

(由本局填寫)

承辦人代碼：
大 類：
I P C 分類：

A6

B6

本案已向：

國(地區) 申請專利，申請日期： 案號： ，☐有 ☐無主張優先權
 美 1994.12.12 08/354,199

有關微生物已寄存於： ，寄存日期： ，寄存號碼：

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄)

裝

訂

線

五、發明說明 (1)

1. 發明領域

本發明係有關在固相擔體上合成的受試化合物物種之組合庫領域。組合庫為多種含有無規選擇的次單位之化學化合物物種之集合。彼等組合庫可經篩選以鑑定出標的受體的配體，因此係有用者。更特定言之，當該固相擔體為可以便利地製成可進一步分割的片段時，本發明係有關構成這種組合庫的方法。

2. 發明背景

組合化學技術在現代產生新醫藥前導物的方法中正得到廣泛的接受 (Gallop, M. A. et al., 1994, J. Med. Chem. 37 : 1233-1251 ; Gordon, E. M. et al., 1994, J. Med. Chem. 37 : 1385-1401.) 一種在使用中的組合作法係基於包含著在每一固相擔體粒子上合成含有不同構造的庫之策略，用該庫與可溶性受體交互作用，與該巨分子目標交互作用的"珠粒"之鑑別，以及定出該鑑別出的"珠粒"所載構造等。(Lam, K. S. et al., 1991, Nature 354 : 82-84)。對此作法的另一取代方式為從固相擔體依序釋出確定的化合物部份，加上隨後測定其在溶液中的活性，鑑別出釋出該活性化合物的粒子，及經由直接序列分析解出其構造 (Salmon, S. E. et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 : 11708-11712)，或讀其密碼解出構造等。(Kerr, J. M. et al., 1993, J. Am. Chem. Soc. 115 : 2529-2531 ; Nikolaiev, V. et al., 1993, Pept. Res. 6 : 161-170 ; Ohlmeyer, M. H. J. et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 : 10922-10926)。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (2)

可溶性無規組合庫可以用由 Furka 首先說明的產生等莫耳肽混合物之單純原理予以合成 (Furka, A. et al., 1988, Xth International Symposium on Medicinal Chemistry, Budapest 1988; Furka, A. et al., 1988, 14th International Congress of Biochemistry, Prague 1988; Furka, A. et al., 1991, Int. J. Peptide Protein Res. 37: 487-493)。此外，也有提及反覆篩選所用的可溶性庫之構成 (Houghten, R. A. et al. 1991, Nature 354: 84-86)。K. S. Lam 揭示出使用不溶性無規組合庫的新穎且出乎意外有力的技術。Lam 氏在固相擔體上合成無規組合庫，使得每一擔體具有一有均一分子構造的受試化合物，並在不事先從擔體脫除受試化合物之下經由固相結合方案篩選該庫 (Lam, K. S. et al., 1991, Nature 354: 82-84)。

不過，在合成無規組合庫時，只有在合成所用粒子數目比所合成的構造數目較高至少一個大小級次之情況中，才能以近乎確定性地達到所有可能構造的表出 (Burgess, K. et al., 1994, J. Med. Chem. 37: 2985-2987)。

對於組合庫的構成，需要在正好匹配組成該庫的化合物數目之具有明確數目的固相粒子上進行該合成。該數目通常為在預定數目的"無規化"位置中所含每一位置上的次單位類別數目之相互乘積。例如，對於三個位置(三體物)的庫，其每一位置可被五種次單位之一種所佔據時，該庫即具有 $5 \times 5 \times 5 = 125$ 物種。在這種理想情勢下，可以消除掉由分解和混合程序所產生的庫所具統計不確定性。接著即可進行該庫的檢定而不會"漏失"掉一活性化合物或偵檢相同

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (3)

的構造數次，這種情形對於常只尋找單一活性化合的小庫(數萬個構造之範圍)係特別有利者。(參看，如 Stanková, M. et al., 1994, Drug. Develop. Res. 33 : 146-156))。因此，在合成組合庫的技藝中，有需要提出一種方法來合成一庫，其可使庫中每一潛在物種有一預定的次數，較佳者一次。

3. 發明概述

本發明涵蓋一種在固相擔體上製造一組合庫之方法，該基質可以經由切割而輕易地且連續地形成個別的分段。組合庫的受試化合物係由在不同位置上的次單位所構成的。組合庫的受試化合物物種係經由在每一受試化合物位置上逐步添加次單位而合成的。該次單位係從一組該位置的次單位類別中選出來的。根據本發明，在每一逐步添加之前，即將擔體基質分成一數目的分段，該數目等於在該步驟要加入的次單位類別之數目。該方法可以反覆地進行直到該擔體基質的分段變成小得不能實行為止。

採用本發明方法時，實施者可以構成一組合庫，其具有預定數目的物種及預定數目的固相擔體分段。於該庫中，任何單一固相擔體分段上只接著單一受試化合物物種。根據本發明構成的庫係將所含每一預定受試化合物物種置於預定數目的固相擔體分段之上。於一較佳實施例中，每一物種係存在於一個且只有一個擔體之上。

本發明方法不同於先前所用合成組合庫之方法，原因在於本發明採用一預定的分割程序以取代混合和無規再分類

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明 (4)

等步驟。這些庫因而稱為"非無規"或"經管制"(directed)的庫。

分割方法可以構思成使所得分段能大體地辨識，例如，具有不同的長度，寬度，或在該分段為平面者之情況中，該分段可構形成為具有獨特形狀的邊或末端等。經由將次單位類別的逐步添加與擔體的大體特性配合起來，即可鑑別次單位的類別。

4. 繪圖之簡略說明

圖1：用以合成經管制庫的通用程序。具有三個位置，於每一步驟有二個胺基酸予以無規化所得庫之例子，產生具有八個三肽的庫。

圖2：在棉線上合成具有125個四肽的混合物之模型庫的程序。

圖3：有2888個五肽的薄膜庫之合成程序。"n" = 在特定位置中無規化的胺基酸數目。

5. 發明之詳細說明

如本文中所用者，一受試化合物物種可為單一明確的分子構造。另外，一受試化合物物種可為一型主物種(motlf species)，其為一確定分子的混合物，其中在一或多個受試化合物物種的位置上存在著多重次單位物種。型主庫為一組合庫，其中的受試化合物物種為型主物種。如本文所用者，在構成型主庫時，"次單位類別"一詞指的是次單位化

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (5)

學物種或指次單位物種的明確混合物。關於型主庫，在已加入次單位物種混合物後，一受試化合物物種的位置稱為"混合位置"。為了符合無規組合庫的命名，在含有單一次單位物種的型主庫或非型主庫中，一受試化合物物種的位置稱為"無規位置"，例外者為當該庫的所有物種在某一位置具有相同的次單位物種時，該位置稱為"不變"位置或"固定"位置。型主庫在申請中，共同讓渡的專利申請序號No. 08/246,435 (1994年五月20日提出申請)中有說明，該申請案併於本文以為參考。

為了促成接著到擔體基質的受試化合物物種之合成，提出一種鍵聯工具。該鍵聯工具可具有多重反應性部位供次單位接著之用。於一實施例中，該次單位為具有可脫除的保護基之二官能次單位；胺基酸即為熟悉的例子，在這些情況之下，該受試化合物為聚合物。

於另一實施例中，該鍵聯工具包括含有多重，正交封阻的反應性部位供次單位，而稱為腳手架(scaffolds)。於該實施例中，次單位提供該腳手架的取代基。如此，受試化合物即為經取代的腳手架物種。加在該腳手架每一部位上的次單位可為二官能性或單官能性者，而接在腳手架所具反應性部位上的取代基可包括一或多種次單位。

根據本發明，經取代腳手架庫的二官能和單官能次單位及聚合物庫的二官能次單位可以經由各種化學鍵連接到成長中的受試化合物，下面所列為非限制性化學鍵例子：醯胺，酯，脲，胺基甲酸酯，碳-羰基鍵，碳-氮鍵，碳-碳單

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明 (6)

鍵，烯烴鍵，硫醚鍵，和二硫鍵等。腳手架庫和非-肽聚合物庫中所含受試化合物的製造化學載於審查中，共同讓渡的專利申請案，序號08/249,830(1984年五月24日提出申請)之中，其併於本文以為參考。

固相肽合成通常是在珠狀聚合物上進行的(Merrifield, R. B., 1963, J. Am. Chem. Soc. 85 : 2149-2154)，不過，也可以採用代用的固體擔體形式。該等固體擔體包括薄膜(Daniels, S. B. et al., 1989, Tetrahedron Lett. 30 : 4345-4348)，紙張(Frank, R., 1992, Tetrahedron 48 : 9217-9232；Frank, R. and R. Döring, 1988, Tetrahedron 44 : 6031-6040)，或棉Eichler, J. and R. A. Houghten, 1993, Biochemistry 32 : 11035-11041；Lebl, M. and J. Eichler, 1989, Pept. Res. 2 : 232-235有關多重合成技術的評述可參看(Frank, R., 1993, Bioorg. Med. Chem. Lett. 3 : 425-430；Jung, G. and A. G. Beck-Sickinger, 1992, Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 31 : 367-383)。對於棉的先前經驗(Eichler, J. et al., 1991, Pept. Res. 4 : 296-307)導致選擇棉線作為合成"經管制"或"非無規"庫的實驗固體擔體。這種庫的原理是單純者，闡示於圖1之中，將連續擔體依第一無規化步驟中所用次單位類別的數目區分成同數的部份，並將各分段個別地與恰當殘基反應。於反應完畢後，將擔體基質的每一分段再區分成與第二無規化步驟中所用次單位類別的數目同樣多的部份，用每一片段所得恰當分段集中進行偶合。

以這種方式，繼續合成直到受試化合物的所有位置都加上次單位為止或直到處理該擔體的機械限制都已達到為止。棉線的方便機械限制係在數量毫米的尺寸時達到，此限

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明 (7)

制將棉線庫的實用容量界定在10個受試化合物到50,000個受試化合物之間。具有這種比例的庫具有實質的用處，尤其是在非肽庫的情況中。依此，具有少到二，三，四和五個無規位置供2或3至19或更多的次單位類別數目所用之庫係在本發明範圍之內者。

於另一實施例中，該基質可為官能化薄膜。適當擔體基質的非限制性實施例包括聚丙烯和聚四氟乙烯(鐵氟龍TEFLON)等。最小實用面積為約1平方毫米，且由於該等薄膜只有10微米厚，因此在本發明方法採用自動化時，即可最便利地構成具有幾百萬化合物的庫。用薄膜狀擔體基質構成的庫，其大小只受限於篩選該庫的經濟性，效率及費用，而非受限於其合成的任何技術考慮。

本發明第三實施例為具有官能化材料線束，其機械性質比棉更好的"可再構造的牙刷"("restructurable toothbrush)。來自不同刷的線束可以解開並再組合成不同的組合供下一個次單位添加步驟所用。在二或三次逐步添加後可將個別線束解開且再組合供下一步驟所用。用於最後一個無規化步驟，可將該等線根據上述本發明方法切割成分段。

本發明所揭示的"經管制"庫的構造方法可用來摻加簡單的密碼程序，其係採用簡單地(如，大體目視地)鑑別庫中的重要構造特徵，如根據擔體的物理特性者，例如，材料的顏色(Campian, E. et al., 1993, 13th APS, Edmonton, Canada)，尺寸和形狀(於線的情況中為長度)等。

與以固定行列構成，其中每一物種的位置鑑別其構造之

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (8)

物種庫不同者，於本發明較佳實施例中一受試化合物物種的完整構造不被可大體觀察的特性所包容。相反地，在篩選試驗後，受試化合物物種的構造係決定於構造分析。該構造分析可以利用如，在肽類受試化合物的情況中的艾德曼降解，或質譜分析術等類技術進行。被分析的構造可為受試化合物本身或該構造可為接到每一個相擔體上除了受試化合物以外的編碼分子之構造。接到固相擔體上的編號分子所具構造為，第一，與接到該擔體上的受試化合物物種隨意地或系統地相關聯者以鑑定該受試化合物，及，第二，經選擇出以期能輕易地測定出者。在組合庫中任意密碼分子的選擇和使用載於審查中，共同讓渡的專利申請案，序號No. 08/249,830 (1994年五月24日提出申請)之中，其併於本文以為參考。

6. 實施例

下面的實施例係提出作為本發明某些具體實施例的闡釋性實施例而不欲用以對本發明範圍給予限制者。

我們製備了兩個模型"非無規"肽庫。下面要先簡略地摘述這兩庫的個別製備和篩選。各庫所用材料和方法，合成與篩選等之更詳細說明在6.1-6.5段中續予提出。

第一庫係在棉線上製備，只含有125種肽的混合物(參看圖2)。將棉線(125公分)用 β -丙胺酸改質(Eichler, J. et al., 1991, Pept. Res. 4: 296-307)並用甘胺酸接到其上。然後將棉線分成五個分段，於每一分段上分別偶合上Gly, Ala, Leu,

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

錄

五、發明說明 (9)

Phe, 和 Tyr。於完全偶合和 Fmoc 去保護基之後，在每一線上偶合 L-胺基酸混合物。之後，對於接下去的兩個步驟，將每一線片段截成 5 個分段，用選自上述五種胺基酸的組合中之一種胺基酸鹽化每一片段。其後，將所得 125 個片段組合，去保護基，中和，洗清和乾燥；導致產生具有 125 個四肽型主物種的型主庫（每一粒子上有 19 種肽的混合物，其中 1, 2 和 4 等位置為無規位置而位置 3 為固定位置）。

然後，將每一分段切成一半，將兩半段放置到兩個配合的微滴板內，其中一個裝著一濾器。接著，將濾板置於乾燥器內暴露於氮氣中以使肽從棉上脫出來。選用先前述及的氣體氮解劈斷法 (Bray, A. M. et al., 1994, J. Org. Chem. 59 : 2197-2203, Bray, A. M. et al., 1993, Tetrahedron Lett. 34 : 4411-4414)，其原因在於，在劈斷後，肽會留在乾燥擔體粒子的表面上。之後，可將肽溶解在試驗緩衝液中。

在用緩衝液萃取出該肽後，將該肽轉移到另一板上，進行抗- β -腦內啡抗體結合檢定。其中有一洞經觀察到有陽性反應，經分析對應的棉分段之順序，鑑定出序列 Tyr-Gly-Mix-Phe (Mix 為所有胺基酸的混合物)，對應於已知的抗- β -腦內啡抗體之主題。進一步分析顯示出一公分的棉線可得到 400 奈莫耳 (nmol) 的釋出肽，可用來製備 40 毫升 10 μ M 的受試化合物溶液，超出多重檢定所夠用者。

第二實施例為一個 2888 肽庫，其係用一張 16 x 16 公分的官能化聚四氟乙烯 ("鐵氟龍") 薄膜片合成者。用 N-保護 β -丙胺酸將該薄膜鹽化後，構成具有 β -丙胺酸和甘胺酸重複型

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (10)

序列的聯結者 (linker)。圖3列出其合成順序。該庫的受試化合物物種具有構造 Xxx-Xxx-Pro/Gly-Gln/Phe-Phe/Leu (Xxx為無規化所用19種L胺基酸中的一種)，其中含有一個序列 Leu-His-Pro-Gln-Phe 的複本 (38種 Xxx-His-Pro-Gln-Xxx 複本)，其中的 His-Pro-Gln 為鏈黴抗生物素蛋白 (streptavidin) 的已知主題，及一個 Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu 複本，其含有 Tyr-Gly-Xxx-Phe 序列，為抗- β -腦內啡單株抗體的已知主題。(Barrett, R. W. et al., 1992, Anal. Biochem. 204 : 357-364 ; Cwirla, S. E. et al., 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87 : 6378-6382 ; Devlin, J. J. et al., 1990, Science 249 : 404-40625 ; Lam, K. S. et al., 1993, Bioorg. Med. Chem. Lett. 3 : 419-424; Lam, K. S. et al., 1991, Nature 354:82-84 ; McLafferty, M. A., 1993, Gene 128 : 29-36 ; Pinilla, C., 1993, Gene 128 : 71-76) 然後用兩種模型目標，鏈黴抗生物素蛋白和抗- β -腦內啡，以固相結合程序篩選該庫。

用鏈黴抗生物素蛋白篩選時，得到55個陽性方塊。彼等肽的特定性係經由添加已知的競爭者生物素予以測定的。含有肽的方塊中有17塊在生物素存在中不會和鏈黴抗生物素蛋白反應，不過，所有該17塊方塊於沒有生物素之下再度有陽性染色，且具有大約相等的強度。對三塊方塊上的肽個別地定其序列，得到表1所列結果。將所有方塊切成小分段並同時進行序列測定。這種多重序列測定實驗 (Lebl, M. et al., 1993, In C. H. Schneider and A. N. Eberle, Peptides 1992, Proc. 22.EPS Eds. ESCOM, Leiden) 揭露出肽鏈個別位置的要求。

與抗- β -腦內啡浸漬得到21個染色方塊。將這些陽性交

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (11)

互作用粒子去染色，並再與抗- β -腦內啡抗體一起浸漬，但使用另外的偵檢程序。於第一種染色中，用生物素標示抗體並與鏈黴抗生物素蛋白-鹼性磷酸酶複合物一起浸漬以偵檢結合目標。第二回偵檢係經由與抗-小鼠抗體-鹼性磷酸酶複合物一起浸漬而進行的。以這種方式，消除掉第一種偵檢程序的非特定性交互作用且由於第二種偵檢係只用經選擇過的粒子進行的，因此明顯地減低偵檢出非特定性交互作用(偵檢系統的特定性交互作用)的機率。第二種浸漬只偵檢出三個陽性方塊。測定其序列而得表1所示序列。發現其中有含主題Tyr-Gly-__-Phe之預測序列。

表1. 在經選出用以結合到鏈黴抗生物素蛋白和抗- β -腦內啡的陽性方塊上所找到的序列

<u>鏈黴抗生物素蛋白</u>	<u>抗-β-腦內啡</u>
Gly-His-Pro-Gln-Phe	Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu
Met-His-Pro-Gln-Phe	Tyr-Gly-Gly-Phe-Phe
Lys-His-Pro-Gln-Phe	Tyr-Gly-Pro-Phe-Leu

6.1 材料與方法

儀器分析：UV/VIS吸收光譜係在Hewlett Packard HP 8452A Diode-Array分光光度計上，用1公分石英光析管記錄的。艾德曼降解測定序列係在ABI蛋白質序列測定儀 (Applied Biosystems, Foster City, CA) 和 Porton PI 3010 儀器 (Porton Instruments, Tarzana, CA) 之上進行的。

材料：商業級溶劑不經純化即使用。經保護的胺基酸係得

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

錄

五、發明說明 (12)

自 Bachem (Torrance, CA), Advanced ChemTech (Louisville, KY), 或 Propeptide (Vert-le-Petit, France)等者。單株抗- β -腦內啡抗體(3-E7系)係購自 Boehringer Mannheim。拼合到鹼性磷酸酶的鏈黴抗生物素蛋白係得自 Pierce (Rockford, IL), 而山羊抗-小鼠鹼性磷酸酶複合物係得自 Bio-Rad (Richmond, CA)。d-生物素係購自 Sigma (St. Louis, MO)。

通用程序：固相合成係在聚丙烯注射筒內人工進行的 (Krchňák, V. and J. Vágner, 1990, Pept. Res. 3 : 182-193)。Fmoc 保護基係用 50%六氫吡啶/DMF以 1 x 10分鐘切除。使用 DIC/DMF來活化 $N\alpha$ -Fmoc胺基酸。每一縮合反應的完成性係用溴酚藍方法監測的 (Krchňák, V. et al., 1988, Collect. Czech. Chem. Commun. 53 : 2542-2548)。偶合程序包括在偶合與去保護基之間及在去保護基與偶合之間用 DMF進行洗清(6-8次)。最後一次去保護基係用混合物 K 完成的 (King, D. S. et al., 1990, Int. J. Peptide Protein Res. 36 : 255-266)。

6.2 在棉線上合成經管制庫

將棉線(5米, 6米/克)置於 25%三氟乙酸(TFA)/二氯甲烷(DCM)中處理 1小時。之後, 用 DCM洗(3x), 以 5%二異丙基乙胺/DCM中和(5分鐘), 再用 DCM和 DMF洗(3x)。在添加 N-甲基咪唑(3.5毫莫耳)活化下, 用 DIC(2毫莫耳)和 HOBt(2毫莫耳)將 Fmoc- β -Ala(2毫莫耳)偶合隔夜。用 DMF洗棉線並經由光度測定法測定切出的 Fmoc基而測定取代度-0.41毫莫耳/克(683奈莫耳/公分)。取 5條棉線(各 25公分)置於五支聚丙烯注射筒內並以 DIC/HOBt程序偶合上經 Fmoc保護的胺基酸(Phe,

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (13)

Tyr(But), Ala, Leu, Gly)。於偶合完成後(以溴酚藍法監測)，用DMF洗該等棉線，置於一未注射筒內，切斷Fmoc基。在用DMF和2% HOBt/DMF溶液洗清之後，用其莫耳比例(在領試實驗中測定)針對不同反應性調整過的19種L-Fmoc胺基酸(不含半胱胺酸)混合物偶合到所有的棉段上。(Eichler, J. and R. A. Houghten, 1993, Biochemistry 32 : 11035-11041 ; Geysen, H. M. et al., 1986, Mol. Immun. 23:709-715 ; Pinilla, C. et al., 1992, BioTechniques 13: 901-905)於此偶合反應完成之後，洗清棉線，切掉Fmoc基並將洗後的棉線以下述方式分到五支注射筒內。從每一條棉線切出5段各5公分的棉線段並放置在不同的注射筒內。以這種方式，所有注射筒都只含一段從每一25公分棉線切出的5公分棉線段而沒有一支注射筒裝著一多於一段的棉線段。進行五種胺基酸衍生物(同上)的偶合，洗滌棉線，脫除Fmoc基並再細分棉線段。於此例中，係從所有五公分線段切出1公分長線段並分別放到五支注射筒內。進行相同的五種胺基酸之偶合，切掉Fmoc基並用TFA, DCM和甲苯醚(50 : 45 : 5)混合物切除側鏈保護基兩小時。之後，用DCM, MeOH清洗棉線段並予以乾燥。一棉線樣品的胺基酸定量分析顯示有400奈莫耳/公分的取代度。

6.3. 棉線上的經管制庫之篩選

將棉線段切半，分別放到兩個匹配微滴板(一個裝著一濾器底而另一個為正常板-"構造估測板")的匹配位置。將濾器板放到乾燥器內，反覆地抽氣及充填氣體氮。於20小時的暴露於氮氣中之後，將乾燥器充真空，脫除氮氣。於各

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (14)

洞中加入釋放緩衝液PBS/吐溫(Tween)(100微升)並將各板置於室溫下振盪隔夜，該溶液係經過濾到試驗板者。

進行抑制ELISA時，係使用96-洞的Immulon板(Dynatech)。每一洞最先是使用50微升的鏈黴抗生物素蛋白(20微克/毫升)/碳酸氫鹽緩衝液(pH 9.4)(Pierce)予以覆蓋隔夜，接著用PBS洗三次。用200微升的牛血清白蛋白(BSA, 3毫克/毫升)/PBS處理各洞以遏止非特定性吸附，然後。用PBS/吐溫洗三次，再加入50微升的生物素化Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu(Salmon, S. E. et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 11708-11712)(10奈克/毫升)。於一小時後，用PBS/吐溫洗各板，加入50微升從棉線段釋出的溶液(或Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu, 陽性對照)，接著加入50微升的抗- β -腦內啡(40奈克/毫升)。在室溫下浸漬一小時後，用PBS/吐溫洗各板，再加入50微升1:1000稀釋度的山羊抗-小鼠IgG辣根過氧化酶拼合物(Bio-Rad)。一小時之後，清洗各板，加入100微升的30微升30% H₂O₂/10毫升2,2'-疊氮基二-(3-乙基苯并噻唑啉磺酸)受酶質/檸檬酸鹽緩衝液(pH 4.2)溶液。15分鐘之後，在405 nm下讀取各ELISA板的值。只有一個洞顯示出明顯的抑制現象。用"構造估測板"中配合洞所得棉線段樣品(0.3毫米)進行序列測定而得序列Tyr-Gly-Mix-Phe。

6.4 在官能化交聯鐵氟龍薄膜上合成經管制庫

將具有約35奈莫耳/平方公分取代度的親水性胺丙基官能化薄膜(在16×16公分鐵氟龍薄膜上UV交聯胺丙基甲基丙烯醯胺，N,N-二甲基丙烯醯胺，和亞甲基-二-丙烯醯胺而得者

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明 (15)

， Perseptive Biosystems, Bedford, MA) 放到 50 毫升 Falcon 管內並用 Fmoc- β -Ala 在 DMF 中以 DIC/HOBt 程序進行醃化。依序偶合上 Fmoc-Gly, Fmoc- β -Ala, 和 Fmoc-Gly。於去保護基後，將薄膜分成兩部份，再分別偶合上 Fmoc-Phe 和 Fmoc-Leu。於偶合完畢(溴酚藍監測)並去保護基之後，將各分段再分成兩半，且予以重組後進行 Fmoc-Gln 和 Fmoc-Phe 的偶合。要進行下一偶合時，將薄膜再分成兩分段並予以重組以進行 Fmoc-Pro 和 Fmoc-Gly 的偶合。至此，將這些偶合所得各分段(8 x 4 公分)細分成 19 條(8 x 0.21 公分)共將各條置於 19 支小的聚丙烯管內。使用 19 種自然胺基酸(Cys 除外)在此階段進行偶合。於偶合完畢和去 Fmoc 保護基之後，將各條切成 19 分段(4 x 2.1 毫米)並再分置於 19 個容器內。使用同樣一組 19 種胺基酸進行最後的偶合。將所有分段組合，脫除 Fmoc 基並用混合物 K 切斷側鏈保護基(King, D. S. et al., 1990, Int. J. Peptide Protein Res. 36: 255-266)。用 TFA(2x), DCM(5x), MeOH(3x), 和水(5x)依次洗各薄膜分段。根據最後釋出的 Fmoc 之吸光度測量定出取代度為 43.3 奈莫耳/平方公分。

6.5 在交聯鐵氟龍薄膜上進行經管制庫的篩選

根據公開的程序進行肽庫的篩選(Lam, K. S. and M. Lebl, 1992, Immunomethods 1: 11-15)。先用雙重蒸餾過的水洗該肽方塊。於充分洗滌之後，用 0.05% 明膠(w/v)洗滌及塗被該等方塊以阻斷非特定性結合。之後，用 PBS/吐溫(137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 4.3 mM Na_2HPO_4 , 1.4 mM KH_2PO_4 , pH 7.2, 含有 0.1% 吐溫-20)和 2 x PBS/吐溫/明膠(2 x PBS, 0.1% 吐溫-

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明 (16)

20(v/v)，和 0.05%明膠(w/v))洗清，接著與 20 nM鏈黴抗生物素蛋白-鹼性磷酸酶/2 x PBS/吐溫/明膠一起浸漬。再度用 PBS/吐溫，2 x PBS/吐溫/明膠及 TBS(137 mM NaCl，2.7mM KCl，25mM Tris鹼，pH 7.4)依次洗該庫。然後加入標準受酶質 5-溴-4-氯-3-吡啶基磷酸酯。接著，將該庫和受酶質移置於培養皿中進行顏色顯現。收集到 55 個有包方塊，用 6M 胍鹽酸鹽，pH 1.0 洗後，用 DMF 去色，以明膠塗被並用 100 nM d-生物素以 20nM 鏈黴抗生物素蛋白-AP 在 2 x PBS/吐溫/明膠中進行競爭。與受酶質浸漬得到 17 個無色有競爭的方塊。再與 20 nM 鏈黴抗生物素蛋白-AP 浸漬接著用受酶質處理後產生 17 個陽性反應方塊。

剩餘的庫用 6M 胍鹽酸鹽，pH 1.0，DMF 及明膠塗被予以循環處理。於用 PBS/吐溫和 2 x PBS/吐溫/明膠依次洗清後，加入 250 奈克/毫升生物素化抗- β -腦內啡抗體/2 x PBS/吐溫/明膠。於充分洗滌後，加入鏈黴抗生物素蛋白-鹼性磷酸酶。接著，洗該庫，加入受酶質，依上文所述進行顏色顯現。有 21 個方塊顯示顏色，並隨後循環處理使彼等準備好供特定性測定之用。使用 2 x PBS/吐溫/明膠作為緩衝液，加入 200 奈克/毫升的抗- β -腦內啡抗體，接著用 1.5 nM 山羊-抗-小鼠-AP 充分洗滌。之後，用 PBS/吐溫，2 x PBS/吐溫/明膠和 TBS 依次清洗，並加入受酶質。其結果，有 3 方塊顯現出表示有結合之顏色。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

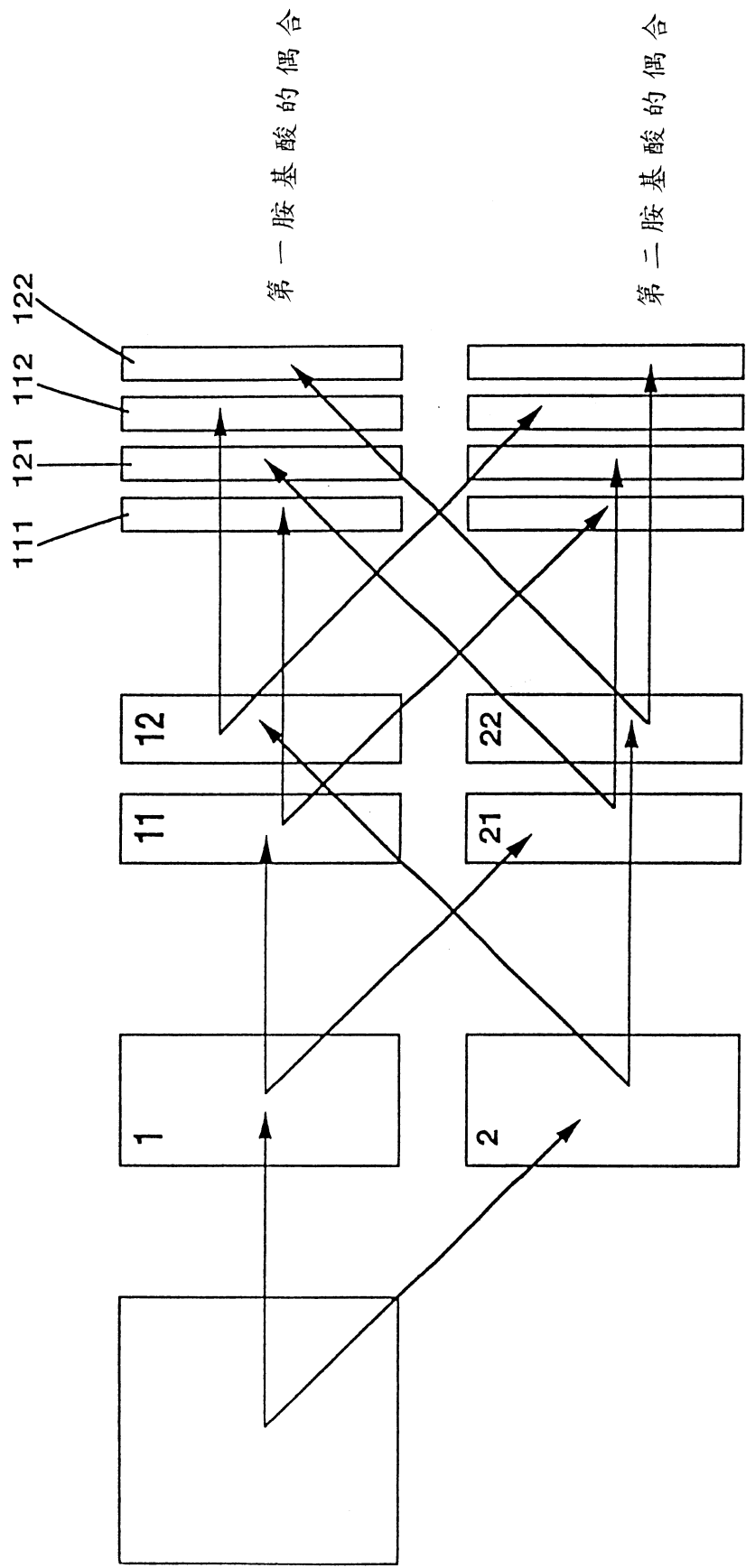


圖 1 第一次偶合 第二次偶合 第三次偶合

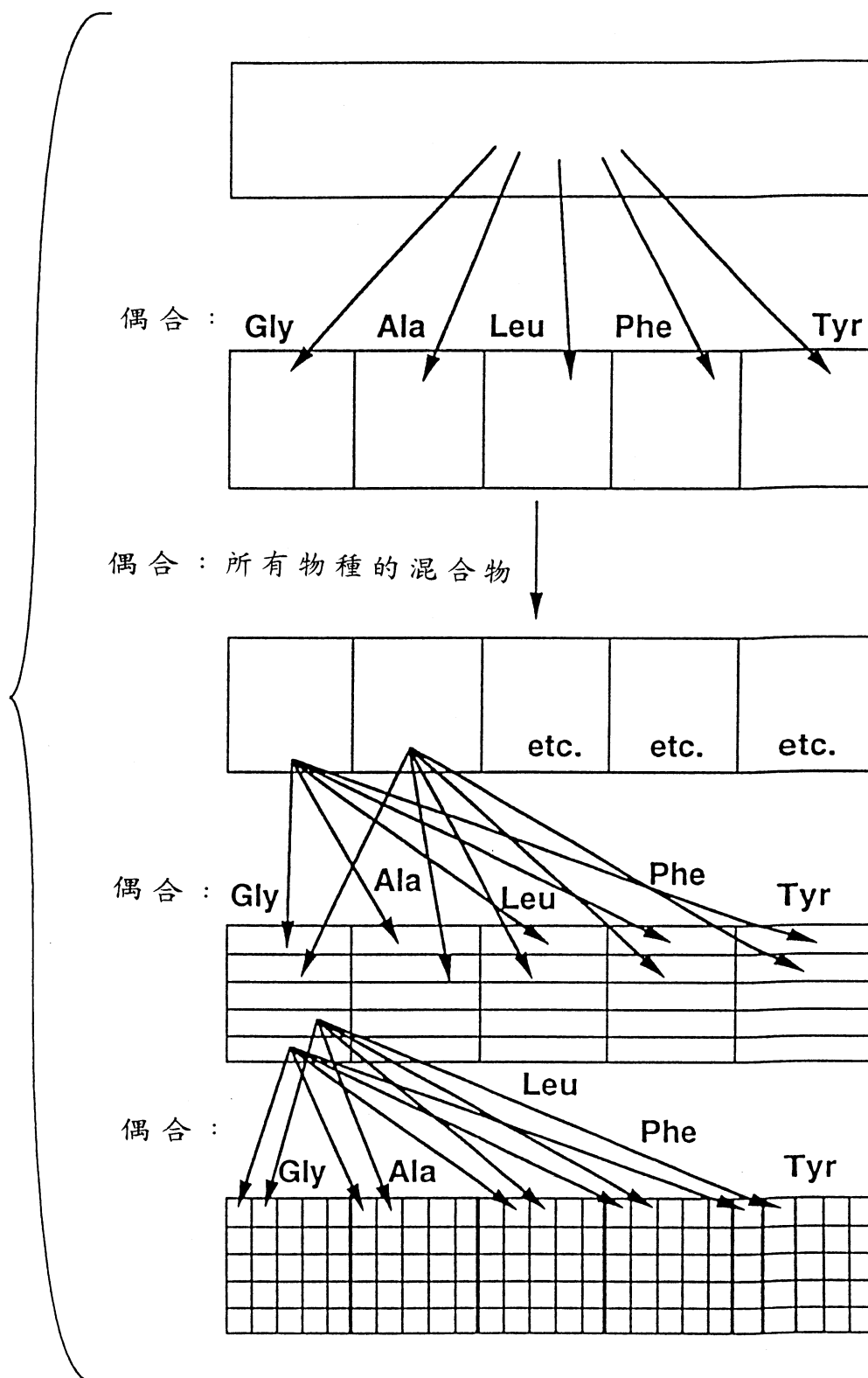
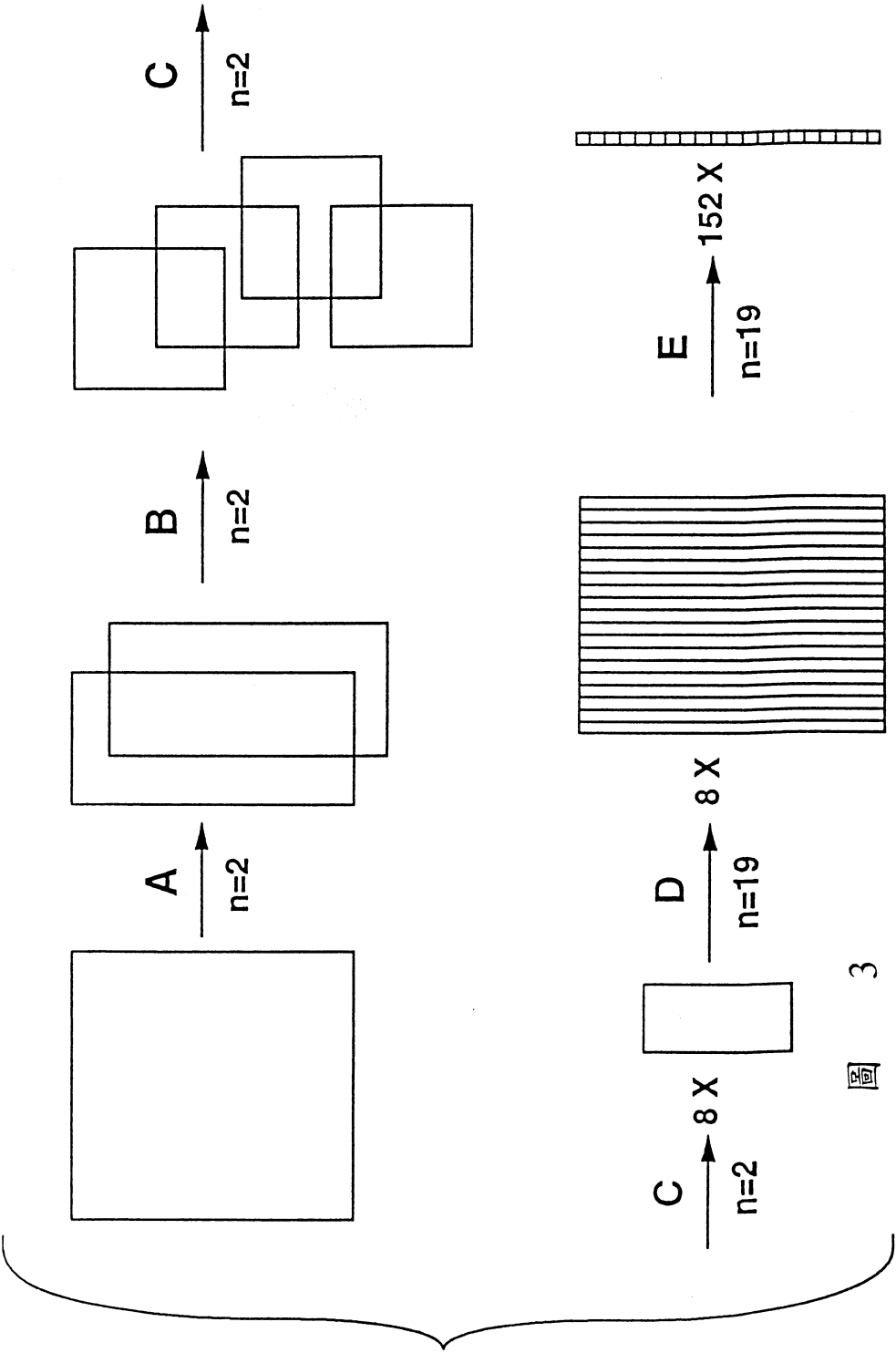


圖 2



公告本

申請日期	84.12.28
案號	84114061
類別	C07K 1/04

(92年5月替換頁)

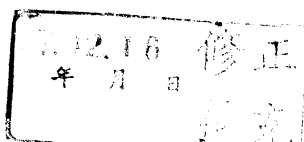
92年5月27日修正補充

544454

(以上各欄由本局填註)

發明專利說明書

一、發明名稱	中文	包含用於鑑定所標定配體或受體之受試化合物的組合庫
	英文	COMBINATORIAL LIBRARIES COMPRISING TEST COMPOUNDS USEFUL FOR IDENTIFYING A LIGAND OR ACCEPTOR OF INTEREST
二、發明人	姓名	麥可·勒布爾
	國籍	捷克
	住、居所	美國亞利桑納州歐洛山谷市北格蘭維爾肯永路12460號
三、申請人	姓名(名稱)	美商亞芬帝斯製藥公司
	國籍	美國
	住、居所(事務所)	美國紐澤西州水橋市鹿特路202-206號
	代表人姓名	羅斯·J·歐勒 ROSS J. OETHER



A5

B5

四、中文發明摘要(發明之名稱：

包含用於鑑定所標定配體或受體之受試化合物
的組合庫)

揭示一種在固相擔體上產生非無規組合庫之技術，其中一組預定的受試化合物物種各存在於預定數目的固相擔體上，較佳者，只在一擔體上，且各固相擔體只具有單一受試化合物物種。因為該技術不採用該固相擔體的任何無規分割，所以各預定受試化合物物種係以絕對確定度製備者。更確切而言，該方法是根據在加入一種以上的次單位之每一合成步驟之前，對連續固相擔體基質之逐步區分。該固相擔體基質的非限制性例子包括聚丙烯膜，聚四氟乙烯膜和棉線等，此外也揭示用該技術製得之組合庫。

英文發明摘要(發明之名稱：

COMBINATORIAL LIBRARIES COMPRISING TEST
COMPOUNDS USEFUL FOR IDENTIFYING A LIGAND
OR ACCEPTOR OF INTEREST)

A technique is disclosed for generating nonrandom combinatorial libraries on solid phase supports in which each of a set of predetermined species of test compounds is present on a predetermined number of solid phase supports, preferably on only one, and each solid phase support has only a single species of test compound. Each of the predetermined species of test compounds is prepared with absolute certainty because the technique does not employ any random division of the solid phase supports. Rather, the method is based on the stepwise division of a continuous solid phase support matrix prior to each synthetic step in which more than one type of subunit is added. Non-limiting examples of matrices of the solid phase supports include polypropylene membranes, polytetrafluoropropylene membranes and cotton thread. The combinatorial libraries made by the technique are also disclosed.

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄)

裝

訂

線

六、申請專利範圍

修正
92.3.20 補充

公告本

1. 一種製造受試化合物之組合庫之方法，該方法包括下列步驟：
 - (a) 選出兩塊或更多塊物理性及重覆性可分割之固相擔體，每一塊擔體只附接許多種類別次單位中之一種，其中該次單位具有被保護基保護之反應性基團，而此次單位之類別數目則與所選用之擔體數目相等，每一種次單位只附接一塊擔體；
 - (b) 脫除保護基，因此提供反應基；
 - (c) 分割每一塊擔體形成許多物理上分開之小塊，小塊之數目與次單位類別數目相等；及
 - (d) 使許多種類別次單位中一種次單位附接已接在每一塊擔體上之各類別次單位，以形成許多不同受試化合物物種，每一塊擔體上只形成一種受試化合物，每一種受試化合物包含多數次單位，其中受試化合物之次單位類別數目等於步驟(a)所選用擔體塊數目，每一塊擔體上只形成一種受試化合物物種，且受試化合物物種數目等於擔體塊數目。
2. 根據申請專利範圍第 1 項之方法，其尚包括反覆進行一次或多次步驟(c)與(d)之步驟。
3. 根據申請專利範圍第 1 項之方法，其中次單位為胺基酸。
4. 根據申請專利範圍第 1 項之方法，其中固相擔體選自下列各物組成之群中：膜、紙片與棉。
5. 根據申請專利範圍第 4 項之方法，其中該膜為經官能化

六、申請專利範圍

交聯之聚四氟乙烯。

6. 根據申請專利範圍第 4 項之方法，其中該棉係呈繩或線狀。
7. 一種製造受試化合物之組合庫之方法，該方法包括至少連續兩次反覆進行下列步驟：
 - (a) 選出由兩種或更多種次單位類別所組成之組合；
 - (b) 將具有鍵聯質(linker)之連續固相擔體分割成許多物理上分開之小塊擔體，該鍵聯質具有反應性位置及一個或多個保護基，且小塊之數目等於所選用次單位類別數目之整數倍；
 - (c) 使一種類別次單位實質上附接在已附接固相擔體對應小塊上之所有反應性位置；之後
 - (d) 脫除鍵聯質之保護基，以形成反應性位置，藉以提供至少兩個次單位附接在每一塊固相擔體上，且其中每一塊固相擔體附接具有單一一種受試化合物之選定次單位，每一種受試化合物由固相擔體之預定塊數代表。
8. 根據申請專利範圍第 7 項之方法，其中固相擔體之鍵聯質為一種骨架，該骨架係由許多呈直角型保護之反應性位置組成。
9. 根據申請專利範圍第 7 項之方法，其尚包括在最後一次重覆後，自固相擔體中釋出所附接次單位之步驟。
10. 根據申請專利範圍第 7 項之方法，其中固相擔體選自下列各物組成之群中：膜、紙片與棉。

六、申請專利範圍

11. 根據申請專利範圍第 10 項之方法，其中該膜為經官能化交聯之聚四氟乙烯。
12. 根據申請專利範圍第 10 項之方法，其中該棉係呈繩或線狀。
13. 根據申請專利範圍第 7 項之方法，其中次單位具有一個或多個可與鍵聯質之至少一個保護基分別獨立釋出之保護基。
14. 根據申請專利範圍第 7 項之方法，其中步驟(b)中擔體塊數等於所選用次單位類別數，因此每一種受試化合物類別即由一塊固相擔體代表。
15. 一種製造受試化合物之組合庫之方法，該方法包括下列步驟：
 - (a)使具有一個以上保護基之鍵聯質附接至連續固相擔體；及
 - (b)脫除鍵聯質之一種保護基，以提供反應性位置；
且進一步包括至少重覆兩次下列步驟：
 - (c)選出由兩種或更多種次單位類別所組成之組合；
 - (d)將連續固相擔體分割成許多物理上分開之小塊擔體，
小塊之數目等於所選用次單位類別數目之整數倍；
 - (e)使一種類別次單位實質上附接在已附接固相擔體對應小塊上之所有反應性位置；之後
 - (f)脫除鍵聯質之保護基，以形成反應性位置，
藉以提供至少兩個次單位附接在每一塊固相擔體上，且
其中每一塊固相擔體附接具有單一一種受試化合物之選

六、申請專利範圍

定次單位，每一種受試化合物由固相擔體之預定塊數代表。

16. 根據申請專利範圍第 15 項之方法，其中固相擔體之鍵聯質為一種骨架，該骨架係由許多呈直角型保護之反應性位置組成。
17. 根據申請專利範圍第 15 項之方法，其中次單位為雙官能性次單位，且保護基為次單位之取代基。
18. 根據申請專利範圍第 17 項之方法，其中雙官能性次單位為胺基酸。
19. 根據申請專利範圍第 15 項之方法，其尚包括在最後一次重覆後，自固相擔體中釋出所附接次單位之步驟。
20. 根據申請專利範圍第 15 項之方法，其中固相擔體選自下列各物組成之群中：膜、紙片與棉。
21. 根據申請專利範圍第 20 項之方法，其中該膜為經官能化交聯之聚四氟乙烯。
22. 根據申請專利範圍第 20 項之方法，其中該棉係呈繩或線狀。
23. 根據申請專利範圍第 15 項之方法，其中次單位具有一個或多個可與鍵聯質之至少一個保護基分別獨立釋出之保護基。
24. 根據申請專利範圍第 15 項之方法，其中步驟(d)中擔體塊數等於所選用次單位類別數，因此每一種受試化合物類別即由一塊固相擔體代表。
25. 一種製造受試化合物之組合庫之方法，該方法包括至少

六、申請專利範圍

連續兩次反覆進行下列步驟：

- (a)選出由兩種或更多種具有一個或多個保護基之次單位類別所組成之組合；
- (b)將具有鍵聯質(linker)之連續固相擔體分割成許多物理上分開之小塊擔體，該鍵聯質具有反應性位置且小塊之數目等於所選用次單位類別數目之整數倍；
- (c)使一種類別次單位實質上附接在已附接固相擔體對應小塊上之所有反應性位置；之後
- (d)脫除次單位之保護基，以提供反應性位置，藉以提供至少兩個次單位附接在每一塊固相擔體上，且其中每一塊固相擔體附接具有單一一種受試化合物之選定次單位，每一種受試化合物由固相擔體之預定塊數代表。

- 26. 根據申請專利範圍第 25 項之方法，其中次單位為雙官能性次單位，且保護基為次單位之取代基。
- 27. 根據申請專利範圍第 26 項之方法，其中雙官能性次單位為胺基酸。
- 28. 根據申請專利範圍第 25 項之方法，其中鍵聯質具有一個或多個保護基，鍵聯質之保護基與次單位之保護基可分別獨立釋出。
- 29. 根據申請專利範圍第 25 項之方法，其中固相擔體選自下列各物組成之群中：膜、紙片與棉。
- 30. 根據申請專利範圍第 29 項之方法，其中該膜為經官能化交聯之聚四氟乙烯。

六、申請專利範圍

31. 根據申請專利範圍第 25 項之方法，其中步驟(b)中擔體塊數等於所選用次單位類別數，因此每一種受試化合物類別即由一塊固相擔體代表。
32. 一種製造受試化合物之組合庫之方法，該方法包括下列步驟：
- (a) 使具有一個或多個保護基之鍵聯質附接連續固相擔體；
 - (b) 脫除鍵聯質之一保護基，以提供反應性位置；
且進一步包括至少連續兩次反覆進行下列步驟：
 - (c) 選出由兩種或更多種具有一個或多個保護基之次單位類別所組成之組合；
 - (d) 將連續固相擔體分割成許多物理上分開之小塊擔體，
小塊之數目等於所選用次單位類別數目之整數倍；
 - (e) 使一種類別次單位實質上附接在已附接固相擔體對應小塊上之所有反應性位置；之後
 - (f) 脫除次單位之保護基，以形成反應性位置，
藉以提供至少兩個次單位附接在每一塊固相擔體上，且其中每一塊固相擔體附接具有單一一種受試化合物之選定次單位，每一種受試化合物由固相擔體之預定塊數代表。
33. 根據申請專利範圍第 32 項之方法，其中鍵聯質具有一個以上可與次單位之保護基分獨立釋出之保護基。
34. 根據申請專利範圍第 32 項之方法，其中固相擔體選自下列各物組成之群中：膜、紙片與棉。

六、申請專利範圍

35. 根據申請專利範圍第 34 項之方法，其中該膜為經官能化交聯之聚四氟乙烯。
36. 根據申請專利範圍第 32 項之方法，其中步驟(d)中擔體塊數等於所選用次單位類別數，因此每一種受試化合物類別即由一塊固相擔體代表。