液混合之後，金-HSA 綴合物(50μl)立刻被加入該反應混合物中。締合動力學在 600 nm 接續著並且在數分鐘之後，一 500 倍過量的地谷新(20 μl)被注入該反應混合物且解離於相同波長下在自動化儀器中被接續。結果被展現於第 4 圖中以及箭頭表示配位子過量加入的時間。有關締合與解離曲線兩者之經計算的線性回歸被提供以介於 0.86 以及 0.99 的相關係數。

締合以及解離動力學的分析允許計算藥物-HSA 交互作用的平均親和力為每莫耳 $1.6\pm2.5.10^5$ 升(五個分析的平均值± s.d.)。藉由透析而被檢測之有關人類血清白蛋白之地谷新的表觀親和力為每莫耳 $1.85.10^5$ 升(Westphal, U. (1986) Steroid-Protein Interactions II. Springer-Verlag, Berlin, 603pp)。

實施例 4

一由金奈米粒子以及聚(o-胺苯甲酸(poly(o-anthranilic

acid)))所製成的複合膠體如公開的美國專利申請案號 20070172834 以及公開的國際申請案號 WO2006047371 (Englebienne and Van Hoonacker, 2006，其被併入此處以作為參考資料)中所廣泛地描述的被製備。

該複合溶液藉由加入 50 mM 的醋酸鈉而被緩衝在 pH 5。複合溶液(0.5 ml)接著於室溫下在 10 分鐘的期間與一由 3%醋酸所構成並且含有漸增濃度之抗壞血酸的水溶液反應。一空白組藉由混合相同體積的膠體以及配於水中的 3% 醋酸而被製備。在培育之後，抗壞血酸樣品相對於空白組於 600 nm 在光學密度上的變化被紀錄並且相對於抗壞血酸濃度作圖以產生一標準曲線。該等結果被展現於第 5 圖中。抗壞血酸是一種強的還原劑並且一類似的，但相反的曲線可以使用一強的氧化劑而被產生，因為膠體對氧化-還原的敏銳敏感度。因此，一預定候選藥物的氧化還原電位可以藉由允許其於一預定 pH 以及濃度下與膠體的反應，並且藉由比較其光學反應性相對那個已知氧化劑或還原劑(諸如被顯示在第 5 圖中的實例)所具有者而被評估。作為一實例，分子 Trolox® (6-羥基-2,5,7,8-四甲基 -2-羧酸)、一水溶性維生素 E 衍生物，當在相同條件下被測試時展現出一氧化還原電位類似於抗壞血酸(它完全符合被公開的數據)。

如同在國際公開案號 WO03027656 中進一步描述的(其在此所引用者作為參考資料)，一 NCE、候選藥物或前導的氧化還原電位是依各重要參數，其可以是一當決定該

分子是否更需要進一步被開發。再者，雖然一還原劑藥物可能展現有益的治療效用，一氧化劑可能是具有毒性的(Shargel, L. and Yu, A.B.C. (1999) Applied Biopharmaceutics and Pharmacokinetics, 4th ED. McGraw-Hill, New York, 768pp)。一藥物的氧化還原電位水準更決定其代謝的類型以及快速性並且今後調節其藥物動力學圖形。

實施例 5

一系列已知藥物對牛血清白蛋白的親和力根據在實施例 1 中所提供的操作步驟被分析。這些藥物對蛋白質是不良的結合劑(乙醯胺苯酚(Paracetamol)以及醋醯水楊酸(Acetylsalicylic acid))、中等結合劑(紅黴素(Erythromycin)、茶鹼(Theophyllin)、氯苯那敏(Chlorpheniramine))，或一高結合劑(水楊酸(Salicylate))。有關各個結合對之經計算的親和力常數的 log 接著在一圖上相對於活體內結合至血漿蛋白質(從已公開數據所獲得的(Goodman and Gillman，1996，上文))的百分率作圖。非線性最小平方回歸提供具有足夠重要性的平方相關係數(r^2 = 0.95)以允許有信心推論從如同活體外所獲得的白蛋白親和力而來之一預定樣品的活體外血漿蛋白質結合數據。血漿蛋白質結合的藥物的部分進一步允許吾人計算其分布體積，其對於描述一藥物的藥物動力學來說是一種必要的參數。第 6 圖顯示得自於本實施例的 6 個藥物(縱座標)之數據的表觀分布體積，與得自於從活體內藥物動力學的分布

體積(橫座標，Goodman and Gillman，1996，上文)的回歸與相關函數。

實施例 6

一在它們的表面展現人類血清白蛋白(HSA, Sigma A-1653)之含有奈米粒子的金膠體如在實施例 3 中所描述的被製備。地谷新(Fluka 37100)被溶解在甲醇(100 mg/升，128 μM)中並且更被稀釋於 PBS 中以產生樣品溶液(分別含有 12.8、6.4、2.5，以及 1.25 μM)。這些樣品以及一 PBS 空白組(100 μl)被分別地置放在已標示的拋棄式塑膠試管(已加入加速緩衝液(600 μl; 200 mM Tris-HCl pH 8 含有 250 mM 氯化鎂，70g/l 聚(乙二醇) 6000、15g/l 聚(乙二醇) 35,000 以及 Triton X-100 10ml/l)與金-HSA 綴合物(200μl))中。在震盪-混合之後，試管於室溫下被培育歷時 10 分鐘。在培育之後，於 540 nm 的光學密度在一分光光度計(Ultrospec 2000, Pharmacia)(空白組被歸零)被紀錄。各個樣品在光學密度上的增加接著相對於濃度被作圖。該圖被顯示於第 7 圖中。從計算自兩個獨立實驗的結合等溫線，一具有 $7.5\pm2.3.10^5$ 的平均表觀親和力被獲得。透過透析而被決定之地谷新對人類血清白蛋白的表觀親和力為每莫耳 $1.85.10^5$ 升(Westphal，1986，上文)。

實施例 7

藥物的連續稀釋於室溫下在 3 小時期間被二重複地培育以帶有人類血清白蛋白在它們表面的膠體金奈米粒子。源自於藥物-蛋白質交互作用的 UV-可見光訊號相對於被

加入的濃度作圖且表觀親和力常數從結合等溫線被計算出。第 8 圖顯示此一結合等溫線的一實例。第 9 圖顯示 6 種已知藥物的分析再現性：呋塞米(furosemide)、吲哚美辛(indomethacine)、伊布洛芬(ibuprofen)、苯唑西林(oxacilline)、咪帕明(imipramine)，以及奈普生(naproxen)。該等藥物被隨機地分配在三個分開的平盤中。親和力數據與來自參考文獻的數據比較。第 10 圖顯示利用此技術所觀察到的表觀親和力以及從參考文獻而來的表觀親和力數據的相關性(實驗的或計算自%血清蛋白質結合)。破折號線表示相同。

實施例 8

藥物的連續稀釋於室溫下在 2 小時期間被二重複地培育以在它們表面帶有人類血清類粘蛋白(orosomucoid)(α1-酸糖蛋白)的膠體金奈米粒子。源自於藥物-蛋白質交互作用的 UV-可見光訊號相對於被加入的濃度作圖且表觀親和力常數從結合等溫線被計算出。第 11 圖顯示維拉帕米(verapamil)以及紅黴素的結合等溫線的實例。第 12 圖顯示 19 個已知藥物所觀察到與那些得自於參考文獻者的分析再現性與表觀親和力的相關性。19 個已知藥物為阿米替林(amitryptiline)、氯苯那敏(chlorpheniramine)、氯丙(chlorpromazine)、地昔帕明(desipramine)、鹽酸二苯胺明(diphenylhydramine HCl)、紅黴素(erythromycine)、氟哌啶醇(haloperidol)、吲哚美辛(indomethacin)、咪帕明(imipramine)、丁二苯吡唑二酮(phenylbutazone)、吲哚洛爾

(pindolol)、哌唑 (prazosin)、普賴蘇濃(prednisolone)、普萘洛爾(propranolol)、奎寧定(quinidine)、筒箭毒鹼(tubocurarine)、丙戊酸(valproate)、維拉帕米(verapamil)，以及殺鼠靈(warfarin)。

實施例 9

一具有 40 nm 膠體金奈米粒子的溶液如同在實施例 1 中所述的被製備。所獲得的膠體奈米粒子(pH 4.76)接著被塗覆以 11-巰基十一烷酸(11-mercaptoundecanoic acid)(95%, Aldrich 450561)如下：100 mL 的膠體金溶液被混合以 0.4 mL 的一 1:10 Tween 20 (Aldrich 274238)水溶液並且被允許於室溫下在磁性攪拌下培育歷時 20 分鐘。11-巰基十一烷酸的一 1 mg/mL 溶液被製備於乙醇中。2 百微升(0.2 ml; 200 μg)的此溶液在 9.8 mL 乙醇中被稀釋並且在磁性攪拌下被混合以膠體。混合物接著於室溫下被培育歷時 2.5 小時。這個操作步驟提供奈米粒子，其以一由一疏水性烷鏈所製成的膜(透過硫醇被接附至粒子並且透過巰基十一烷酸的羧基基團於外側被終止)所完全穩定，藉此模擬一生理學雙層膜。該溶液的最終 pH (5.09)近似那個在人類十二指腸。此奈米粒子溶液接著被 1:4 地稀釋於水中且 0.198mL 使用一 Tecan Freedom EVO pipetor 被吸入聚苯乙烯 96 井平盤。相同的自動機接著被用來將 2μL 的已知藥物溶液(配於 DMSO (10 mM)中)三重複地分配。空白組井也被製備含有 DMSO。該等溶液被混合應且於室溫下被培育歷時 1 小時。藥物與膜的交互作用由 LSPR 位移(LSPR shift)於 530 nm 下

被紀錄。該等數據被平均並且空白組 OD 因為單獨 DMSO 而被減去。一相關性經由 Caco-2 細胞層(cell layers)以藥物之表觀穿透率的 log (n = 44; r^2=0.58; p<0.005)被發現。第 13 圖顯示已知藥物在 LSPR 訊號以及 Caco-2 穿透率常數(參考文獻數據)間所得到的相關性。一相關性(n = 57; r^2=0.78)被觀察到介於在人類活體內被吸收之藥物的百分率部分以及 LSPR 訊號(對應於與由人造膜所圍繞之金奈米粒子交互作用之藥物交互作用的程度)。第 14 圖顯示已知藥物在 LSPR 訊號以及腸道中被吸收之%部分所得到的相關性。

實施例 10

已知藥物的氧化還原電位被分析。已知藥物在一預定最終濃度(100 μM)於 pH 4 下被引入一導電聚合物(聚[苯胺-2-羧酸]，PANI-COOH)的緩衝溶液中。溶液被混合並且於室溫下被培育(10 分鐘)。光學密度於 450 nm 被讀取。含有藥物以及酞酸緩衝液的一樣品空白組以相同方式被製備，培育以及讀取。空白組溶液的 OD 450 nm 從導電聚合物反應混合物的 OD 450 nm 被減去。第 15 圖顯示 PANI-COOH 在與已知化合物反應後的 450 nm 訊號以及它們個別的還原電位(參考文獻數據)間的相關性。一線性關係在 450 nm 訊號以及已知分子的還原電位間被觀察到(第 15 圖)，其允許推論 NCEs 的還原電位

篩選具有 60 個已知藥物的存庫允許鑑定溴麥角隱亭(bromocriptine)為一個相對強的氧化劑(E = -364 mV)，哌唑

哄以及氯磺丙哄(chlorpropamide)為相對強的還原劑(E = 747 以及 848 mV)，與參考文獻數據一致(Wardman P. (1989) Reduction potentials of one-electron couples involving free radicals in aqueous solution. J. Phys. Chem. Ref. Data 18, 1637-1755)。雖然一還原劑藥物可展現有益的治療效用，一氧化劑可能是具有毒性的。一藥物的氧化還原電位水準也進一步決定其代謝的類型以及快速性且今後調節其藥物動力學圖形(Shargel and Yu，1999，上文)。

實施例 11

一金奈米粒子的溶液如同實施例 1 中所描述的被製備。具有 pH 2-12 的一系列 50mM 緩衝液接著被製備(磷酸鹽[pH 2、3、6、7、8]、醋酸[pH 4 與 5]以及硼酸鹽[pH 9、10、11、12])，其被進一步以金膠體溶液稀釋 5 倍。所得到的 10 mM 緩衝膠體的最終 pH 繼而被紀錄。藥物溶液(10 µl，100 mM 配於 DMSO 中)接著被吸取到 1 mL 的緩衝膠體中且混合物被震盪-混合。在培育 30 分鐘之後，該等溶液被吸取至 96-井聚苯乙烯平盤且於 620 nm 與 525 nm 的 O.D.被紀錄。O.D. 620 nm/O.D. 525 nm 被算出。此比例有關於膠體的凝集(agglutination)(亦即，比例越高，凝集越多)。典型地，一分子的離子化產生可能促進膠體凝集的電荷。因此，以緩衝金膠體滴定一分子超過一 pH 的範圍可允許吾人從 S 形曲線(繪自於凝集的對未凝集的膠體作為一 pH 的函數)的截距中點(interpolated mid-point)來檢測離子化常數。此一滴定曲線的實例(奎寧定)被顯示於第 16

圖。下面的表 1 比較得自於本方法的 pKa 結果與參考文獻的參考數值。第 17 圖顯示膠體金的所測量到以及所預期的 pKa 間的相關性(n =7; r^2=0.89)。

表 1. 比較得自於 1 mM 藥物的膠體金 pH 滴定所得到之 pKa 數值與 Williams, D.A. and Lemke, T.L. (2002) pKa values for some drugs and miscellaneous organic acids and bases. In: Foye's Principles of Medicinal Chemistry, 5th Edition, Lippincott, Williams and Wilkins, Philadelphia, PA, pp. 1070-1079 的參考數據

藥物	觀察到的 pKa	參考文獻的 pKa
阿司匹靈	3.3	3.5
氨苯碸 (Dapsone)	3.9	2.4
多西環素 (Doxycycline)	4.3 (1)	3.4 (1)
	8.7 (2)	9.3 (2)
紅黴素	6.9	8.8
吲哚美辛	5.1	4.5
萘夫西林 (Nafcillin)	3.0	2.7
乙醯胺苯酚	9.5	9.4
奎寧定	7.4	8.5

如同這些數據顯示，被描述在本實施例中的方法允許吾人檢測藥物在一 pH 範圍中的 pKa。與參考數值的差異

是因為 DMSO 存在於本技術中(Bordwell, F.G. (1988) Equilibrium acidities in dimethyl sulfoxide solution. Acc. Chem. Res. 21, 456-463)。

從上面討論以及結果，本發明明顯提供一重要的新類型分析，用在各種不同供藥物開發過程中，NCEs、候選藥物以及前導化合物的快速高通量檢測 PK/ADME-Tox 特徵的應用。例如，使用該膠體在藥物開發以及發展應用上提供一個超過目前使用中的放射性、層析以及質譜技術(涉及將結合從游離部分的一個物理分離)，因為膠體導電聚合物、膠體金屬以及其複合材料可以被應用在均質"混合以及讀取"分析。該等分析可以在各種不同儀器中被實施並且對於具有此技藝中的通常技術者來說，許多光子偵測系統明顯是可以被使用的。本發明的分析系統用在 NCEs、候選藥物以及前導化合物的活體外 PK/ADME-Tox 篩選的許多方面，諸如結合至血漿蛋白質、膜交互作用、對代謝酵素的活性、疏水性、電荷交互作用、氧化還原電位，以列舉一些代表性應用。以其本身而論，該發明對該技藝代表一個明顯的貢獻。

雖然上述發明已藉由描述以及實施例的方式來詳細地說明供清楚了解，對於那些具有該技藝中的通常技術者來說根據本發明教示的某些變化以及修飾可以在不偏離隨附申請專利範圍的精神以及範疇的情況下對其作出。

因此，前面僅僅描述本發明的原則。將被理解的是：那些習於本技藝者將設計出不同排列(其雖然在此處未被

清楚地描述或顯示)、實施本發明的原則並且被包括在其精神以及範疇之內。再者，此處所描述的全部實施例以及條件語言主要地被意欲來協助讀者了解發明人所提供的本發明的原則以及概念以促進該技藝，並且要被推論為對於該等被特別描述的實施例以及條件來說不是限定的。在者，此處所有陳述本發明之原則、方面以及具體例的說明還有其特定實施例被意欲涵括其結構性以及功能性等效物。除此之外，該等等效物意欲包括目前已知的等效物以及在將來被發展的等效物，意即，任何實施相同功能(無關乎結構)而被發展的元件。因此，本發明的範疇不被意欲為限定此處所顯示與描述的示範性具體例。更確切地說，本發明的範疇以及精神是透過隨附的申請專利範圍而被體現。

【圖式簡單說明】

第 1 圖顯示茶鹼與一 BSA-金膠體綴合物的結合等溫線。

第 2 圖顯示膽紅素與一 BSA-金膠體綴合物的結合等溫線。

第 3 圖顯示磷酸鹽緩衝的聚(苯胺)的滴定曲線。

第 4 圖顯示 hSA-地谷新的締合與解離的動力學。

第 5 圖顯示抗壞血酸標準曲線。

第 6 圖顯示有關乙醯胺苯酚、醋醯水楊酸、紅黴素、茶鹼、氯苯那敏以及水楊酸所得到的表觀分布體積與得自於從活體內藥物動力學的分布體積間的回歸與相關函數。

第 7 圖顯示地谷新與一 HAS-金膠體綴合物的結合等溫線。

第 8 圖顯示戊硫代巴比妥(thiopental)與一 HAS-金膠體綴合物的結合等溫線。

第 9 圖顯示 6 種已知藥物的 HSA-金膠體綴合物分析再現性：呋塞米、吲哚美辛、伊布洛芬、苯唑西林、咪帕明，以及奈普生。

第 10 圖顯示以 HAS-金膠體綴合物分析所觀察到的表觀親和力以及從參考文獻而來的表觀親和力數據的相關性(實驗的或計算自%血清蛋白質結合)。破折號線表示相同。

第 11 圖顯示維拉帕米以及紅黴素與一人類血清類粘蛋白(α1-酸糖蛋白)金膠體綴合物的結合等溫線。

第 12 圖顯示阿米替林、氯苯那敏、氯丙　、地昔帕明、鹽酸二苯胺明、紅黴素、氟哌啶醇、吲哚美辛、咪帕明、丁二苯吡唑二酮、吲哚洛爾、哌唑　、普賴蘇濃、普萘洛爾、奎寧定、筒箭毒鹼、丙戊酸、維拉帕米，以及殺鼠靈所觀察到的人類血清類粘蛋白(α1-酸糖蛋白)金膠體綴合物分析再現性與表觀親和力的相關性。

第 13 圖顯示已知藥物在 LSPR 訊號以及 Caco-2 穿透率常數(參考文獻數據)間所得到的相關性。

第 14 圖顯示已知藥物在 LSPR 訊號以及腸道中被吸收之%部分所得到的相關性。

第 15 圖顯示 PANI-COOH 在與已知化合物反應後的 450 nm 訊號以及它們個別的還原電位(參考文獻數據)間的

相關性。

第 16 圖顯示奎寧定與一膠體金的滴定曲線。

第 17 圖顯示膠體金的所測量到以及所預期的 pKa 數值間的相關性(n =7; r^2=0.89)。

【主要元件符號說明】

無。

五、中文發明摘要：

提供使用膠體導電聚合物、貴金屬奈米粒子或穩定金屬/導電聚合物複合膠體作為試劑供至少活體外預測(若不是檢測)新化學品(NCEs)的 PK/ADME-tox 特性的方法。亦提供其應用之包括本發明方法以及試劑的套組。這些有關於本發明之方法以及試劑的突出特性在於它們所涉及的反應是均質的、快速的，以及如同"混合以及讀取"過程被進行的事實。

六、英文發明摘要：

Methods using colloidal conductive polymers, noble metal nanoparticles or of stable metal/conductive polymer composite colloids as reagents for at least the in vitro prediction of, if not the determination of, PK/ADME-tox properties of new chemical entities (NCEs) are provided. Also provided are kits that include the subject methods and reagents for application thereof. The salient characteristics of these methods and reagents pertaining to the present invention reside in the fact that the reactions in which they are involved are homogeneous, rapid, and proceed as "mix and read" processes.

十、申請專利範圍：

1. 一種活體外檢測一候選化合物之一被預測的活體內生物特性的方法，該方法包含有：
   (a) 令該候選化合物與一奈米粒子膠體接觸；
   (b) 偵測與該候選化合物接觸的奈米粒子膠體的一光學特性；以及
   (c) 從該被偵測的光學特性檢測該候選化合物的一被預測的活體內生物特性。
2. 如申請專利範圍第 1 項的方法，其中該生物特性是一 ADME/TOX 特性。
3. 如申請專利範圍第 2 項的方法，其中該 ADME/TOX 特性是吸收。
4. 如申請專利範圍第 2 項的方法，其中該 ADME/TOX 特性是分布。
5. 如申請專利範圍第 2 項的方法，其中該 ADME/TOX 特性是代謝。
6. 如申請專利範圍第 2 項的方法，其中該 ADME/TOX 特性是排泄。
7. 如申請專利範圍第 2 項的方法，其中該 ADME/TOX 特性是毒性。
8. 如申請專利範圍第 1 項的方法，其中該生物特性為一氧化還原電位。
9. 如申請專利範圍第 1 項的方法，其中該奈米粒子膠體包含有一導電聚合體膠體。

10. 如申請專利範圍第 1 項的方法，其中該奈米粒子膠體包含有一貴金屬膠體。

11. 如申請專利範圍第 1 項的方法，其中該奈米粒子膠體包含有金屬/導電聚合物複合膠體。

12. 如申請專利範圍第 1 項的方法，其中該奈米粒子膠體更包含有一與該候選化合物交互作用的試劑。

13. 如申請專利範圍第 12 項的方法，其中該試劑特異性地結合至該候選化合物。

14. 如申請專利範圍第 12 項的方法，其中該試劑是一肽或一蛋白質。

15. 如申請專利範圍第 12 項的方法，其中該試劑是一酵素。

16. 如申請專利範圍第 12 項的方法，其中該試劑是一受體。

17. 如申請專利範圍第 12 項的方法，其中該試劑是一膜。

18. 如申請專利範圍第 12 項的方法，其中該試劑共價地鍵結至該候選化合物。

19. 如申請專利範圍第 1 項的方法，其中該奈米粒子膠體包含有一清潔劑。

20. 如申請專利範圍第 1 項的方法，其中該光學特性是光吸收。

21. 如申請專利範圍第 1 項的方法，其中該方法更包含有將該被偵測的光學特性與一對照組相比較。

22. 如申請專利範圍第 1 項的方法，其中該奈米粒子膠體包含有一特異性地結合至該候選化合物的試劑，且該方法更包含有：

(i) 製備該候選化合物結合至該試劑的一結合等溫線；以及

(ii) 從該結合等溫線估算該候選化合物對該試劑的結合親和力。

23. 如申請專利範圍第 1 項的方法，其中該方法更包含有檢測該候選化合物的 pKa。

24. 如申請專利範圍第 1 項的方法，其中該奈米粒子膠體包含有一特異性地結合至該候選化合物的試劑，且該方法更包含有：

(i) 令該奈米粒子膠體與一第一濃度的該候選化合物接觸以檢測締合動力學；以及

(ii) 令該奈米粒子膠體與一第二濃度的該候選化合物接觸以檢測解離動力學。

25. 如申請專利範圍第 1 項的方法，其中該方法包含有令該候選化合物在複數不同的濃度以及 pH 數值下與該奈米粒子膠體接觸以獲得該候選化合物的一氧化還原電位。

26. 如申請專利範圍第 1 項的方法，其中該方法更包含有檢測至少一額外候選化合物的一被預測之生物特性。

27. 如申請專利範圍第 26 項的方法，其中該方法包含有在實質上相同之時檢測至少 10 個不同候選化合物的一被預測之生物特性。

28. 如申請專利範圍第 27 項的方法，其中該方法在一高通量篩選裝置中被執行。

29. 如申請專利範圍第 1 項的方法，其中該奈米粒子膠體是

與一固體基質締合。

30. 如申請專利範圍第 1 項的方法，其中該奈米粒子膠體不是與一固體撐體締合。

31. 一種裝置，包含有：

一包含有一奈米粒子膠體的容器；

一與該容器偶合的光學偵測器；以及

一被設定藉由該光學偵測器從該容器所得到的一光學訊號來檢測一候選化合物的一被預測之生物特性的處理器。

32. 如申請專利範圍第 31 項的裝置，其中該裝置含有至少 10 個不同的容器，各個含有奈米粒子膠體。

33. 如申請專利範圍第 32 項的裝置，其中該裝置是一高通量篩選裝置。

34. 一種用於檢測一候選化合物之一被預測的生物特性的套組，該套組包含有：

奈米膠體；以及

用於依據申請專利範圍第 1 項的方法來使用該膠體的操作指南。

十一、圖式：

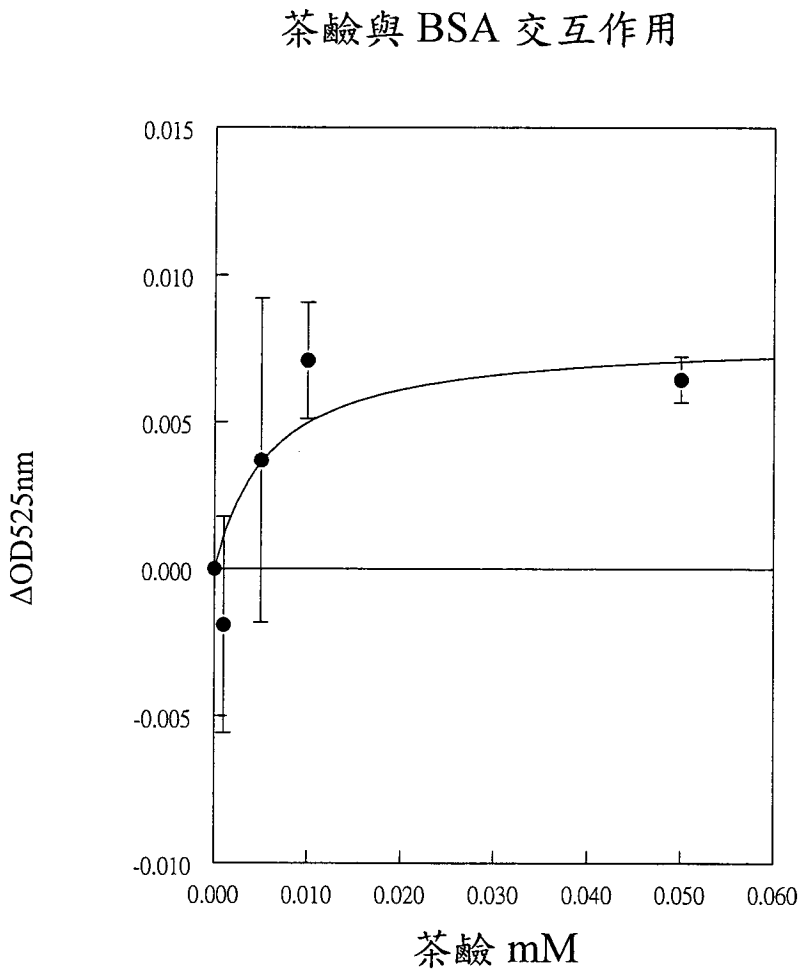

茶鹼與 BSA 交互作用
ΔOD525nm
0.015
0.010
0.005
0.000
-0.005
-0.010
0.000
0.010
0.020
0.030
0.040
0.050
0.060
茶鹼 mM

圖 1

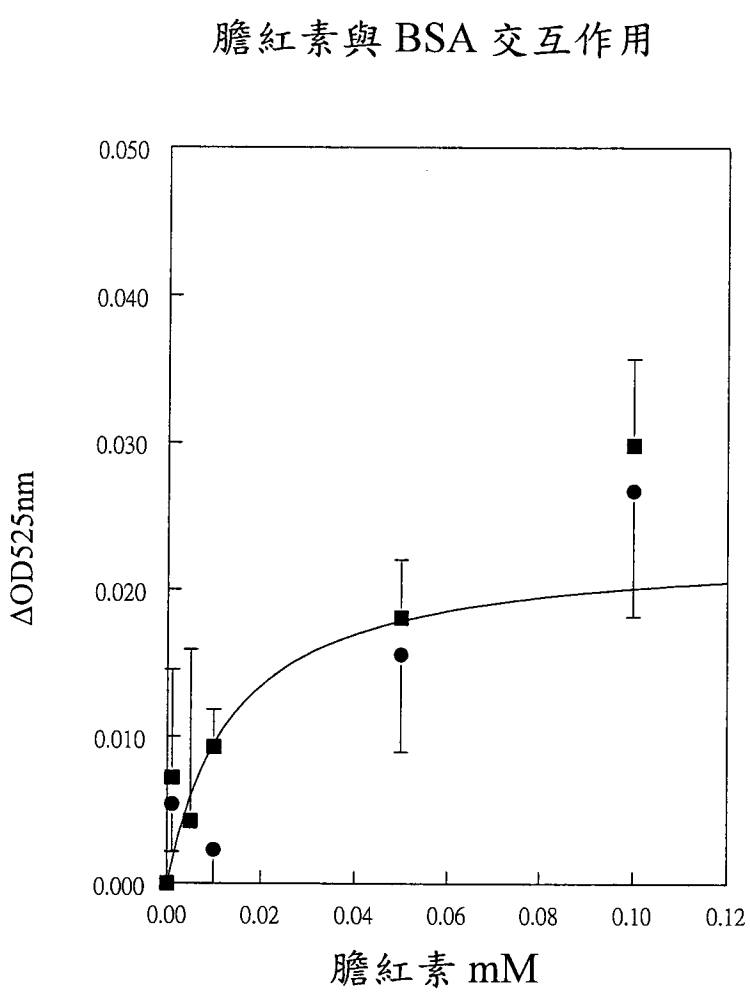

膽紅素與 BSA 交互作用
0.050
0.040
0.030
0.020
0.010
0.000
ΔOD525nm
0.00
0.02
0.04
0.06
0.08
0.10
0.12
膽紅素 mM

圖 2

磷酸鹽緩衝的聚(苯胺)的滴定

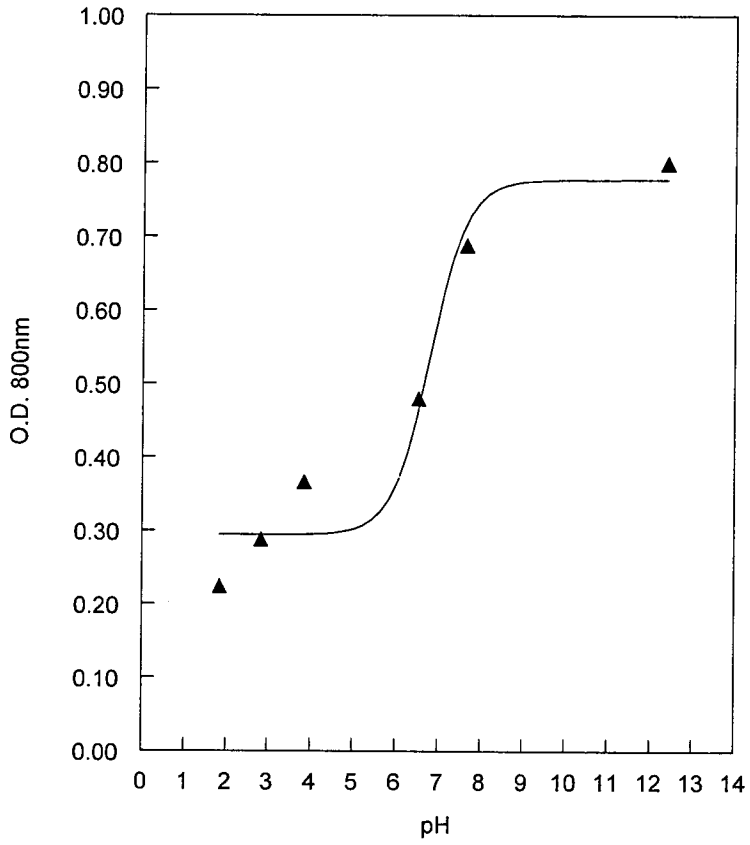


圖 3

hSA-地谷新的締合與解離的動力學

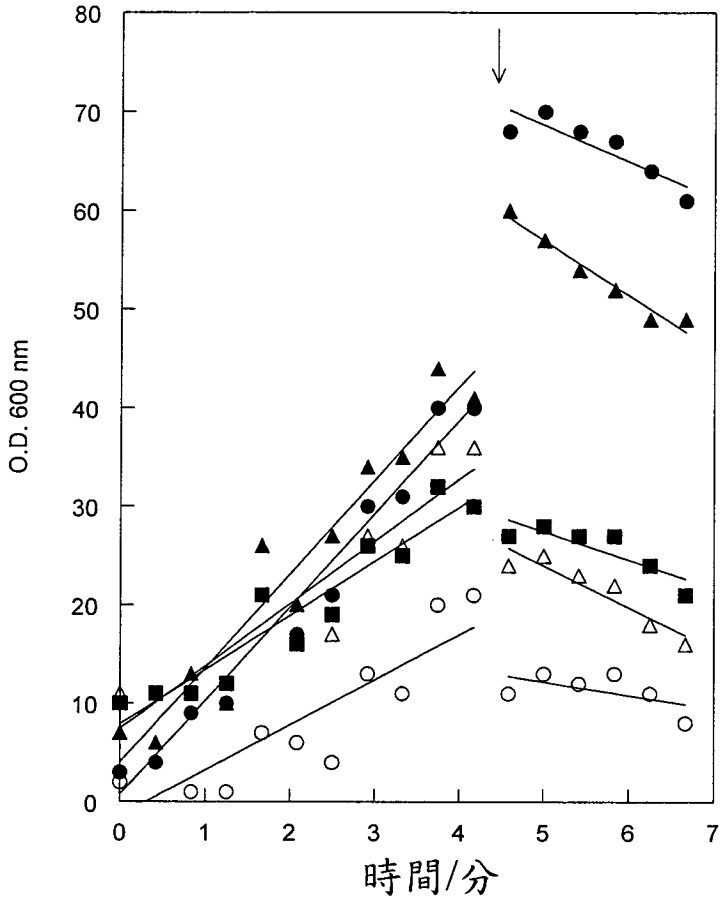


圖 4

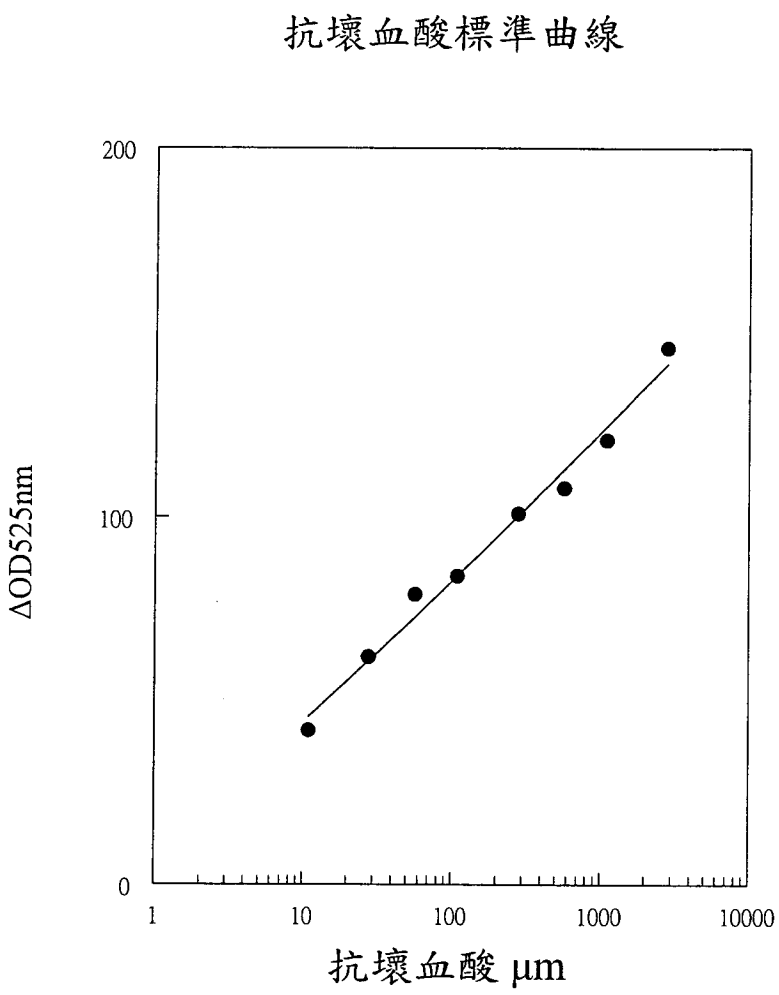


圖 5

分布體積

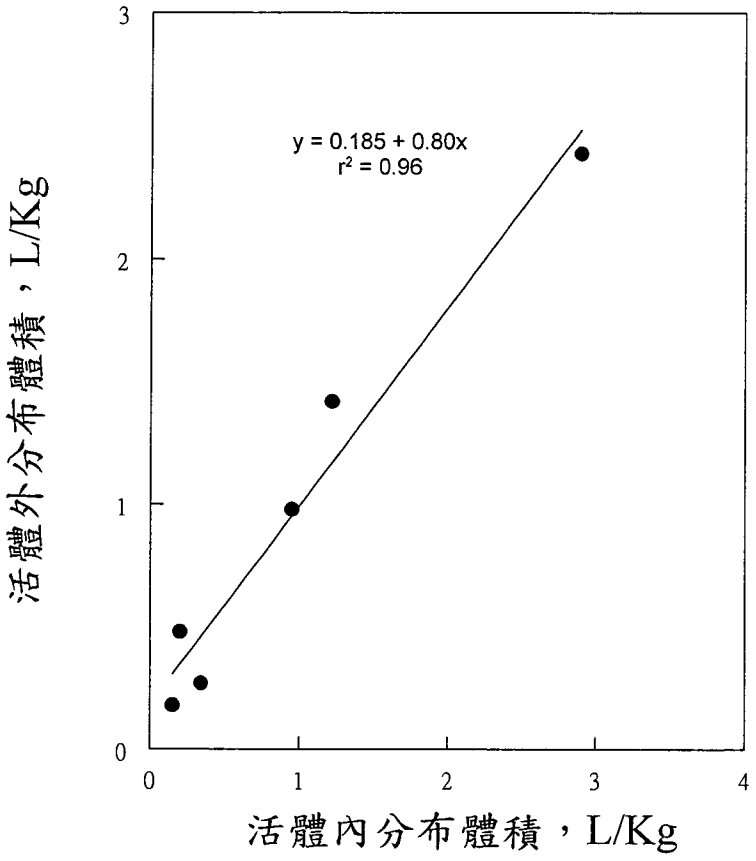


圖 6

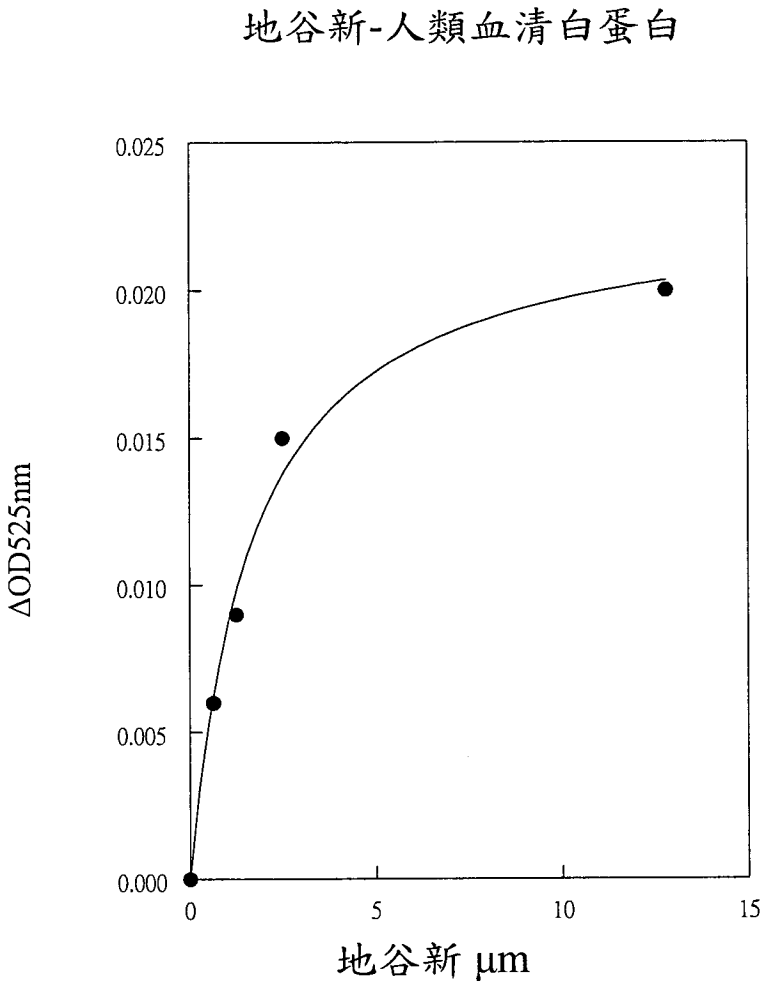

地谷新-人類血清白蛋白
0.025
0.020
0.015
0.010
0.005
0.000
ΔOD525nm
0
5
10
15
地谷新 μm

圖 7

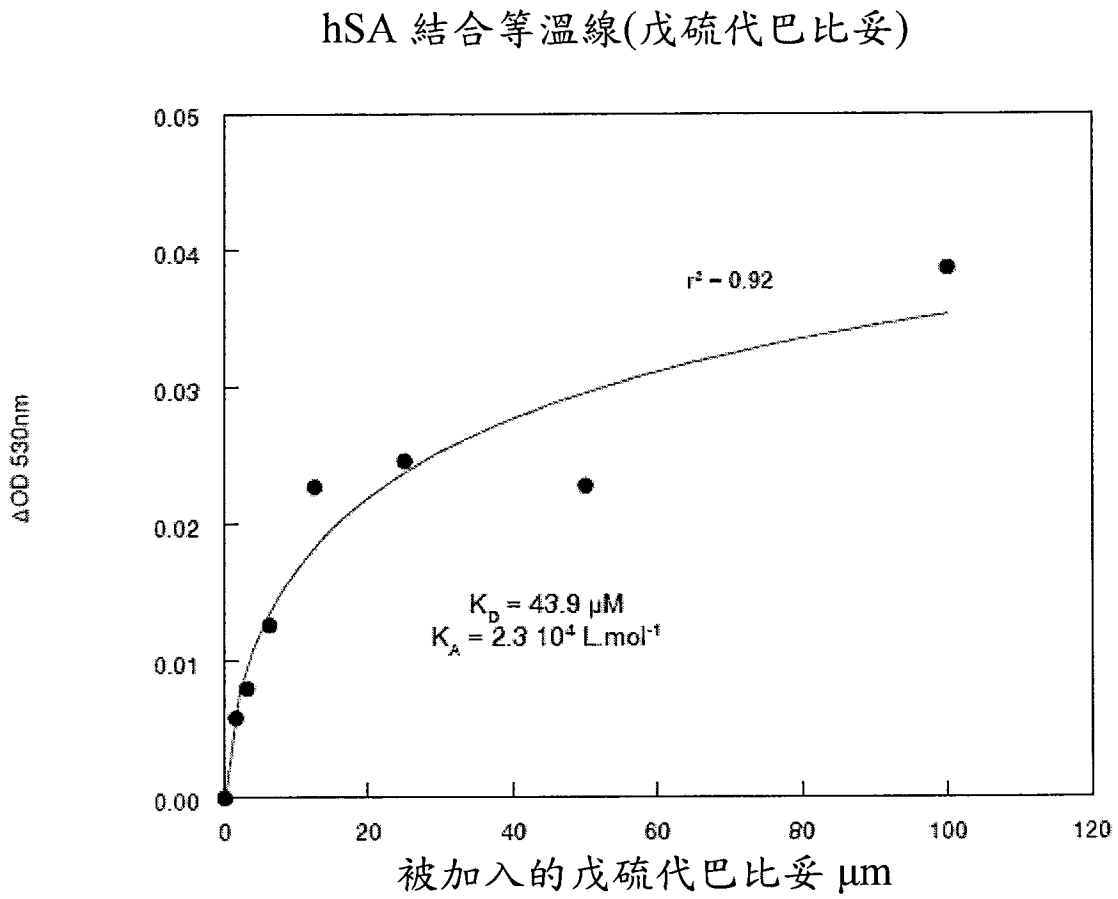

hSA 結合等溫線(戊硫代巴比妥)
ΔOD 530nm
0.05
0.04
0.03
0.02
0.01
0.00
r² = 0.92
K_D = 43.9 μM
K_A = 2.3 10⁴ L.mol⁻¹
0
20
40
60
80
100
120
被加入的戊硫代巴比妥 μm

圖 8

分析再現性

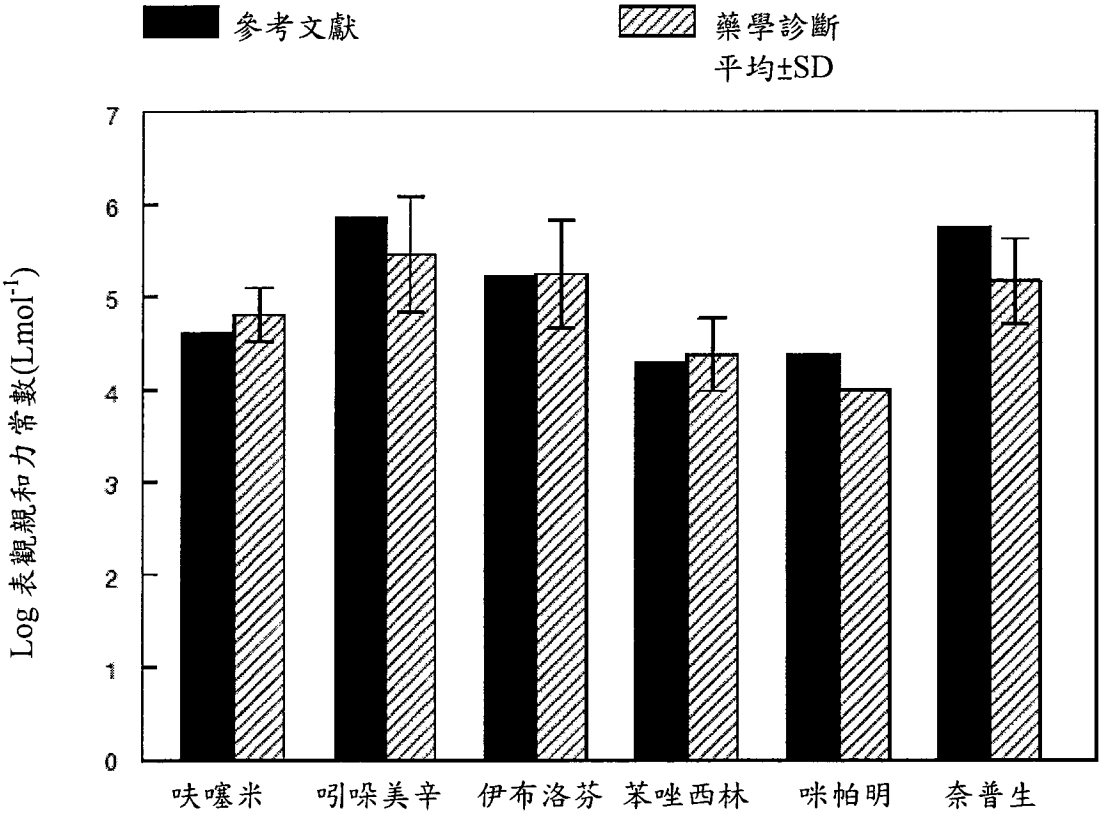

參考文獻
藥學診斷
平均±SD
Log 表觀親和力常數(Lmol-1)
0
1
2
3
4
5
6
7
呋噻米
吲哚美辛
伊布洛芬
苯唑西林
咪帕明
奈普生

圖 9

觀察到的以及期望的表觀新和力的相關性(log)

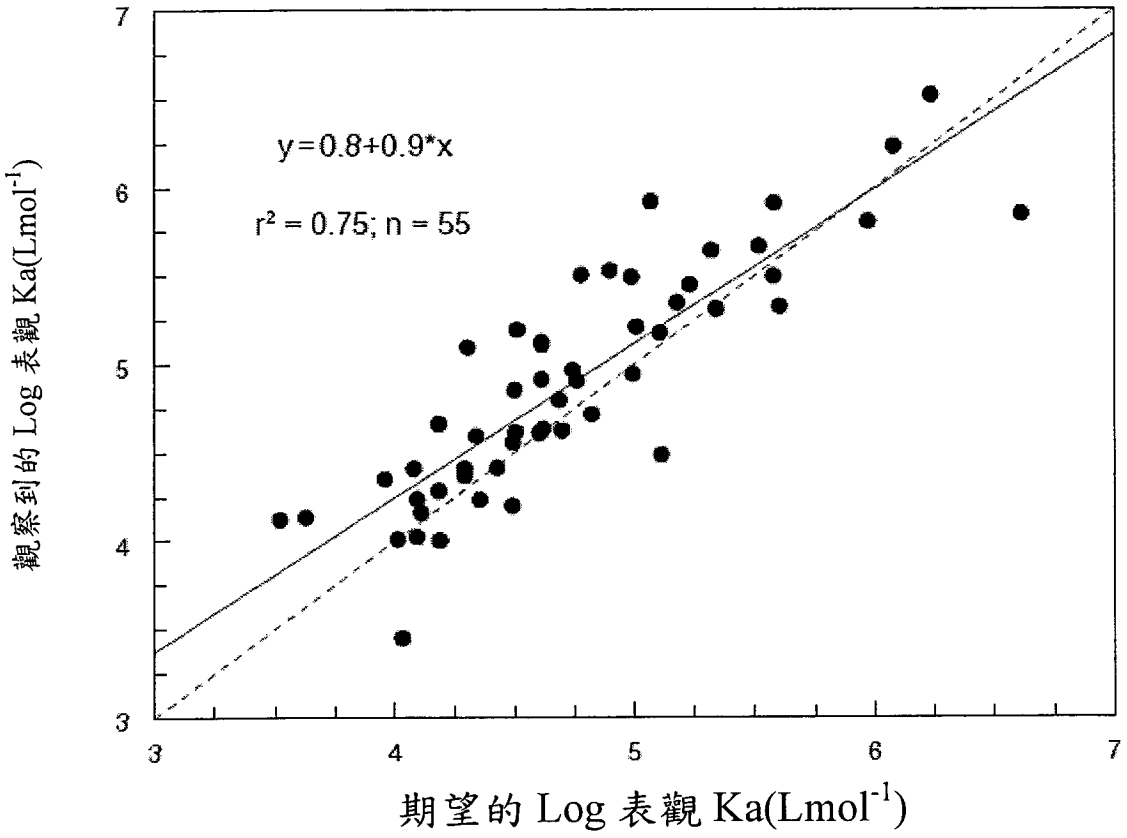


圖 10

血清類粘蛋白結合等溫線(維拉帕米以及紅黴素)

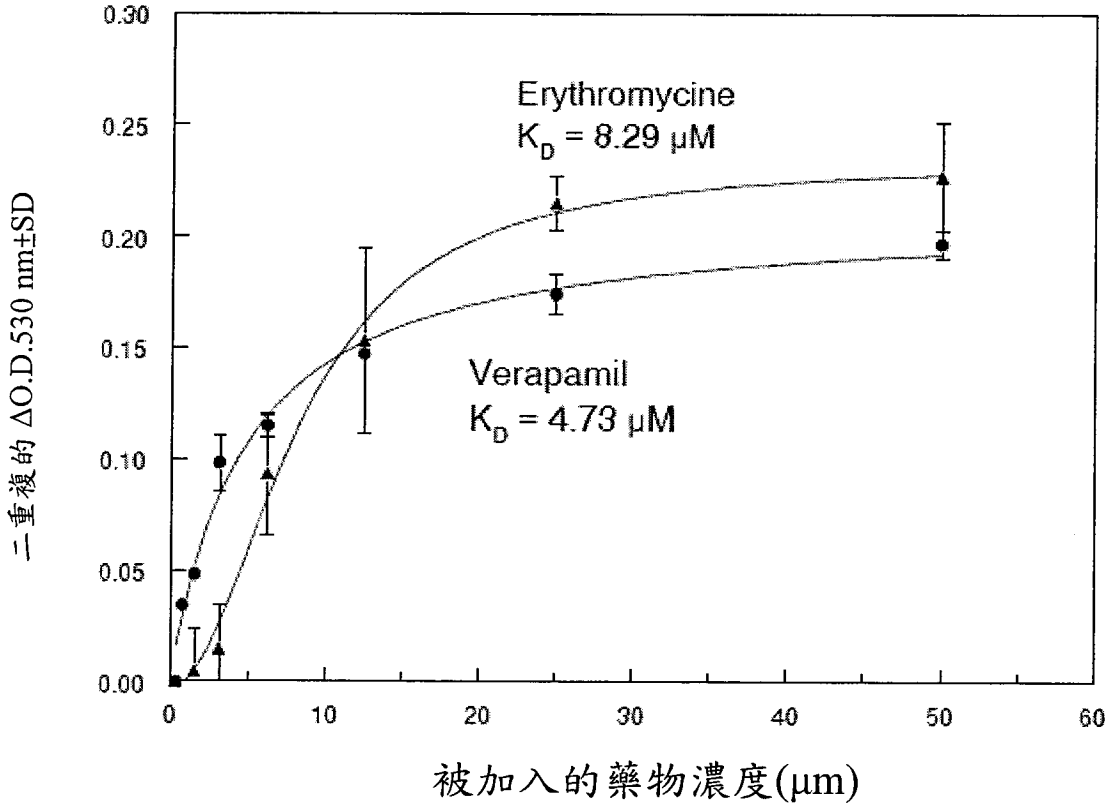


圖 11

血清類粘蛋白與參考文獻數據相關性以及再現性

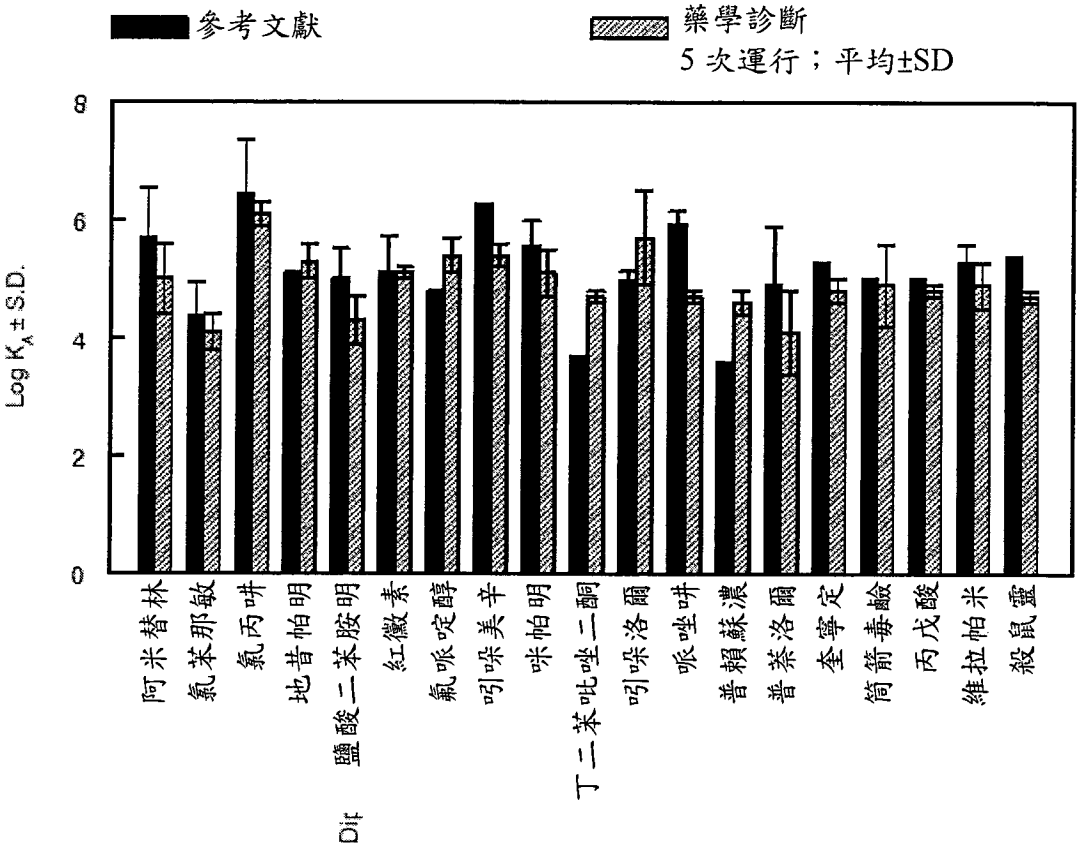


圖 12

已知藥物的 LSPR 訊號以及 Caco-2 穿透率常數

(參考文獻數據)間的相關性

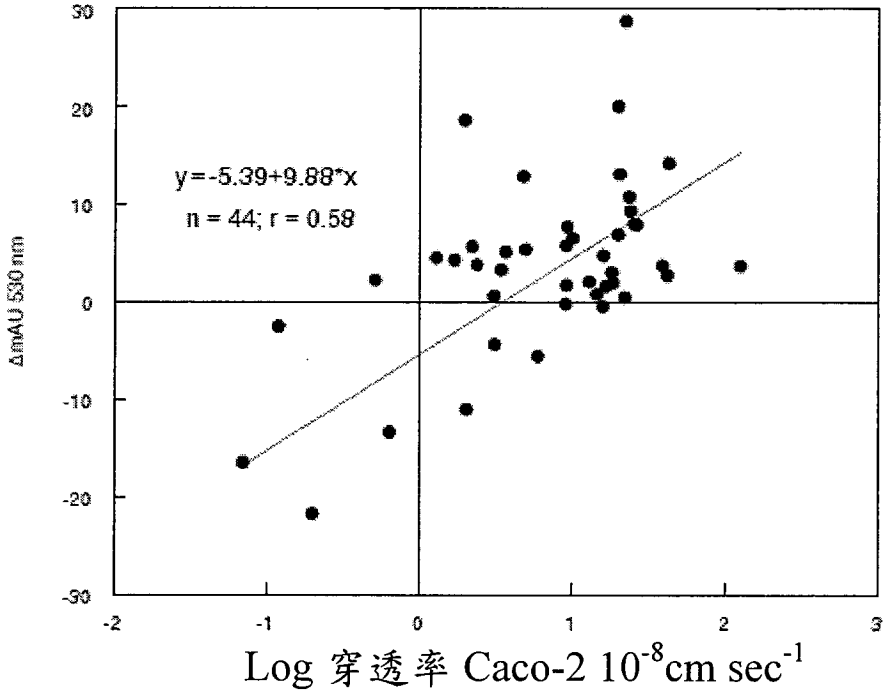


圖 13

已知藥物的 LSPR 訊號以及徑口服投藥所吸引之

百分率部分(參考文獻數據)間的相關性

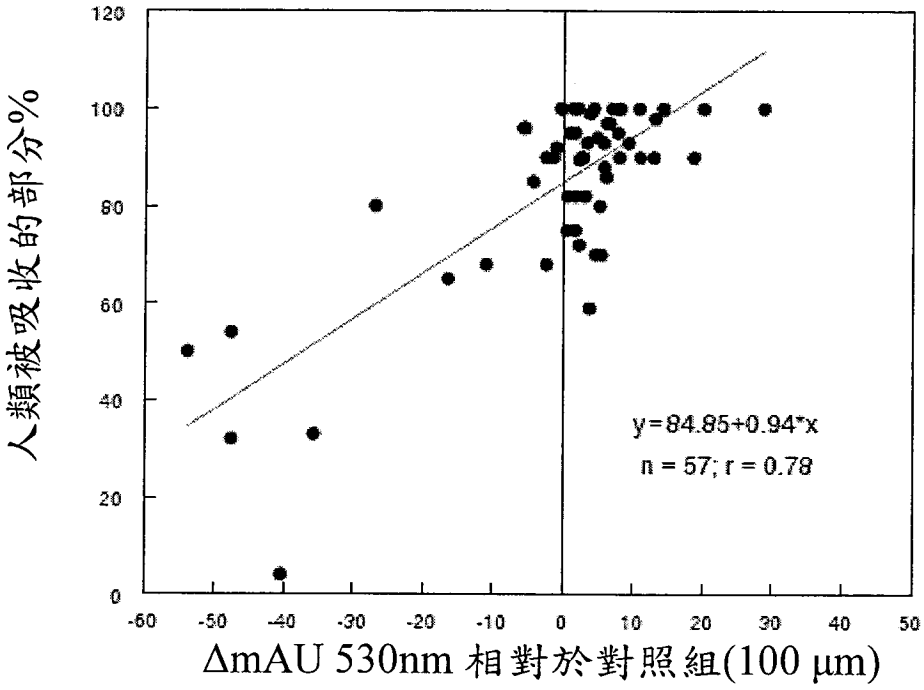


圖 14

使用 Pani-COOH 的氧化還原電位分析

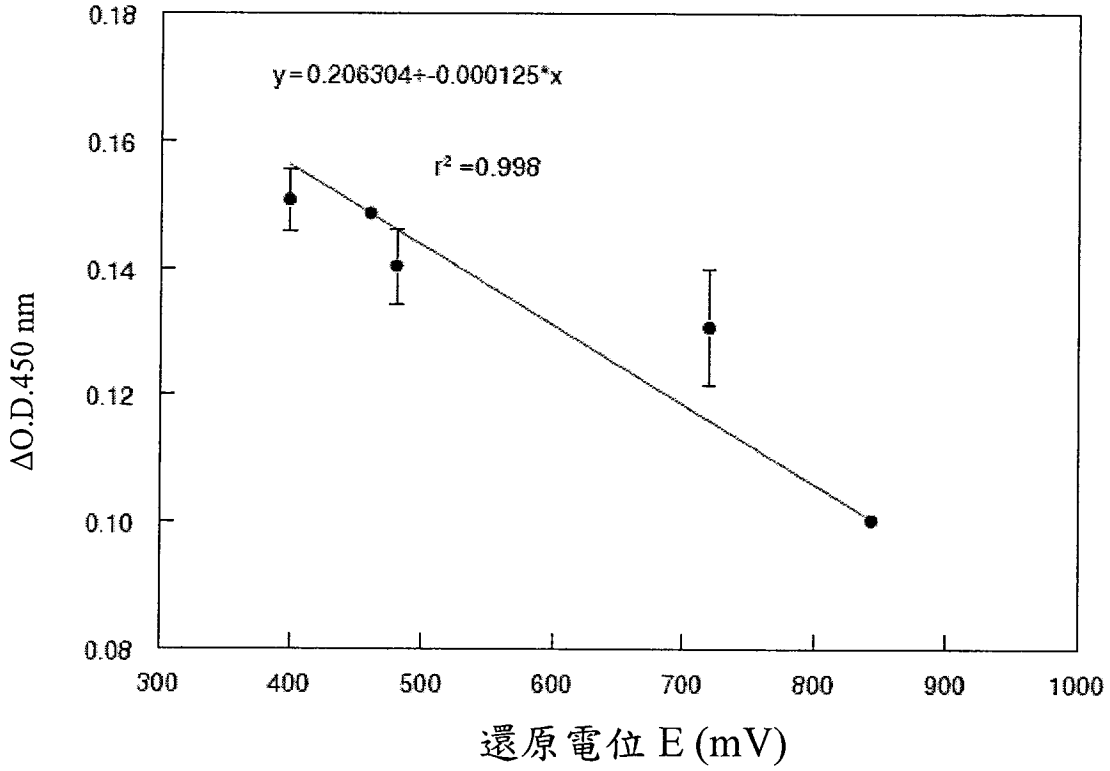


圖 15

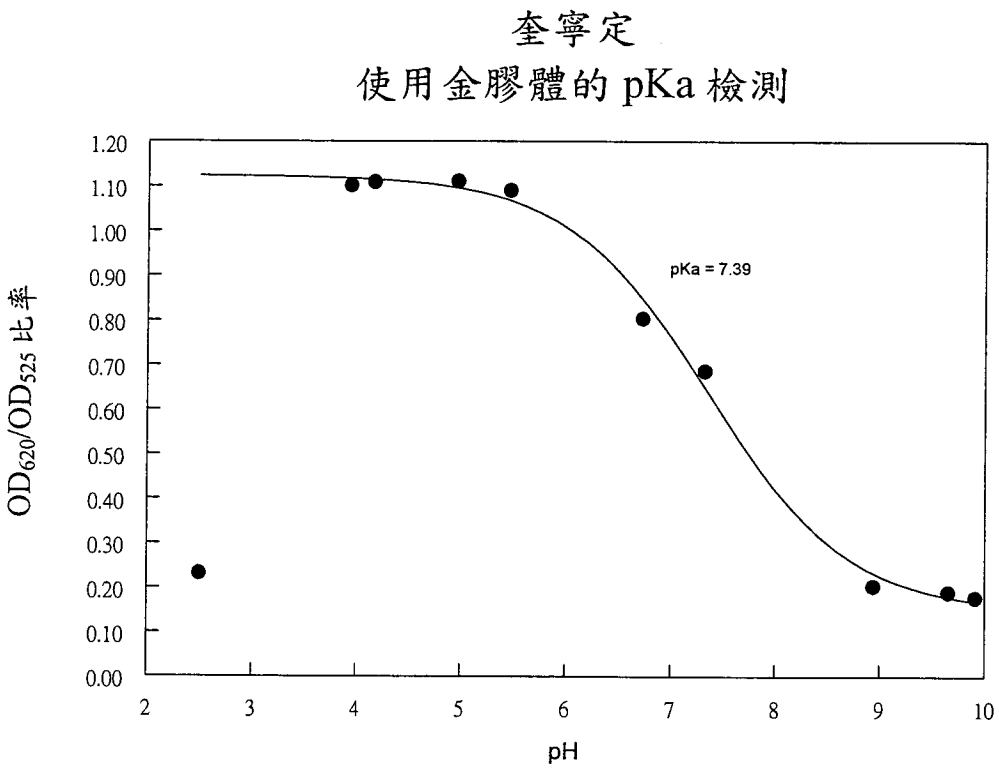

奎寧定
使用金膠體的 pKa 檢測
pKa = 7.39
OD620/OD525 比率
pH
1.20
1.10
1.00
0.90
0.80
0.70
0.60
0.50
0.40
0.30
0.20
0.10
0.00
2
3
4
5
6
7
8
9
10

圖 16

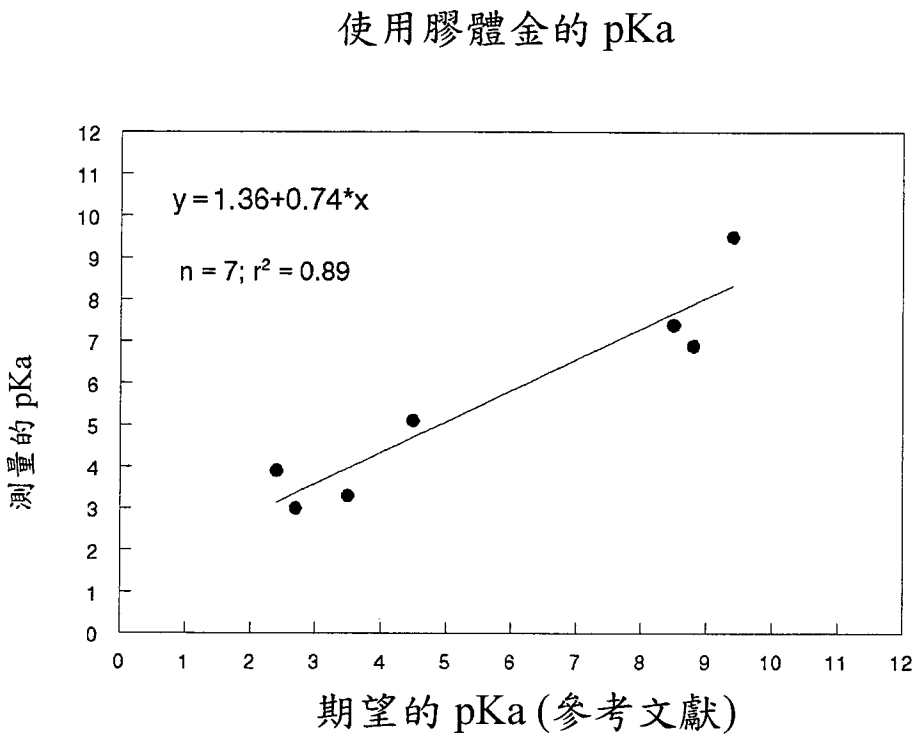

使用膠體金的 pKa
y = 1.36+0.74*x
n = 7; r² = 0.89
測量的 pKa
期望的 pKa (參考文獻)
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12

圖 17

七、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第（ 12 ）圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

無。

八、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

無。