



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 01815353.4

[43] 公开日 2003 年 10 月 29 日

[11] 公开号 CN 1452719A

[22] 申请日 2001.7.5 [21] 申请号 01815353.4

[30] 优先权

[32] 2000. 7. 7 [33] US [31] 09/611,835

[86] 国际申请 PCT/US01/21292 2001. 7. 5

[87] 国际公布 WO02/04946 英 2002. 1. 17

[85] 进入国家阶段日期 2003. 3. 7

[71] 申请人 康宾纳特克斯公司

地址 美国麻萨诸塞州

[72] 发明人 B·R·斯托克维尔 A·波里西

M·A·福利

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

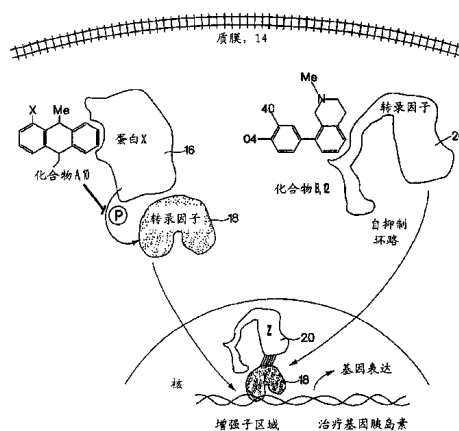
代理人 关立新 徐雁漪

权利要求书 6 页 说明书 25 页 附图 6 页

[54] 发明名称 鉴定用作治疗剂的实体组合的方法

[57] 摘要

本发明涉及使用组合阵列筛选具有生物活性的双实体或更高级组合的方法。所述方法包括下列步骤：(a) 提供实体，(b) 产生实体的组合阵列，(c) 提供由一种或多种生物成分组成的测试元件，(d) 将实体组合阵列与测试元件在保证每一实体/测试元件接触都彼此分隔的条件下接触，(e) 检测或测定测试元件的性质，和(f) 鉴定出引起不同于组合中的实体自身的作用的对测试元件的作用的实体组合。



1. 筛选具有生物活性的双实体或更高级组合的方法，所述方法在包括至少 49 个不同实体组合的至少 7×7 组合阵列中使用至少 7 种实体，所述方法包括下列步骤：
 - 5 (a) 提供所述实体，
 - (b) 产生所述实体的组合阵列，
 - (c) 提供由一种或多种不同生物成分组成的测试元件，
 - (d) 将所述实体组合阵列与所述测试元件在保证每一实体/测试元件接触都彼此分隔的条件下接触，
 - 10 (e) 检测或测定测试元件的性质，和
 - (f) 鉴定出引起不同于组合中的实体自身的作用的对测试元件的作用的实体组合。
2. 权利要求 1 的方法，其中步骤 (b) 和 (d) 包括依次将所述实体与所述测试元件接触，由此在所述测试元件存在下产生所述阵列。
- 15 3. 权利要求 1 的方法，其中所述测试元件包括两个或更多个不同的生物成分。
 4. 权利要求 3 的方法，其中所述测试元件包括活细胞。
 5. 权利要求 4 的方法，其中所述检测步骤 (e) 是通过细胞印迹测定进行的。
 - 20 6. 权利要求 4 的方法，其中所述检测步骤 (e) 是通过报道基因测定进行的。
 7. 权利要求 4 的方法，其中所述检测步骤 (e) 是通过荧光共振能量传递测定进行的。
 8. 权利要求 4 的方法，其中所述检测步骤 (e) 是通过检测荧光钙结合指示剂染料来进行的。
 - 25 9. 权利要求 4 的方法，其中所述检测步骤 (e) 采用荧光显微镜检查。
 10. 权利要求 4 的方法，其中所述检测步骤 (e) 采用表达特征测定。
 - 30 11. 权利要求 4 的方法，其中所述细胞是人细胞。
 12. 权利要求 4 的方法，其中所述细胞选自癌细胞、免疫细胞、神经元和成纤维细胞。

13. 权利要求 1 的方法，其中所述测试元件包括不含细胞的培养基，所述培养基包含至少两种有机生物分子和至少一种报道分子。
14. 权利要求 1 的方法，其中步骤 (b) 和 (d) 其中的一个或两个步骤是用机器人系统进行的。
- 5 15. 权利要求 1 的方法，其中步骤 (b) 和 (d) 其中的一个或两个步骤是用微流控技术进行的。
16. 权利要求 1 的方法，其中步骤 (b) 和 (d) 其中的一个或两个步骤是用喷墨打印机技术进行的。
17. 权利要求 1 的方法，其中所述实体是化合物、离子或放射。
- 10 18. 权利要求 17 的方法，其中所述化合物选自非聚合有机化合物、脂质、碳水化合物、肽、无机化合物和低聚核苷酸。
19. 权利要求 17 的方法，其中所述放射选自可见光、可见光范围之外的光和离子化放射。
20. 权利要求 1 的方法，其中至少一种所述实体是以纯化形式使用的化合物。
- 15 21. 权利要求 20 的方法，其中每种所述化合物是以纯化形式使用。
22. 权利要求 1 的方法，其中所述实体是作为混合物的组分提供的化合物。
- 20 23. 权利要求 22 的方法，其中所述混合物是天然产物提取物。
24. 权利要求 1 的方法，其中所述作用是协同作用。
25. 治疗患者的方法，包括给所述患者施用依据权利要求 1 的方法鉴定的组合。
26. 依据权利要求 1 的方法鉴定的实体组合。
- 25 27. 药物组合物，其中包含 (i) 依据权利要求 1 的方法鉴定的实体组合，和 (ii) 可药用载体。
28. 筛选具有生物活性的双实体或更高级组合的方法，所述方法包括下列步骤：
- (a) 由一组实体产生至少 200 个独立的双实体或更高级组合的阵列，
- 30 (b) 提供包括一种或多种不同生物成分的测试元件，
- (c) 将实体组合阵列与所述测试元件在保证每一实体/测试元件接触都彼此分隔的条件下接触，

- (d) 检测或测定测试元件的性质, 和
- (e) 鉴定出引起不同于组合中的实体自身的作用的对测试元件的作用的实体组合。
29. 权利要求 28 的方法, 其中步骤 (a) - (c) 包括依次将所述实体
5 与所述测试元件接触, 由此在所述测试元件存在下产生所述阵列。
30. 权利要求 28 的方法, 其中还包括下述步骤: (f) 将步骤 (a) - (e) 重复至少 2 次, 其中在步骤 (a) 中, 所述至少 200 个组合的阵列在每次重复中不同。
31. 权利要求 30 的方法, 其中步骤 (f) 的至少两次重复是彼此在
10 10 天内进行的。
32. 权利要求 28 的方法, 其中所述阵列包括至少 400 个独立的组合。
33. 权利要求 28 的方法, 其中所述阵列包括至少 1540 个独立的组合。
- 15 34. 权利要求 28 的方法, 其中所述实体是化合物、离子或放射。
35. 权利要求 34 的方法, 其中所述化合物选自非聚合有机化合物、脂质、碳水化合物、肽、无机化合物和低聚核苷酸。
36. 权利要求 34 的方法, 其中所述放射选自可见光、可见光范围之外的光和离子化放射。
- 20 37. 权利要求 28 的方法, 其中至少一种所述实体是以纯化形式使用的化合物。
38. 权利要求 28 的方法, 其中每种所述化合物是以纯化形式使用。
39. 权利要求 28 的方法, 其中所述实体是作为混合物的组分提供的
25 的化合物。
40. 权利要求 38 的方法, 其中所述混合物是天然产物提取物。
41. 权利要求 28 的方法, 其中所述作用是协同作用。
42. 权利要求 28 的方法, 其中步骤 (a) 和 (c) 其中的一个或两个步骤是用机器人系统进行的。
- 30 43. 权利要求 28 的方法, 其中步骤 (a) 和 (c) 其中的一个或两个步骤是用微流控技术进行的。
44. 权利要求 28 的方法, 其中步骤 (a) 和 (c) 其中的一个或两个步

骤是用喷墨打印机技术进行的。

45. 治疗患者的方法，包括给所述患者施用依据权利要求 28 的方法鉴定的组合。

46. 依据权利要求 28 的方法鉴定的实体组合。

5 47. 药物组合物，其中包含(i) 依据权利要求 28 的方法鉴定的实体组合，和(ii) 可药用载体。

48. 筛选具有生物活性的双实体或更高级组合的方法。所述方法包括下列步骤：

(a) 产生至少 49 个独立的双实体或更高级组合的阵列，

10 (b) 提供包括一种或多种不同生物成分的测试元件，

(c) 将所述实体组合阵列与所述测试元件在保证每一实体/测试元件接触都彼此分隔的条件下接触，

(d) 检测或测定测试元件的性质，

15 (e) 鉴定出引起不同于组合中的实体自身的作用的对测试元件作用的实体组合，和

(f) 在一周的时间内将步骤(a) - (e)重复至少 25 次，其中在每次重复中使用不同的阵列。

49. 权利要求 48 的方法，其中在 30 天的时间内将步骤(a) - (e)重复至少 100 次，并且其中在每次重复中使用不同的阵列。

20 50. 权利要求 48 的方法，其中所述实体是化合物、离子或放射。

51. 权利要求 50 的方法，其中所述化合物选自非聚合有机化合物、脂质、碳水化合物、肽、无机化合物和低聚核苷酸。

52. 权利要求 50 的方法，其中所述放射选自可见光、可见光范围之外的光和离子化放射。

25 53. 权利要求 48 的方法，其中所述实体是以纯化形式使用的化合物。

54. 权利要求 48 的方法，其中所述实体是作为混合物的组分提供的化合物。

55. 权利要求 54 的方法，其中所述混合物是天然产物提取物。

30 56. 权利要求 48 的方法，其中所述作用是协同作用。

57. 权利要求 48 的方法，其中步骤(a)和(c)其中的一个或两个步骤是用机器人系统进行的。

58. 权利要求 48 的方法，其中步骤 (a) 和 (c) 其中的一个或两个步骤是用微流控技术进行的。

59. 权利要求 48 的方法，其中步骤 (a) 和 (c) 其中的一个或两个步骤是用喷墨打印机技术进行的。

5 60. 筛选具有生物活性的双实体或更高级组合的方法，所述方法包括下列步骤：

(a) 由一组实体产生至少 10000 个独立的双实体或更高级组合的阵列，

(b) 提供包括一种或多种不同生物成分的测试元件，

10 (c) 将实体组合阵列与测试元件在保证每一实体/测试元件接触都彼此分隔的条件下接触，

(d) 检测或测定测试元件的性质，

(e) 鉴定出引起不同于组合中的实体自身的作用的对测试元件的作用的实体组合，和

15 (f) 在 10 天或更少的时间内将步骤 (a) - (e) 重复至少 2 次，其中在步骤 (a) 中，至少 10000 个双实体组合的阵列在两次或更多次重复中不同。

61. 筛选具有生物活性的实体组合的方法，所述方法包括下列步骤：

20 (a) 提供包括一种或多种不同生物成分的测试元件，

(b) 将测试元件与至少 100 种实体在保证每一实体/测试元件接触都彼此分隔的条件下接触，

(c) 检测或测定测试元件的性质，

25 (d) 选择引起性质改变的实体，其中所述性质改变是相对于未与所述实体接触的测试元件的性质而言的，

(e) 由所鉴定的实体产生至少 49 个独立的双实体或更高级组合的阵列，

(f) 将实体组合阵列与测试元件在保证每一实体组合/测试元件接触都彼此分隔的条件下接触，

30 (g) 检测或测定步骤 (f) 的测试元件的性质，和

(h) 鉴定出引起不同于组合中的实体自身的作用的对所述步骤 (g) 测试元件性质的作用的实体组合。

62. 权利要求 61 的方法，其中步骤(a)的测试元件与步骤(f)的测试元件相同。

63. 权利要求 61 的方法，其中步骤(c)的测试元件性质与步骤(g)的测试元件性质相同。

鉴定用作治疗剂的实体组合的方法

发明背景

5 许多病症与众多表型改变有关。这在临床上很早以前就有所表现，但直到最近，在基因学上的进展才在分子水平上证实了这一观察结果。例如，癌细胞的表达研究已揭示了数百个由多个体细胞突变引起的基因表达改变。此外，人的细胞和组织参与体内稳态机制，这样它们经常包含大量自身调节性信号传导系统。引起细胞状态改变的天
10 然信号经常不是递送到单一靶位点上，而是递送到合适的组合的靶位点上。因此，多个变量的适当改变了具有高度特异性影响。

相反，出于历史方面和技术上的原因，药物、化学和生物研究人员是把注意力集中在引起生物作用的单一、个别分子上。这一研究方式得以鉴定出作用于特异蛋白的小的有机分子，提供了对生物和医药
15 都有价值的物质。这些分子还用作这样的蛋白生物功能探针，它们可具有治疗相关性，并且通过起化学蛋白剔除的作用，由此引起蛋白功能损失来有效地阐明信号传导途径。此外，由于这些小分子与特定的生物靶位点相互作用，并且它们能够影响特定生物功能，因此它们还可用作开发治疗剂的候选物质。

20 因为不能预测哪些小分子与生物靶位点相互作用，所以在生成大量小有机分子方面付出了巨大努力。之后将这些分子集中到所谓的化合物“库”中，以建立具有适当所需特征的“多样库”。这样的多样库可以由预存在的小分子集合生成，或者可以用“组合化学”来生成。可将这些库联系起来进行灵敏的筛选，以鉴定出活性分子(Stockwell
25 等人. Chem. Biol. 1999, 6, 71-83)。

在许多情况下，研究人员开发了偏差库，其中所有成员共享特定的特征，例如能够与靶蛋白相互作用，或设计用来模拟一类天然化合物的特定方面的特征性结构特征。例如，已设计了多个库来模拟天然
30 肽的一种或多种特征。这样的“肽模拟”库包括邻苯二甲酰亚氨基库(WO 97/22594)、噻吩库(WO 97/40034)和苯并二氮杂卓库(US 专利 5,288,514)。已经合成了具有天然产物的结构特征、并且与小型基于细胞的测定相容的一个库(Tan 等人. J. Am. Chem. Soc. 1998, 120,

8565)。

现代药物开发方法在很大程度上是建立于迅速测定出化合物对生物过程的作用的能力上。在制药工业，注意力已集中于鉴定出能够阻断、减轻或甚至是增强生物分子之间相互作用的化合物上。具体来说，
5 在生物系统中，受体与其蛋白配体之间的相互作用可经常直接或经由某些下游事件导致对该系统的有害或有益作用，并因此给寻找其治疗的患者带来有害或有益的作用。因此，长期以来，研究人员一直在寻找能减轻、阻断或甚至是增强这样的受体/配体相互作用的化合物。

设计高效率筛选系统以克服在现有生化且基于细胞的测定的效率
10 方面受到的实际限制。传统的有机化合物合成和传统的生物测定需要大量的时间、人力以及熟练的技能。筛选大量化合物使得必须减少与每次筛选有关的对时间和人力的需求。

因此，对于开发新的药物活性剂，高效率筛选不同的分子集合在寻找先导化合物中起关键作用。输入到这些高效率筛选中的是化合物的库，所述库是用预存在的化学合成分子(例如用制药公司所拥有的库)、天然产物(例如微生物发酵肉汤)和通过组合化学技术生成的新库
15 (Tan 等人. *J. Am. Chem. Soc.* 1998, 120, 8565)。这样的库由最高达一百万种化合物组成，这提高了找到具有所需特征以用作先导药物候选者的一种化合物的可能性(Tan 等人 *J. Am. Chem. Soc.* 1999,
20 121, 9073-9087)。

提高药物开发的传统模式，组合化学使得所获得的供筛选的化合物数量大大增加，并且人类基因组研究已揭示了大量新的用于筛选的分子靶位点。筛选可以通过多种不同方式使用这些新的靶位点，以寻找酶抑制剂、受体激动剂和拮抗剂。传统目标是发现能在生物系统中
25 减轻、阻断或增强单一极重要相互作用的化合物(Weber 等人., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 1995, 34, 2280-2282)。此外，有大量研究人员采用基于表型的测定系统，其中筛选是在完整的活细胞上进行的，并且所筛选的内容是细胞的某些基于可检测到的特征(Stockwell 等人. *Chem. Biol.* 1999, 6, 71-83; Mayer 等人. *Science*, 1999,
30 286, 971-974)。

迄今为止所开发的高效率筛选方法是基于“一种药物 - 一种靶位点”模式设计的，这种模式是制药工业所采用的主要模式。出于历史

原因，并且由于管理考虑和意识到的风险因素，现代药物开发方法主要是每次找到一种活性分子以用作药物候选对象。临床人员很强以前就认识到“一种药物 - 一种靶位点”途径对于许多疾病的治疗是不足的。它们已经测试了治疗同一病症或具有明显逻辑联系的某些明显的治疗剂组合。例如，在 HIV 的治疗和化疗中，联合使用多种活性剂已变得成为必要。有史以来一直最有希望的药物是一种联合用药物—Premarin，它是用来治疗女性闭经后的复杂改变，是由 22 种以上单独且重要的组分组成的。

发明概述

10 我们已经发明出了非常有效的新的扰乱生物系统的方法。这需要系统地进行高效率筛选化合物组合，即混合物或非化学键合的组合，以发现能在生物系统中协同相互作用的组合。本发明方法可筛选出有效的化合物治疗组合，其中所述组合表现出以前未知的治疗作用，甚至当组合中的每种化合物可能以前不具有任何认识到的生物作用，以及甚至据推断化合物和组合应当不是用于组合中的明显候选对象时亦是如此。

因此，一方面，本发明提供了筛选具有生物活性的双实体或更高级组合的方法，所述方法在包括至少 49 个不同实体组合的至少 7×7 组合阵列中使用至少 7 种实体。所述方法包括下列步骤：(a) 提供实体，(b) 产生实体的组合阵列，(c) 提供由一种或多种生物成分组成的测试元件，(d) 将实体组合阵列与测试元件在保证每一实体/测试元件接触都彼此分隔的条件下接触，(e) 检测或测定测试元件的性质，和 (f) 鉴定出引起不同于组合中的实体自身的作用的对测试元件的作用的实体组合。

25 在第二个相关方面，本发明涉及筛选具有生物活性的双实体或更高级组合的方法。所述方法包括下列步骤：(a) 产生至少 200 个独立的两种或更多种实体的组合的阵列，(b) 提供包括一种或多种不同生物成分的测试元件，(c) 将实体组合阵列与测试元件在保证每一实体/测试元件接触都彼此分隔的条件下接触，(d) 检测或测定测试元件的性质，和 (e) 鉴定出引起不同于组合中的实体自身的作用的对测试元件的作用的实体组合。如上文的第一个测定所述，该测定的组分可以改变。在优选的实施方案中，该方法还包括下述步骤：(f) 将步骤 (a)

- (e) 重复至少 2 次，其中在步骤 (a) 中，至少 200 个组合的阵列在每次重复中不同。在其它优选的实施方案中，阵列包括至少 400 或 1540 个独立的组合。其中重复进行两次步骤 (f)，优选彼此在 10 天内进行。

5 在第三个相关方面，本发明涉及筛选具有生物活性的双实体或更高级组合的方法。所述方法包括下列步骤：(a) 产生至少 49 个独立的两种或更多种实体的组合的阵列，(b) 提供包括一种或多种不同生物成分的测试元件，(c) 将实体组合阵列与测试元件在保证每一实体/测试元件接触都彼此分隔的条件下接触，(d) 检测或测定测试元件的性质，(e) 鉴定出引起不同于组合中的实体自身的作用的对测试元件的作用的实体组合，和 (f) 在一周的时间内将步骤 (a) - (e) 重复至少 25
10 次，其中在每次重复中使用不同的阵列。如上文的测定所述，该测定的组分可以改变。

在第四个相关方面，本发明涉及筛选具有生物活性的双实体或更高级组合的方法。所述方法包括下列步骤：(a) 产生至少 49 个独立的
15 两种或更多种实体的组合的阵列，(b) 提供包括一种或多种不同生物成分的测试元件，(c) 将实体组合阵列与测试元件在保证每一实体/测试元件接触都彼此分隔的条件下接触，(d) 检测或测定测试元件的性质，(e) 鉴定出引起不同于组合中的实体自身的作用的对测试元件的作用的实体组合，和 (f) 在一个月
20 的时间内将步骤 (a) - (e) 重复至少 100 次，其中在每次重复中使用不同的阵列。如上文的测定所述，该测定的组分可以改变。

在第五个方面，本发明涉及筛选具有生物活性的双实体或更高级组合的方法。所述方法包括下列步骤：(a) 由一组实体产生至少 10000
25 个独立的双实体或更高级组合的阵列，(b) 提供包括一种或多种不同生物成分的测试元件，(c) 将实体组合阵列与测试元件在保证每一实体/测试元件接触都彼此分隔的条件下接触，(d) 检测或测定测试元件的性质，(e) 鉴定出引起不同于组合中的实体自身的作用的对测试元件的作用的实体组合，和 (f) 在 10 天或更少的时间内将步骤 (a) - (e) 重复至少 2 次，其中在步骤 (a) 中，至少 10000 个双实体组合的阵列在
30 两次或更多次重复中不同。

在第六个方面，本发明涉及筛选具有生物活性的双实体或更高级组合的方法。所述方法包括下列步骤：(a) 提供包括一种或多种不同

生物成分的测试元件, (b) 将测试元件与至少 100 种实体在保证每一实体/测试元件接触都彼此分隔的条件下接触, (c) 检测或测定测试元件的性质, (d) 选择引起性质改变的实体, 其中所述性质改变是相对于未与实体接触的测试元件的性质而言的, (e) 由所鉴定的实体产生至少 49 个独立的双实体或更高级组合的阵列, (f) 将实体组合阵列与测试元件在保证每一实体组合/测试元件接触都彼此分隔的条件下接触, (g) 检测或测定步骤(f)的测试元件的性质, 和(h) 鉴定出引起不同于组合中的实体自身的作用的对步骤(g)测试元件性质的作用的实体组合。优选地, 步骤(a)的测试元件与步骤(f)的测试元件相同, 但是可能希望在各个步骤中使用不同的测试元件(例如在步骤(a)中使用培养的细胞, 在步骤(f)中使用整个动物)。类似地, 步骤(c)的测试元件性质优选与步骤(g)的测试元件性质相同, 但是可能希望在各个步骤中使用不同元件。

对于所有测定, 可使用多种活性读取技术, 包括细胞印迹测定、报道基因测定、荧光共振能量传递(FRET)测定、荧光钙结合指示剂染料、荧光显微镜检查、或表达特征测定。测定优选使用机器人系统与 384 和 1536 孔板自动进行。还这样装配测定, 以使得部分或所有方法可用微流控技术进行。或者, 可通过使用训练的科学工作和高效流水操作来进行测定。

在本发明组合中测试的优选实体是化合物(例如非聚合有机化合物, 特别是小分子; 脂质; 碳水化合物; 肽; 无机化合物; 和低聚核苷酸, 包括 DNA 和 RNA 分子)、离子(例如金属离子)和放射(例如可见光、可见光范围之外的光、微波放射、红外放射或离子化放射例如 X-射线和 γ 射线)。当在组合中测试的实体是化合物时, 它们优选以纯的形式使用, 但是也可以作为混合物的组分, 例如作为天然产物提取物使用。例如, 子集(一种或多种化合物)可以以纯的形式使用, 每种化合物可以以纯的形式使用。优选地, 每一实体/测试元件接触是在小于 200 μL 、更优选小于 100 μL 、最优选小于 50 μL 或甚至 25 μL 的体积内进行的。在一些情况下, 可使用小至 10 μL 或甚至 500 nL 或更小的体积。此外, 化合物优选在小于 100 μL 、更优选小于 1 μL 、最优选小于 100 nL 或甚至 50 nL 的体积中。本领域技术人员应当认识到可使用更小的体积(例如 10 nL 或甚至 1 nL)。

5 优选的测试元件是全细胞(例如转化的细胞或未转化的细胞)例如神经元、成纤维细胞、平滑肌细胞、心脏细胞、骨骼肌细胞、神经胶质细胞、胚胎干细胞、血细胞生成干细胞、肥大细胞、脂肪细胞、原生动物、细菌细胞、酵母细胞、神经干细胞、和包括 T 细胞与 B 细胞在内的免疫细胞、细胞簇、组织、动物和重新配制的不含细胞的培养基;在某些情况下,测试元件可由单一生物相关性分子例如蛋白或低聚核苷酸组成。

10 所需组合显示的对测试元件的作用优选为对测试元件的性质的协同作用,例如增加或减少 DNA 合成的协同作用。或者,组合在性质上可能是叠加性的,但是具有较少的副作用,或者一种实体可对另一种实体施加负性的、但是有用的作用,例如一种化合物抵抗另一化合物的毒性。

15 可以以任何顺序将实体与测试元件接触,即可将一种实体加到测试元件中,然后加入另一种实体,或者可将两种实体组合,然后与测试元件接触。

20 本发明的高效率筛选方法代表制药工业采用的传统药物开发方法的快速高效率替代方法。本发明可确定以前未知的、治疗有效的组合,例如小分子组合,其中某些分子是新合成的,并且某些可能是已知的 FDA 批准的药物。当有效的组合完全由 2、3、4 或更多种药物组成,并且所有药物都是 FDA 批准的时,这样的新组合还具有易于通过 FDA 批准的优点。

通过阅读下列详细说明和权利要求书,本发明的其它特征和优点将显而易见。

定义

25 “组合化学库”:本文所用的“组合化学库”是多个复合分子,优选天然产物的 reminiscent,其是通过在将核心(scaffold)结构衍生化的每个阶段使用不同的反应物由可衍生化的模板结构合成的。

30 “多样库”:本文所用的“多样库”是已经由任何多个可能来源集合在一起的多个复合分子,这些来源包括先前存在的化学合成分子(例如得自制药公司的专利药库)、天然产物(例如微生物发酵肉汤)、和由组合化学技术生成的新库。

“可衍生化的模板结构”:本文所用的“可衍生化的模板结构”

是由模板结构合成的化合物，其中含有能够与合成试剂反应以生成一种新的官能团的潜在或活性官能团。本文所用的“潜在官能团”是存在的、但是短暂没有活性的官能团。通过用激活试剂释放，潜在官能团变得有活性，并因此可进一步衍生化。

5 “测试元件”：本文所用的“测试元件”是与实体组合接触，然后观察实体的作用的系统。测试元件优选包括在细胞内的两种或更多种生物成分。

“化合物印迹”：本文所用的“化合物印迹”是指使用高精度机器人例如用于cDNA微测定的那些将化合物施加到一个表面(例如玻璃)上(J. Am. Chem. Soc. 1999, 121, 7967-7968)。化合物斑点的直径可以为 250 微米或更小，并且化合物可以共价连接在或经由静电或疏水相互作用粘着在表面上。

“微流控”：本文所用的“微流控”装置是通过任何光刻法制得的通道结构，光刻法包括常规光刻法(例如 Caliper Technologies, Mountain View, CA; <http://www.calipertech.com>)或非常规法(例如软平版印刷，描述在例如 Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 1998, 37, 550-575 中)。

“喷墨”：本文所用的“喷墨”技术是指用于递送小体积液体的热喷墨以及压电喷雾技术。

20 “小分子”：本文所用的“小分子”是指在实验室中合成的或在自然界中发现的有机化合物。小分子的特征一般在于，其含有几个碳-碳键，并且分子量低于 1500 g/摩尔，但是该特征并不是限制本发明的目的。自然界中存在的“小分子”的实例包括但不限于紫杉醇、dynemicin 和雷帕霉素。

25 附图简述

附图 1 是概念图，其表明了两种不同的试剂是如何在细胞内协同作用的，其中这两种试剂与同一细胞内的不同靶目标结合。

附图 2 是概念图，其表明了两种不同的试剂是如何在生物体内协同作用的，其中这两种试剂与不同细胞或组织中的靶目标结合。

30 附图 3 是可在本文描述的种类组合筛选中获得的实验数据的实例。显示了得自 5 个不同的 384 孔板的结果。结果在平板格式中显示，其中有标记为 A-P 的 16 排，和标记为 1-24 的 24 列。活性水平在每

个孔中作为数字显示,其中 1 是指基准活性(没有作用),5 是指发现了活性组合。

附图 4 是指用于通过目前市售的技术进行组合筛选的方法的图。

发明详述

5 本发明提供了在使用有关生物测定的高效率筛选系统中,将个体分子库在 2-、3-、4-和更高级组合中组合起来,以鉴定仅存在于其独特组合中的分子作用的方法。然后这样的组合可用于探测和研究另外的生物系统,可具有直接的生物应用,并且可作为用于新的人类治疗或在人中进行其它应用的活性分子。这些组合还可用于在特定农产
10 品,包括动物或植物中促进生长、生育、成熟或其它特性。它们可用于制备化妆品、香料、食品防腐剂或营养添加剂。因此,本发明提供了用于系统进行化合物组合的高效率筛选以发现在生物系统中具有改善的性质的化合物组合的高效方法。

我们假设,当包含与多个分子靶目标相互作用的多种活性剂时,
15 与复杂系统例如人细胞和组织相互作用的药物可能是最有效的。这种对于药物如何起作用的理解形成了我们设计和开发药物的新策略的一个基础。这种新方法有望在多种现有治疗中取得显著改善,并给目前难治的疾病,特别是需要在多个变量中有适当改变的疾病提供了有效治疗。

20 目前,制药工业的主要开发模式是这样的,设计抗一个靶目标的一种药物。我们的方法使用我们对于多变量设计要求的理解,我们认为这是系统地开发新一代药物的关键所在。

在组合中测试的实体

25 如上所述,可在本发明组合中测试多种实体。下面更详细地对其进行描述。

化合物和离子

依据本发明筛选的主要一类化合物是有机小分子。这些化合物可合成获得或者是自然存在的(例如前列腺素、凝集素、天然存在的次级代谢物、激素等)。纯形式的有机小分子的大库可得自制药公司、化学
30 公司和学术实验室;这样的库还可以用已知的组合化学技术合成。化合物可具有或不具有已知的生物活性。本发明的化合物和组合库可由结合在固体载体上的可衍生化的模板结构合成,例如由得自基于莽草

酸的环氧醇模板或基于吡啶的模板异烟酰胺的可衍生化的模板结构生成的化合物和库。除了小的有机分子,可在本发明组合中筛选的其它分子包括生物聚合物,包括低聚核苷酸(DNA和RNA);多肽(抗体、酶、受体、配体、结构蛋白、人蛋白的突变类似物、和肽激素);脂质;碳水化合物;和多糖。也可以筛选无机分子,例如可能有生物活性的离子如金属离子,例如铜离子、铁离子、银离子、锌离子、镁离子、锰离子和金离子。

其它实体

可影响生物系统的其它非化学实体也可以依据本发明进行筛选,它们可以与其它非化学实体组合或者与如上所述的化学实体组合。可筛选的非化学实体包括光(可见光和在可见光范围之外的光,例如红外和紫外光);离子化放射例如 α -射线和 γ 射线;高压;增加或降低的温度或pH;气态物质例如氧、氮、二氧化碳等,和任何频率的声振动(声音)。

测试元件

在大多数情况下,用于检测组合的作用的生物测定是由多种成分组成的。在某些测定中,测试元件是全细胞,特别是对于其中测定是基于表型的测定更是如此。这样的全细胞测定提供了可能形成多变量治疗性化合物效率的全套复杂分子相互作用。其它测定采用采用了重新配制的含细胞的培养基,所述培养基含有多种所需的复杂系统,并且可包括基于所测定的可能的组合作用的某些报道作用。其它测定采用更高级的生物系统例如用于多变量组合筛选的细胞簇、组织和动物模型。

可用于测定个体化合物的任何生物测定易于与本发明组合筛选相适应。测定可包括例如化合物越过细胞膜的运输、电位、动作电位产生、细胞增殖、细胞增殖、细胞死亡、细胞特异性、细胞分化、细胞迁移、基因表达或蛋白水平(通过例如检测mRNA、蛋白或报道基因来测定的)、酶活性、磷酸化、甲基化、乙酰化、蛋白易位到细胞核上(或蛋白定位中的其它改变)、抗病原体的能力(例如病毒或细菌)和产生免疫反应的能力。在整个生物体测定中,动物行为可起报道的作用。

在一个实例中,该测定是非破坏性测定(例如其中可测定化合物的作用、同时又不损害细胞的基于细胞的测定)。这样的测定使得能够在每个孔中用多浓度的多个组合来进行测定。例如,将递增浓度的化合

物 A 加到孔中，每次加入化合物后进行测定。当达到化合物 A 的所需浓度时(根据化合物的所需测定反应或已知性质(例如毒性、溶解度))，以递增浓度加入化合物 B，每次加入后进行测定。该方法可在一个孔中重复多次，使得能够在一个平板中进行数百、数千或甚至数百万个测定。

可能希望进行比较测定来鉴定组合的可能副作用。例如，对于筛选其杀死或减弱肿瘤细胞增殖的能力的化合物组合，可同时筛选其对正常的非肿瘤细胞的作用。表现出针对肿瘤细胞的所需活性，并且对正常细胞的作用很小或者没有作用的化合物组合是优选的组合。对正常细胞有不希望的作用的组合是较不优选的。然而，这些组合(或具有类似结构的化合物的组合)在不同浓度下可能是有效的，并且无需从另外的实验中排斥出去。

含有复杂生物分子例如蛋白、碳水化合物和脂质的不含细胞的培养基是通过已知方法制得的，例如通过下列方法：将哺乳动物、蛙、酵母或细菌细胞裂解；从这样的细胞裂解物中纯化特定级分；使用市售兔子网状细胞裂解物(通常用于体外进行转录和/或翻译反应)；或从哺乳动物、酵母或细菌细胞中收获培养上清液，而不将这些细胞裂解。

细胞印迹测定

测定活性的一种方法是细胞印迹测定。在该方法中，将细胞接种到测定平板的孔中。细胞优选为粘着性细胞，这样它们粘着在孔的底部并在上面生长。使用上述方法加入化合物。例如，可进行细胞印迹以通过测定 BrdU 的掺入来检测增殖。在该实例中，将细胞培养一定时间(例如 4 - 72 小时)。然后使用例如机器人液体传送装置或者 16 或 18 通道棒来抽吸培养基。通过在 4℃ 加入 70% 乙醇和磷酸盐缓冲盐水(PBS)并保持 1 小时来将细胞固定。除去固定试剂并用 PBS 将细胞洗涤一次。用 PBS 洗涤后，向每个孔中加入具有 0.5% 吐温 20 的 2N HCl，并保持 20 分钟。用含有 10% 体积的 2N NaOH 的 Hank's 平衡盐溶液(HBSS)将 HCl 中和。取出该溶液，用 HBSS 将细胞洗涤 2 次，然后用含有 0.5% 牛血清白蛋白(BSA)和 0.1% 吐温 20 的 PBS 洗涤一次。除去洗涤溶液，施加抗-BrdU 抗体，该抗体是作为在含有 0.5% 牛血清白蛋白(BSA)和 0.1% 吐温 20 的 PBS 中的 0.5 μg/mL 鼠抗-BrdU 抗体施加的。该抗体溶液还含有识别 Ig 抗体(例如鼠抗-BrdU 抗体)的鼠次级抗体

(以 1:2000 的稀释度); 该次级抗体与辣根过氧化物酶(HRP)缀合。培养 1 小时后, 除去抗体溶液, 用 PBS 将细胞洗涤 2 次。第 2 次 PBS 洗涤后, 向每个孔中加入 HRP 酶作用物(含有鲁米诺、过氧化氢和增强剂例如对碘苯酚)。然后通过暴露于膜(将一片膜置于平板的顶部)或通过
5 使用发光计或发光板读数器在标准条件下(例如每个孔曝光 0.3 秒)读取从每个孔发出的光的量来测定每个孔中的光的量。从每个孔中输出的光的量指示了在该孔中发生的 DNA 合成的量。理想的活性剂组合是这样的, 与对照相比, 光输出量增加或减少了。例如, 减少光输出量的组合将降低 DNA 的合成速度, 并因此可有效地抑制或阻止肿瘤细胞
10 增殖。或者, 光输出量增加意味着 DNA 合成增加。例如, 可以在例如 200×1 组合阵列中使用原发细胞(其中一种固定组分阻断 DNA 合成, 并因此对细胞有毒害作用)。使用该阵列, 可筛选出阻止第一种化合物的毒性作用的第二种试剂。在多种免疫缺陷疾病中, 免疫细胞不由于对同种抗原或自身抗原起反应而增殖。使用培养的免疫细胞和上述方
15 法, 可筛选促进免疫细胞增殖的试剂。或者, 可筛选自身免疫抑制剂。在该实例中, 通过同种抗原或自身抗原刺激一类免疫细胞(已从外周血细胞分离出来的 B-细胞或 T-细胞)群体。特异性地抑制由于对自身抗原而不是同种抗原起反应而发生的增殖的化合物组合是有用的自身免疫治疗候选对象。

20 测定活性的其它方法

上述细胞印迹测定易于与不是 BrdU 的抗原的测定适应。此外, 可测定多种细胞内的翻译后改变。例如, 抗核仁素或组蛋白 H3 的磷酸化变型的抗体可用于测定处于细胞周期 M (有丝分裂) 期的细胞。因此,
25 引起细胞印迹测定中磷酸化核仁素或组蛋白 H3 增加的化合物组合是能够抑制 M 期的细胞的组合, 并且是可能的抗癌剂。还可以使用能特异性地识别乙酰化的组蛋白 H4 的抗体通过细胞印迹测定来检测例如组蛋白 14 的乙酰化。引起组蛋白 H4 过乙酰化增加的化合物或化合物组合也可能是抗癌剂。

在上述实例中, 可这样改变操作, 除去培养基, 并加入固定试剂(在
30 PBS 或 Tris 缓冲盐水中的 70% 乙醇 4% 甲醛)。然后通过除去固定试剂和加入渗透剂(例如吐温 20、三硝基甲苯 X-100 或甲醇)来使其变得可渗透。除去膜渗透剂, 然后用 PBS 或 Tris 缓冲盐水洗涤, 之后加入

初级抗体。使用这些其它细胞印迹实施方案，通常没有酸变性步骤。

报道基因测定

测试元件性质的测定可用报道基因来进行。该方法提供了这样的优点，一旦制得试剂(例如稳定转染的细胞系)，测定易于进行，并且
5 与例如细胞印迹测定相比需要较少的时间。报道基因包括编码多肽的报道基因，这样的多肽由于色度、荧光、发光或酶性质而易于检测，和增强子/启动子元件，其赋予报道基因表达特异性。报道基因元件包括但不限于荧光素酶、 β 内酰胺酶、绿色荧光蛋白、蓝色荧光蛋白、氯霉素乙酰转移酶(CAT)、 β 半乳糖苷酶和碱性磷酸酶。增强子/促进子元
10 件包括例如对 NFAT、p53、TGF- β 或其它信号传导路径或刺激(它们的应答增强子/促进子是已知的)有应答的那些。

NFkB

一种市售报道基因是 pNFkB，它是当 NFkB 被激活时产生光的荧光素酶(Stratagene, La Jolla, CA)。该报道基因可稳定或短暂转染到
15 目标细胞系(即 A549 人肺癌细胞)内。为了产生稳定的转染细胞系，将 pNFkB 质粒 DNA 与 G418 抗性质粒以及转染试剂(例如脂转染试剂, Life Technologies, Inc., Rockville, MD)混合，并加到含有以约 40% 铺满度附着在培养皿上的 A549 或其它细胞的 10 cm 培替氏培养皿上。将含有 DNA/脂转染试剂的平板在 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 下培养 4-16 小时。除
20 去培养基，将细胞用不含血清的培养基洗涤 2 次，然后加入含有 10% 胎牛血清(FBS)的培养基。以刚好足以杀死模拟转染(即没有 G418 抗性质粒的转染)的剂量(约 700 μ g/mL)加入 G418。将细胞在 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 下培养 2 周，每 3 天替换一次培养基。在 2 周结束时稳定转染的克隆长成了小克隆；通过环-克隆和单独繁殖来使这些克隆分开。针对所关
25 注的报道基因来筛选 G418 抗性克隆，筛选是通过测定具有或不具有短暂转染的 NFkB 的细胞裂解物的光输出量来进行的。一旦用稳定转染的 pNFkB 鉴定出了克隆，即通过将细胞铺在测定板中来将其有用筛选。

对于短暂的转染测定，将 pNFkB 质粒 DNA 与转染试剂混合，加到含有例如以约 70% 铺满度附着在培养皿上的 A549 的 10 cm 培替氏培
30 养皿上。将含有 DNA/脂转染试剂的平板在 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 下培养 4-16 小时。除去培养基，将细胞用不含血清的培养基洗涤 2 次，然后加入 10% FBS。将细胞在 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 下培养 24 小时，然后铺到用于筛选

的测定板内。

可使用其它技术将报道基因引入到细胞内，所述其它技术包括但不限于病毒或逆转录病毒感染、bolistic 注射或细胞摄取裸 DNA。本领域技术人员应当认识到，将报道基因引入到欲测定的细胞内的任何方法应当与本文描述的筛选方法相容。

一旦获得了具有报道基因的细胞，即用吸移管、多通道吸移管、384 孔多滴平板充填器(Labsystems, Franklin, MA)将或其它液体处理装置将它们接种到测定板(96 孔、384 孔)中。通过几种方法中的一种加入化合物以形成组合。4-72 小时后，除去培养基，用 HBSS 洗涤 2 次，加入裂解缓冲液(参见 Stockwell 等人., J. Amer. Chem. Soc. 1999, 121:10662-10663)，加入 ATP/荧光素，并在平板读数器或发光计(e.g. LJI BioSystems Inc., Analyst AD, Sunnyvale, CA)上测定发光。

荧光共振能量传递测定

在另一个实例中，使用荧光共振能量传递(FRET)来检测和测定所关注的两种蛋白的相互作用。在该实例中，通过标准分子生物学方法，分别使用绿色荧光蛋白(GFP)和蓝色荧光蛋白(BFP)将第一种和第二种蛋白融合。使用上文描述的转染技术或其它差不多的方法将编码这两种融合蛋白的 DNA 构建元件在哺乳动物细胞、酵母、蠕虫或其它细胞或生物体中共表达。加入化合物组合。将平板置于平板读数器上，并如下所述测定荧光。激发供荧光团(即 BFP)，并测定接受荧光团(即 GFP)的发射。提高这两种蛋白的邻近将导致接受荧光团的发射增强。因此，引起所关注的这两种蛋白彼此靠近的化合物组合是通过接受荧光团的荧光增强来鉴定的。

例如，获得含有 Smad2 和 Smad4 的表达载体。将编码 GFP 的 cDNA 融合到 Smad2 的 5' 末端，将编码 BFP 的 cDNA 融合到 Smad4 的 5' 末端。将这些表达载体稳定或短暂地转染到哺乳动物细胞内，用化合物组合处理细胞，用激发 BFP 但不激发 GFP 的光照射平板。测定 GFP 的荧光(例如 512 nm 光)，并鉴定引起在该波长的光发射增加的化合物组合。这样的组合引起 Smad2 和 Smad4 彼此靠近，并且可能激活 TGF- β 信号，因此可用于治疗癌症化疗粘膜炎和自身免疫性疾病。

荧光钙指示剂染料

读取测试元件性质改变的另一方法使用荧光钙指示剂染料例如 fluo-3 (Molecular Probes, Eugene WA; <http://www.molecularprobes.com>)、fura-2 和 indo-1。Fluo-3 基本上不发荧光, 除非与 Ca^{2+} 结合, 并在约 0.14 的饱和 Ca^{2+} 下表现出量子产率。fluo-3 的完整的乙酰氧基甲基酯衍生物 AM (fluo-3 AM) 也因此不发荧光。使用设计用于荧光素 (FITC) 的滤光器装置照惯例检测与 Ca^{2+} 结合的 fluo-3 的绿色荧光发射 (~525 nm)。依据制造商的说明, fluo-3 表现出至少 100 倍的依赖于 Ca^{2+} 的荧光增强。

将细胞接种在孔中, 按照制造商的说明向细胞中加入 fluo-3, 加入化合物, 使用平板读数器测定荧光。导致荧光增强的化合物组合 (但是自身不发荧光) 由此引起细胞内钙浓度增加。

荧光显微镜检查

另一测定使用常规的荧光显微镜检查来检测与化合物组合接触的细胞中的荧光水平或定位。在一个实例中, 使用表达 GFP 标记的 Smad2 的稳定转染的细胞系。接种细胞, 加入化合物, 培养 1 小时, 并使用具有自动载物台的荧光显微镜来给每个孔中的细胞成像。鉴定引起标记蛋白定位改变的化合物组合。例如, 通过该方法可鉴定出引起 GFP-Smad2 从核外面移位到核内部的组合。这些组合可激活 TGF- β 信号传导, 并因此可用于治疗癌症、自身免疫性疾病和粘膜炎症。

采用 CDNA 测定的表达特征测定

用于检测一起在测试元件中产生改变的化合物的另一测定是表达特征测定。在该实例中, 接种细胞, 加入化合物组合, 将细胞培养 2 - 24 小时。使用标准方法从每个孔中收获 PolyA RNA。使用标准方法将 RNA 逆转录到 cDNA 内, 但是在逆转录期间引入荧光染料 (例如 Cy3-dUTP)。将 Cy3 标记的 cDNA 与得自未处理细胞的 Cy5 标记的 cDNA 混合, 并杂交到 DNA 微测定中 (例如由 Affymetrix, Santa Clara, CA 商购获得的 DNA 微测定, 或 Incyte, Palo Alto, CA, 在 Nature Genet. Suppl. 21, Jan 1999 (引入本发明以作参考) 中作了综合描述)。在该微测定中, Cy3 和 Cy5 荧光在每个点的相对水平指示了在每个基因的表达中已经有改变。该方法用于鉴定引起所需的基因表达改变的组合, 例如将疾病基因表达复原至健康基因表达的组。或者, 测定由给定的信号传导分子例如胰岛素引起的表达特征, 并发现引起胰岛素

性质出现的化合物组合，这指示了这些组合模拟胰岛素的作用。

完整的生物体

与本文描述的筛选方法相容的另一生物测定使用完整的动物。在一个实例中，将线虫 *C. elegans* 置于个体孔(优选每个孔中具有一个
5 以上的线虫)中，并通过检测微生物性质中的改变来测定化合物的活性。例如，可将线虫进行工程处理以在生命周期的特定阶段或仅在持续(dauer)状态期间表达绿色荧光蛋白。使用自动显微镜检查系统给每个孔中的线虫成像，并测定绿色荧光蛋白，或检测蠕虫中由特定化合物组合引起的形态学改变。

10 另一完整的动物测定使用较大的动物，例如在皮肤表面上或皮肤表面附近有肿瘤的裸鼠。化合物组合可以是在 DMSO 中的混合物，将其擦在皮肤上，渗透皮肤，并到达肿瘤。或者，化合物可静脉内、肌内或口服施用。检测活性的其它完整生物体方法可包括使用得自发酵的非洲蟾蜍卵母细胞的在特定介质中发育的小蝌蚪、其中器官可在特定
15 介质中培养一定时间的亲器官性培养物(得自小鼠或其它动物的外植体)和得自多种动物的卵(受精或未受精的)。另一方法是测定在两个弹簧之间伸展的心脏组织或肌肉组织的张力；调节收缩的化合物组合将导致在这些弹簧上的张力增加或减小。

化合物的标记

20 虽然某些测定可不用任何标记的实体组合进行，但是在某些实施方案中，将一种或多种组合的实体标记，这样可检测或测定该组合对测试元件的作用。可使用任何多种已知的标记物，例如已经广泛用于生物化学技术，如使用生物素-链霉抗生物素相互作用或六组氨酸标记的蛋白的蛋白亲和色谱法(Janknect 等人., Proc. Natl. Acad. Sci.
25 USA 1991, 88:8972; Wilcheck 等人 Methods in Enzymology, Wilcheck, M; Bayer, E. A. Eds. Academic Press Inc. San Diego, 1990; pp. 123-129)。

分子的组合

30 本发明方法可使用现有的机器人系统、96-孔、384-孔、1536-孔或其它高密度贮备板和 96-孔 384-孔或 1536-孔或其它高密度测定板，通过它们每周能够筛选最高达 150,000 种或更多种化合物。可依据本发明来使该技术的自动化与分子组合的筛选相适应。本发明方法

还可以使用通过常规光刻法或通过非常规方法(例如软平版印刷术或近场光平版印刷术)制得的微流控系统以将该方法微型化。本发明方法还可以使用喷墨印刷或化合物印刷技术。此外,本发明方法还使用训练的技术员工作来获得与机器人系统相同的结果和生产率。化合物组合可在与测试元件接触之前制得,或者它们可在测试元件存在下原位制得。在下文中更详细地描述这些铺平板方法。

手工铺平板

可用手将化合物铺平板(即加到欲测定的细胞中)。在一个实例中,用手将纯化的化合物组合,并在 7×7 组合测定中测试。化合物(在这种情况下包括7种化合物)是在贮备板中。将化合物在测定板中组合。操作者将第一种化合物(或多种化合物)从贮备板的一个孔铺到测定板的一排孔中,然后铺在测定板的一列孔中。用贮备板的第二个孔重复该操作,只是铺在测定板中的操作是在铺入第一种化合物的那排孔和那列孔上面的一排孔和一系列孔中进行的。重复该操作直至已铺完了全套组合。

机器人铺平板

有多种将化合物加到孔中以形成组合阵列的方法,本领域技术人员应当理解,下列实施例仅是为了举例说明,并不是限制。

在一个机器人铺平板的实例中,使用机器人液体递送系统。递送系统可从例如 Beckman Coulter (Fullerton, CA)、Tecan (Research Triangle Park, NC)或 Zymark (Hopkinton, MA)商购获得。机器人系统将特定体积的第一组化合物铺到给定排的每个孔中,这样第1排将具有相同的化合物,第2排将具有相同的化合物,如此等等。然后液体递送系统将同一组化合物沿着列铺在孔中,这样每一列将接受相同的化合物(虽然不同的列将具有不同的化合物)。可使递送系统与递送小体积(例如1 nL)相适应。

用于有效递送的另一方法使用喷墨印刷技术(Gordon 等人., J. Med. Chem. 1994, 13:1385-1401; Lemmo 等人., Curr. Opin. Biotechnol. 1998, 9:615-617)。喷墨印刷打印机从含有测试化合物的多个容器中抽取;将每种化合物从来源孔中打印出来或注射到用于每种化合物的每一单独的排和列的表面上去。如上所述,将下一种化合物打印到下一排和下一列上,并且对此进行重复直至用化合物组合

将整个栅格铺完。

将化合物加到测定板中的另一方法使用由 Patrick Brown 在 Stanford University 开发的用于点滴 DNA 的微测定点滴器。该装置使用 eight-quill 笔打印头和八直线 quillheads, 将它们浸在贮备板中, 并沿着每排打印。然后将平板旋转 90 度或者将打印头旋转 90 度; 之后将打印头沿着列打印。可以改变打印头的大小, 使用例如 2、4 或 16 打印头(对于 384 孔板), 和更高的数目(对于更高密度平板)。

将化合物加到测定板中的另一方法使用称为 Hydra 的市售装置 (Robbins Scientific, Sunnyvale, CA), 其可装配有能够从化合物的标准贮备板滴出已知体积的 384 个独立的注射器。

铺测试化合物的另一方法使用微流控系统例如由 Caliper Technologies (Mountain View, CA) 商购获得的, 并直接施加该系统以产生可形成组合的阵列。在这种情况下, 微量规模的组合阵列是使用毛细管流产生的, 以将化合物溶液分配到在矩阵上的交叉点中。

另外的铺平板方法

本领域技术人员应当理解, 任何平板配置都可以与本发明筛选方法相适应。例如, 16×16 正方形平板可具有 256 个孔以代替 16×24 平板中的 384 个孔。这使得能够采用其中仅沿着排或仅沿着列加液的任何液体加入系统, 因为可以简单地将正方形平板旋转 90 度来以其它方向加液。还可以在该设计中引入正方形平板夹持器, 夹持器将具有标准 96 孔或 384 孔微量滴定板的大小或足印, 这样改变的微正方形平板能配合在任何现有平板液体处理系统内。

提供组合的预测试的化合物或元件的另一方法是将它们以固体形式而不是液体形式提供, 例如作为少量干粉提供。因此, 可将两种干的组分(或一种湿的组分与一种干的组分)混合, 然后将该组合加到培养基(其中组合的实体可溶于培养基中)内的细胞中。固体化合物包括得自组合合成的珠子, 其中在珠子上加入不同化合物。例如, 可用珠子采摘器加入珠子。在一个实例中, 珠子是有磁性的, 并且可使用磁铁加入。

在应用机器人的本发明高效率测定中, 每个孔必须独立地在空间上是可寻址的, 并且优选能够从贮备板中取出大量(最高达 100 μ L)和少量(最少达 1 nL)每种化合物。下面描述用于进行本发明组合筛选测

定的机器人平台的实例。

创建双工作站机器人平台。第一个工作站包括简单的 XYZ 机器人臂，其具有连接的针递送装置例如由 VWR (cat#62409-608) 获得。贮备板和测定板进入该工作站，机器人臂将针下降到贮备板内，并将这些针移动到测定板内，由此根据针的尺寸递送 1-1000 nL (最通常递送 50 nL)。如该实例中上面所述，不同的针装置使得能够递送不同的化合物组合。机器人的第二个工作站是压电分配器，其能够从一种化合物的贮备孔中取出较大体积 (最高达 10 微升)，然后将较小体积分配到测定板的每个孔中。例如，Ivek Digispense 2000 系统 (<http://www.ivek.com/digi2000.html>) 具有 10 nL 的分辨率，并且对于该目的是足够的。

非化合物组合试剂

如果越过整个板存在的组合试剂 (即如果其是某些形式的放射)，则可以让含有细胞和所加入的化合物的平板经过放射源，由此完成组合的形成。其它形式的非化合物组合试剂包括例如高压和热。

可以以类似于加入化合物的方式改变某些非化合物试剂。例如，改变 pH，向孔中加入不同量的碱或酸。类似地，可使用适于加入化合物的任何方法加入离子。

库的大小

对于小的化学库 (<1000 种化合物)，可使用本文所述的系统测试二元 (最高达一百五十万种组合) 和四元组合 (最高达几亿种组合)。

组合功率迅速产生有效的库来鉴定多变量治疗。多变量治疗库的大小迅速竞争，然后扩展并超过任何可常规获得的多样化或非多样化库。两两组合中的 200 种化合物的库产生了 19,900 种组合的多价治疗库，在大小上大于最近用于影响细胞分裂的新化合物的天然产物库 (Mayer 等人. *Science*, 1999, 286, 971-974)。在三元组合中的 300 种化合物的库产生约四百五十万种用于多变量治疗库的不同实体组合，大于目前产生的最大的组合化学库，并具有可能较大的多样性。

活性等级筛选

开始可用标准方法测试多样库。将化合物在生物测定中筛选，并通过活性划分等级。然后两两地以及在三元组合中测试库中活性最强的化合物 (例如根据欲测定的组合空间的量，20 个最有活性的或 1000

个最有活性的)。如果需要的话,可再次通过活性将这些组合划分等级,并对于四元组合或五路组合重复该操作,直至鉴定出所需数目的有效组合。

遗传算法

- 5 使用遗传算法来提供鉴定具有不同于活性剂本身的所需生物活性的活性剂组合。在该方法中,给每种活性剂指定独特的条形码,条形码可以是任何系列的数字、字母或其它符号。在优选的实施方式中,条形码是二进制代码(零和一)。从全部可能的两两组合中选择(随机或根据某些其它特征)特定数字(N,“群体大小”)的两两组合,并测定
- 10 每一组合的活性。选择群体当中X个最有活性的成员(其中X小于N)。N个新组合是用一系列操纵因素由X个活性组合形成的,操纵因素包括(i)复制(简单地再选择最初的组合),(ii)突变(将一位条形码变异成不同的值),和(iii)重组(两个条形码分别在某种程度的中央点分离,并将相对的末端连接以产生2个新的杂交条形码)。将选择、放大、
- 15 突变和重组过程重复循环多次,在每个循环结束时测定每个活性剂组合的活性。这提供了测试有限数目组合的方法,同时还能够发现高度有效的活性剂组合。

- 优化遗传算法(或其它算法)的方法如下:选择N种活性剂的C种组合进行实验。测定全套 $(N!)/((N-C)!(C!))$ 组合的每一成员的活
- 20 性。此外,也可以测定所有低级组合。使用该全套活性数据,能够评价不同算法的成功比例和效率,或没有进行另外的“湿”小规模操作的单独算法的不同置换码。也就是说,发现活性组合的所有策略都可以“在硅中”比较,并且可以比较其相对绩效。

贮备液

- 25 保持2类贮备液。将每种化合物在两种贮备格式中保存。第一类贮备液格式由以4 mM的终浓度溶解在100微升二甲亚砜(DMSO)中的化合物组成,并贮存在384孔聚丙烯板(Matrix Technologies)中。第二类贮备液格式由以4 mM的终浓度溶解在1500微升DMSO中的化合物组成,并贮存在深孔96孔聚丙烯板中。对于每一类平板制备多个副本。
- 30 将一个贮备板副本在 -20°C 贮存以备常规使用,将备份副本在 -80°C 贮存以长期贮藏。

测定板

使用 3 类测定板。调节上述针式递送装置中的针的尺寸以与每个尺寸的测定板相适应。

1) 市售 384 孔板(例如具有盖子的 NalgeNunc 白色聚苯乙烯细胞培养处理的戊基平板, cat# 164610)

5 2) 市售 1536 孔板(例如 Greiner 或 Corning)

3) 常规制得的 1536 或 6144 孔板(由聚二甲基硅氧烷制得的, Dow Coming)和 delran molds, 以及 Omni trays.

控制化合物加入的软件

使用 Microsoft Visual Basic 或程序设计语言, 使用常规编程技术, 编写软件以运行上述装置。该软件容许装置读取贮备板或测定板的条形码, 跟踪平板在测定台上的位置, 并将适当体积的合适化合物递送到合适的测定孔中。因此, 预先测定或选择所有欲筛选的组合, 装置以自动格式进行组合筛选, 仅需要简单的由操作者实施的步骤, 例如将特定平板置于测定台上, 并将特定平板从测定台转移到恒温箱中。

条形码读取器和打印机

依据标准技术使用条形码打印机, 以给每个平板产生独特的鉴别数码, 将条形码打印在标签上, 并将标签压在测定板或贮备板上。软件记录在每个测定板和贮备板的每个孔中的每种化合物的标记。条形码读取器与测定台连接以在其进入和离开测定台时扫描每个平板。

提供下列实施例是为了举例说明, 而不是以任何方式限制。

实施例 1

附图 1 是概念图, 其表明了两种不同的试剂是如何在细胞内协同作用的, 其中这两种试剂与同一细胞内的不同靶目标结合。在该附图中, 化合物 A 10 与化合物 B 12 越过质膜 14, 并自由扩散到哺乳动物细胞的胞质区域内。化合物 A 与蛋白 X 16——一种激酶结合, 抑制该激酶的活性。激酶 X 一般通过给 Y 加上磷酸酯基而使转录因子 Y 18 失活。一旦化合物 A 已经抑制了激酶 X, 转录因子 Y 就被激活, 并且 Y 转移到细胞核内, 与治疗基因例如胰岛素的增强子区域中的 DNA 紧密结合。然而, 在没有第二种转录因子 Z 20 存在的情况下, 转录因子 Y 不能激活胰岛素的表达。然而, 在该附图中, 化合物 B 与转录因子 Z 结合, 除去了该转录因子上的自抑制环路, 由此引起该转录因子 Z 转移到细

胞核中，并与转录因子 Y 结合。Y 和 Z 一起而不是单独地使得治疗基因胰岛素的表达被激活。

附图 2 是概念图，其表明了两种不同的试剂是如何在生物体内协同作用的，其中这两种试剂与不同细胞或组织中的靶目标结合。在该
5 附图中，化合物 A 50 扩散到胰腺 54 的 β 胰岛细胞 52 内。化合物 A 引起编码胰岛素 56 的治疗基因在这些细胞中表达。然而，当脂肪组织中的靶目标脂肪细胞上不存在胰岛素受体时，胰岛素是无效的。同时，化合物 B 扩散到脂肪组织 60 中的脂肪细胞 58 内，激活胰岛素受体 62 在这些细胞中的表达。A 和 B 一起而不是单独地使得胰岛素活性在该个
10 体中恢复。

附图 3 是可在本专利申请描述的种类组合筛选中获得的实验数据的实例。显示了从 5 个不同的 384 孔板中获得的结果。显示了得自 5 个不同的 384 孔板的结果。结果在平板格式中显示，其中有标记为 A - P 的 16 排，和标记为 1 - 24 的 24 列。活性水平在每个孔中作为数字
15 显示，其中 1 是指基准活性(没有作用)，5 是指活性组合。平板 1 显示了当以 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 在溴脱氧尿苷细胞印迹测定中测试时化合物 1 - 384 的活性，其中该细胞印迹测定是测定在 A549 人癌细胞(如下所述)中的细胞周期抑制活性。平板 2 显示了当以 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 在同一测定中测试时化合物 1 - 384 的活性。平板 3 显示了当以 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 在同一测定中测试时
20 化合物 385 - 768 的活性。平板 4 显示了当以 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 在同一测定中测试时化合物 385 - 768 的活性。注意，在平板 1 - 4 中，没有化合物表现出任何活性。平板 5 显示了当以 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 测试时化合物 1 - 768 的 384 个两两组合的活(即化合物 1 - 384 和 385 - 768 都同时以 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (每种化合物)加到测定板中，产生 384 个不同的随机的两两组
25 合)。注意，孔 A1 表现出活性。这表明化合物 1 (在具有化合物 1 - 384 的平板的孔 A1 中)自身没有任何活性，化合物 385 (在具有化合物 385 - 768 的平板的孔 A1 中)自身没有任何活性，但是化合物 1 与化合物 385 协同产生了活性组合。

实施例 2

30 一般方法

附图 4 是指用于通过目前市售的技术进行组合筛选的方法的图。人 A549 肺癌细胞得自 American Type Culture Collection (ATCC, 商

品目录号 CCL185), 并在含有 10% FBS、100 单位/mL 青霉素钠、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 硫酸链霉素和 2 mM 谷氨酸盐的 Dulbecco's 改进的 Eagle 培养基 (DMEM) (GibcoBRL, Rockville, MD) (称为 10% 培养基) 中于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 下培养。使用 Multidrop 384 液体分配器 110 (Labsystems
5 Microplate Instrumentation Division, Franklin, MA) 向白色不透明的 384 孔板 100 (Nalge Nunc International, Rochester, NY) 的每个孔中接种 4000 个细胞。细胞在 40 μL 含有 10% FBS 的培养基中接种。

在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 下培养 16 小时后, 向每个孔中加入 50 μM 测试
10 化合物在 10% 培养基中的贮备液, 使每个孔的总体积达到 10 μM 。在之前、之后立即、或几小时或数天后, 通过将在针阵列 130 上的小针浸在贮备板 140 或 150 的每个孔内、然后浸在测定板 100 的每个孔中来加入第二种化合物。Matrix Technologies Pin Transfer device 130 (384 或 96 个针) 是足够的 (商品目录号 350500130 和
15 350510203)。该二步骤方法使得能够测试在多个两两组合中抗大量其它化合物的一种特定化合物。还需要具有一个这样的平板, 在其上面, 在没有最初的化合物 (存在于所有孔中的化合物) 存在的情况下测定一组用针递送的化合物, 以确定用该组合是否已经实现了新的特征。

还可以使用不同方法来提供用于与测试元件接触的化合物组合。
20 例如, 代替如上所述的在整个两两组合中固定一种化合物的做法, 以能够获得所有两两组合的方式用针递送一组化合物。用针将一组 16 种化合物从贮备板 140 递送到 384 孔测定板 100 的 16 排孔中。然后将同一组 16 种化合物递送到同一测定板的 16 列孔中, 获得了具有不同两两组合的 256 可孔矩阵。

25 在每个上述实例 (或类似变型) 中, 一旦已经加入所有化合物, 即将含有 A549 细胞和化合物的测定板在恒温箱 120 中于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% 二氧化碳下培养 48 小时。48 小时后, 使用 Multidrop 384 110 将 10 μL BrdU 从 50 μM 在培养基中的贮备液 (由 10 mM 在 PBS 中的贮备液, pH 7.4 制得的) 中以 10 μM BrdU 的终浓度加到孔中。将细胞在恒温箱 (120)
30 中于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% 二氧化碳下再培养 12-16 小时。用在整个吸引方案中使用的与室内真空源连接的 24 通道棒 (V&P Scientific) 将上清液从每个孔中除去。用 50 μL 冷 (4 $^{\circ}\text{C}$) 的 70% 乙醇/30% PBS 将细胞固定,

在冰上培养 1 小时，用 90 μL 冷 (4°C) 的 PBS 洗涤，然后加入 25 μL 2M HCl / 0.5 % 吐温 20 / ddH₂O。将细胞在室温培养 20 分钟，然后用 90 μL 10 % 2M NaOH / 90 % Hank's 平衡盐溶液 (HBSS, GibcoBRL) 洗涤，用 90 μL HBSS 洗涤两次，用 75 μL PBSTB (PBS, 0.1 % 吐温 20 (Sigma), 0.5 % 牛血清白蛋白 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) 洗涤一次。然后加入在 PBSTB 中含有 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 鼠抗-BrdU 抗体 (1:1000 稀释的储备液, (BD Biosciences-PharMingen San Diego, CA) 和 1:2000 稀释的与 HRP 缀合的抗-鼠 Ig 抗体 (Amersham Pharmacia Biotech Inc., Piscataway, NJ) 的 20 μL 抗体溶液。将细胞在室温培养 1 小时，用 90 μL PBS 洗涤两次，然后向每个孔中加入 20 μL HRP 底物溶液。该 HRP 底物溶液是通过将等体积的得自 Amersham ECL 检测试剂盒的溶液 1 和 2 混合而获得的。将平板置于 LJL Biosystems Inc. (Sunnyvale, CA) Analyst AD 平板读数器 160 内，在每个孔中检测 0.3 秒的发光。然后比较组合与在初始浓度或初始浓度 N 倍的浓度下单独的活性剂的活性，其中 N 等于在该筛选中发现的活性化合物的数目。如果组合表现出大于在初始浓度与初始浓度 N 倍的浓度下每种单独的活性剂的活性，则已经观察到了协同作用。即使没有观察到协同作用，相对于组成组合的单独的组分，组合也可以具有有利的性质 (例如副作用降低)。

对上述方法作简单改动，在第一个步骤中加入两种不同的化合物，以测试三元组合。类似地，可加入三种化合物以测试四元组合，如此等等。使用这样的方法，测试更高级的化合物组合。

下面描述鉴定抑制增殖的化合物组合。该描述是为了举例说明，而不是以任何方式限制。

在 BrdU 细胞印迹测定中 (见下文)，测定单独的或者在所有的 21 种可能两两组合中的 7 种化合物，以确定其对细胞周期进行的作用。将这 7 种化合物 (鬼臼毒素、紫杉醇、奎纳克林、苜蓿地尔、潘生丁、异丙嗪和田麦角碱；分别购自 Sigma Aldrich Corp., St. Louis, MO) 称重到一英钱玻璃瓶中，并溶于二甲亚砜以产生 4 mg/mL 的储备液。将 6000 个人 A549 肺癌细胞接种在 384 白色不透明 NalgeNunc 细胞处理平板 (cat# 164610) 中，是在 30 μL 10 % 培养基 (含有 10 % 胎牛血清、100 单位/mL 青霉素钠、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 硫酸链霉素和 2 mM 谷氨酸盐

的 Dulbecco's 改进的 Eagle 培养基, 所有这些都是得自 Life Technologies) 中接种的。在 10% 培养基中将每种化合物稀释至最终的测定浓度的 4 倍(最终的测定浓度是 0.25% DMSO, 240 nM 鬼臼毒素, 60 nM 紫杉醇, 420 nM 奎纳克林, 25 μ M 苜普地尔, 400 nM 潘生丁, 5 25 μ M 异丙嗪, 840 nM 田麦角碱)。将 15 微升每份化合物在培养基中的 4 \times 贮备液加到 8 列和 8 排正方形区的一排和一系列中(第 8 行仅含有载体 DMSO), 这样就测定了 7 种化合物的所有可能的二元组合以及信号剂自身。将细胞在 37 $^{\circ}$ C、5% 二氧化碳下培养 46 小时。将 BrdU 以 10 μ M 的终浓度加入, 这是通过加入 15 μ L 50 μ M BrdU 在 10% 培养基中的溶液来实现的。将细胞在 37 $^{\circ}$ C、5% 二氧化碳下培养过夜。

16 小时后, 用在整个该方案中使用的与室内真空源连接的 24 通道棒(V&P Scientific) 将上清液从每个孔中除去。通过用于所有随后的加液步骤的 Multidrop 384 平板充填器(Labsystems) 向每个孔中加入 50 微升 70% 乙醇/ 30% 磷酸盐缓冲盐水(4 $^{\circ}$ C)。将平板在室温培养 1 15 小时, 然后抽吸各个孔, 向每个孔中加入含有 0.5% 吐温 20 的 25 μ L 2 M HCl。将平板在室温培养 20 分钟。然后向每个孔中加入 25 微升 2 M NaOH。抽吸出每个孔中的液体, 并将孔用 75 μ L Hank's 平衡盐溶液洗涤 2 次。再用 75 μ L PBSTB (含有 0.5% 牛血清白蛋白和 0.1% 吐温 20 的磷酸盐缓冲盐水) 洗涤这些孔。向每个孔中加入 20 微升抗体溶液 20 (含有 0.5 μ g/mL 抗-BrdU 抗体(PharMingen) 和 1:2000 稀释的抗鼠 Ig-HRP (Amersham)。将平板与抗体溶液在室温培养 1 小时, 然后抽吸出抗体溶液, 并用磷酸盐缓冲盐水洗涤一次。最后向每个孔中加入 20 μ L ECL 检测试剂(得自 Amersham's ECL 检测试剂的溶液 1 和 2 的等体积混合物)。在 LJI Analyst 平板读数器上以 0.2 秒集成时间/孔 25 读取每个孔中的发光。在两个平板中重复该实验, 并在总共 16 个平行测定实验中测定每个两两组合。如下表所示的数据显示了每一化合物组合的抗增殖活性。重点显示了 5 个有统计学显著性的($p < 0.001$) 组合。所有活性都规格化到含有细胞但没有接受任何处理的一组孔上。因此, 为 1 的值代表没有活性的物质, 大于 1 的值代表一定水平 30 的抗增殖活性。

	DMSO	鬼臼毒素	紫杉醇	奎纳克林	苜普地尔	潘生丁	异丙嗪	田麦角碱
DMSO	1.0							
鬼臼毒素	6.5	6.5						
紫杉醇	6.3	6.3	7.7					
奎纳克林	1.7	6.6	6.9	2.3				
苜普地尔	1.8	15.2	3.1	3.0	14.4			
潘生丁	1.5	8.9	8.8	2.3	2.4	2.0		
异丙嗪	1.3	3.9	6.4	2.4	15.2	1.8	4.8	
田麦角碱	1.0	5.7	5.8	1.6	1.9	1.5	1.2	1.0

该表格表面，现有的得到 FDA 批准的具有抗增殖活性的药物的 5 种组合不同于单个组分。鬼臼毒素和紫杉醇都是抑制细胞有丝分裂的微管稳定剂，潘生丁是抗血小板剂，苜普地尔是钙通道阻断剂，异丙嗪是 H1 组胺受体拮抗剂，并且还用作 CNS 镇静剂和抗胆碱能剂。通常认为，作为人用治疗剂，潘生丁具有较高的安全性，特别是与紫杉醇和鬼臼毒素的毒副作用相比更是如此。因此，在该测定中，潘生丁增强了紫杉醇和鬼臼毒素对人肺癌细胞的抗增殖作用。此外，苜普地尔增强了鬼臼毒素的作用，但是抑制了紫杉醇的作用。该结果不能从现有技术中预测出来，并且突出表明了凭经验的高效率组合测试在观察药物当中的意想不到的相互作用的重要性。例如，在目前的治疗适应征中没有用作抗增殖剂的苜普地尔和异丙嗪组合在一起能强烈地抑制肺癌细胞的增殖。

其它实施方案

在本说明书上文中提及的所有出版物和专利都引入本发明以作参考。对于本领域技术人员来说显而易见的是，在不背离本发明范围和实质的情况下，可对所述的本发明方法和系统作不同的改进和改变。虽然已经结合特定的优选实施方案描述了本发明，但是应当理解，所要求保护的本发明应当不限于这样的特定实施方案。实际上，对于药物开发和相关领域的技术人员显而易见的，对本文所描述的进行本发明的方式所作的各种不同改变在本发明范围内。

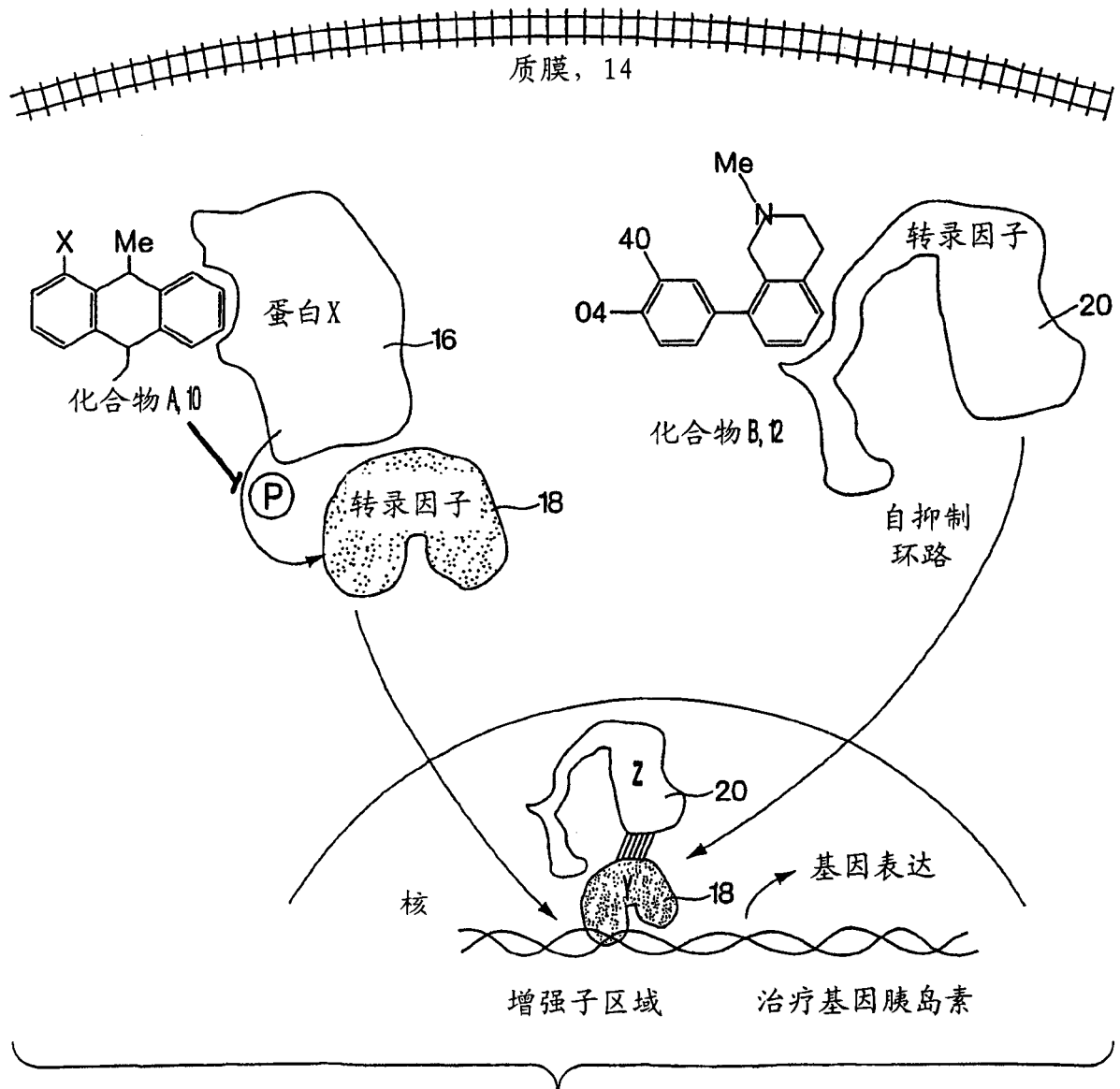


图 1

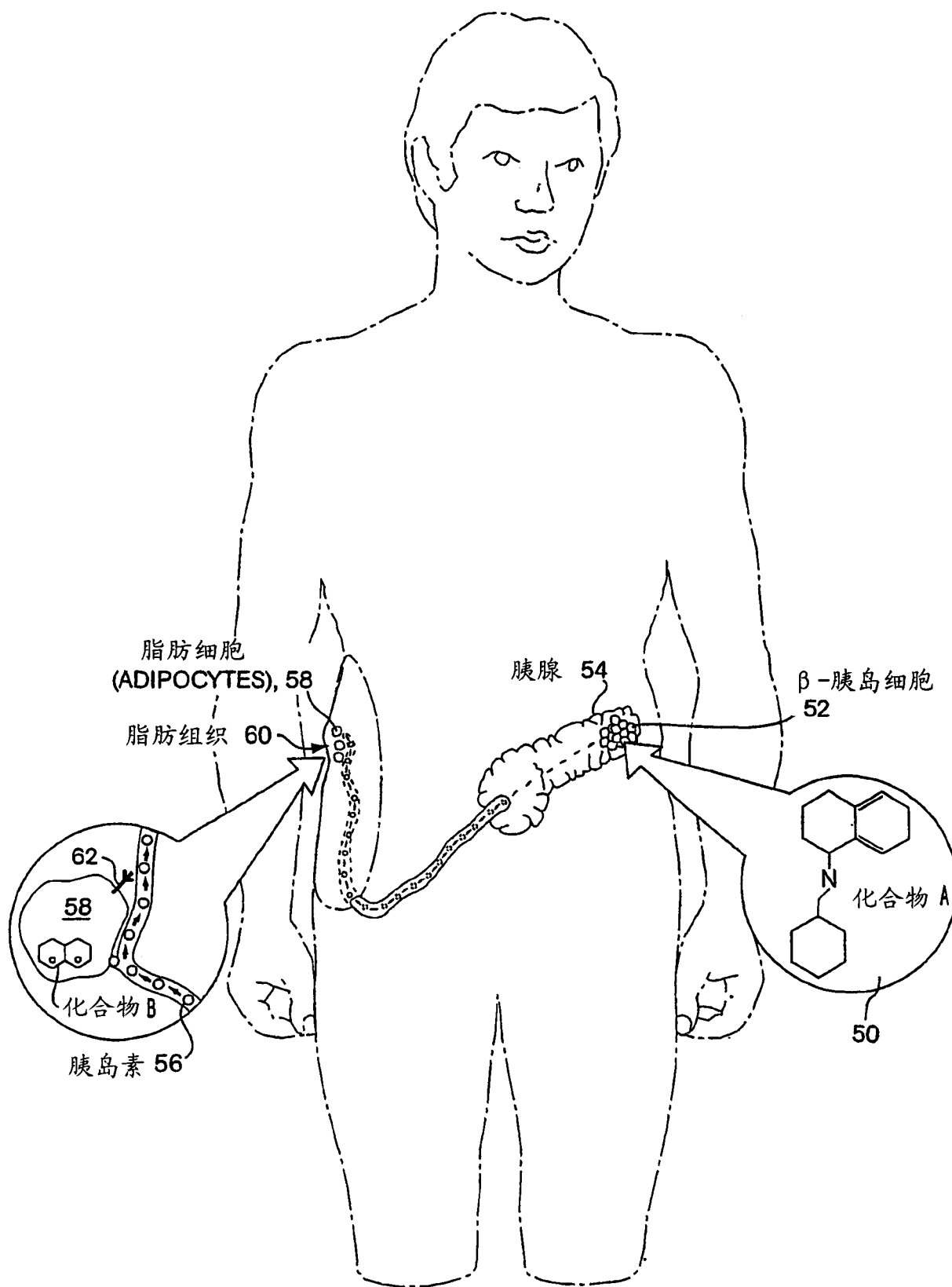


图 2

平板1

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
A	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
C	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
D	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
E	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
F	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
G	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
H	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
I	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
J	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
K	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
L	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
M	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
N	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

图 3A

平板2

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
A	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
C	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
D	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
E	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
F	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
G	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
H	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
I	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
J	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
K	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
L	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
M	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
N	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

图 3B

平板3

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
A	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
C	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
D	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
E	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
F	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
G	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
H	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
I	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
J	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
K	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
L	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
M	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
N	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

图 3C

平板4

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
A	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
C	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
D	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
E	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
F	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
G	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
H	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
I	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
J	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
K	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
L	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
M	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
N	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

图 3D

平板5

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
A	5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
C	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
D	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
E	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
F	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
G	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
H	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
I	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
J	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
K	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
L	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
M	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
N	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

图 3E

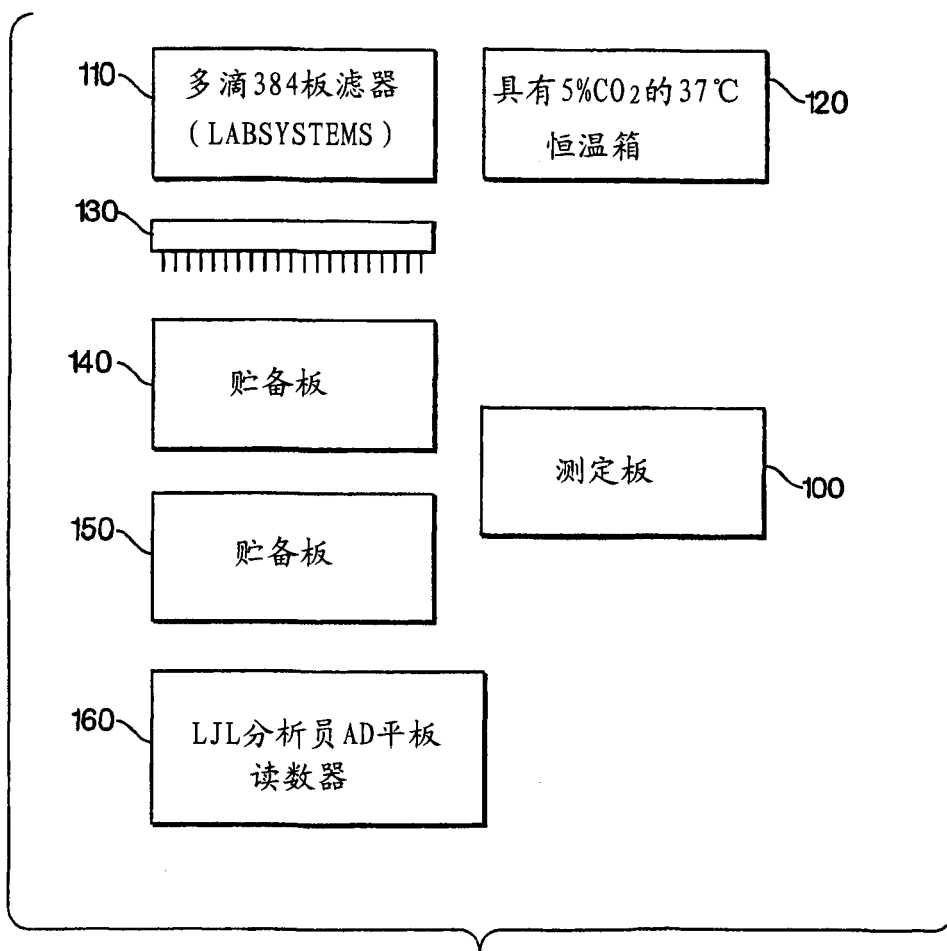


图 4

专利名称(译)	鉴定用作治疗剂的实体组合的方法		
公开(公告)号	CN1452719A	公开(公告)日	2003-10-29
申请号	CN01815353.4	申请日	2001-07-05
[标]申请(专利权)人(译)	康宾纳特克斯公司		
申请(专利权)人(译)	康宾纳特克斯公司		
当前申请(专利权)人(译)	康宾纳特克斯公司		
[标]发明人	BR斯托克维尔 A波里西 MA福利		
发明人	B·R·斯托克维尔 A·波里西 M·A·福利		
IPC分类号	G01N21/64 A61K45/00 A61P35/00 C12Q1/20 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/58 G01N37/00 G01N33/543		
CPC分类号	G01N33/5008 G01N33/5011 G01N33/502		
代理人(译)	关立新		
优先权	09/611835 2000-07-07 US		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及使用组合阵列筛选具有生物活性的双实体或更高级组合的方法。所述方法包括下列步骤：(a)提供实体，(b)产生实体的组合阵列，(c)提供由一种或多种生物成分组成的测试元件，(d)将实体组合阵列与测试元件在保证每一实体/测试元件接触都彼此分隔的条件下接触，(e)检测或测定测试元件的性质，和(f)鉴定出引起不同于组合中的实体自身的作用的对测试元件的作用的实体组合。

