

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
G01N 33/50 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200880017704.2

[43] 公开日 2010 年 3 月 24 日

[11] 公开号 CN 101680882A

[22] 申请日 2008.5.28

[21] 申请号 200880017704.2

[30] 优先权

[32] 2007.5.29 [33] US [31] 60/940,641

[86] 国际申请 PCT/IB2008/003187 2008.5.28

[87] 国际公布 WO2009/031049 英 2009.3.12

[85] 进入国家阶段日期 2009.11.27

[71] 申请人 药物诊断股份有限公司

地址 比利时泽利克

[72] 发明人 P·恩格勒比内 A·梵胡纳克

R·马丁内兹-内拉 P·德普里尔

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利
商标事务所
代理人 陈 昕

权利要求书 3 页 说明书 34 页 附图 17 页

[54] 发明名称

用于测定新化学实体和候选药物的 PK/ADME
-Tox 特性的试剂和方法

[57] 摘要

本发明提供了使用胶体导电聚合物、贵金属纳米粒子或稳定的金属/导电聚合物复合胶体作为试剂的、新化学实体(NCE)的 PK/ADME - Tox 特性的如果不是测定至少是体外预测的方法。另外还提供了试剂盒,该试剂盒包括用于本发明应用的方法和试剂。本发明的这些方法和试剂的显著性特点在于,它们所涉及的反应是均相的、快速的、并且进行了“混合并读取”的过程。

1. 一种测定候选化合物的预测的体内生物学特性的体外方法，其特征在于，所述方法包括：

- (a) 使候选化合物与纳米粒子胶体接触，
- (b) 检测与该候选化合物接触的纳米粒子胶体的光学特性，及
- (c) 从检测到的光学特性测定该候选化合物的预测的体内生物学特性。

2. 权利要求1的方法，其特征在于，所述生物学特性是 ADME/TOX 特性。

3. 权利要求2的方法，其特征在于，所述 ADME/TOX 特性是吸收。

4. 权利要求2的方法，其特征在于，所述 ADME/TOX 特性是分布。

5. 权利要求2的方法，其特征在于，所述 ADME/TOX 特性是代谢。

6. 权利要求2的方法，其特征在于，所述 ADME/TOX 特性是排泄。

7. 权利要求2的方法，其特征在于，所述 ADME/TOX 特性是毒性。

8. 权利要求1的方法，其特征在于，所述 ADME/TOX 特性是氧化还原电位。

9. 权利要求1的方法，其特征在于，所述纳米粒子胶体包括导电聚合物胶体。

10. 权利要求1的方法，其特征在于，所述纳米粒子胶体包括贵金属胶体。

11. 权利要求1的方法，其特征在于，所述纳米粒子胶体包括金属/导电聚合物复合胶体。

12. 权利要求1的方法，其特征在于，所述纳米粒子胶体还包括与所述候选化合物发生相互作用的试剂。

13. 权利要求12的方法，其特征在于，所述试剂与所述候选化合物特异性结合。

14. 权利要求12的方法，其特征在于，所述试剂是肽或蛋白质。

15. 权利要求12的方法，其特征在于，所述试剂是酶。

16. 权利要求 12 的方法，其特征在于，所述试剂是受体。

17. 权利要求 12 的方法，其特征在于，所述试剂是膜。

18. 权利要求 12 的方法，其特征在于，所述试剂与候选化合物共价键结合。

19. 权利要求 1 的方法，其特征在于，所述纳米粒子胶体包含洗涤剂。

20. 权利要求 1 的方法，其特征在于，所述光学特性为光吸收度。

21. 权利要求 1 的方法，其特征在于，所述方法还包括将所述检测到的光学特性与对照相比较。

22. 权利要求 1 的方法，其特征在于，所述纳米粒子胶体包含与所述候选化合物特异性结合的试剂，以及所述方法还包括：

(i) 绘制所述候选化合物与所述试剂结合的结合等温线，以及

(ii) 从所述结合等温线估算所述候选化合物对所述试剂的结合亲和力。

23. 权利要求 1 的方法，其特征在于，所述方法还包括测定所述候选化合物的 pKa。

24. 权利要求 1 的方法，其特征在于，所述纳米粒子胶体包含与所述候选化合物特异性结合的试剂，以及所述方法包括：

(i) 使所述纳米粒子胶体与第一浓度的所述候选化合物接触，测定缔合动力学；以及

(ii) 使所述纳米粒子胶体与第二浓度的所述候选化合物接触，测定解离动力学。

25. 权利要求 1 的方法，其特征在于，所述方法包括使所述候选化合物在多个不同浓度和 pH 值下，与所述纳米粒子胶体接触，以获得所述候选化合物的氧化还原电位。

26. 权利要求 1 的方法，其特征在于，所述方法还包括测定至少一种额外候选化合物的预测的生物学特性。

27. 权利要求 26 的方法，其特征在于，所述方法包括在基本相同的时间测定至少 10 种不同候选化合物的预测的生物学特性。

28. 权利要求 27 的方法，其特征在于，所述方法是在高通量筛选装置中进行的。

29. 权利要求 1 的方法，其特征在于，所述纳米粒子胶体与固体基质缔合。

30. 权利要求 1 的方法，其特征在于，所述纳米粒子胶体不与固相支撑体缔合。

31. 一种装置，包括：

包含纳米粒子胶体的容器，

与该容器耦合的光学检测器，

被设定为通过所述光学检测器从该容器获得的光学信号来测定候选化合物的预测的生物学特性的处理器。

32. 权利要求 31 的装置，其特征在于，所述装置包含至少 10 个不同的容器，每个容器都包含纳米粒子胶体。

33. 权利要求 32 的装置，其特征在于，所述装置是高通量筛选装置。

34. 用于测定候选化合物的预测的生物学特性的试剂盒，所述试剂盒包含：

纳米粒子胶体，和

用于在权利要求 1 的方法中使用所述胶体的说明书。

用于测定新化学实体和候选药物 的 PK/ADME-Tox 特性的试剂和方法

相关申请的交叉参考

本申请主张 2007 年 5 月 29 日提交的美国临时专利申请序号 60/940,641 的优先权, 该申请被引入本文作参考。

技术领域

现在人们普遍承认, 将新化学实体 (NCE) 转换为上市药物的过程是缺乏效率的。对于上市的每种新药物来说, 制药公司必须筛选 5-10,000 种化合物。最常被举出的估计显示, 研发新药的支出将花费 8 亿美元, 大部分花费的费用仍然是失败 (Bains, W. (2004) Failure rates in drug discovery and development: Will we ever get any better? Drug Discovery World 5(4), 9-18)。

背景技术

照惯例, 药物每次一个地从天然来源获得或合成的。在传统的药物开发步骤中, 新化合物的合成被认为是药物发现和开发过程的速度限制步骤。自动化组合化学的出现, 使我们能够在一天内就合成成千上万的化合物, 从而克服了这种速度限制步骤。

这种有机合成的技术改良迅速要求高通量筛选 (HTS) 的执行, 使制药科学家有机会在几天内测试那么多针对药物靶标的化合物, 即细胞受体, 离子通道或酶的生物活性 (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, 尽管合成和生物

评价的速度急升，能够通过全部药物开发过程的化合物的数量仍然很少。1963年至1999年，每年推出的新药物输出量基本持平(Service, R.F. (2004) Surviving the blockbuster syndrome. Science 303, 1796-1799)。

许多新化学实体(NCE)失败的主要原因是较差的药代动力学(PK), ADME (吸收、分布、代谢和排泄)和 Tox(毒理学)特征。单单这些原因就占新候选药物在药物开发过程中的损耗率的50%。其他损耗原因是缺乏疗效(30%), 对人产生不良反应(10%), 商业或其它原因(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)。

药物发现和开发过程可以归纳为三个阶段：发现，开发和注册。发现阶段(合成，先导发现，先导优化)可能会持续3至4年。开发阶段包括临床I至III期。在发现的后期和开发的早期，药代动力学(PK)/吸收、分布、代谢和排泄-毒理学(ADME-TOX)特征分别在细胞培养模型和动物中进行评估(I期临床)进行的(Englebiennne, 2005年，同上)。考虑到I期临床通常会持续两年左右，大部分失败发生在对新化学实体(NCE)付出了2至6年的研究工作之后。因此，尽早在药物发现过程获得关于候选药物的药代动力学(PK)/吸收、分布、代谢和排泄-毒理学(ADME-Tox)特征的关键信息是更理想的。

为了在药物发现和开发过程中迅速获得这些信息，提出了许多定量构效关系(QSAR)模型(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

模型是计算机程序，允许将(例如，通过电脑辅助计算)化学结构特征与带有此分子特征的分子显示相应的 ADME 特性的预定的概率在电脑中作出关联。现在描述这种电脑技术的专利和专利已被申请。参阅如，美国公开申请 US2004009536 和 US2005119832。

体外方法也已被开发和公布，允许推断候选药物的亲油性 (Lombardo, F., Obach, R.S. et al. (2004) Prediction of human volume of distribution values for neutral and basic drugs. 2. Extended data set and leave-class-out statistics. J. Med. Chem. 47, 1242-1250; Wilson, D.M., Wang, X. Et al. (2001) High-throughput Log D determination using liquid chromatography-mass spectrometry. Combinatorial Chem. High Throughput Screen. 4, 511-519) , 膜渗透电位 (Taillardat-Bertschinger, A., Carrupt, P.A. et al. (2003) Immobilized artificial membrane HPLC in drug research. J. Med. Chem. 46, 655-665), or plasma protein-binding (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), 和所有制约它们的 PK/ADME-TOX 特性的特征。另见国际专利公布 W09942511, W003027656 和 W02005034915, 以及美国专利 US US6,868,343。

尽管这种体外方法通常被认为具有高通量筛选性是事实，他们的性能和时效还较低。许多这种方法需要很长的潜伏期，必须从游离型药物分离出结合型药物(例如，通过离心)，在此之前，可分别进行与固相试剂结合的药物或溶液中游离的药物的浓度测量。此外，药物浓度从通过包括高效液相色谱(HPLC),放射性同位素计数和/或质谱的复杂技术获得的数据进行推断。

发明内容

本发明的实例，通过提供基于具有贵金属胶体，导电聚合物胶体，或其复合材料的光子反应优势的“混合并读取 (mix and read)”技术的新化学实体 (NCE) 的 ADME 特征的体外测定方法，规避了这些缺点，正如在下文中详细说明的。

贵金属如金、银的纳米粒子可以制备成各种几何形态，如球形，棒形或棱锥形。这些小物体包含化学还原形式的并且视它们的制备方式而定的金属元素，它们可以以还原的粉末状固体存储，或者以在例如水或各种有机溶剂中的稳定的悬浮液 (例如，胶体) 存放。由于粒子的纳米尺寸，肉眼不能从真正的溶液中辨别这些悬浮液，尽管显微镜可以，因此这些悬浮液被称为胶体溶液。因此这些粒子容易在各种支撑体上铸造以形成明确的结构。

这些金属纳米粒子的研究由于其独特的电子、光学和催化特性近年来已经成为非常活跃的领域。由于光与电磁场相关，纳米粒子的光电特性特别有趣。事实上，因为它们是金属并能导电，贵金属纳米粒子被其表面密集的电子云包围着。当这些电子被光激发时，电磁辐射与这些电子相结合以形成从粒子表面辐射开来的集体振荡。结果，这些粒子会显示出可成功应用到分析技术上的特定的光吸收、反射、发射和散射特性。事实上，配体结合纳米粒子表面的固定受体会招致粒子周围的折射率变化，其直接由其光子特性的特定变化说明 (Englebienne, P. et al. (2003) Surface plasmon resonance: Principles, methods and applications in biomedical sciences. Spectroscopy 17, 255-278)。迄今，被研究的粒子大多数是相同金属均质制成的。不过，最近已经显示，可以使用结构交替的不同金属构建纳米物体。这一新进展为它们在许多应用领域 (包括生物分子相互作用的定量检测) 中作为纳米条形码的使用开辟了道路 (Bao, Y.P., Wei, T.F., Lefebvre, P.A. et al. (2006) Detection of protein analytes via nanoparticle-based bio bar code technology. Anal. Chem. 78, 2055-2059)。

同样地，导电聚合物或导电聚合物和贵金属的复合材料也可以以

含纳米粒子的胶体形式获得。导电聚合物是分别由炔、苯或杂环单体的重复序列构成的广泛共轭的有机大分子。这些聚合物可以通过氧化(p-掺杂)或还原而从它们的绝缘状态(n-掺杂))获得接近金属的导电性。导电聚合物的另一个重要的共同特征是它们在氧化状态变化时经受铬转变的能力 (Englebienne, P. (1999) Synthetic materials capable of reporting biomolecular recognition events by chromic transition. J. Mater. Chem. 9, 1043-1054)。由被导电聚合物层包围的贵金属构成的复合纳米粒子的使用可以引发两种材料的导电电子的相互作用, 这允许纳米材料在它们环境的各种变化(包括折射率和氧化还原电位)下的光子反应性增加, (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)。也请参阅公布的美国专利申请号: 2007-0172834; 本文中并入了该公开的内容作为参考。

由于这些纳米粒子对环境的特定的光子敏感性, 它们已被用于各种均相分析技术(包括用各种分析物的定量免疫分析)的标记, (Englebienne, P. (2000) Immune and Receptor Assays in Theory and Practice. CRC Press, Boca Raton, 392pp)。包含特定受体的、用导电聚合物共价标记的、并在固体支撑体上流延形成的双层脂质膜, 已被提议通过分光光度法直接监测其与特定配体的相互作用, 例如如 US6, 395, 561 中所描述。

本发明证实并请求保护由导电聚合物、贵金属或其复合材料构成的胶体粒子被用于溶液中或固体支撑体上以快速检测新化学实体(NCE)的 PK/ADME-TOX 特性的有利应用。

因此, 提供了使用在溶液中的或流延在固体支撑体上的纳米粒子胶体(例如导电聚合物胶体、贵金属纳米粒子或稳定的金属/导电聚合物复合胶体)作为试剂, 至少用于预测、以及在某些实施方案中用于新化学实体(例如, 候选药物或先导化合物)的 PK/ADME-Tox 特性的体

外测定的方法。另外提供的还有试剂盒，其包括用于该应用的方法和试剂，以及实施该方法的装置。这些方法和试剂的实施方案方面包括，它们所涉及的反应是均质的、快速的并且进行了正如“混合并读取”过程的事实。

附图说明

图 1 显示了茶碱与 BSA-胶体金共轭物的结合等温线。

图 2 显示了胆红素与 BSA-胶体金共轭物的结合等温线。

图 3 显示磷酸盐-缓冲的聚(苯胺)的滴定曲线。

图 4 显示了 HAS (人血清白蛋白)-地高辛的缔合和解离动力学。

图 5 显示了抗坏血酸标准曲线。

图 6 显示了得自对乙酰氨基酚、乙酰水杨酸、红霉素、茶碱、氯苯那敏和水杨酸的数据的表观分布容积与从体内药代动力学获得的分布容积之间的回归和关联函数。

图 7 显示了地高辛与 HSA-胶体金共轭物的结合等温线。

图 8 显示了硫喷妥与 HSA-胶体金共轭物的结合等温线。

图 9 显示了 6 种已知药物的 HSA-胶体金共轭物分析再现性：咪塞米、吲哚美辛、布洛芬、苯唑西林、丙咪嗪和萘普生。

图 10 显示了由 HSA-胶体金共轭物分析观察到的表观亲和力与从参考文献中得到的表观亲和力数据(实验或从血清蛋白结合百分比计算而来)之间的相关性。虚线表明相同。

图 11 显示了维拉帕米和红霉素与人血清类粘蛋白($\alpha 1$ -酸性糖蛋白)胶体金共轭物的结合等温线。

图 12 显示了由阿米替林，氯苯那敏，氯丙嗪，丙咪嗪，盐酸苯海拉明，红霉素，氟哌啶醇，吲哚美辛，丙咪嗪，保泰松，吲哚洛尔，哌唑嗪，泼尼松龙，普萘洛尔，奎尼丁，筒箭毒碱，丙戊酸盐，维拉帕米和华法林观察到的人血清类粘蛋白($\alpha 1$ -酸性糖蛋白)胶体金共轭物分析再现性以及表观亲和力的相关性。

图 13 显示了已知药物在 LSPR (局部表面等离子体共振)信号和

Caco-2 (结肠腺癌细胞) 渗透率常数 (文献数据) 之间获得的相关性。

图 14 显示了已知药物在 LSPR 信号和肠道吸收百分比部分之间获得的相关性。

图 15 显示了 PANI-COOH (聚苯胺羧酸) 在与已知化合物反应后的 450nm 信号, 以及它们各自的还原电位 (文献数据) 之间的相关性。

图 16 显示了奎尼丁-胶体金的滴定曲线。

图 17 显示了使用胶体金的测量的 pKa 值与预期的 pKa 值之间的相关性 ($n=7$, $r^2=0.89$)。

定义

除非另有规定, 本文所用的所有技术和科学词汇具有与本发明所属技术领域的普通技术人员所通常理解的相同的含义。不过, 为了明确和便于参考, 某些要素的定义如下。

术语“胶体”是指在液体介质中悬浮微粒的流体组合物。在代表性胶体中, 其中的粒子大小介于 1 纳米和 1 微米之间。

术语金属胶体是指其内部悬浮的微粒是金属微粒的胶体。

术语“贵金属”是指元素周期表中的八 (VIII) 族金属, 包括但不限于: 铂, 铱, 钯等, 以及金, 银等。

术语“导电性聚合物”或“导电的聚合物”是指导电的聚合物材料。在代表实例中, 导电聚合物是有机聚合物, 例如 π -共轭有机聚合物。例如, 可以采用聚吡咯, 聚噻吩, 聚苯并噻吩, 聚异硫茚, 聚噻吩乙炔, 聚苯胺, 聚乙炔, 聚丁二炔, 聚萘, 聚芘, 聚咔唑, 聚噻吩, 聚呋喃和聚苯并呋喃, 聚对亚苯, 聚吡啶, 聚吡嗪, 和聚并苯, 例如并四苯, 并五苯, 并六苯, 并七苯, 二苯并五苯, 四苯并五苯, 芘, 二苯并芘, 蒽, 二萘嵌苯, 萘, 涤纶, 卵苯, quaternary 和环蒽及其衍生物。

正如本领域众所周知的, 导电聚合物可以通过将材料 (例如, 苯醌衍生物、和四氟乙烯以及四氟基对醌二甲烷及其衍生物, 它们作为接受电子的受体, 或例如具有氨基、三苯基、烷基、羟基、烷氧基、

苯基等官能团的材料，被取代的胺（例如苯二胺），蒽，苯并蒽，被取代的苯并蒽，芘，被取代的芘，卟啉及其衍生物，以及四硫富瓦烯及其衍生物，它们作为电子供体）并入到具有官能团（例如二甲氨基，氰基，羧基和硝基）的聚合物材料中来进行掺杂。本文所描述的掺杂是指接受电子的分子（受体）或供给电子的分子（供体）被掺入该采用掺杂的聚合物中。在本发明中被用作掺杂剂的可以是受体或供体。

术语“胶体导电聚合物”是指由导电聚合物粒子构成的胶体。

术语“金属/导电聚合物复合胶体”是指由表面有导电聚合物存在的金属粒子构成的胶体。

术语“胶体共轭物”或“共轭纳米粒子”是指作为胶体一部分的纳米粒子，其中分子显示在该胶体表面以赋予反应性，例如，但不限于受体、核酸、硫醇化烷基链等。反应分子在纳米粒子表面的附着可以通过物理或化学方法发生。

术语“固体支撑体”和“固态基质”是指任何透光的固相，例如但不限于，玻璃或石英，胶体被沉积在其上以形成光反应薄膜，从而作为传感器使用。

术语“吸附”是指在分子（例如，受体，膜或配体）的薄膜对于与它们接触的固体本体（如金属或复合粒子）的表面的附着。

本文中所用的术语“接触”是指拿到或放在一起。因此，当两个物品被拿到或摆放在一起时，第一个物品就接触了第二个物品，例如，相互触碰。术语“合并”是指以使两个物品成为一个组合物的方式将两个不同的组成接触。

术语“搅动”是指组合物发生物理运动，使得其中的各组分彼此发生相对移动。因此，术语搅动泛指混合、搅拌等。

本文中所用的术语“配体”是指作为特异性结合对的一个成员的任何类型的分子。关注的配体包括但不限于生物分子，其中术语“生物分子”是指关注的任何无机、有机或生化分子、基团或物种，例如它们能与关注的受体发生特异性结合或相互作用，所述受体例如为抗体、细胞受体、离子通道、血浆蛋白、酶或脂质结构。配体也可以与

相应的结合力分子，例如通过巯基的氧化攻击，形成共价加成物。典型的生物分子包括肽、蛋白质、氨基酸和核酸。本发明的具体实施方案中，配体可以是在药物发现和开发过程中药物化学家合成或分离的要被发展成先导化合物的候选药物或任何新化学实体(NCE)。

本文中所用的术语“肽”是指通过由一种氨基酸的羧基和另一基团的氨基之间形成酰胺所产生的任何化合物。

本文中所用的术语“寡肽”是指少于约 10 至 20 个残基的肽，例如氨基酸单体单元的肽。

本文中所用的术语“多肽”是指大于约 10 至约 20 个残基的肽。术语“多肽”和“蛋白质”可以互换使用。

本文中所用的术语“蛋白质”是指超过约 50 个残基的特定序列的多肽，包括 D 型和 L 型，改性形式等。

本文中所用的术语“核酸”是指由核苷酸（如脱氧核（糖核）苷酸或核（糖核）苷酸）组成的聚合物，或合成生成的化合物（例如，美国专利号 5948902 和其所引用的参考资料所述的 PNA），它可以与天然存在的核酸以那种类似于两种天然存在的核酸所具有的序列特异性的方式（可参与沃森-克里克(Watson-Crick)碱基配对相互作用）来杂交。

术语“核苷”和“核苷酸”包括不仅包含已知的基于嘌呤和嘧啶的部分，还包括已改性的基于其他杂环的部分。这些改性包括甲基化嘌呤或嘧啶，酰化嘌呤或嘧啶或其他杂环。此外，术语“核苷”和“核苷酸”包括那些不仅包含传统的核糖和脱氧核糖、而且包含其它糖类的部分。改性的核苷或核苷酸还包括糖部分的改性，例如，一个或更多羟基被卤原子或脂肪族基团所替换，或被官能化为醚、胺等。

本文中所用的术语“核糖核酸”和“RNA”是指由核苷酸组成的聚合物。

本文中所用的术语“新化学实体”、“候选药物”和“先导化合物”是指无机或有机化合物，包括将开发作为用于人类或动物的药物的从天然来源分离出来的或从头合成的金属盐，由氧、氢、氮、磷、硅、肽、蛋白质和核酸的碳复合物构成的小分子。

所谓“均相”是指组合物始终具有相同或类似的种类或性质，例如始终一致的结构或组成。

术语“均相测定”是指以“混合并读取”原理为基础的一个分析测定系统，例如，不要求任何结合配体和游离配体的物理分离，并且其结果是直接从完整的反应混合物中测量而来的。

本文中所用的术语“脱氧核糖核酸”和“DNA”是指由脱氧核(糖核)苷酸组成的聚合物。

本文中所用的术语“寡核苷酸”是指具有大约 10 至 100 个核苷酸、长度最多 200 个核苷酸的单链核苷酸多聚体。

“生物聚合物”是由一种或多种重复单元组成的聚合物。生物聚合物存在于生物系统(尽管它们可能是合成而来)，并可包括肽，蛋白质或多核苷酸，以及由氨基酸类似物或非氨基酸基团组成、或含有氨基酸类似物或非氨基酸基团的化合物，或者由核苷酸类似物或非核苷酸组成、或含有核苷酸类似物或非核苷酸的化合物。这包括多核苷酸(其中传统的骨架已被非天然或合成的骨架替代)，以及核酸(或合成或天然存在的类似物)(其中一个或多个传统的碱已经被能参与沃森-克里克型氢键相互作用的基团(天然或合成的)或替代。多核苷酸包括单链或多链结构，其中的一条链或多条链可以也可以不与其他链完全排列在一起。例如，“生物聚合物”可以包括不论其来源的受体、抗体、结合蛋白，DNA(包括 cDNA)，RNA，寡核苷酸和 PNA，以及在美国专利号 US5948902 及其引用的参考文献(全部被并入本文作参考)所描述的其它多核苷酸。

短语“光学特性”是指光学参数，即，一种特性，其值可以确定某物的特征或行为，其中代表性的光学术性包括但不限于：光吸收、光发射、光反射和光散射。

术语“局部表面等离子体共振”是指在贵金属纳米粒子或其导电聚合物复合材料的可见光谱中的特定光吸收带。正如本领域技术人员众所周知的，这种特定光吸收带的波长和高度会在周围介质的折射率(例如，介电(dielectric)的平方根)被改变时分别移位和增加。

所谓“表面等离子体共振耦合”是指当至少两个或更多个贵金属纳米粒子被放到接近等于其平均直径最多 2.5 倍的距离时所发生的局部表面等离子体共振效应的增加。

本文中所用的术语“药代动力学”(PK)，“ADME”和“毒理学”(Tox)是指药物在包括例如人类的哺乳动物的动物中的吸收、分布、代谢、排泄和毒理学效应，这会影响它们作为药物的功效。特别地，这些术语是指药物、候选药物、先导化合物或新化学实体(NCE)的以下能力：在给定的时间内均匀或不均匀分布到该动物或人类体内、进入细胞或生物体的局部（如大脑）、迅速或不迅速代谢、与血清或血浆蛋白或特定的代谢酶结合（例如但不限于细胞色素家族成员）的亲和力高或低、与生物或合成膜或层发生相互作用，或与涉及代谢的分子或其衍生物如葡萄糖苷酸，半胱氨酸和谷胱甘肽形成共价加成物。

术语“参考”和“控制”被互换使用，意指可以与观测值比较的一个已知值或一组已知值。本文中所用的“已知”是指该值表示已理解的参数，如亲和力、结合比例、分布容积、光吸收、光发射等。

术语“评估”和“评价”可以互换使用，意指任何形式的测量，并且包括测定介质中存在的一个元素是否与胶体或共轭物发生相互作用。术语“确定”、“测量”、“评估”和“测定”可以互换使用，包括定量和定性测定。评估可以是相对的或绝对的。“评估反应性”包括测定一对配体之间，以及配体和纳米粒子或其共轭物之间的相互作用的水平。

本文中所用的术语“检测”是指定量或定性地测定一个信号。

术语“结合”是指两个物体彼此缔合而生成一个稳定的复合结构。在某些实施方案中，两个互补的核酸的结合，可称为特定杂交。术语“特异性杂交”，“特异性杂交至”和“特定的杂交”和“选择性杂交成”，可以替换使用，是指核酸分子在严格的条件下优先结合、双联或杂交到特定的核苷酸序列。在某些实施方案中，配体和受体之间的结合，指的是带有预定亲和力或亲合力的特定的相互作用。在其他的实施方案中，配体与分子的结合可以指配体的反应性结构和目标分

子的特定基团之间的共价键结合。

这里所谓“竞争的”或“竞争”是指在一个预定的检测中一个配体与另一个配体或其蛋白共轭物竞争，以结合为受体或酶。

术语“亲和力”和“亲合力”是指是一对结合配体相互缔合的强度。

术语“筛选”是指测定感兴趣的某物（例如分析物，事件等）的存在。本文使用的术语“测定”是指鉴定，即建立，确认，评估或测量感兴趣的特定参数的值，例如，杂交参数。值的测定可以是定性的（例如，存在或不存在）或定量的，定量测定可以是相对的（即，其单位相对于对照值或已知值（即参比值）的值）或绝对的（例如，测定实际分子的数目）。

本文中所用的术语“样品”是指一种液体组合物，在某些实施方案中，液体组合物是含水组合物。

具体实施方案

提供了使用纳米粒子胶体例如导电聚合物胶体、贵金属纳米粒子或金属/导电聚合物复合材料胶体作为试剂以用于至少预测（如不是预测，则是）测定体外新化学实体（NCE）、候选药物或先导化合物的PK/ADME-Tox特性的方法。另外提供的还有实践本发明的实施方案的试剂盒和装置。

在更详细地描述本发明之前，应该理解，本发明并不限于所述特定实施方案，因此当然可以变化。也应该理解，本文使用的术语只是为了描述特定的实施方案，而目的不是要限制，因为本发明的范围将只限于本申请的权利要求。

凡是提供了值的范围的，应该理解为，每个介于其间的值，除非上下文有明确说明，是指下限单位的十分之一，介于那个范围的上限和下限之间的和任何其他指定的或在那个指定范围之间的值都被包括在本发明范围内。这些小范围的上限和下限可独立地被包含在较小的

范围内，并且也被包含在本发明范围内。在本发明中，适用该指定范围内任何特定的排除限制。当该指定范围包括一个或两个限值时，不包括其中一个或两个限值的范围也包含在本发明范围内。

本文出现的某些范围以数字值呈现，其前面会加一术语“约”。这里使用的术语“约”是为了提供该词之后的确切数字、以及与该词之后的数字接近或近似的数字的文字支持。确定一个数字是否接近或近似具体被举出的数字时，接近或近似未列举的数字可以是在它出现的上下文中与具体被举出的数字本质同义的数字。

除非另有规定，本文所用的所有技术和科学术语具有与本领域技术人员通常理解的相同的含义。任何类似或等同于本文所述的方法和材料也可以被用于本发明的实施或测试中，以下开始描述代表性的示例方法和材料。

本文附上本说明书引用的所有出版物和专利供参考，正如每个独立的出版物或专利被特定地和独立地指名要被引入作为参考和已经被引入作参考，以便公开和描述与被引用的出版物相关的方法和/或材料。任何出版物的引用是在本申请的申请日之前的公开，不应认为是承认本发明无权先于之前的发明提前出版。此外，提供的出版日期可以与需要得到单独确认的实际出版日期不同。

注意，说明书和权利要求中所使用的单数形式“一”，“一个”和“该”包括复数概念，上下文另有明确说明的除外。也请注意，权利要求的起草可能会排除任何可选元素。因此，此说明的目的是作为与权利要求要素叙述相关的像“仅”、“只”等的排除术语、或“否定”限制的用的前置基础。

因为阅读该公开内容的本领域技术人员都很清楚，本文所述和说明的每一个实施方案都具有分立的组成和特征，它们可在不偏离本发明的范围或精神的前提下从其它任何几个实施方案的任一个的特征中分离或与其它任何几个实施方案的任一个组合。任何陈述的方法可以根据陈述的事件顺序或任何其他逻辑上可行的顺序实施。

正如上文所归纳的,本发明提供了用于新化学实体(NCE)、候选药物或先导化合物(本文统称为“候选化合物”)的 PK/ADME-Tox 特性的测定、(如果不是测定)至少是体外预测的方法、试剂、试剂盒和装置。因此,提供了测定候选化合物的至少 1 种预测的 PK/ADME-Tox 特性的方法。在进一步描述发明的各方面和某些实施方案时,首先详细综述了所使用的胶体的代表例子和光子特性,然后在本发明范围内讨论所用胶体的代表性制造步骤和方法的。此外,提供了包括作为本发明胶体作为试剂的试剂盒和装置的综述和实施本发明方法的用途。

导电聚合物、金属以及金属/导电聚合物复合胶体

正如上文总结的,本发明利用了导电聚合物、金属或金属/导电聚合物复合胶体的光子特性,以报告(在体外均相分析系统中)配体与结合作伙伴、相互作用结构(例如膜,或电荷或氧化还原敏感性纳米粒子)之间的相互作用,从而推断一个或几个 PK/ADME-TOX 特征,即体外预测候选化合物的一个或多个 PK/ADME 特性。

本发明的实施方案中使用的胶体是稳定的。本文提到的术语“稳定”是指胶体粒子在胶体的载体介质中维持悬浮的能力,例如,粒子不会由悬浮液中沉淀出来至任何明显的程度。胶体在本发明方法中使用的另一个方面是,它们报告,由于它们的光子特性发生显著变化,它们在物理环境中发生变化,诸如折射率,电荷或氧化还原电位的变化。本文中所使用的和作为本领域技术人员已知的术语“光子特性”是指这些纳米材料吸收或散射紫外线或可见光,发出磷光、荧光或冷光等的能力。

因为主题胶体可以由导电聚合物、金属或它们的复合材料构成,它们包括导电聚合物成分,金属成分或同时有金属成分和导电聚合物金属成分二者。胶体的金属成分在其存在时可以是贵金属。有兴趣的贵金属包括但不限于:元素周期表第八(VIII)族金属,包括但不限于:铂,铱,钯等,以及金,银等。

术语“导电聚合物”是指导电性聚合材料。在某些实施方案中，导电聚合物是有机聚合物如 p -或 π -共轭有机聚合物。例如，可以使用聚吡咯类，如聚吡咯，聚(N -取代吡咯)，聚(3-取代吡咯)和聚(3,4-二取代吡咯)；聚噻吩类，如聚噻吩，聚(3-取代噻吩)，聚(3,4-二取代噻吩)和聚苯并噻吩；聚异硫茛化合物类，如聚异硫茛化合物；聚噻吩乙炔类，如聚噻吩乙炔；聚(对苯乙烯)类，如聚(对苯乙烯)；聚苯胺类，如聚苯胺，聚(N -取代苯胺)，聚(3-取代苯胺)和聚(2,3-二取代苯胺)；聚乙炔类，如聚乙炔；聚丁二炔类，如聚丁二炔；聚萘类，如聚萘；聚茈类，如聚茈；聚吡唑类，如聚吡唑和聚(N -取代吡唑)，聚硒吩类，如聚硒吩；聚呋喃类，如聚呋喃和聚苯并呋喃；聚对亚苯类，如聚对亚苯；聚吡啶类，如聚吡啶；聚哒嗪类，如聚哒嗪；聚并苯类，如并四苯，并五苯，并六苯，并七苯，二苯并五苯，四苯并五苯，茈，二苯并茈，蒽，二萘嵌苯，晕苯，涤纶，卵苯，quaterylene 和环蒽；衍生物(如三苯并二噻吩，三苯并二噻吩，并六苯-6,15-醌)(它们通过用如氮(N)，硫(S)和氧(O)的原子，或用官能团例如羰基取代聚并苯的某些碳原子来制备)；聚合物类，如聚乙烯吡唑，聚苯硫醚和聚乙烯硫醚。在代表性实施方案中，特别感兴趣的有聚吡咯，聚噻吩，聚苯胺或其衍生物。

在复合胶体中，金属粒子表面涂敷有导电聚合物并悬浮在液体介质中，包括但不限于含水介质，正如美国公布的专利申请号 20070172834 和国际申请公布号 W02006047371 所描述的(安姬儿贝娜(Englebiennne)和范·胡乃可(Van Hoonacker), 2006 年)，其并入本文作参考。“表面涂敷”是指如果不是粒子的整个表面、至少粒子的一部分表面被导电聚合物分子层覆盖。

粒子的尺寸可以有所不同，但在某些实施方案中，范围是从约 1 纳米至约 1 微米，例如由约 1 纳米至约 100 纳米，包括由约 30 纳米到 60 纳米。在某些实施方案中，这种粒子具有较窄的粒度分布。较窄的粒度分布是指粒子的相对标准偏差为平均直径的 30% 以下，在某些具体实施方案中为 20% 以下，例如为 17% 或以下，包括 10% 以下。

在某些实施方案中，这些粒子或用作胶体溶液，或流延在固体基质，（如玻璃或其他合适的固体物质）上的传感膜。

在某些实施方案中，粒子显示为受体或亲水的，疏水的或混合的膜，例如在它们的表面特异性或非特异性结合感兴趣的配体。“显示”是指受体或膜是固定在粒子表面的，其中该受体或膜可以共价和非共价地结合到粒子表面。粒子表面上的受体分子或制造该膜的分子的密度可以改变，范围可以是每个粒子约 2 至约 50 个分子、例如约 5 至约 25 个分子。

如上所述，各种不同类型的受体或膜层可以显示在胶体粒子的表面。在某些实施方案中，特定受体视在给定的应用（如下面讨论的应用）中至少要被预测或测定的 PK/ADME-Tox 特性而存在。感兴趣的代表性受体包括但不限于以上讨论的受体，如血浆结合蛋白，细胞色素家族酶，亲水或疏水的膜，洗涤剂，核酸，肽等。

胶体的 pH 值可以改变，在某些具体实施方案中，范围是从约 2 至约 12，如从约 4.5 至约 9.0。胶体可以包括除了涂敷有聚合物的金属离子以外的很多不同的额外组分，感兴趣的其他组分包括但不限于：盐，缓冲剂，洗涤剂，稳定剂等。

制备方法

本发明胶体可使用导致产生本发明胶体的任何方便的步骤，例如，如上所述的步骤进行制备。在一个实施方案中，胶体导电聚合物是在稳定剂存在的情况下，在适当单体的酸性水溶液中氧化生成的聚合物，如聚乙烯吡咯烷酮或聚乙烯醇。胶体导电聚合物在进一步衍生前可以通过层析进行纯化。在另一实施方案中，贵金属胶体可以通过在适当的温度下在水中还原金属盐来制备。这类胶体纳米粒子生产方案的代表例子在《理论与实践中的免疫和受体测定》一书中分别在第 243 和 234 页有提供(Englebienne, P. (2000) Immune and Receptor Assays in Theory and Practice. CRC Press, Boca Raton, 392pp)。在另一实施方案中，起始的或前体金属胶体和水溶性导电聚合物，以使水溶

性导电聚合物足以吸附在金属胶体的粒子表面方式相互结合，从而生产出本发明使用的复合胶体产品。这种稳定的复合纳米粒子胶体的生产步骤在公开的美国专利申请 US20070172834 和公布的国际申请 W02006047371(安姬儿贝娜 (Englebienné) 和 范·胡乃可 (Van Hoonacker), 2006 年) 中有提供，将其引入本文作参考。

在有关本发明的一些实施方案中，胶体进一步显示出与感兴趣的候选化合物发生相互作用的试剂(物质)，其中该试剂可以是各种实体(如上所述)，包括但不限于：受体、酶、天然或合成膜、核苷酸、抗体、配体、或其衍生物，例如用于生物传感的目的。这些被显示的分子可以通过电荷吸附或共价结合便利地附着到粒子表面。任何适当的耦合步骤都可以被采用。

效用

如上所述的本发明胶体可用于各种不同的应用，目的是预测或推断候选化合物例如新化学实体(NCE)、候选药物或先导化合物的 PK/ADME-TOX 特征。该方法用于如果不能测定，至少可以预测候选化合物的一项或多项 PK/ADME-Tox 特性。

在某些实施方案中，感兴趣的特性是吸收。在化合物可以在组织中发挥药效前，它必须进入血流——通常经过黏液表面(类似消化道(肠道吸收))。摄入靶器官或细胞也必须得到保证。这在诸如血脑屏障的一些天生屏障中可能是一个严重的问题。如在较差的化合物溶解度，胃中化学不稳定，无法穿透肠壁，这些因素都会减少口服药物后的药物被吸收程度。吸收关键性地决定化合物的生物利用度。口服时吸收较差的药物必须通过如静脉注射或吸入等不太理想的方法进行用药。

在某些实施方案中，感兴趣的特性是分布。化合物需要运送到其发挥药效的位置，大多数经过血流。由此，化合物可以分布到组织和器官，通常程度有不同。

在某些实施方案中，该特性是新陈代谢。化合物一进入人体就开

始分解。大多数的小分子药物代谢是在肝脏中通过称为细胞色素 P450 酶的氧化还原酶实现的。由于发生了代谢，最初(母体)的化合物被转化成新的化合物，称为代谢产物。当代谢产物为药理学惰性时，代谢会使母体药物的用药量失效，这通常会减少对人体的疗效。代谢产物也可以是药理学活性的，有时甚至比母体药物更有活性。

在某些实施方案中，该特性是排泄。化合物及其代谢产物必须通过排泄从身体清除，通常是通过肾脏(尿)或粪便。除非排泄是完全的，外来物质的积累可以反向地影响正常的新陈代谢。

在某些实施方案中，感兴趣的特性是 pK_a 。化合物的 pK_a 值会影响化合物的许多特征，例如反应性和光谱特性(颜色)。在生化学中，蛋白质和氨基酸侧链的 pK_a 值对酶的活性和蛋白质的稳定性是极为重要的。该特性在化学上具有普遍重要性，这是因为化合物的电离会改变其物理行为以及如溶解度和亲脂性等宏观特性。例如，任何化合物的电离会提升水的溶解度，但降低亲脂性。这可以在药物发现中用来通过调整在相关 pH 下电离基团的 pK_a 以增加血液中化合物的浓度，不过这么做必须谨慎，因为电离的化合物穿过细胞膜的渗透性会减弱。

在某些实施方案中，特性是毒性。毒性是对某物为毒性或有毒程度的计量。毒性可以指影响整个生物体，如人，或子结构如细胞(细胞毒性)或器官(器官毒性)，如肝脏(肝毒性)。

在有关本发明的一些实施方案中，本发明胶体可以用于筛选含有用于结合到血浆蛋白的配体、与天然或合成的膜、或酶(如细胞色素 P450 族成员)，细胞膜通道(例如 ATP 结合盒转运的成员，诸如抗多种药的蛋白-1)等(当这些受体在纳米粒子上显示时)发生相互作用的样品。在其他的实施方案中，用洗涤剂稳定的纳米粒子在一个合适的 pH 值可以与包含配体的样品接触，以测定其电荷或氧化还原电位。纳米粒子也可以在其表面显示与配体可形成共价加成物的分子。在一些实施方案中，感兴趣的配体可以与其他配体为与受体、酶等结合而展开竞争。

在这些应用中，大量胶体或固定的胶体量会流延在固体支撑体上，

例如，裸露的或包含对配体为特异性的受体或酶的胶体，将天然或合成的膜分别与将要筛选的样品接触；对胶体的光学参数进行监测以测定发生相互作用时的改变，例如，胶体在给定的波长时吸收的改变。任何方便的光学参数都可以在该步骤中进行评估或监测，其中代表性参数包括但不限于：吸收，散射，荧光，冷光等。光学参数可以使用任何方便的装置和方法进行监控，适当的方法是本领域技术人员众所周知的，并且代表性方法在下面的实验部分有更详细的介绍。

光学参数改变的存在或不存在被用于确定感兴趣的配体是否与受体有相互作用，是否与其它配体为受体或纳米粒子展开竞争，以及达到何种程度的竞争。

通过参考对照，如从使用药学家已经进行了广泛研究并且其 PK/ADME-TOX 特征已在文献中发表的已知对照药物的同一系统获得的数据，测定的结果涉及具体的 PK/ADME-TOX 特征，例如 logP、logD、电荷、氧化还原电位、分布容积、细胞或血脑屏障穿透、代谢转化和可能的毒性等。在某些实施方案中，经计算的参数，如配体对受体的亲和力，可从光学结果获得，人们可以直接从任何方便的公式计算 PK/ADME-TOX 参数，如目前广泛为本领域技术人员所知的公式。

化合物的 pK_a 值允许人们根据下述关系式计算在给定 pH 值时的离子化百分比(例如，在不同的身体器官，如血液、十二指肠、回肠等)，关系如下：

$$\text{离子化百分比} = 100 \frac{1}{1 + 10^{\pm(pH - pK_a)}}$$

其中，指数符号“+”是针对碱，“-”是针对酸。

同样，在 pH 值为 7.4 时直接与清除率 (CL) 相关的分子的电离物种的分配系数 (D) 的对数，可以根据谢勒 (Scherrer) 关系式从辛醇/水分配系数 (P_o/w) 和 pK_a 计算出来：

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

对于单质子酸，虽然对于单质子碱来说指数被写为 $pK_a - pH$ 。在更复杂的情况下，如果涉及多质子分子，上述等式的第二项就变成：

$$\log[1 + 10^{-\sum_1^n pK_{a_i} - npH} + 10^{-(pK_{a_1} - pH)}]$$

当纳米粒子被膜或细胞层包围时，分子与纳米粒子的相互作用产生的信号，通过当时的层，直接与药品的转移率 (transfer rate) (dQ/dt) 相关，并因此允许计算通过组织的表观渗透系数 (P_{app}):

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

其中 A 是层的表面积， C_0 是起始浓度。这种关系式进一步允许估计组织中游离的药物分数 (f_{u_T})。同样，控制分子结合到血清蛋白 (如白蛋白和 α_1 -酸性糖蛋白) 的 n 个独立结合位点的亲和力常数 (K_A) 允许人们计算血浆中游离的药物分数 (f_{u_P}):

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

反过来，奥依-托泽 (Oie-Tozer) 等式进一步允许人们推断稳定状态下的分布容积 (V_{Dss}):

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

其中， V_P 和 V_E 是血浆和细胞外液量 (体重分别为 0.0436 和 0.151L/Kg)， $R_{E/I}$ 是血管外相对于血管内的蛋白质比率 (视为 1.4)， V_R 是药物被分布的物理容积减去细胞外空间 (0.380L/Kg 体重)。

分子与细胞色素 P450 同工酶的相互作用等温线提供了与内在清除率 (CL_{int}) 对应的 V_{max}/K_m 比率的估值，从而进一步允许人们估计结果等于 CL_{int} 乘以 f_{u_T} 的总清除率 (CL_{tot})。这些相辅相成的关系式，最终允许人们推断一些药物动力学参数，如口服用药后的半衰期 ($t_{1/2}$):

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

对于最广泛的意义而言，本方法可以是定性或定量的。因此，当检测是定性的时，本方法提供读数和评价，如存在于被测定样品中的目标配体是否与纳米粒子有相互作用的评估。在其它一些实施方案中，本方法对存在于被测定样品中的目标配体是否呈逐渐增加浓度地与胶体发生相互作用提供了定量检测，即，与一定量的胶体相互作用的存在于被测定样品中的目标配体的实际量的评价或评估。在这些实施方案中，定量检测可以是绝对的，或者如果所研究的参数是已知的或已

通过其他方法评估过的，则也可以是相对的。因此，当在量化诸如样品中目标配体的亲和力等参数时，所使用的术语“量化”可以指绝对或相对定的量化。绝对量化，可以通过包含被测定配体的已知浓度和分析结合等温线得出。或者，相对量化可以通过对比所有与相同胶体有相互作用的目标配体和参比配体产生的光学信号得出，以提供两个或多个不同配体的每一个的相对量化值，例如相对于彼此。

本发明方法可以用于检测在各种不同类型的样品中一个或多个目标配体与胶体的相互作用，包括含有可以与水溶液混合的有机溶剂（如二甲基亚砷、二甲基甲酰胺、乙醇、甲醇等）的复杂样品，本发明方法提供了高灵敏度的目标配体相互作用的检测。

本发明的方法可用于检测很多种配体与纳米粒子的相互作用。感兴趣的配体可以是有机或无机分子，包括无机或有机盐类，蛋白类分子，例如，但不限于，蛋白类配体，包括肽、蛋白质及其片段，以及核酸和其他类型的配体，其中配体可以是单个分子，复合物（包括彼此可以是也可以不是共价键结合的两个或两个以上分子的亚单元），微生物（例如病毒或单细胞病原体），细胞，多细胞生物体或它们的一部分等。

此外，本发明方法也可用于筛选调节给定的特异性结合成员配对的化合物。术语“调节”既包括降低（如抑制）加强两个分子间的相互作用也包括加强两个分子间的相互作用。例如，当胶体显示出结合配对的第一个成员，并且该胶体在候选药物存在下与第二个成员接触时，可以评价或评估候选药物对结合成员对的相互作用的效果。

不同种类的配体和候选药物可以通过上述方法筛选。这些配体和候选药物包括很多化学种类，包括但不限于有机分子类，例如具有 50 以上且 2500 道尔顿以下分子重量的小型有机化合物。配体和候选物质包括与蛋白质或其他由纳米粒子表现的受体的结构性相互作用所必须的官能团，尤其是氢键或疏水键，并可以至少包括胺、羰基、酰基、卤素、羟基或羧基，例如至少两个化学官能团。配体和候选物质通常包括被一个或多个上述官能团取代的环状碳或杂环结构和/或芳香族

或聚芳烃结构。配体和候选物质也可以在生物分子中被发现，所述生物分子包括肽、糖、脂肪酸、类固醇、嘌呤、嘧啶、衍生物，结构类似物或它们的组合。

配体和候选药物可以从包括合成或天然化合物库的多种来源获得。例如，许多方式可用于各种有机化合物和生物分子的随机和定向的合成，包括对随机寡核苷酸和寡肽的表达。或者，细菌、真菌、植物和动物提取物形式的天然化合物库是可以获得的或容易制造。此外，天然或合成产生的库和化合物可容易地通过传统的化学、物理和生物化学途径修饰，并可用于生成组合库。可以对已知药物进行定向的或随机的化学改性，例如进行酰化、烷基化、酯化，氨化等以生成结构类似物。

在某些实施方案中，本发明方法是以高通量(HT)形式进行的。在本发明的高通量实施方案中，许多不同的化合物同时被测试。“同时测试”是指多种化合物中的每一种基本在同一时间被测试。因此，如果不是全部多种化合物、也是至少其中的一些化合物是同时测定其效果的。同时测试的多种化合物的数量可以是5以上，如10以上，而在某些实施方案中，该数量可以是100以上或1000以上，被测试化合物的数量还可以更高。在高通量实施方案中，同时被测试的化合物的数量可以是10-10000，如100-10000，包括1000-5000。装置可以具有与测试化合物的数量一样多的容器，例如，5以上，10以上，100以上，1000以上，5000以上，10000以上等。在某些实施方案中，感兴趣的有96孔板，384孔板，1536孔板等。各种测定候选药物活性的高通量筛选分析是本领域已知的，并且很容易适用于本发明，包括发行的美国专利US6127133中所描述的内容；将其引入本文作参考。

在上面的筛选分析中识别的药剂可用于各种方法，包括调节目标配体在指定受体上的活性以及与其活性相关的条件的方法。

本发明方法可用于预测或测定候选化合物例如新化学实体(NCE)、候选药物或先导化合物作为具有市场销售潜力的治疗剂的可行性。如上所述，可接受的PK/ADME-TOX特征可以有利于候选化合物的疗效。

为了测定候选化合物是否具有可接受的 PK/ADME-TOX 特征，可以实施本发明的方法，以获得相应于感兴趣的特性的结果，例如，但不限于 pK_a 值，吸收、分布、代谢、排泄和毒性。这些结果可以与对照值进行对比。在某些实施方案中，对照值是指将本发明分析方法用于已知 PK/ADME-Tox 特性的已知化合物所测定的值。在一些实施方案中，对照值可以等于或基本等于具有可接受 PK/ADME-TOX 特征的已知化合物的相应的值。在一些实施方案中，对照值可以等于或基本等于具有可接受 PK/ADME-TOX 特征的两种或多种已知化合物的相应值的平均值。本文中所用的术语“基本上等于”或“基本上类似”是指在指定的值的范围内等于另一个值的值，例如 $\pm 40\%$ ，包括 $\pm 20\%$ ，例如 $\pm 10\%$ 或 $\pm 5\%$ 。

在一些情况下，如上所述，从本发明方法获得的候选化合物的结果，可以与对照值的如上所述感兴趣的特性进行对比。如果从本发明方法获得的结果与对照值基本相同，即落在数值的一定范围内，例如 $\pm 40\%$ ，包括 $\pm 20\%$ ，例如 $\pm 10\%$ 或 $\pm 5\%$ ，那么候选化合物就具有感兴趣的特性的可接受的值。如果候选化合物具有关于该感兴趣的特性的可接受值，那么候选化合物成为具有市场销售潜力的治疗剂的可能性更大。可以针对一项或多项感兴趣的特性，进行从本发明方法获得的结果与对照值的上述比较。一项或多项感兴趣的特性的可接受的值表明，候选化合物可以适合进一步的测试，例如但不限于进一步的体外试验、动物的体内试验、或人体临床试验。由此，某些实施方案还包括测定候选化合物是否具有可接受值，如果具有，进行一次或更多次的后续测试，例如，进一步的体外试验、动物的体内试验、或人体临床试验。

相反，如果从本发明方法得到的结果与对照值不是基本上相同的，那么候选化合物不具有关注特性的可接受值。如果候选化合物不具有关注特性的可接受值，那么这可以表明候选化合物不太可能作为有市场销售潜力的治疗剂。一项或多项关注的特性的无法接受的值表明，候选化合物可能不适合进一步测试。然后作出决定不再进一步测试该

化合物。

试剂盒与系统

正如上文总结的,同时还提供了实施本方法使用的试剂盒和系统。该试剂盒和系统至少包括如上所述液体或固体形式的胶体,或其组分。该试剂盒和系统还可以包括在本发明方法中会使用到的许多可选的组分。感兴趣的可选的组分包括缓冲剂等。

在本发明试剂盒的某些实施方案中,试剂盒将还包括实施本发明方法或用于获得本发明方法的装置的指导(例如,引导用户到提供说明书的网页的网站 URL),这些指导可被印刷在基质上,基质可以是以下的一个或多个:说明书、包装、试剂容器等。在本发明试剂盒中在一个或多个组分存在于相同或不同的容器中是方便或理想的。

装置

还提供了可以用于实施本发明方法的高通量(HT)装置,特别是其高通量实施方案。高通量装置可以具有任何方便的配置,通常包括可以在里面进行测定的两个或更多的流体容纳元件,试剂施用元件和信号检测元件。例如,本发明的高通量装置可以包括具有多个含有流体的孔(例如,96孔,384孔,1536孔等)的板或基质,用于将药剂(例如候选药物)添加到孔中的电脑做出反应的试剂添加装置,用于测量孔中容纳的样品和胶体的至少一项特性如光学特性的测量装置,以及用于先将一个孔与添加药剂的组分排列、再与测量装置排列的对电脑做出反应的移动装置,正如美国专利 US6127133 中详述的,在此引入其公开内容作为参考。同时感兴趣装置还有美国专利 US6468736 和 US5989835 所述的装置;在此引入其公开内容作为参考。本发明的高通量装置包含至少一个含有如上所述的纳米粒子胶体的流体容纳元件。

下面的实施例是以说明方式而不是限制方式提供的。

实验

实施例 1

平均直径 40nm 的金纳米粒子的溶液是通过在 1 升锥形瓶中将 200mg 四氯金酸 (III) (Acros 22362-0010) 溶解在 500ml 蒸馏水中制备的。添加磁棒, 并将容器放在磁力搅拌器上。溶液加热至沸腾, 并剧烈搅拌。当沸腾时, 将 1% 柠檬酸钠 30ml (通过中和 1% 无水柠檬酸 (Sigma C-0759) 制备,) 迅速注入到容器中。沸腾和搅拌一直持续到溶液渐渐变成黑色, 然后变成深红色, 表明纳米粒子的形成。溶液然后被冷却到室温。所得溶胶的特征是在 524nm 的吸收波段和 (1cm 的) 光密度值为 4。

10ml 量的胶体金溶液然后被倒入带有磁力搅拌棒的烧杯中, 并使用 10mM 氢氧化钠在磁力搅拌下逐渐中和至 pH 值 6.5。在磁力搅拌下迅速添加牛血清白蛋白 (脱脂 BSA, Equitech 公司, 750mg/ml, 2ml) 的水溶液。该混合物允许在室温下反应 10 分钟, 然后通过添加 228mg 的四硼酸钠十水合物 (Fluka 72000) 进行缓冲。pH 值被调整为 9 ± 0.1 , 溶液被储存在棕色玻璃瓶中, 并作为在其表面展示白蛋白受体的胶体使用。在药学研究中牛血清白蛋白通常被代替为人血清白蛋白, 因为这两种蛋白表现出对药物非常相似的行为。

茶碱溶液 (100mM) (Fluka 88308) 和胆红素 (Aldrich R750972) 在二甲基亚砜 (DMSO, Fluka 41640) 中制备。这些溶液然后在 pH 值为 9 的硼酸盐缓冲液 (50mM, 含硫酸镁 10mM) 中被稀释 100 倍, 以生成含有 1% DMSO 的 1mM 的缓冲液。这些溶液然后在相同的含有 1% DMSO 的硼酸盐缓冲液中被连续稀释, 以生成低浓度的配体样品。

这些配体溶液 (30 μ l) 以及空白溶液 (含有 1% DMSO 但没有配体的缓冲液) 被吸取到 96 孔板上一式两份。接着连同 50 μ l 的 BSA-胶体金共轭物一起, 添加硼酸盐缓冲液 (50mM pH9 的 120 μ l, 含有 10mM 硫酸镁和 40g/l 聚乙二醇 6000- Fluka 81260)。将板的内容物完全混合并在室温下培养 4 小时。然后使用 Spectramax Plus 板阅读器 (Molecular Devices) 读取 525nm 的单独的孔的光密度。从每个结果中减去空白溶液的光密度 (O.D.)。各个光密度 (O.D.) 想对于配体的浓度被做成曲线, 以产生分别示于图 1 (茶碱) 和图 2 (胆红素) 中的各结合等温线。在每

个图中，光密度(O.D.)信号显示为重复两次的平均值 $\pm$ S.D.。图2进一步显示了两个独立实验的结果。

图1所示的结合等温线允许人们估计茶碱对BSA的亲合力，即 r^2 为0.82时每摩尔 $5.1 \cdot 10^4$ 升。同样，图2中所示的结合等温线允许人们估计胆红素对BSA的亲合力，即 r^2 等于0.73时每摩尔 $1.2 \cdot 10^8$ 升。之所以选择这两个配体的例子，是因为它们对白蛋白具有不同的结合亲合力。胆红素是白蛋白唯一最充分研究的配体，估计具有每摩尔 $9.5 \cdot 10^7$ 升的平均结合亲合力(Peeters, T.Jr. (1996) All about Albumin. Academic Press, San Diego, 432pp p.97)。相反，茶碱对白蛋白的亲合力低得多，这使前者接近100%地与血清白蛋白结合，尽管后者与血浆中蛋白质的结合只有 $56 \pm 4\%$ (Goodman and Gillman (1996) The Pharmacological Basis of Therapeutics, 第9版, (Hardman, J.G. et al. eds). McGraw-Hill, New York)。由目前的技术获得的茶碱亲合力，可以推断出血浆中的结合分数(0.558，非常接近上面给出的实验获得的平均值0.56)，由此通过公开的方程式得出分布容积(Lombardo, F., Shalaeva, M.Y. et al. (2000) ElogPoct: A tool for lipophilicity determination in drug discovery. J. Med. Chem. 43, 2922-2928)。通过将这些数值进入方程式，可以获得每千克0.551升的人类的茶碱分布容积，这属于实验观测到的每千克 0.50 ± 0.16 升的范围(古德曼(Goodman)和吉尔曼(Gillman)，1996年，同上)。药物的分布容积是很重要的参数，其可以允许进一步计算给定剂量的药代动力学的曲线下面积(AUC)。

实施例2

胶体聚(苯胺)的获取如下：将多达10g的聚(乙烯醇)在200ml开水中溶解。然后对热溶液进行过滤，冷却至室温。然后通过加入16.8ml的12N盐酸将该溶液酸化。该溶液的一部分(100ml)被转移到4℃下放置在磁力搅拌器上的带有磁棒的一个干净的烧杯。搅动溶液，并注入0.25ml苯胺(Aldrich 24,861-4)。注入后立即添加刚刚溶解在5ml水中的658mg过二硫酸铵(Aldrich 24,861-4)。溶液在4℃下仍然保持

搅拌 48 小时。然后将该胶体通过色谱法，在 Sephacryl S-1000 柱上用含有 0.5% 吐温 20 的 pH8 的 0.1M 磷酸盐缓冲液洗脱以进行纯化。

缓冲液然后用盐酸或氢氧化钠滴定，并获得滴定过程中记录的各种 pH 值下的光谱(Ultrospec 2000 年，法玛西亚(Pharmacia))。该 pH 范围内与聚苯胺(800 纳米)逐步形成相对应的峰值吸收允许确定磷酸盐阴离子的 pKa 值(理论值: 7.21; 从曲线的计算值: 6.80)。这在图 3 有说明。

因此，正如本实施例所示，测定系统可用于测量分子包括候选药物的 pKa 值，这是一个关键参数，因为它对药代动力学(吸收和膜渗透)有显著的效果。

实施例 3

胶体金溶胶是按上述实施例 1 制备的。然后将胶体如上所述被入血清白蛋白(HSA, Sigma A-1653)涂敷，除了将胶体金设置在 pH 值为 5.5。然后将该试剂用如上的 50mM 硼酸盐进行缓冲，并且分别添加 150mM 氯化钠，吐温 20(0.2%)和鱼明胶(0.1%)进行进一步的稳定。

将地高辛(Fluka 37100)溶解在甲醇(100mg/l, 128 μ M)中，并进一步在 PBS 中稀释以生成分别含有 256, 128, 64, 25.8 和 12.8 nm 的样品溶液。这些样品(30 μ l)与加速缓冲液(120 μ l; 200mM 的 Tris-HCl pH 8, 其中含有 250mM 氯化镁, 70g/l 聚乙二醇 6000, 15g/l 聚乙二醇 35,000 和曲拉通 X-100 (Triton X-100) 10ml/l)混合。混合和反应是在 37°C 恒温下在临床化学分析仪(Cobas Mira Plus 分析仪, ABX 诊断仪, 法国蒙彼利埃(Montpellier))中且在一次性比色皿中进行的。在样品和缓冲液混合后，立即将金-HSA 共轭物(50 μ l)添加到反应混合物中。随后在 600 nm 进行缔合动力学分析，几分钟后，将超过 500 倍的地高辛(20 μ l)注入到反应混合物中，然后在自动化仪器的相同波长下进一步进行解离。结果如图 4 所示，箭头表示添加过量配体的时间。由缔合和解离曲线计算的线性回归提供了 0.86-0.99 之间的相关函数。

缔合和解离动力学分析允许计算药物-HAS 相互作用的平均亲和

力, 为每摩尔 $1.6 \pm 2.5 \cdot 10^5$ 升 (5 次分析的平均值 $\pm$ S.D.)。通过透析测定的地高辛对人血清白蛋白的表观亲和力为每摩尔 $1.85 \cdot 10^5$ 升 (Westphal, U. (1986) Steroid-Protein Interactions II. Springer-Verlag, Berlin, 603pp)。

实施例 4

金纳米粒子与聚(邻氨基苯甲酸)的复合胶体根据公布的美国专利申请 US20070172834 和公布的国际申请 W02006047371(安姬儿贝娜(Englebienne)和范·胡乃可(Van Hoonacker), 2006 年)的广泛描述来制备, 将其引入本文作参考。

复合溶液通过添加 50mM 醋酸钠在 pH 为 5 时进行缓冲。该复合溶液 (0.5ml) 然后与等体积的由 3% 醋酸构成并含有浓度不断增加的抗坏血酸的水溶液在室温下反应 10 分钟。空白溶液是通过在水中混合等体积的胶体和 3% 醋酸制备的。培育后, 在 600nm 处记录抗坏血酸样品对空白溶液的光密度变化, 并相对于抗坏血酸浓度绘制曲线, 以生成标准曲线。结果如图 5 所示。抗坏血酸是一种强还原剂, 可以使用强氧化剂生成一个类似的但相反的曲线, 这是因为胶体对氧化还原具有很强的敏感性。因此, 给定候选药物的氧化还原电位可以通过允许其在特定的 pH 值和浓度下与胶体反应, 并通过与如图 5 所示的例子中的已知氧化剂或还原剂的光学反应性相比较, 得到快速评估。作为一个例子, 分子 Trolox® (6-羟基-2,5,7,8-四甲基色满-2-甲酸), 一种水溶性维生素 E 衍生物, 当在相同条件下进行测试时, 显示出类似于抗坏血酸的氧化还原电位, 这完全符合公开的数据。

如本文所引用的供参考的国际公布 W003027656 的进一步描述, 新化学实体(NCE)、候选药物或先导化合物的氧化还原电位是可以导致决定该分子是否将进行进一步开发的重要参数。事实上, 虽然还原剂药物可以产生有益的治疗作用, 但氧化剂则可能是有毒性的(Shargel, L. and Yu, A.B.C. (1999) Applied Biopharmaceutics and Pharmacokinetics, 4th Ed. McGraw-Hill, New York, 768pp)。药物的氧化还原电位水平也会进一步控制它的代谢种类和速度, 因此可以

调节其药代动力学特征。

实施例 5

一系列已知药物的对 BSA 的亲合力已经根据实施例 1 中的步骤进行了测定。这些药物可以是不良的结合剂(对乙酰氨基酚和乙酰水杨酸), 中等的结合剂(红霉素、茶碱、氯苯那敏), 或高度的结合剂(水杨酸)。将计算出的每个结合对的亲合力常数的对数相对于从公布的数据(古德曼(Goodman)和吉尔曼(Gillman), 1996, 同上)获得的体内结合至血浆蛋白的百分比被绘制成曲线图。非线性的最小二乘回归提供了足够重要的相关函数的平方($r^2=0.95$), 以允许自信地从体外获得的白蛋白亲合力减去给定样品的体内血浆蛋白结合数据。血浆蛋白结合药物的级分允许人们计算其分布容积, 这是药物的药代动力学特征的一个必要参数。图 6 显示了从该例子中 6 种药物数据获得的表观分布容积(纵坐标) 和从体内药代动力学获得的分布容积(横坐标, 古德曼(Goodman)和吉尔曼(Gillman), 1996, 同上)之间的回归和相关函数。

实施例 6

表面显示有人血清白蛋白(HSA, Sigma A-1653)的含胶体金的纳米粒子如实施例 3 所述制备。将地高辛(Fluka 37100) 溶解在甲醇(100mg/1, 128 μ M)中, 并进一步在 PBS 中稀释以生成分别含有 12.8, 6.4, 2.5 和 1.25 μ M 米的样品溶液。这些样品和 PBS 空白溶液(100 μ l)被分别放置到带标签的一次性塑料管中, 向其中添加加速缓冲液(600 μ l; 200mM Tris-HCl pH8, 其中含有 250mM 氯化镁, 70g/1 聚乙二醇 6000, 15g/1 聚乙二醇 35,000 和 10ml/1 Triton X-100)和金-HSA 的共轭物(200 μ l)。经过涡旋混合, 在室温下培育塑料管 10 分钟。培育后, 在 540nm 下的光密度通过分光光度计(Ultrospec 2000, 法玛西亚(Pharmacia)进行记录, 空白液为零。每个样品光密度的增加相对于浓度被绘制成图。如图 7 所示。从两个这样的独立实验计算出的结合等温线, 得到的表观亲和力的平均值为 $7.5 \pm 2.3 \cdot 10^5$ 。通过透析确定的地高辛对人血清白蛋白的表观亲和力为每摩尔 $1.85 \cdot 10^5$ 升(韦斯特法尔(Westphal), 1986 年, 同上)。

实施例 7

将连续稀释的药物在室温下使用表面带有人血清白蛋白的胶体金纳米粒子一式两份培育 3 小时。将药品与蛋白质相互作用产生的紫外-可见光 (UV-vis) 信号相对于所添加的浓度绘制成图, 由结合等温线计算出表观亲和力常数。图 8 显示了这样的结合等温线的一个例子。图 9 显示了 6 种已知药物: 呋塞米、吲哚美辛、布洛芬、苯唑西林、丙咪嗪、萘普生的分析再现性。药物被随机分配到三个不同的板。将亲和力数据与从参考文献获得的数据进行对比。图 10 显示了使用本发明技术观测到的表观亲和力与从参考文献获得的表观亲和力(从血清蛋白结合百分比实验或计算所得)之间的相关性。虚线表示相同。

实施例 8

将连续稀释的药物在室温下使用表面带有人血清类粘蛋白($\alpha 1$ -酸性糖蛋白)的胶体金纳米粒子一式两份培育 2 小时。将药品与蛋白质相互作用产生的紫外-可见光 (UV-vis) 信号相对于所添加的浓度绘制成图, 由结合等温线计算出表观亲和力常数。图 11 显示了维拉帕米和红霉素的这样的结合等温线的例子。图 12 显示了再现性测定结果, 以及由 19 种已知药物观测到的表观亲和力与从参考文献获得的表观亲和力之间的相关性。这 19 种已知的药物是: 阿米替林, 氯苯那敏, 氯丙嗪, 丙咪嗪, 盐酸苯海拉明, 红霉素, 氟哌啶醇, 吲哚美辛, 丙咪嗪, 保泰松, 吲哚洛尔, 哌唑嗪, 泼尼松龙, 普萘洛尔, 奎尼丁, 筒箭毒碱, 丙戊酸盐, 维拉帕米和华法林。

实施例 9

根据实施例 1 所述的方法制备具有 40nm 胶体金奈米粒子的溶液。然后将所得胶体奈米粒子(pH 4.76)用 11-巯基十一烷酸(95%, Aldrich 450561)按如下方式进行涂覆: 将 100mL 胶体金溶液与 0.4mL 1:10 的吐温 20 (Aldrich 274238) 水溶液混合, 并且在室温下在磁力搅拌下培育 20 分钟。制得 11-巯基十一烷酸的 1mg/mL 乙醇溶液。将 200 微升(0.2ml; 200 μ g)该溶液在 9.8mL 乙醇中稀释并且在磁力搅拌下与胶体混合。然后将混合物在室温下培育 2.5 小时。这个操作步骤提供

通过由疏水性烷烃链所制成的膜（该膜通过硫醇粘附至粒子上并通过巯基十一烷酸的羧基在外部被终止）来完全稳定的奈米粒子，由此模拟生理学双层膜。该溶液的最终 pH (5.09) 近似于人的十二指肠。然后将该奈米粒子溶液以 1.:4 稀释在水中，将 0.198mL 该溶液用 Tecan Freedom EVO 移液管吸入至聚苯乙烯 96 孔板中。相同的自动化操作将在 DMSO (10mM) 中的已知药物溶液 2 μ L (配于) 分配成三份。制备含有 DMSO 的空白溶液孔。将这些溶液在室温下混合并培育 1 小时。药物与膜的相互作用通过 530nm 下的 LSPR 位移进行记录。求出上述数据的平均值，由于空白溶液只含有单独的 DMSO，因此从该平均值中减去空白液的 OD (光密度)。通过 Caco-2 细胞层发现了与药物表观渗透率的对数 ($\log$) 具有相关性 ($n=44$; $r^2=0.58$; $p<0.005$)。图 13 显示了获得的已知药物局部表面等离子体共振 (LSPR) 信号与 Caco-2 (结肠腺癌细胞) 渗透率常数 (文献数据) 之间的相关性。发现在人的体内药物吸收百分比与 LSPR 信号 (对应于药物与由人造膜包覆的金奈米粒子发生相互作用的程度) 之间存在相关性 ($n=57$; $r^2=0.78$)。图 14 显示了获得的已知药物局部表面等离子体共振 (LSPR) 信号和在肠道吸收的百分比之间的相关性。

实施例 10

测定已知药物的氧化还原电位。将给定最终浓度 (100 μ M) 的已知药物被放入 pH4 的导电聚合物的缓冲液 (聚 [苯胺-2-羧酸], PANI-COOH) 中。溶液在室温下混合并培育 (10 分钟)。光密度在 450nm 处进行读取, 以同样方式制备包含药物和酞酸盐缓冲液的样品空白液, 培育并读取数据。从导电聚合物反应混合物的 450nm 处 OD (光密度) 值减去空白液的 450nm 处 OD 值。图 15 显示了 PANI-COOH 与已知化合物反应后的 450nm 信号与它们各自的还原电位 (参考文献数据) 之间的相关性。发现 450nm 信号与已知分子的还原电位之间为线性关系 (图 15), 这就允许推断出新化学实体 (NCE) 的还原电位。

对含有 60 种已知药物的库的筛选允许鉴定出作为较强氧化剂 ($E = -364\text{mV}$) 的溴隐亭、作为较强还原剂的吡唑啉和氯磺丙脲 ($E=747$ 和 848

mV)，这与文献数据是一致的(沃德曼(Wardman)，1989年)。虽然还原剂药物可以产生有益的治疗作用，但氧化剂则可能是具有毒性的。药物的氧化还原电位水平也会进一步控制它的代谢种类和速度，因此可以调节其药代动力学特征(沙格尔(Shargel)和余(Yu)，1999年，同上)。

实施例 11

根据实施例 1 所述的方法制备金奈米粒子的溶液。然后制备具有 pH 2-12 的一系列 50mM 缓冲液(磷酸盐[pH2、3、6、7、8]、醋酸[pH4 和 5]以及硼酸盐[pH9、10、11、12])，再用胶体金溶液稀释 5 倍。记录所得 10mM 缓冲胶体的最终 pH。然后将药物溶液(10 μ l, 100mM, 在 DMSO 中)吸取到 1mL 缓冲胶体中，将该混合液涡旋混合。在培育 30 分钟之后，将该溶液吸取至 96 孔聚苯乙烯板上，记录在 620nm 和 525nm 处的 O.D. (光密度)。计算 O.D. 620nm/ O.D. 525nm。该比例涉及胶体的凝集(即，该比例越高，凝集越多)。典型地，分子的离子化产生可能促进胶体凝集的电荷。因此，用缓冲胶体金滴定分子在 pH 的范围可允许人们从 S 形曲线(绘自于凝集的对未凝集的胶体作为 pH 的函数)的截距中点(interpolated mid-point)来测定电离常数。这样的滴定曲线的实例(奎宁定)示于图 16 中。下面的表 I 比较了得自本方法的 pKa 结果与得自参考文献的参比数值。图 17 显示了胶体金的测量的 pKa 值与预期的 pKa 值之间的相关性($n=7$; $r^2=0.89$)。

表 I. 比较通过 1mM 药物的胶体金 pH 滴定所得的 pKa 值与来自 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, 第 5 版, Lippincott, Williams and Wilkins, Philadelphia, PA, pp.1070-1079 的参比数据

药物	观察到的 pKa	参考文献的 pKa
阿司匹林	3.3	3.5
氨苯砜	3.9	2.4
多西环素	4.3 (1)	3.4 (1)
	8.7 (2)	9.3 (2)
红霉素	6.9	8.8
吲哚美辛	5.1	4.5
萘夫西林	3.0	2.7
对乙酰氨基酚	9.5	9.4
奎宁丁	7.4	8.5

如同这些数据所显示的，被描述在本实施例中的方法允许人们检测在一定 pH 范围内的药物的 pKa。与参比数值的差异是因为在现有技术中 DMSO 的存在 (Bordwell, F.G. (1988) Equilibrium acidities in dimethyl sulfoxide solution. Acc. Chem. Res. 21, 456-463)。

从上面的讨论和结果可以看出，本发明提供了一个重要的新型测定方法，其可以用于药物发现过程的早期，新化学实体 (NCE)、候选药物和先导化合物的 PK/ADME-Tox 特性的快速高通量测定的各种不同的应用中。例如，在药物发现和开发应用中使用本发明胶体提供了超过目前使用中的涉及将结合体从游离组分中物理分离的放射性、色谱和质谱的技术，这是因为胶体导电聚合物、胶体金属及其复合物可用于均相“混合并读取”分析。该分析可通过各种仪器实施，并且对本领域技术人员来说，很明显可以使用许多光子检测系统。本发明的分析系统可以用于新化学实体 (NCE)、候选药物和先导化合物的体外 PK/ADME-TOX 筛选的许多方面，例如与血浆蛋白的结合、与膜的相互作用、对代谢酶的活动、疏水性、电荷相互作用、氧化还原电位，这些是几个代表性的应用。因此，本发明对现有技术做出了重大贡献。

虽然上述发明为了澄清理解已经通过附图和实施例进行了详细的

描述，对本领域普通技术人员显而易见的是，在本发明的技术教导下，可以在不偏离权利要求的精神实质或范围的情况下做出某些改变和修改。

因此，上述说明仅仅是说明了本发明的原理。应该理解为，本领域技术人员能够设计出虽然本文没有明确说明或显示但体现了发明的原则并包含在本发明的精神实质和范围之内的各种安排（排列）。进而，本文陈述的所有实施例和条件性用语主要目的是为了帮助读者理解发明人做出了贡献的发明的原则和概念以推动该技术，并且应理解为本发明不限于这些具体的实施例和条件。而且，本文所陈述的本发明的原则、方面、实施方案以及具体的实施例，是为了包括与其结构上和功能上等同的内容。此外，这些等同内容也应该既包括目前已知的等同内容，也包括未来将要开发的等同内容，即，任何开发的执行相同功能的元素，无论结构是否一样。因此，本发明的范围不限于本文表示和描述的示例性实施方案。更确切地说，本发明的范围和精神实质体现在所附的权利要求中。

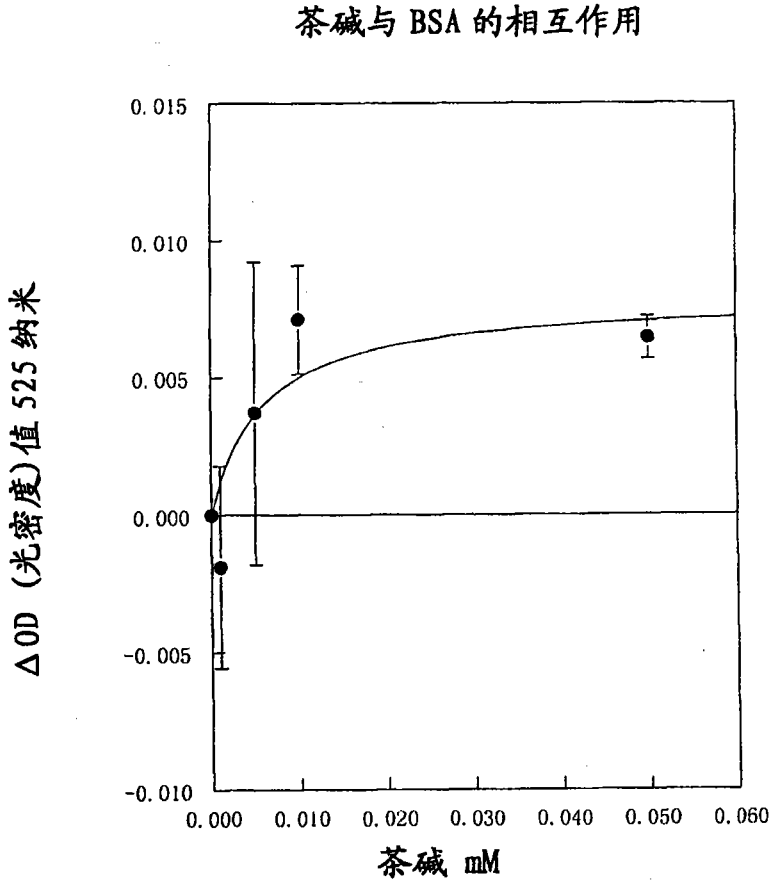


图1

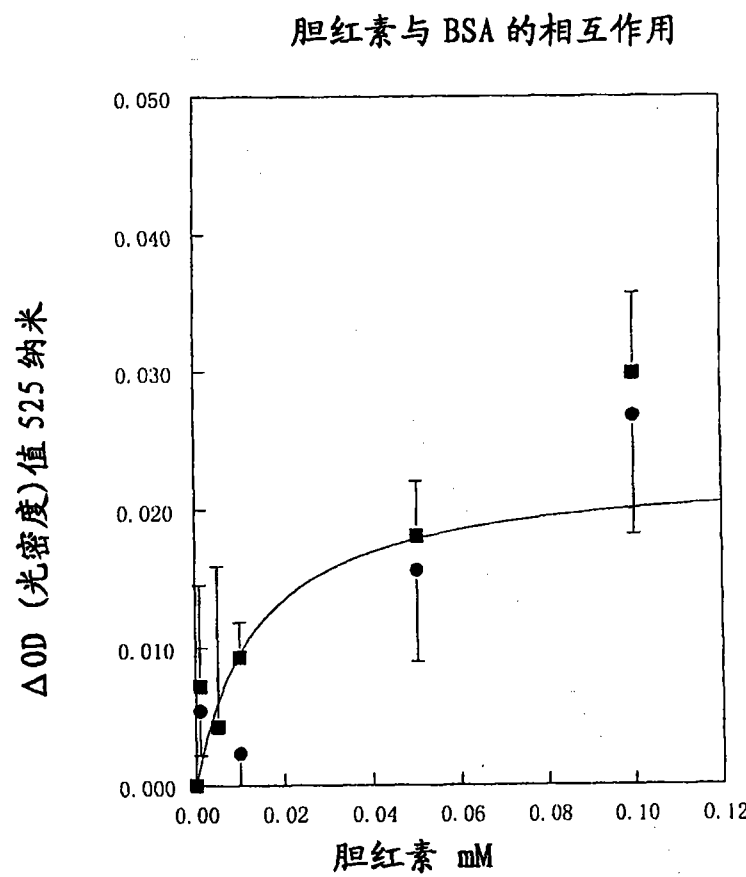


图 2

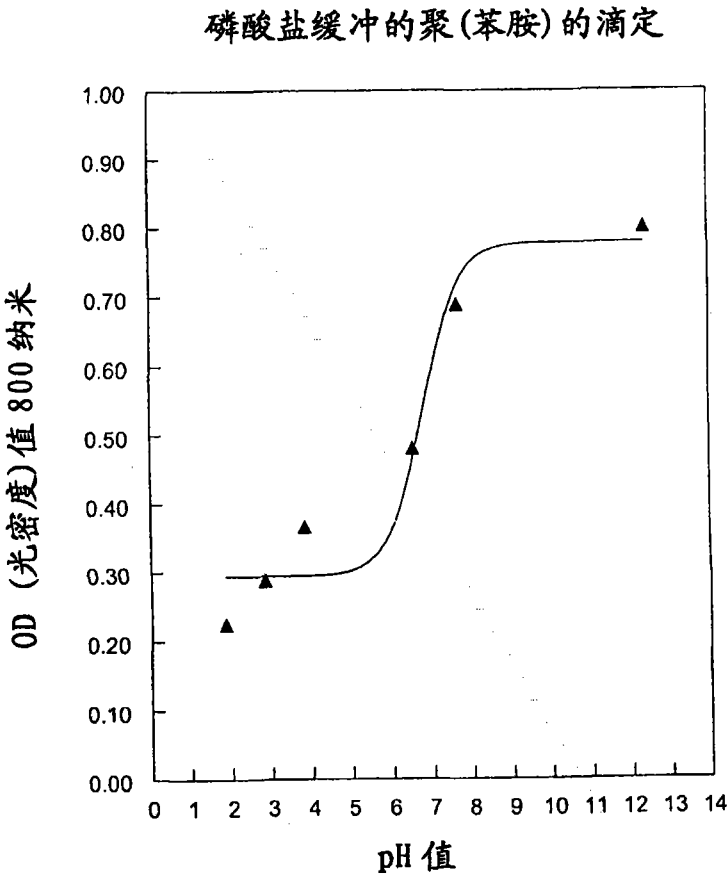


图 3

HAS-地高辛的缔合与解离的动力学

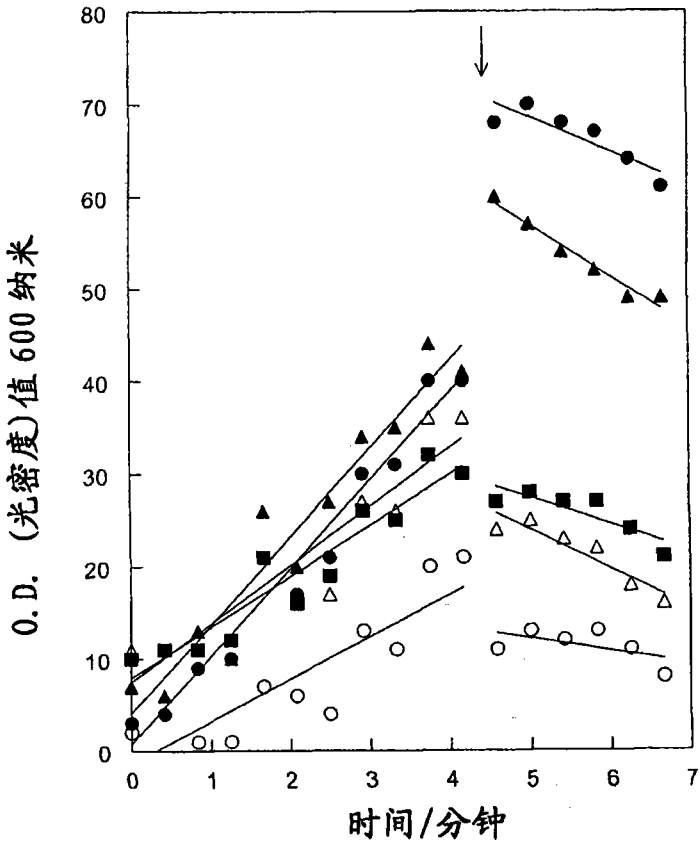


图 4

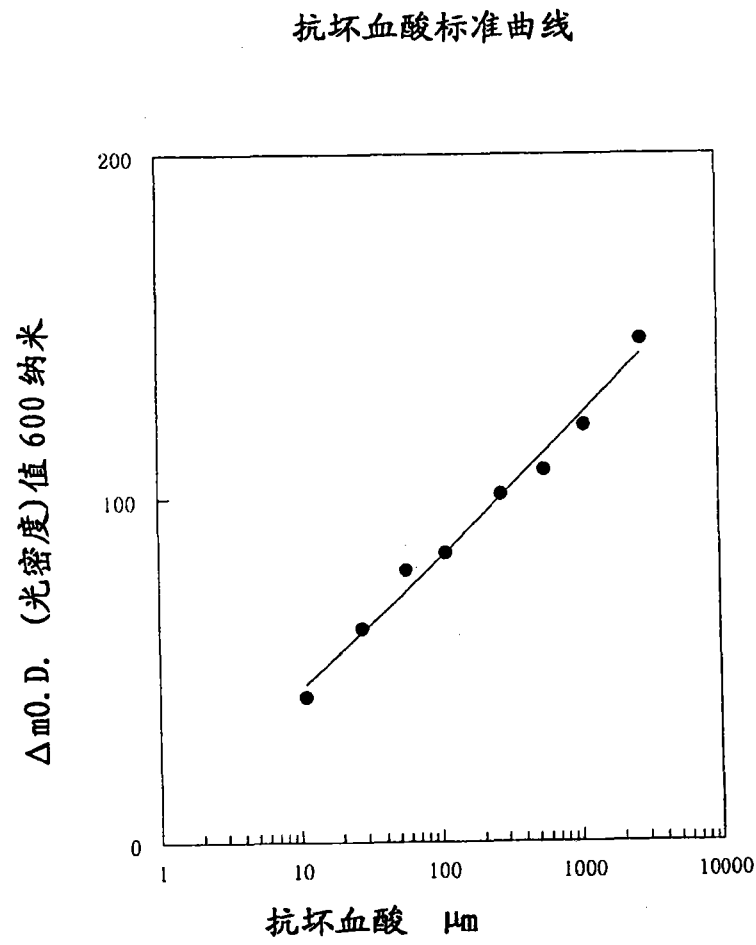


图5

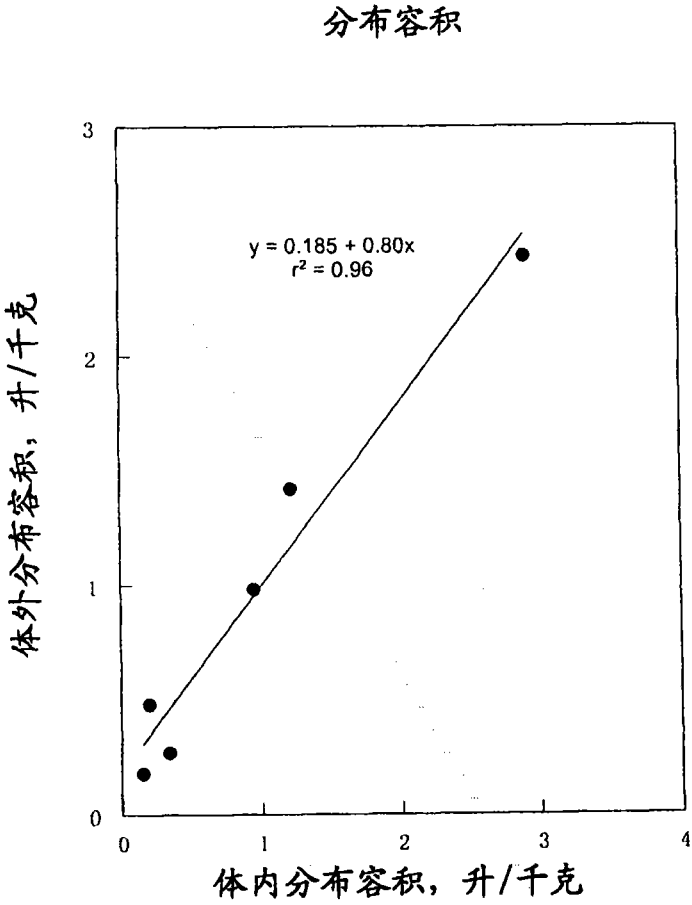


图6

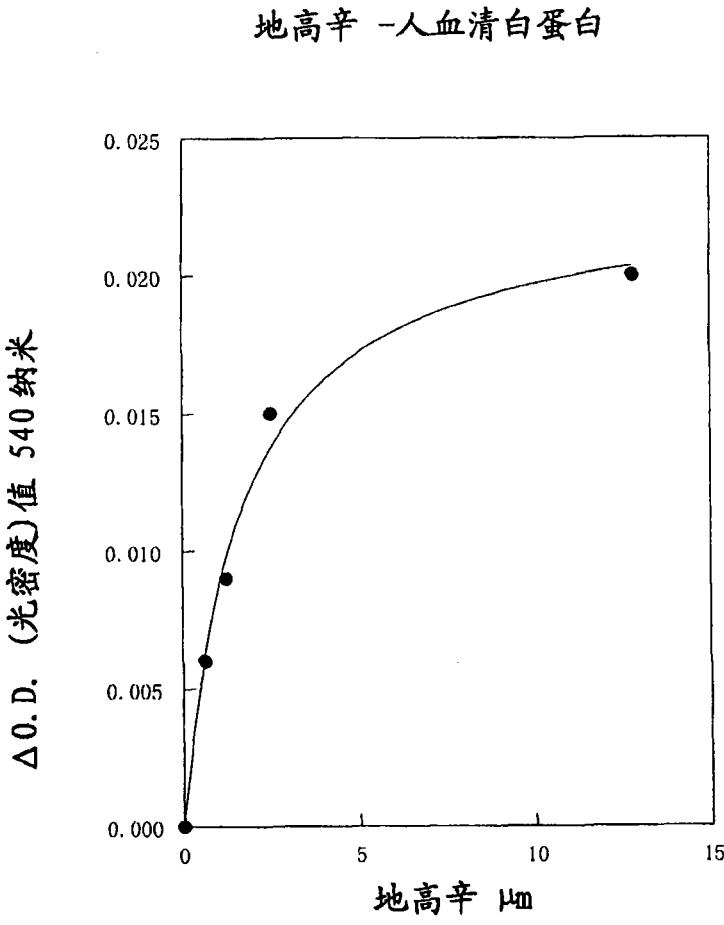


图7

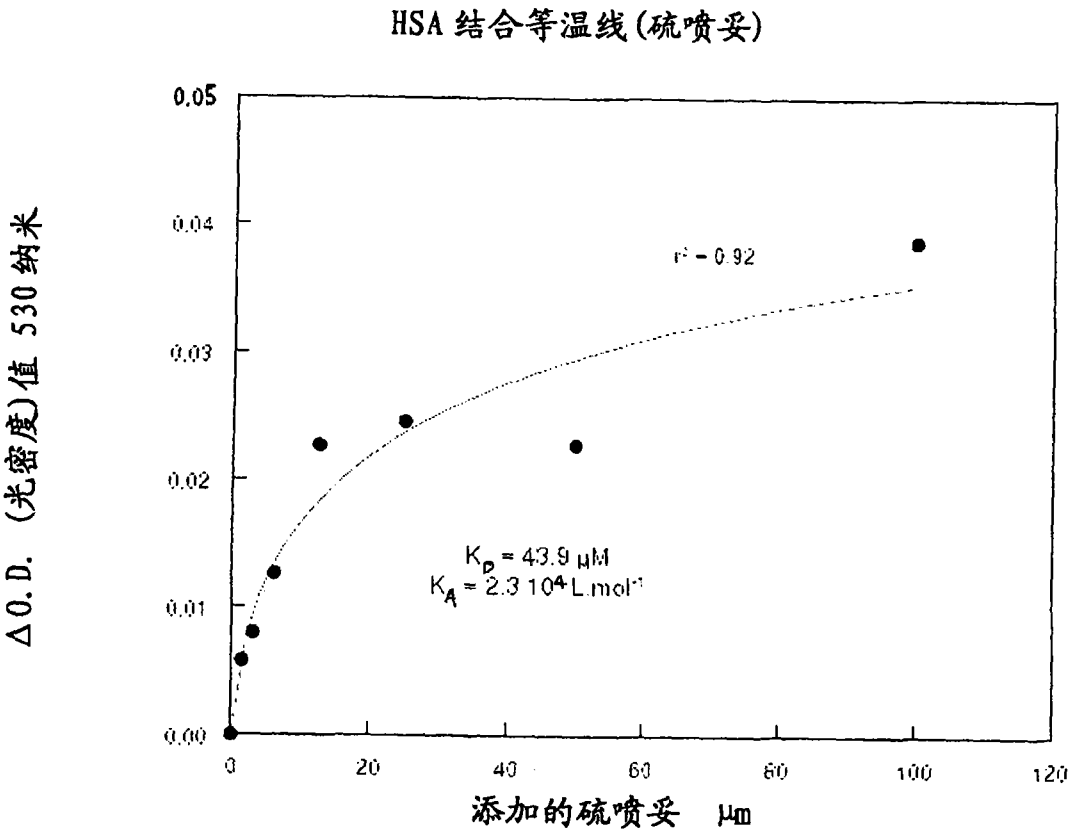


图 8

观察到的和预期的表观亲和力 (log) 之间的相关性

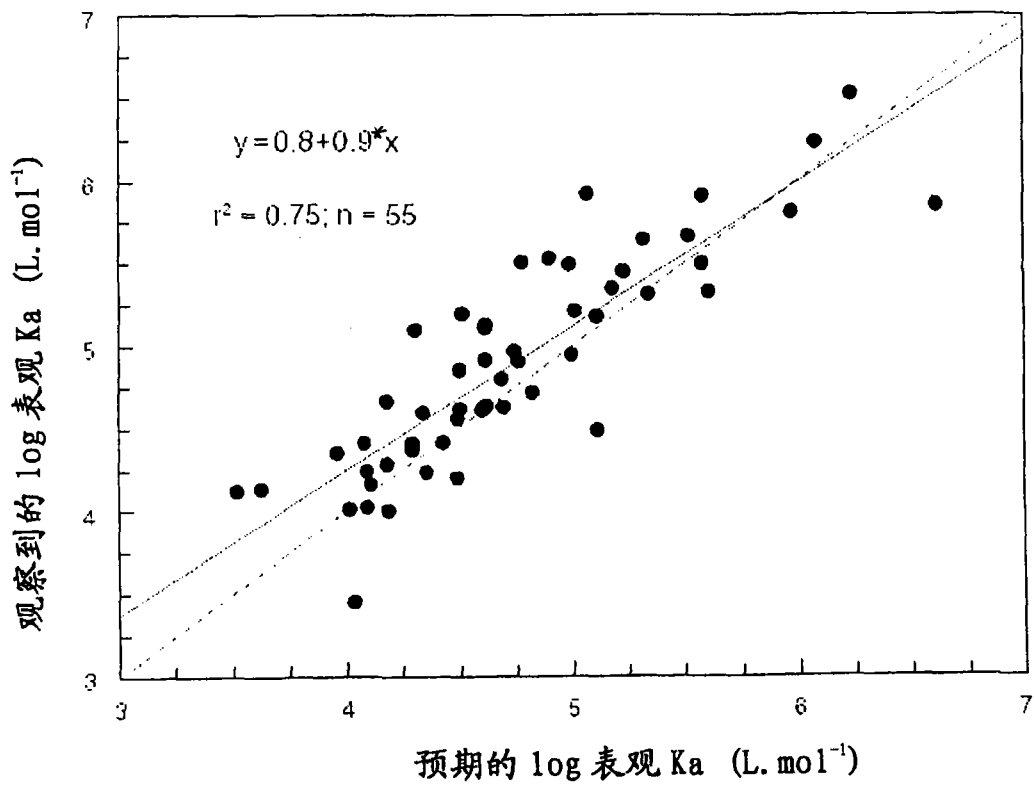


图10

血清类粘蛋白结合等温线(维拉帕米和红霉素)

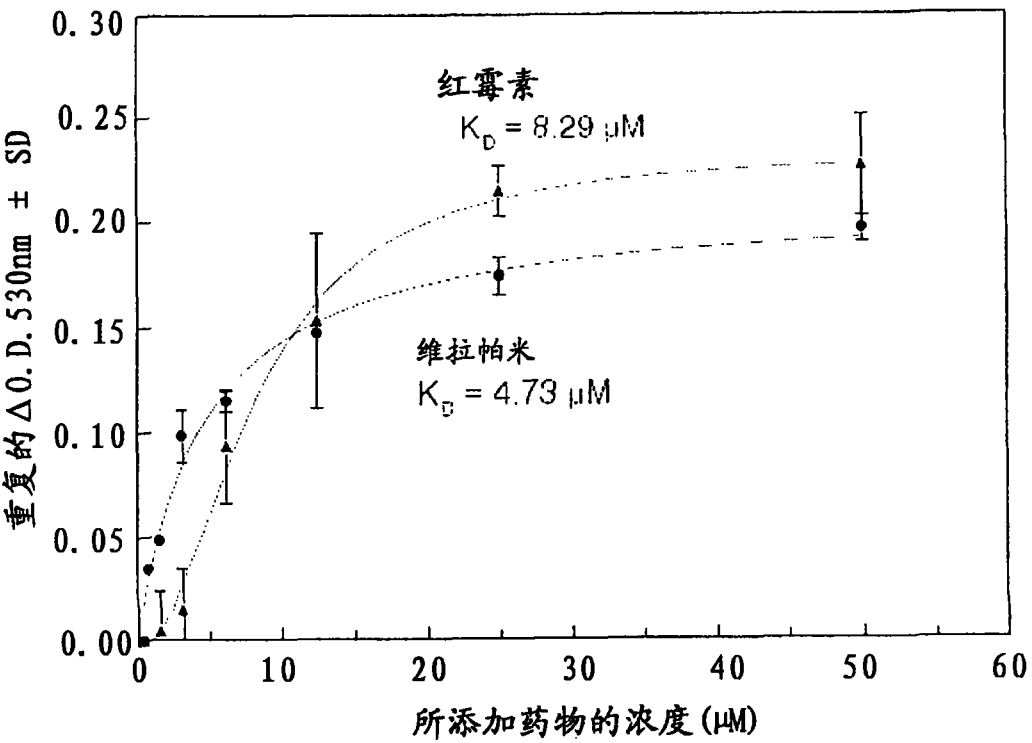


图 11

血清类粘蛋白与参考文献数据的相关性以及再现性

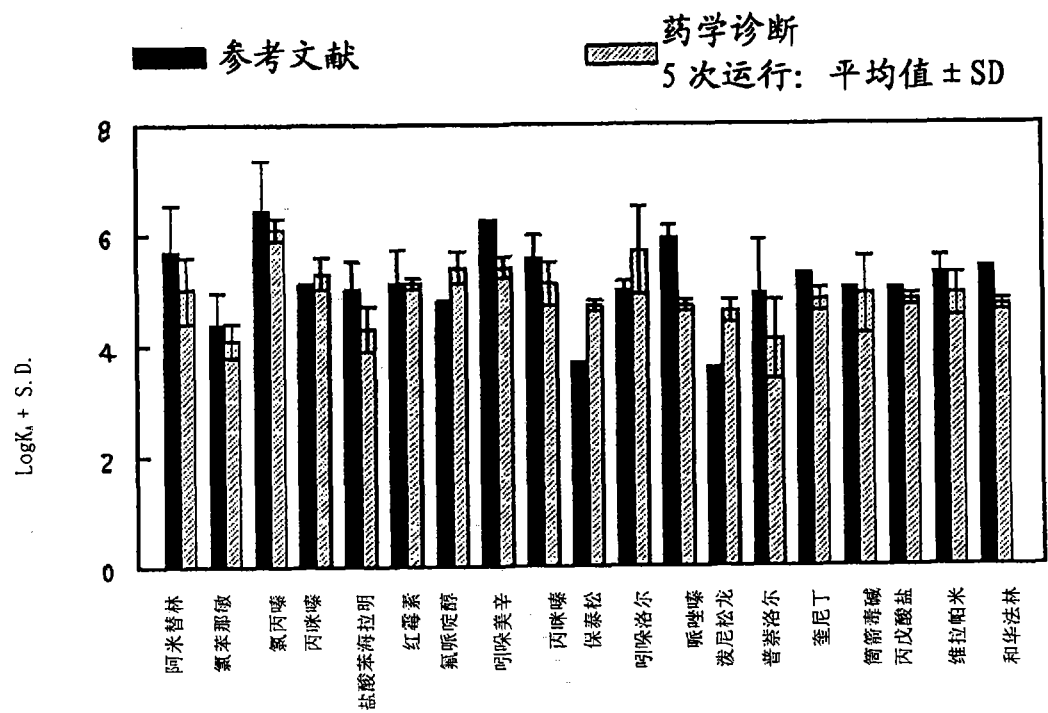


图 12

已知药物的 LSPR 信号与 Caco-2
渗透率常数(参考文献数据)之间的相关性

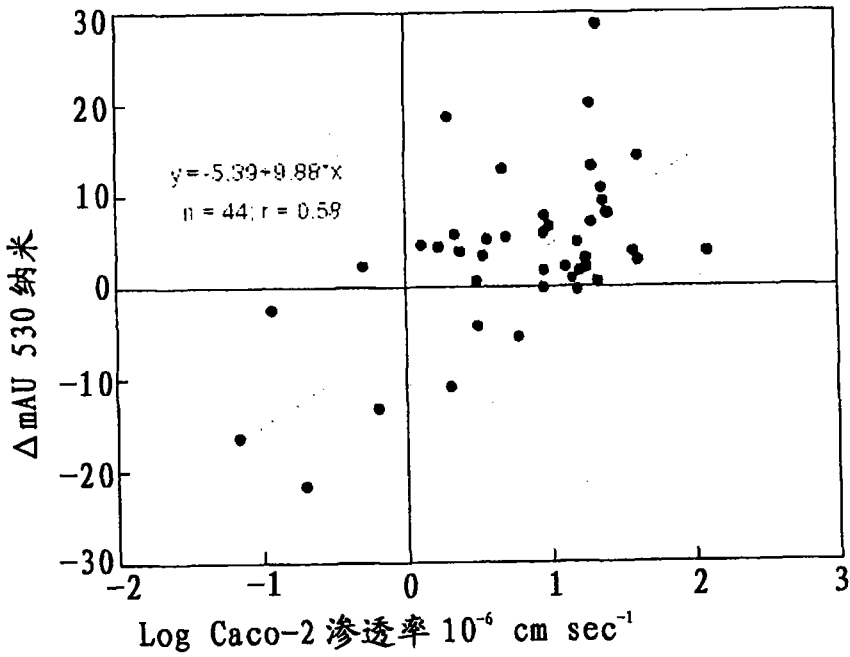


图13

已知药物的 LSPR 信号与口服给药
吸收百分比（参考文献数据）之间的相关性

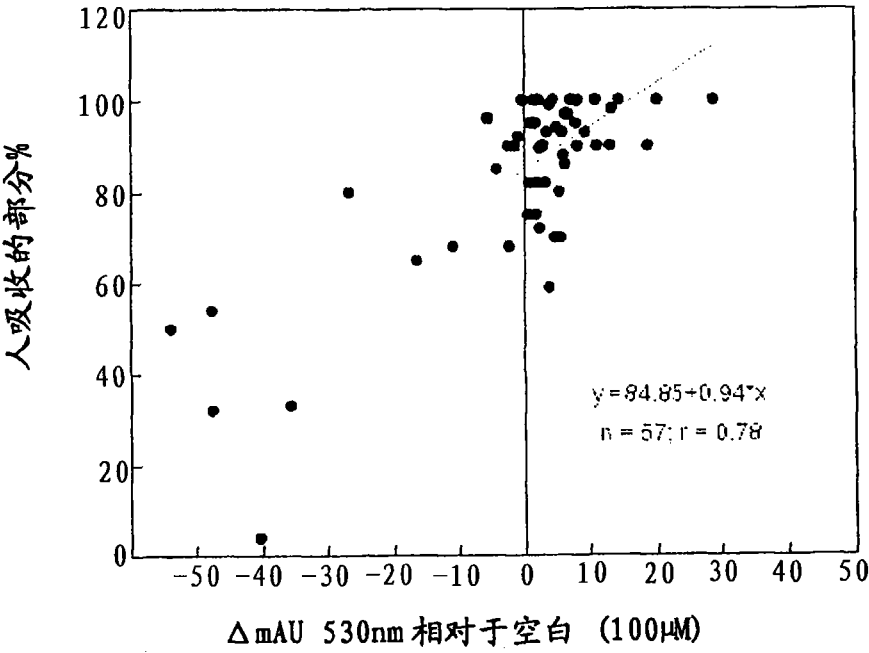


图14

使用聚苯胺羧基 (PANI-COOH) 的氧化还原电位分析

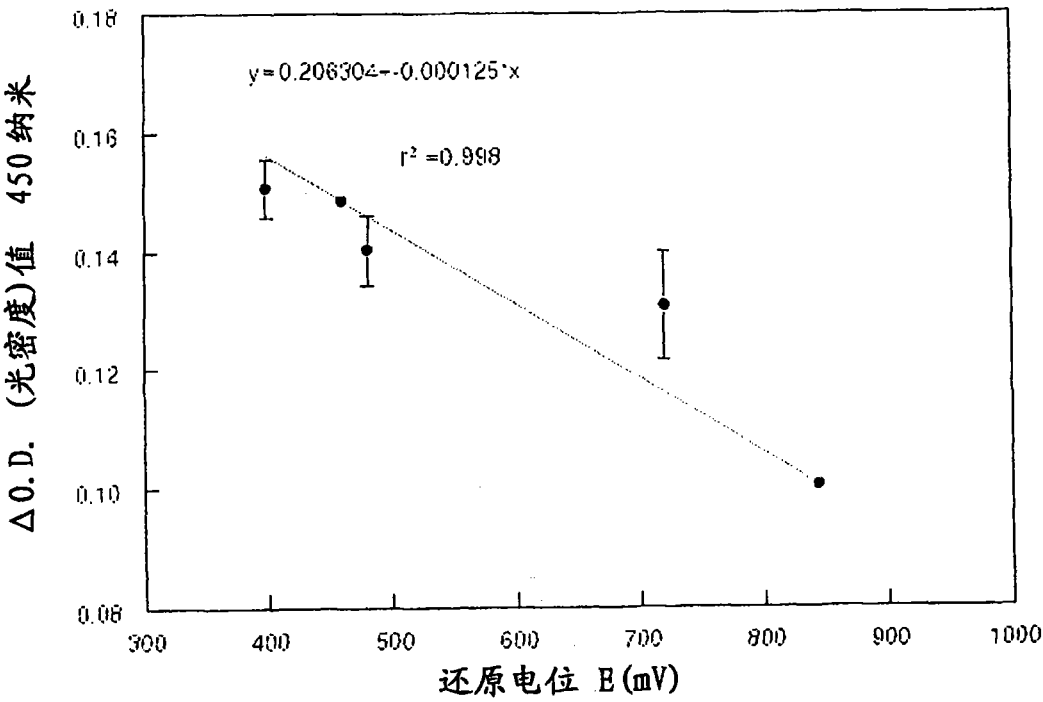


图15

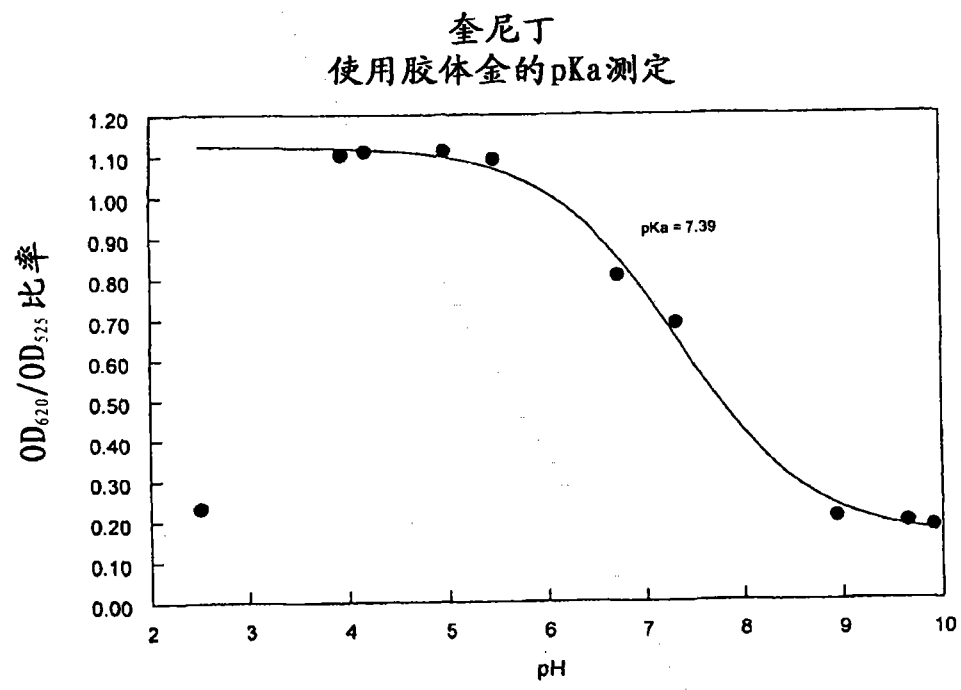


图16

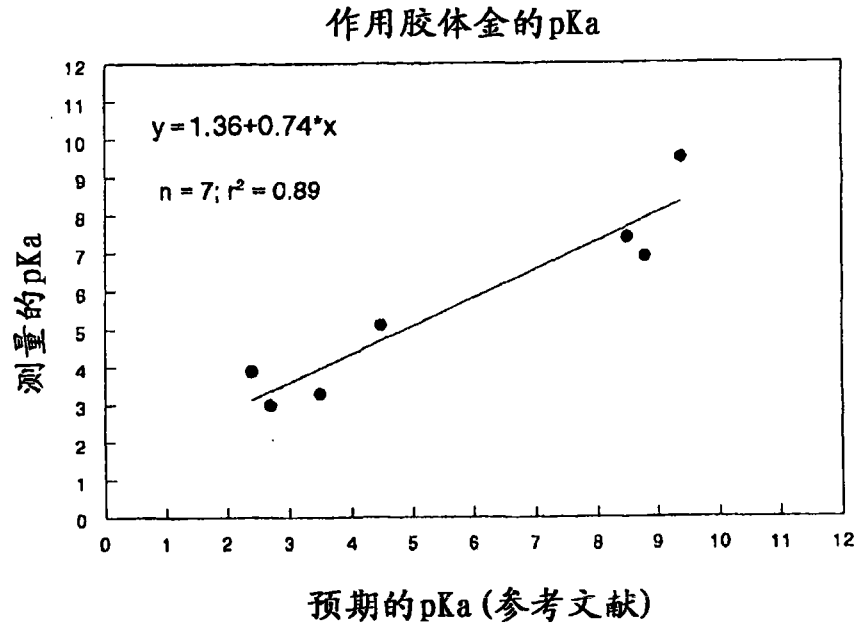


图17