

申請日期	89 年 12 月 4 日
案 號	89125804
類 別	

A4
C4

(以上各欄由本局填註)

發 明 專 利 說 明 書		
一、發明 新型名稱	中 文	
	英 文	
二、發明 創作人	姓 名	(4) 查理斯·馬思克 Marschke, Charles K. (5) 羅諾德·沙弗 Sarver, Ronald W.
	國 籍	(4) 美國 (5) 美國
	住、居所	(4) 美國密西根州卡拉馬如南伯迪克街二八三五號 公寓B棟 2835 South Burdick Street, Apartment B, Kalamazoo, MI 49001, U. S. A. (5) 美國密西根州坡泊布蘭汀大道三二八五三號 32853 Bradeen Avenue, Paw Paw, MI 49079, U. S. A.
	姓 名 (名稱)	
三、申請人	國 籍	
	住、居所 (事務所)	
	代 表 人 姓 名	

裝
訂
線

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

(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
美國 1999 年 12 月 9 日 09/458,171 ☒有主張優先權

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)

發明背景

一項有關藥物發明方法之主要挑戰為小的有機配位基之鑑定，其中該配位基可結合至標的物種，特別是蛋白質標的物。多數新蛋白質標的物係因基因組及生物資訊上的努力所發現的。這些蛋白質中許多具有未知功能或已知特定配位基。因此，利用高產量篩選(HTS)法，包括超高產量篩選法(UHTS)篩選大化學基因庫時，這些標的物之配位基的鑑定存在著挑戰，特別是從分析發展的觀點來看。因此，需要一種可用於鑑定配位基之直接、普遍可應用之方法，特別是 HTS 分析方法，其中該配位基可結合蛋白質，特別是這些具有未知官能度之蛋白質。

已知基質或特定配位基之結合一般會改變蛋白質內在安定性並因此所產生的變性輪廓。因此，測量蛋白質變性的方法可用於偵測並定量配位基-蛋白質間的作用力。

蛋白質的變性係伴隨逐漸失去其三級/四級結構，最後喪失生物活性所產生的。變性可藉許多物理及化學方法達到，其包括溫度、pH 及 / 或離子強度上的改變、趨亂(chaatropic)劑的使用等。接著可進行十分敏感的方法以監測蛋白質構型上的變化。因為其是一種簡單且可廣泛應用的實驗方法，熱變性已被用於多種目的，包括藉不純物的選擇性變性純化蛋白質及研究蛋白質結構、摺疊及安定性。利用示差掃描熱量法(DSC)所獲得之熱變性曲線(TDC)，其中測量隨溫度的逐漸增加而變之已變性蛋白質分率已顯示對測定蛋白質安定性及作有關三級結構之推論上是特

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

始

五、發明說明 (2)

別有用的。

因為化合物的結合改變了蛋白質的內在安定性並因此造成 TDC 及 T_m (中點溫度) 值偏移，故可進一步提高 TDC 的實用性，其中該化合物是既定蛋白質之基質或特定配位基。

熱掃描方法之結果解釋會因變性程序為一步、可逆及連續程序，而且在溫度掃描速率的時間上是非常迅速之假設而有所不同。但是，在一般實驗條件下，大部分蛋白質的變性是不可逆的。一般，只有小蛋白質及極溫和的變性劑之變性容易是可逆的。因此，DSC 可能無法提供可複製及容易解釋的結合測量。

一般而言，DSC 曲線反應許多不同結構區之安定性，部份對配位基之結合敏感，而部份則完全不敏感。而且，變性可在蛋白質結構內許多部位上被引發。這些程序各具有其本身活化能，使其主要程序只發生在窄溫度範圍內。視掃描速率而定，結果既定結構區的安定性可或無法在 DSC 曲線上獲得證實。再者，示差掃描熱量法可見到兩或多個蛋白質變質步驟，其中可預期只有單一轉變。另一個造成掃描熱變性方法較大無法解決性之主要因素為感興趣的配位基與報告蛋白質結構完整性之螢光染料間的結合平衡極視溫度而定。因此，方法的敏感性及所研究之配位基的安定作用在實驗過程中急遽下降。

因此，對一種鑑定可結合至標的物種上之化合物的方法存在著需求。此種方法最好遵從 UHTS 或 HTS，可複製且

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

始

五、發明說明 (3)

不受加熱速率所影響。

發明概述

本發明提供鑑定結合至標的物種(如多肽，包括蛋白質及多核苷酸，包括 DNA 及 RNA)之化合物的方法。這些方法包括使用等溫變性，較佳為結合螢光偵測法。重要地，本發明方法包括遵從 HTS 及 UHTS 之自動操作方法。理想地，想像本發明方法可高達在 24 小時內評估 10,000-60,000 或更多化合物。

蛋白質之等溫變性提供一種鑑定結合配位基之吸引人的方法。重要地，在較佳方法中，本發明結合螢光技術及藉由等溫方法變性以測定標的物(如蛋白質)之安定性因所結合的配位基所造成的變化。在特佳具體實例中，藉螢光強度上的改變可定量標的物種(如蛋白質標的物)因配位基面對等溫變性所造成之變性及安定或不安定作用。

在一個較佳具體實例中，本發明提供一種鑑定結合至標的物種上之測試化合物的高產量篩選方法。該方法包括：於等溫變性條件下培養許多測試混合物，各測試混合物包含至少一種測試化合物(較佳為至少兩種測試化合物，最佳係 2 至 10 種測試化合物)及至少一種標的物種(較佳為只有一種標的物種在任一個測試混合物中)，其中等溫變性條件可有效地引起至少部份標的物種變性(如展開)至可測量的程度。此方法另外包括在至少一種測試化合物的存在下，偵測各標的物種之變性訊號；並比較在至少一種測試化合

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

五、發明說明 (4)

物的存在下，各標的物種之變性訊號與至少一種測試化合物不存在下，在相同等溫變性條件下相同標的物種之變性訊號。本發明方法一般且最好每天可評估至少約 100 個測試混合物。較佳為此評估實質上同時發生。

在此所描述之方法中，標的物種可為多肽(如蛋白質)或多核苷酸(如 DNA 或 RNA)。此標的物種最好是蛋白質。該化合物可特定地(如在特定部位或以特定方式)或非特定地結合至標的物種上。

該結合包括各種機制，例如，包括共價結合、離子結合、氫結合、疏水結合(包含凡得瓦耳力)或其組合。

定義

在本發明中，應用下列定義：

等溫變性條件相當於固定溫度下可有效地使標的分子變性之條件。也包含有關 pH、離子強度、陽離子濃度等所定義之條件，一般將其維持固定以評估既定標的物之各種化合物。

變性訊號相當於標的物種變性時所產生的訊號。

T_m 相當於示差掃描熱量法所測得標的物之熔化轉變中點。

報告分子相當於各別加入的分子如螢光染料或連接至標的物之共價結合報告基。

圖形簡述

五、發明說明 (8)

，例如，變性訊號可利用 UV 吸收度、CD 橢圓率或以標的物種進行微熱量法研究監測之。最好進行初步 DSC 掃描以測量標的物種在適當緩衝溶液中之 T_m (中點溫度)，其中該緩衝溶液為熟諳此技者所熟知可提高標的物之長期安定性。

在結合實驗過程中，將所有成份保持在一既定溫度 (較佳為 $\pm$ 約 0.2°C) 下，其中該溫度係經過選擇以產生緩慢、容易監測的標的蛋白質變性過程。若等溫變性的溫度太低，動力學會太慢。一般而言，希望可測得之變性 (如展開) 量係發生在約 60 分鐘或更少時間內。若溫度太高，動力學會因太快而使測試化合物無法安定已變性標的物種，造成，例如展開程度太大。展開程度太大可能造成聚結，其可能使標的物沈澱。而且，在太高的溫度下，測試化合物可能完全不會結合。等溫變性之所需溫度最好等於 DSC 所測得標的物種之 T_m 值 $\pm$ 約 10°C 。較佳係此溫度係等於標的物種之 T_m 值或低於該值高達約 10°C 。

在或無標的物種存在下，此標的物種最好與可監測其變性之適合報告分子一起培育。在較佳具體實例中，化合物的濃度係與報告分子的濃度大小相當 (較佳係，不大於約 $1\mu\text{M}$)，但相對於標的分子，可能需要過量的報告分子，然而，測試化合物的濃度至少為 10 倍過量。在實施分析之前可設定一次 "衝擊" 的抑制交口百分比，或在進行所有篩選時或完成所有篩選後以統計方式測得。

螢光技術是迅速地變成特選測定方法，特別是對於

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (9)

HTS 及 UHTS。因此，在本發明特定較佳具體實例中，螢光分子可用作特選作記號者。結合螢光技術與藉由等溫方法變性是吸引人的，因為在等溫變性過程中，外加報告分子的量子產量只受蛋白質摺疊變化的影響，不因溫度而改變。另外，任何螢光量子產量上的變化可測量報告分子對不同變性形態之標的物種的結合。因此，可容易測得因結合配位基所造成標的物安定性的改變。

本發明說明等溫變性可用於測量，若已知競爭抑制劑/配位基可結合至標的物種。此結果可與這些藉其他方法獲得之結果相比擬。獲自三種不同偵測方法之變性動力學的一致性確認利用本發明方法可測得相同的展開程序。

標的物變性時，報告分子的螢光最好增加數倍(較佳為至少約 2 倍)。對於蛋白質，這一般是伴隨暴露出蛋白質的疏水區發生。報告分子最好對原標的物也具有低親和力；換言之，原標的物/報告分子錯合物的螢光係與寬廣的濃度範圍呈線性關係，或最好完全不結合至原標的物，因此其不會成為配位基本身。最後，因為化合物庫一般包含多種可在約 300 毫微米(nm)與約 400 毫微米之間吸收及/或放出螢光之化合物，報告分子最好在極少分子干擾的可見光區中激發及放射，如在約 488 毫微米激發及在約 515 毫微米放射。

此類報告分子(如螢光染料)在商業上是可從如分子探測公司(Eugene，奧勒崗州)之來源取得，而且當其結合至標的分子的疏水區時，閃亮地放出螢光。這些包括 SYPRO 橘、

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (10)

SYPRO 紅、Nano 橘、Nile 紅、1-苯胺基萘-8-磺酸(1,8-ANS)及 5-(N,N-二甲胺基苯基)-噁唑-2-基苯基(dapoxyl)丁基磺醯胺(DBS)以及其他 dapoxyl 同系物。Nano 橘螢光提供一種線性螢光範圍係從約 10 毫微克/毫升(ng/mL)至約 10 微克/毫升(g/mL)且背景螢光極低的超敏感染料以定量溶液中的蛋白質。SYPRO 橘及 SYPRO 紅可以如銀著色般良好之敏感度用於凝膠著色。染料之螢光隨蛋白質變性而增加的基礎是其結合至新暴露出的疏水部位上。1,8-ANS 曾被廣泛地使用多年以監測蛋白質的展開；但是，當其結合至已變性蛋白質時的量子產量是遠低於上述這些染料，因此分析中必須使用大量的蛋白質及報告分子。DBS 是一種相當新、溶劑化顯色的染料，其螢光放射在改變環境時可能偏移如 100 毫微米般多。但是，由於其激發及放射波長較低，對 HTS 而言，其比 Nano 橘、SYPRO 橘或 SYPRO 紅更不理想。

任何結合至所希望的標的物種時，放射強度會增加或降低的螢光報告分子皆可用於等溫變性。螢光報告分子對標的物種的親和力可在濃度漸增的已變性標的物種及原標的物種的存在下，藉測量既定濃度之報告分子的螢光而測得。知道親和力之後，可最佳化螢光報告分子相對於標的物種之濃度。

除了利用加入測試化合物與標的物種之混合物中的非共價螢光報告分子之外，可使用經一對螢光團以共價方式作記號的標的物種，或取代之，其中之一可淬滅其他的螢光。因為標的物種的展開改變兩螢光團間分子間的距離，

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

約

五、發明說明 (11)

變性係伴隨螢光的改變而發生。在特定部位上藉於相同標的物種上作記號，可監測到不同結構區的變性。

雖然螢光技術，特別是造成螢光變高的染料結合是特選的偵測方法，但其他技術也可用於本發明方法中。這可包括，例如，監測：1)UV吸收度的變化，例如因芳族氨基酸暴露在溶劑中所造成280毫微米之吸收度的改變；2)利用環狀兩色性(CD)測得莫耳橢圓率的變化；3)紅外線或NMR光譜偏移；4)支撐物質(如固體支撐物)上之移動性的改變，如尺寸排除色層分析法、毛細管電泳等。這些方法中沒有一種方法是必需使用外加或內含的螢光報告分子。

對於具有相當高變性溫度之標的物種，實驗可在chaotrope如脲、胍氯化氫、有機溶劑或任何其他試劑存在下完成，其中該試劑可促進蛋白質變性而不會不適當地干擾報告分子與標的物種之結合。

各標的物分子變性的正確實驗條件將各不相同。熟諳此技者可作適當的選擇及/或以實驗方式決定適當的緩衝系統(pH、離子強度、離子共因素等)。例如，蛋白質分子的等電點(pI)可幫助決定何種pH可用於這些研究中。

事實上，本發明方法可在多貯器樣品固定器，如微量滴定盤中進行。一般，加入所有成份，除了標的物種之外，並將多貯器樣品固定器保存在適當溫度下一段時間。待熱平衡達到之後，最好將該樣品固定器移至下一站，在該站將標的物種加入所有貯器中，最好同時。在添加任何成

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (12)

份之前，多貯器樣品固定器一般是倍密封的。例如，微量滴定盤可包含一個由塑膠壓片所製成的蓋子，其可密封此盤，但以微量滴定管端可容易地穿透之，但管端移開後會再度密合的方式留下切口。導入標的物種之後，樣品固定器立刻被移至適當的偵測器中以讀取變性訊號或移至保溫箱中保存之直到需要偵測時為止。所有步驟皆可手動，或希望可利用自動機器來完成。

對於高產量篩選，可使用商業上可取得之 Zymark/Zymate PCS 系統 (Zymark 公司，Zymark 中心，Hopkinton，MA)，其裝有快速盤模組、有夾套的選轉木馬、10-盤保溫箱系統與界面相連的螢光盤讀取機。此系統可操作 96-及 384-井微量滴定盤而且可經過調整提供本發明等溫變性方法用。例如，10 盤保溫箱可被修改成具有加熱元件如 Waterlow 撓曲墊加熱器以培養樣品。保溫箱的溫度可進一步藉循環水槽的使用而控制之。Zymark/Zymate 系統包含一個裝有夾套的選轉木馬，其可經過修改使內部具有控溫增溼器及風扇，外面具有加熱燈以幫助控制溫度並減低微量滴定盤中樣品體積的損失。Zymark/Zymate 系統也包含一個吸量站 (快速盤模組)，其可被修改成，例如具有加熱板及加熱燈。對於螢光測量，也可將 BMG POLARstar 微量盤讀取機 (BMG 實驗室技術公司，Durham，北卡羅萊那州) 修改成利用循環水槽控制溫度 (如從約 -20°C 至約 90°C)。此系統可利用機器及電腦軟體自動操作，可將其修改成容許樣品經歷等溫條件。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

結

五、發明說明 (13)

利用本發明方法，藉由長波長螢光染料可監測胸苷酸激酶(TK)及 Stromelysin 在有或無其特定配位基之存在下的等溫變性動力學，當此染料結合至已展開之蛋白質所露出的疏水區上時，其量子產量會增加。隨時間所產生的變化皆符合兩連續一級反應之反應流程。換言之，兩種蛋白質的變性動力學可以兩相(diphasic)模式作最佳的描述。因此，許多步驟中或許只有兩個步驟是速率決定步驟。重要地，螢光測量可提供大量展開程序之動力學資訊。速率常數受配位基濃度的影響可分析蛋白質/配位基錯合物之結合等溫、反射安定作用等項。藉比較其結果與這些穩定狀態螢光光譜法、環狀兩色性及 UV 光譜測定法所獲得的結果，確認此方法的有效性。從數種分析偵測方法的結果所算得之對應速率常數是可同等的。兩個步驟的速率常數皆視活性部位之配位基的結合而定。解離常數代表熔化轉變溫度下配位基的親和力。生理溫度下，親和力常數(即“解離常數”)可從在兩溫度下所進行之測量利用外插法測得。這些結果，結合這些在多井(如 96-井)格式中所獲得的結果，顯示等溫變性是一種 HTS，包括 UHTS 之特選方法，其中配位基對任何既定蛋白質有高特定性。

已一般性地描述過本發明，藉參考下列實例將可更容易了解其內容，其中該實例係以說明方式提供而不欲作為限制。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

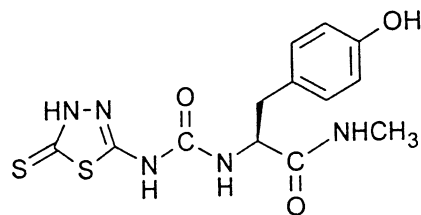
五、發明說明 (14)

實例

I. 材料及方法

A. 試劑

SYPRO 橘、SYPRO 紅、Nano 橘、1-苯胺基萘-8-磺酸 (1,8-ANS) 及 dapoxyl 丁基磺醯胺 (DBS) 是購自奧勒崗州 Eugene 市分子探測公司。單磷酸胸苷 (TMP) 及所有其他試劑是購自 Sigma-Aldrich 化學公司。所有所用商業取得的試劑是試藥級或更好級數。相當於 PNU-143988 之化合物具有下列結構：



B. 蛋白質

S. aureus 胸苷酸激酶係由人類基因組科學公司繁殖而成的，而且藉親和力色層分析法利用購自 Qiagen (QIAGEN 公司，Valencia，加州) 之 Ni^{2+} -NTA 管柱純化之。對於 TK，變性係發生於 5 毫莫耳 (mM) 含有 0.5 mM β -巯基乙醇之 pH 為 7.80 的 (三羥甲基) 甲胺緩衝液中，並在 53 °C 溫度下測量之，除了 52 °C 下所進行的自動機械分析有效實驗之外。
S. aureus 尿苷酸基激酶 (UK) 係由人類基因組科學公司繁殖而成的，而且藉親和力色層分析法利用 Ni^{2+} -NTA 管柱 (QIAGEN 公司，Valencia，加州) 純化之。藉由 DSC 利用 50 mM (三羥甲基) 甲胺緩衝液、500 mM NaCl、10% 甘油及

五、發明說明 (15)

5mM β -氫硫基乙醇之 pH 為 7.80 的緩衝溶液測得 UK 的轉變中點 T_m 為 45.5 °C。等溫變性的有效實驗是在 41 °C 之 T_m 下，於 50mM(三羥甲基)甲胺緩衝液、200mM NaCl、10%甘油及 5mM β -氫硫基乙醇所形成之 pH7.5 緩衝溶液中完成。如 Finzel 等人，Prot Sci，7，2118-2126(1998)所描述般繁殖及純化 Stromelysin。其藉 DSC 所測得之 T_m 為 75 °C。此溫度是經過選擇以供下列等溫變形實驗用。Stromelysin 所用的緩衝系統係由 10mM 咪唑、2.5mM $CaCl_2$ 、5 微莫耳 (μM) $ZnCl_2$ 所組成的，其 pH 為 6.50。

C. 配位基

所有配位基之儲備溶液係被製於二甲基亞砷(DMSO)中，除非另外陳述。水溶解度總是十分高的，因此對於特定蛋白質，在緩衝系統中製備二級儲備溶液；另外，稀儲備溶液係製於 DMSO 中。將小部份配位基溶液，一般為 10 微升或更少，加入緩衝溶液中並在加入蛋白質之前，使其於適當溫度下槽中平衡。控制組實驗評估所加入的 DMSO 對蛋白質變性之影響。在一些例子中，將 0.1% CHAPS(重量/體積百分比，(3-[(3-氯醯胺基丙基)-二甲基氨]-1-丙烷磺酸酯)加入反應混合物中以抵消 DMSO 的作用。為了確認此系統之有效性，測試化合物子群以作為許多具有較高作為蛋白質標的物之配位基之可能性的代表性化合物，其中該化合物已事先在活性分析中顯示出對胸苷酸激酶或尿苷酸基激酶之活性。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

給

五、發明說明 (16)

D. 螢光測量

對於螢光測量，使用比例型的光子計數 ISS K2 光譜螢光計 (ISS 公司，Urbana，依利諾州)。在整個實驗過程中，藉由多科學程式化溫度控制器 (多科學公司，Niles，依利諾州) 裝置將溫度維持在 0.2 °C 內。利用下列放射過濾器可在過濾槽見到放射：供 Nano 橘用之 530 毫微米 (nm) 波帶過濾器，供 SYPRO 橘用之 590 毫微米遮斷，供 SYPRO 紅及 Nile 紅之 630 毫微米遮斷及供 1,8-ANS 及 dapoxyl 丁基磺醯胺用之 470 毫微米遮斷。或者，藉 BMG POLARstar 微量盤讀取機 (BMG 實驗室技術公司，Durham，北卡羅萊那州) 進行螢光測量。溫度可藉循環水槽控制之。此儀器利用 485 毫微米中心波長、15 毫微米波帶激發過濾器及 580 毫微米中心波長、12 毫微米波帶放射過濾器最佳可測得 Nano 橘。

依下列方式監測等溫變性過程中外加染料之螢光隨時間的變化。將測試染料加入攪拌中含有 2 毫升緩衝溶液之比色杯中，其中該緩衝溶液已在所需溫度下預先經過熱平衡。記錄染料的基線約 45 秒，並加入小部份蛋白質儲備溶液以引發變性反應。依此方式，該蛋白質事實上瞬間達到變性溫度。在另一個實驗中，無染料的存在下，將蛋白質保持在變性溫度下並於反應終點時加入報告分子。在後面實驗中，隨染料之添加總是立即造成螢光增加。為了確認染料本身在實驗條件下不會與顯著比例之原有蛋白質進行錯合，以漸增的蛋白質量滴定固定量之染料並顯示螢光增

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

結

五、發明說明 (17)

加量不會達到飽和。

三個 stromelysin 的三氨基酸基被埋在活性部位區中，此為蛋白質展開之敏感的報告者。因此，此蛋白質的等溫變性也可藉由內含色氨酸螢光之改變而測量之。對於這些實驗，蛋白質係在等溫變性溫度下被加入比色杯內已平衡之緩衝溶液中。激發波長為 293 毫微米並利用 320 ± 10 毫微米波帶過濾器監測放射。

E. 熱量測量

stromelysin 及 TK 的 DSC 是利用購自 Microcal (Northampton, 麻塞諸塞州) 之 MC-2 示差掃描熱量計完成。對於 stromelysin，將溶於 pH6.50 緩衝溶液之 $150 \mu\text{M}$ 酵素裝入熱量計的 1.2 毫升樣品槽中，其中該緩衝溶液包含 10mM 咪唑、2.5mM CaCl_2 及 5mM ZnCl_2 。對於 TK，將溶於 pH 7.70，50mM(三羥甲基)甲胺緩衝溶液之 $15 \mu\text{M}$ 酵素裝入樣品槽中，其中該緩衝溶液包含 0.50M NaCl、10% 甘油及 5mM 2-氫硫基乙醇。參考槽係裝入相同的緩衝溶液。以 1°C /分鐘的速率從 25°C 掃描至 80°C 之前，先將溶液去氣 5 分鐘。從蛋白質掃描中減去基線掃描並將所得數據轉變成單位蛋白質濃度，其中該基線掃描係在樣品槽中利用滲析緩衝溶液所收集得到的。利用標準電熱脈衝校正儀器的 Y-軸並分別利用正十八碳烷及三十六碳烷校正溫度軸，其中正十八碳烷及三十六碳烷的熔化溫度分別為 28.2°C 及 75.9°C 。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

約

五、發明說明 (18)

F.環狀兩色性

環狀兩色性(CD)光譜係利用 Jasco J-715 光譜偏光測定計(Jasco 公司, Easton, 米尼蘇達州)及光徑為 0.1 厘米(cm)之圓柱狀石英槽測得, 其中石英槽係利用 Haake D8 循環水槽(Haak GmbH, Karlsruhe, 德國)恆溫至 0.1 °C 內。蛋白質濃度的選擇係以蛋白質莫耳橢圓率為基礎, 通常落在約 1 μ M 至約 20 μ M 範圍內。在注入該槽之前, 先製備蛋白質溶液或蛋白質與 10 至 100 倍過量之配位基溶液。先在 22 °C 下以 0.25 秒應答、100 毫微米/分鐘之掃描速度、1.0 毫微米之解析度和帶寬及累積數 5, 將各溶液從 178 毫微米掃描至 260 毫微米。然後迅速地將該槽加熱至等溫變性溫度並監測 222 毫微米下橢圓率隨時間所產生的變化。在 0.5 毫秒(msec)的時間間距下, 以 1.0 毫微米帶寬並累積 16 秒抽查兩色性。每秒儲存數據一次並以 16 秒為一組當為測試平均。時間掃描後, 在相同溫度下完成波長掃描。定期檢查石英槽及和含不含配位基之緩衝溶液的吸收度及兩色性。各實驗間, 如上述般將石英槽徹底清理過並以蒸餾水及乙醇沖洗之。

G.吸收度測量

UV 吸收度係利用 Perkin-Elmer Lambda 40 UV-Vis 雙光束分光光度計(Perkin-Elmer 公司, Norwalk, 康乃狄克州)進行測量。將裝有緩衝溶液之光徑為 1.0 厘米的含蓋石英比色杯置於參考光束中。在樣品光束中, 將含有 1.5 毫升已去

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

五、發明說明 (19)

氣緩衝溶液或緩衝溶液加配位基之光徑為 1.0 厘米的含蓋石英比色杯置於恆溫槽固定器中，並在等溫變性溫度下平衡之，其中所加入的配位基少於蛋白質溶液的體積。利用 Neslab Exacal EX200 循環水槽 (Neslab 儀器公司，portsmouth，新罕夏州) 將溫度維持在 0.1 °C 內。將 1-5 微升部份的蛋白質儲備溶液加入含有緩衝溶液或緩衝溶液加配位基的比色杯中以產生 1.5 毫升之最終體積並使蛋白質濃度近 0.5 μM。再度蓋上比色杯的蓋子，每秒以 2 毫微米帶寬及 0.5 秒應答測量 280 毫微米處的吸收度並測量高達 30 分鐘。針對各蛋白質，測定數個配位基濃度的影響，其範圍係從約 0.5 μM 至約 400 μM。各實驗間，如上述般，以硝酸及 10% 甲醇徹底清理比色杯並以蒸餾水及乙醇沖洗之。

H. 數據分析

只在少數例子中，蛋白質變性隨時間所產生的改變是一種表觀一級程序。利用下式之非線性最小平方法分析這些數據：

$$Y = Y_0 + \Delta Y \cdot (1 - e^{-k_{exp} \cdot t}) \quad \text{式 1}$$

其中 Y 是以實驗方式所測得的訊號， T_0 是背景訊號， ΔY 是變性程序相關訊號之總變化，t 是時間及 k_{exp} 是以實驗方式所測得之表觀一級速率常數。一般而言，變性動力學

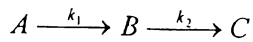
(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

五、發明說明 (20)

呈現雙相動力學，經常具有明顯的誘導期。根據兩連續一級反應之反應流程分析這些時間過程：



式 2

其中 k_1 及 k_2 是一級速率常數，而且所有三個物種當場貢獻所見訊號。對應於這些反應過程中所見訊號的方程式為：

$$Y \doteq Y_A \cdot e^{-k_1 t'} + Y_B \cdot \frac{k_1}{k_2 - k_1} (e^{-k_1 t'} - e^{-k_2 t'}) + Y_C \left[1 + \frac{1}{k_1 - k_2} (k_2 e^{-k_1 t'} - k_1 e^{-k_2 t'}) \right]$$

式 3

其中 Y_A 、 Y_B 及 Y_C 各別為物種 A、B 及 C 的訊號。在實驗誤差內， $Y_A = Y_B$ 經常發生，因此簡化該分析：

$$Y = Y_A + (Y_C - Y_A) \left[1 + \frac{1}{k_1 - k_2} (k_2 e^{-k_1 t'} - k_1 e^{-k_2 t'}) \right]$$

式 4

當 $Y_B = Y_C$ 時，實驗曲線簡化成簡單一級上升或衰退，視 $Y_A > Y_B$ 或 $Y_B > Y_A$ 而定。

經常超乎預期，利用方程式 3 或方程式 4 初步分析數據，指出 k_1 及 k_2 彼此極為相似。因為方程式 3 對 $k_1 = k_2$ 的例子無效，因此我們積分此系統之速率方程式：

五、發明說明 (21)

$$\frac{dA}{dt} = -k \cdot A \quad \text{式 5}$$

$$\frac{dB}{dt} = k \cdot A - k \cdot B \quad \text{式 6}$$

$$\frac{dC}{dt} = k \cdot B \quad \text{式 7}$$

產生：

$$A = A_0 \cdot e^{-k \cdot t} \quad \text{式 8}$$

$$B = k \cdot A_0 \cdot t \cdot e^{-k \cdot t} \quad \text{式 9}$$

$$C = A_0 \cdot [1 - (k \cdot t + 1) \cdot e^{-k \cdot t}] \quad \text{式 10}$$

然後藉下式可獲得訊號隨時間所產生的變化：

$$Y = Y_A \cdot e^{-k \cdot t} + Y_B \cdot k \cdot t \cdot e^{-k \cdot t} + Y_C \cdot [1 - (k \cdot t + 1) e^{-k \cdot t}] \quad \text{式 11}$$

使用此式並結合非線性最小平方法以 $k_1 \approx k_2$ 分析之實驗結果。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

五、發明說明 (22)

自動機械分析

上述溫度下於 96-井微量滴定盤格式中，依高產量篩選模式測試化合物庫，其中滴定盤格式為每個井只有單一個化合物。評估供 TK 及 UK 用之最佳染料及染料相對於蛋白質之最佳比例。各微量滴定盤包含 88 個單一化合物及 8 個最初只包含緩衝溶液加染料(無化合物)的控制井。以塑膠 96-井微量盤密封板(Tomtec 公司，Hamden，康乃狄克州)手動密封這些分析盤。這些密封片上留有切口使吸量管端容易進入，接著吸量管端移開後可再密合。剩餘步驟係依下列方式以自動機械方式進行。將分析盤放入溫度/溼度控制保溫箱中一段初培養期，一般 60-90 分鐘，在該初培養期中，將分析盤平衡至所需分析溫度。然後利用 BMG POLARstar 進行螢光測量， T_i ，以建立分析底線。這些含有化合物加緩衝溶液加染料之井的螢光讀數可用於確定化合物本身的作用。接著在一組保溫箱中另外進行一段培養期以確保井內容物係平衡至分析溫度，將分析盤移至快速盤液體分散單元。將蛋白質從盤貯器加至分析盤中，其中該分析盤係位於改良過的加熱板位置上。在分析溫度下，將分析盤運回溫度/溼度控制保溫箱中一段預定時間，一般 30 分鐘，以進行最後培育。利用 BMG POLARstar 進行第二次螢光測量， T_f 。控制井(分析緩衝溶液加染料加蛋白質)定義分析上限。含化合物(加分析緩衝溶液加染料加蛋白質)之井的螢光測量相較於控制井在 T_i 及 T_f 讀數之比較定義哪種化合物可結合至並安定感興趣的蛋白質。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

總

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

五、發明說明 (23)

II 結果

進行配位基結合研究之前，測定既定蛋白質可以容易測量之速率進行變性的溫度。該速率在稍微低於或等於熱轉變溫度(T_m)的溫度下是最適合測量方法的，其中熱轉變溫度係由示差掃描熱量法所測得。為測定哪種螢光染料對既定蛋白質可產生最大訊號，利用濃度為 $1\mu\text{M}$ 之各種染料及 $0.5\mu\text{M}$ 之蛋白質在 T_m 下完成初步等溫變性實驗。所有測試染料的光譜性質係表示於表 1 中。由於其長激發及放射波長，吸引人將 Nano 橘、SYPRO 橘及 SYPRO 紅用於 HTS 格式中。

表 1 測量等溫變性中所用的光譜參數

染料	λ_{exc} ，毫微米	λ_{em} ，毫微米
1,8-ANS	390	470
Dapoxyl 丁基磺醯胺	372	470
Nile 紅	590	630
Nano 橘	490	525
SYPRO 橘	500	590
SYPRO 紅	550	630

A. 胸苷酸激酶

如圖 1 中所示，胸苷酸激酶(TK)的熱掃描透露 T_m 是位於 53°C ，然後選擇該溫度以進行所有後續的等溫實驗。冷

訂

線

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

五、發明說明 (24)

卻及再加熱蛋白質時，無發現任何顯著的波峰(結果未顯示出)，其指示此蛋白質已以不可逆方式變性。

螢光 圖 2 顯示初步實驗的結果，其中各染料視時間而變的螢光變化係在 53 °C 下於等溫變性的胸苷酸激酶存在下測得。所有染料的螢光在變性過程中係以雙相方式增加，以 DBS 產生超過背景之最大淨增加量。Nano 橘、SYPRO 橘及 SYPRO 紅(一般用於蛋白質定量及凝膠著色染料)之螢光也明顯增加，然而莫耳數超過蛋白質四倍之 1,8-ANS 的螢光增加量相當小。最後，也確定添加原有蛋白質時，實驗中所用之 Nano 橘或 SYPRO 橘的螢光增加量在寬廣的蛋白質濃度範圍內係呈一直線。這些結果說明染料在實驗條件下無法飽和蛋白質。換言之，染料本身不會與配位基競爭，而且他們無法安定蛋白質至任何可測量的程度。

因為其光譜性質(參見表 1)，故選擇 SYPRO 橘用於其他變性實驗中。圖 4 顯示 TK 等溫變性過程中，在漸增的 TMP 量存在下，發生 SYPRO 橘螢光之代表性時段，其中 TMP 是該酵素之特定配位基。蛋白質先變性，然後於程序終了加入染料時，螢光的增加是瞬間發生的(數據未顯示出)。因此，螢光的變化受時間影響係代表蛋白質展開，而且染料並無緩慢結合至已變性蛋白質上。隨時間所產生的變化是兩相的，指示存在著至少兩個速率決定展開程序。利用非線性最小平方法及各種動力學模式分析結果。在所有測試模式中，兩個具有相同速率常數之連續一級反應模式，方程

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

五、發明說明 (25)

式 11，與數據最吻合。實驗點與利用最配合的參數及方程式 11 所算得之理論曲線的一致性係表示於圖 4 中。

早期線性部份之時段的斜率也與第一個速率常數成正例，因此可用於分析 TMP 濃度對變性速率的影響。圖 5 顯示這兩個參數隨配位基濃度而改變。利用非線性最小平方法及相對於各種模式之方程式分析曲線，其中該方程式係有關佔據配位基結合部位的變性速率。從每個蛋白質中有兩個 TMP 分子完全協同結合造成該酵素 6 倍安定性(圖 5)的模式可發現到最佳的一致性。此結果並不完全令人驚訝，因為如尺寸排除色層分析法所證明，胸苷酸激酶是一種二聚體蛋白質(由 A.Lavie 等人在 自然結構生物學，4，601-604(1997)中所提出"胸苷酸激酶的結構揭露 AZT 活化中決定步驟後之原因"裏可知大腸桿菌蛋白質係以二聚體的形式存在)。從斜率可算得 K_d 為 9.1 ± 1.6 mM 並且從速率常數可算得 K_d 為 7.6 ± 0.8 mM。這些在 53 °C 下所測得協同 K_d 值無法直接與非協同動力學參數 $K_m = 27 \mu\text{M}$ 相比，其中此非協同動力學參數係在 25 °C 下利用飽和 ATP 濃度藉由活性分析所測得的。似乎好像協同性係由依序添加所組成之 TK 動力機制的事實所產生，因此 TMP 只可結合至具有已佔用 ATP 部位之酵素，而且 TMP 可微弱地結合至 ATP 部位上。

吸收度及環形兩色性 爲了確定染料的螢光變化實際上係與兩種形態之已變性蛋白質成比例，而且事實上爲了測量變性程序，使用兩種其他技術，CD 及 UV 吸收度以研究

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

五、發明說明 (26)

相同蛋白質之展開動力學。

原有蛋白質及其已變性形態之環形兩色性掃描顯示 CD 光譜上的顯著變化係伴隨展開而發生的(圖 6)。例如，在 222 毫微米之 α -螺旋訊號的強度損失 45%。因此，持續在 222 毫微米下監測莫耳橢圓率隨時間的改變。如圖 7 中所示，222 毫微米的橢圓率迅速增加並約 10 分鐘後達到最大。25mM TMP 的添加，大幅降低原配位基之橢圓率的增加速率及幅度。該數據與簡單一級反應完全吻合，因此指示橢圓率的主要改變係因兩連續展開步驟中第一個步驟所造成的。

最後，測量 280 毫微米之增色性隨時間所產生的改變，其中該改變係因暴露於溶劑中之芳族胺基酸增加所造成的。圖 8 的數據顯示與 TK 展開有關之增色性變化是快速的且是兩相的。吸收度數據極符合兩個連續一級反應之模式。該結果與兩個連續一級反應之模式極為吻合，但具有不同的速率常數，如方程式 3 所描述般。

由這三種技術所獲得的速率常數係比較於表 2 中。由於光譜干擾，無測試 TMP 的存在性對增色性之改變的影響。所有這些方法所測得的物理性質在第一個速率決定步驟過程中經過顯著變化是顯而易見的。在第一個步驟的速率常數 k_1 之間有良好一致性，指示所有三種方法是測量相同程序。另一方面，由 SYPRO 橘所觀察的第二個步驟在增色性上不會產生任何變化，而且由增色性所觀察到第二個極緩慢的步驟在其相關 SYPRO 橘螢光上沒有任何改變。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

結

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

五、發明說明 (27)

表 2. 各種方法所測得胸苷酸激酶在 53 °C 下變性之速率常數

方法	$k_1 \times 10^3, \text{秒}^{-1}$	$k_2 \times 10^3, \text{秒}^{-1}$
環狀兩色性 ^④	12.0±0.04	無法取得
280 毫微米之吸收度 [*]	17.0±0.20	2.90±0.09
SYPRO 橘螢光 [#]	17.0±0.09	17.0±0.09

④一級反應；*利用方程式 4 算得；#利用方程式 3 算得。

B. Stromelysin

Stromelysin 之 CD 光譜(Sarver 等人，BBA，1434，304-316(1999))及色氨酸螢光(Epps 等人，J.Prot.Chem，17，699-712(1998))係受配位基結合至活性部位所影響。如圖 9 中所示，DSC 顯露此蛋白質具有極高 T_m ，75 °C。而且，DSC 實驗顯示 T_m 因配位基結合而增加如 15 °C 般多(Sarver 等人，BBA，1434，304-316(1999))。因此，Stromelysin 的結構清楚導致其本身進行等溫變性研究，其中配位基的結合引人注目地影響展開程序。即使色氨酸螢光是一種有用的監測變性程序之工具。

螢光. 如利用 SYPRO 橘及(圖 10A 中所示)所監測到的，在 75 °C 下 Stromelysin 隨時間而改變之變性是兩相的。此變性是迅速並以隨劑量而變的方式受 PNU-143988 所抑制，其中 PNU-143988 是一種已知噻二唑型競爭抑制劑。

在無配位基的存在下，變性反應係與具有兩個不相等

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

結

五、發明說明 (28)

速率常數之兩個連續一級反應(方程式 3)的模式最一致，接著線性向下漂。線性下向漂最像衍生自己變性蛋白質聚結及/或沈澱。在抑制劑存在下所發生的變性中此現象是不存在的。數據分析顯示最佳動力模式是兩個具有相同速率常數之連續一級速率的模式(方程式 11)。從這些分析所算得之速率常數係表示於表 3 中。

表 3.各種方法所測得 Stromelysin 在 75 °C 下變性之速率常數

方法	$k_1 \times 10^3, \text{秒}^{-1}$	$k_2 \times 10^3, \text{秒}^{-1}$
SYPRO 橘螢光	60.2 ± 1.8	7.49 ± 0.04
色氨酸螢光	67.7 ± 1.2	6.77 ± 0.12
吸收度	50.2 ± 1.8	無法取得

Stromelysin 的內在色氨酸螢光對配位基誘發構型改變，並大概對活性部位區之變性特別敏感的。如圖 10B 中所示，在 75 °C 下等溫變性期間，色氨酸螢光強度迅速、兩相地消失。色氨酸螢光隨時間衰退係最符合兩個具有相同速率常數之連續一級反應的模式(方程式 11)。此模式產生與相同條件下由這些 SYPRO 橘之螢光增加量所測得之速率常數極為一致的速率常數(表 3)。

兩種衍生自螢光動力學曲線之參數可測量變性速率，即反曲點之斜率及一級速率常數。如圖 11 之螢光測量例子所示般，兩參數值在抑制物的存在下以可飽和、視劑量而

五、發明說明 (29)

定的方式降低。視濃度而變係與抑制物的結合造成變性速率急遽下降之模式一致。以簡單 Langmuir 結合等溫模式各項分析數據，由初速率獲得 $K_d=0.28\pm0.02\mu\text{M}$ 而從速率常數獲得 $K_d=0.35\pm0.13\mu\text{M}$ 。這些在 75°C 下所測得的值極可與 25°C 下藉速率分析所測得所測得 $K_d=0.40\mu\text{M}$ 之值相提並論。

吸收度在有或無 PNU-143988 的存在下，Stromelysin 之等溫變性顯露出增色性變化的速率及大小視劑量而定之抑制性(數據未顯示出)。增色性在三分鐘內達到最大值並在較長處理時間中輕微下降，PNU-143988 以視劑量而定之方式延長整個反應所需時間。與未經抑制之反應實驗數據相符之最簡單的模式是簡單一級反應，而且最符合的速率常數可與其他技術所測得之兩步驟變性程序中第一個步驟速率常數相比。

自動機械 HTS 分析之有效性 在進行有效性實驗之前，在上述分析條件下利用 TK 及 UK 等溫變性用之 96-井微量滴定盤格式測得最佳染料及染料對蛋白質之最佳比例。TK 的等溫變性最好是在 $0.4\mu\text{M}$ 蛋白質及 $1.1\mu\text{M}$ 染料之最後分析濃度下以 Nano 橘測得。依相同方式，利用 Nano 橘獲得足夠視窗而得以偵測具有 $0.4\mu\text{M}$ 蛋白質及 $0.8\mu\text{M}$ 染料之最後分析濃度的 UK 之等溫變性。

爲了表示等溫變性如自動機械 HTS 分析之有效性，TK

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

五、發明說明 (30)

及 UK 的變性是在已知配位基的存在下於微量盤格式中以所述自動機械操作之分析方法完成。在 TK 例子中，所用的配位基是 TMP，而在 UK 例子中是尿苷單磷酸酯 (UMP)。在無 (控制組) 或有漸增的配位基濃度存在下施加蛋白質分析變性條件。正如熟諳此技者將會作的，利用 T_i 及 T_r 螢光測量算得抑制百分比。如基於比色杯實驗中所見結果所預期的，對於胸苷酸激酶，漸增的 TMP 濃度會降低蛋白質的變性，TMP 濃度對所算得控制組之抑制百分比所作的曲線係符合 Langmuir 結合等溫模式，考慮誤差，可產生類似先前所見之表觀 K_d 值。相同地對於尿苷酸基激酶，UMP 對變性的影響係視濃度而定，增加 UMP 的濃度時，降低變性。依 Langmuir 模式之各項分析數據。造成的計算獲得 $5.76 \pm 0.95 \text{ mM}$ 之表觀 K_d 值，其可與在 25°C 下所完成之活性分析所獲得之 1 mM 的表觀 K_d 值相比。

在化合物子集的存在下，藉由 TK 及 UK 之等溫變性可促進 HTS 系統的有效性，其中該化合物子集具有較高包含蛋白質配位基之潛力，因為這些化合物在活性分析中具有抑制活性。此有效性試驗係如所述般是以 $10 \mu\text{M}$ 最終化合物濃度完成。利用 T_i 及 T_r 測量，可算得抑制百分比。利用離分析盤控制組之平均值三個標準偏差作為活性去除值測得真實活性。結果係表示於表 4 中。也進行控制組實驗。在這些實驗中可見到具有包括螢光及淬滅等內在光譜性質的化合物。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

五、發明說明 (31)

表 4 HTS 有效性試驗之結果

蛋白質標的物	所測試之化合物編號	活化數目
TK	703	83
UK	703	97

C. 黃金葡萄球菌 FemA

黃金葡萄球菌 FemA(Ehlert 等人，細菌期刊，179，7573-7576(1997)及 Tschierske 等人，FEMS 微生物學，153，261-264(1997))是一種細胞壁生物合成想必包含之蛋白質並因此提供一種作為可能抗菌劑之吸引人的標的物。此蛋白質被表示成具有 6-his 標記，因此其如上述胸苷酸激酶可以 Qiagen Ni²⁺-NTA 管柱純化之。可安定蛋白質之緩衝溶液係選擇可充分遠離等電點(pI 值)之 pH；而且使用適當的離子強度及陽離子，因此可獲得最大的結構，正如 CD 橢圓率研究中所監測得般。

因為此蛋白質沒有任何已知化學功能，等溫變性提供一種發現可結合至此蛋白質之化合物的理想方法。相信此蛋白質呈現類似這些由胸苷酸激酶及 stromelysin 所見到之多相動力學。T_m值係藉示差掃描熱量法研究所測得。如上面所描述般，詳細的動力變性途徑必須先藉螢光、吸收度及/或另一種物理方法測得。在 96-井微量滴定盤格式中迅速評估最佳染料及染料對蛋白質之最佳比例。所用螢光是 SYPRO 紅。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

編

五、發明說明 (32)

在每個井有單一化合物之 96 井微量滴定盤格式中低於 T_m 值 5°C 或至多 5°C 下以高產量篩選模式測試該庫 ($>100,000$)。各微量滴定盤包含 88 個別化合物。而且，8 個控制井存在於此盤中，其最初只包含緩衝溶液加染料(無化合物)。添加蛋白質之前，讀取含有化合物加控制井之微量滴定盤之讀數 (T_i 讀數)，其可建立此分析之下限。此這些含有化合物加緩衝溶液加染料之井的螢光讀數被用於確定化合物本身的作用。

在分析溫度下一段時間如 30 或 60 分鐘之後，完成另一個螢光測量 (T_r 讀數)。此控制井(分析緩衝溶液加染料加蛋白質)定義此分析之上限。在 T_i 及 T_r ，這些含有化合物(加分析緩衝溶液加染料加蛋白質)之井的螢光值相較於控制井之螢光值的比較定義哪種化合物結合並安定感興趣之蛋白質，其在此實例中為黃金葡萄球菌 Fem A。只有追蹤這些在接下來的重複實驗中顯示出安定性之化合物以作為可能的配位基結合劑。

除了真的結合至 femA 的化合物之外，化合物可提供較高螢光係因為其：1)是可結合染料之疏水性化合物；2)在所用波長下具有內在螢光；3)可行成微胞；或4)可為變性劑、去安定劑等。相同地，化合物可能具有結合活性但顯示比預期結果低，因為該化合物在所測試的波長下吸收光(淬滅)。

為了消除直接影響染料的化合物，在分析溫度下添加蛋白質之前，讀取化合物加染料加緩衝溶液之讀數。因此

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

總

五、發明說明 (33)

可鑑定出任何具有內在螢光、淬滅、螢光增強或螢光團接收之化合物。爲了評估這些可提高蛋白質變性之化合物，完成篩選後進行額外的研究。化合物對結合至標的分子之染料的影响係在周遭溫度下完成。任何屬變性劑之化合物證明可提高螢光染料對該蛋白質之結合，即使無蛋白質發生熱變性時。此類化合物只有當其對特定蛋白質(標的物)呈現此性質而且不以此方式影響兩或多個蛋白質(標的物)時是令人感興趣。

符合所有這些標準之後，然後進一步特徵化這些想像是真實結合劑的化合物。第一個研究可確定此化合物是否呈現出合理的劑量應答。另外，可研究這些化合物對蛋白質變性動力學之影響，因此可測定 K_d 值。爲了在既定溫度下測定 K_d 值，測定整個時間過程動力學之配位基劑量應答曲線。此程序必須在三或多個溫度下完成。然後，假設 Arrhenius 行爲，可獲得化合物在任何溫度下之 K_d 值。

除了篩選整個個別化合物庫之外，可測試化合物混合物。使用整庫子集，在此子集中每個微量滴定盤井係包含 8 個化合物之混合物。分析係如上述般進行。然後鑑定這些呈現適當結果之混合物的化合物並個別測試之。在此例中，正結果可能發生在混合物中，但不發生在各個化合物中，因爲結果可能相加，或更像加成性。因此，若各個化合物之分析是不活躍，可測試混合物之排列以決定哪種組合可獲得原篩選結果。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

約

五、發明說明 (34)

D. 黃金葡萄球菌未知基因產物

除了篩選整個化合物集團外，可以理論標準為基礎測試該庫子集或"子庫"。利用子庫的優點是加速從高產量篩選發現可用的化合物。在此實例中，利用另一種蛋白質標的物，黃金葡萄球菌未知基因產物。此蛋白質是一種此生物體之必要基因產物。具有此已消除功能之黃金葡萄球菌基因經過設計之菌株可防止細菌生長。但是，其生理/生物化學功能是未知的；雖然在其他微生物體中尋找基因組的數據庫以鑑定類似基因，他們也具有未知生理或生物化學功能。因為此基因的 DNA 順序是已知的，構造物可藉放置 6-his 標記於蛋白質的胺基-或羧基-末端上而製得，並如其他所述 6-his 標記蛋白質所描述般純化之。類似上述 femA 蛋白質，在既定實驗條件下可獲得如，例如藉 CD 所監測得之最大結構。

藉不同處搜尋可產生一種特定測試子庫，不同子庫，其中化合物係依其結構/化學性質分類。將最不同的化合物選出，但同樣地，他們代表整庫之相異性。進一步測試本來所鑑定出在等溫變性研究中可安定此蛋白質標的物之化合物。而且，利用電腦搜尋程式從整庫中選擇該庫中具有類似這些配位基結合劑的化合物。這些也被測試。依此方式，藉只篩選整個化合物集團中有限的子集可鑑定出活性化合物。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

五、發明說明 (35)

E. 核酸等溫變性

含有感興趣順序之寡脫氧核糖核苷酸可被合成或商業購得而且可以適當順序組合成雙 DNA。然後將組成的 DNA 插入表達系統(如取自 Ambion 之 MEGAScript)中以產生感興趣之 RNA。或者，若感興趣的 RNA 十分小，可建造含有適當啟動子之寡聚物，因此可完成體外轉錄而不需任何無性繁殖及表達步驟。藉由任一熟諳分子生物技術者已知的議定書可獲得 RNA 的分離。

關於蛋白性標的物，可以 DSC 實驗測得 T_m 。可用於監測從規則轉變成不規則 RNA 結構之內在螢光染料的實例包括 SYBR 綠、SYBR 綠 II、Pico-綠及 TOPRO、YOYO 等。可用於說明此研究方法之 RNA 分子的實例包括：1) HIV-1 tar 47-86 (Mei 等人，生物化學，37，14204-14212(1998))；2) RNA aptamer J6f1 (Cho 等人，生物化學，37，4985-4992(1998))；及 3) 16srRNA 之 A-位置 (Wong 等人，化學與生物，5，397-406(1998))。已知可結合至這些代表性 RNA 分子的配位基為：1) 新黴素，其他氨基葡萄糖苷抗生素及其他化合物 (Mei 等人，生物化學，37，14204-14212(1998))；2) 妥布黴素 (Cho 等人，生物化學，37，4985-4992(1998))；及 3) 康那黴素及其他氨基葡萄糖苷 (Wong 等人，化學與生物，5，397-406(1998))。

正如已知蛋白性標的物的配位基可在等溫條件下安定其結構，這些已知配位基在類似條件下可安定其同源 RNA 分子。相同地，關於蛋白質標的物，在高產量篩選中可測

五、發明說明 (36)

試大化合物集團以測定是否任何化合物皆可在等溫變性條件下結合治並安定這些核酸結構物。這些化合物可單獨或以數種化合物之組合物的形式進行測試。除了利用這些螢光染料監測等溫變性之外，熟諳此技者也可利用 UV 增色性或毛細管電泳監測這些變化。

清楚地本發明可以異於前文描述及實例中所特別描述之方式實行的。在上述教學內容的指導下，本發明可能有許多改良及變化，其因此也在本發明範圍內。在此將所引用之所有出版品、專利及專利申請案整個揭示內容併入以作為參考。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

四、中文發明摘要(發明之名稱： 於等溫變性條件下鑑定結合至標的物種上之化合物的方法)

本發明提供一種鑑定結合至標的物種上之化合物的高產量篩選方法。該方法包括：於等溫變性條件下培養多種測試混合物，各測試混合物包含至少一種測試化合物及至少一種標的物種，其中該等溫變性條件可有效地引起至少部份標的物種變性至可測量的程度。此方法另外包括在至少一種測試化合物的存在下，偵測各標的物種之變性訊號；並比較在至少一種測試化合物的存在下，各標的物種之變性訊號與至少一種測試化合物不存在下，在相同等溫變性條件下相同標的物種之變性訊號。

英文發明摘要(發明之名稱：)

**METHODS OF IDENTIFYING COMPOUNDS THAT BIND TO
TARGET SPECIES UNDER ISOTHERMAL DENATURING
CONDITIONS**

A high throughput screening method for identifying a compound that binds to a target species. The method includes: incubating a plurality of test mixtures under isothermal denaturing conditions, each test mixture including at least one test compound and at least one target species, wherein the isothermal denaturing conditions are effective to cause at least a portion of the target species to denature to a measurable extent. The method further involves detecting a denaturation signal of each target species in the presence of the at least one test compound; and comparing the denaturation signal of each target species in the presence of the at least one test compound with a denaturation signal of the same target species in the absence of the at least one test compound under the same isothermal denaturing conditions.



(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄)

裝

訂

象

834353

圖 1

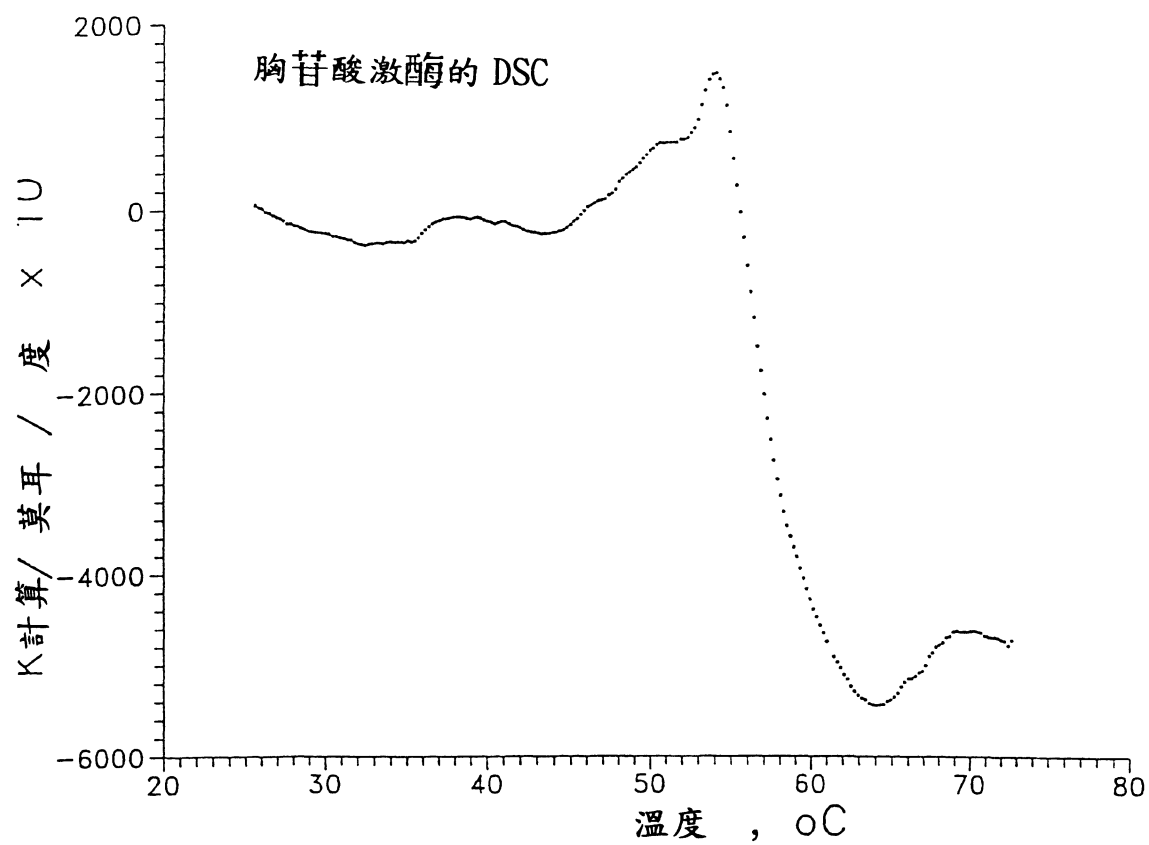


圖 2

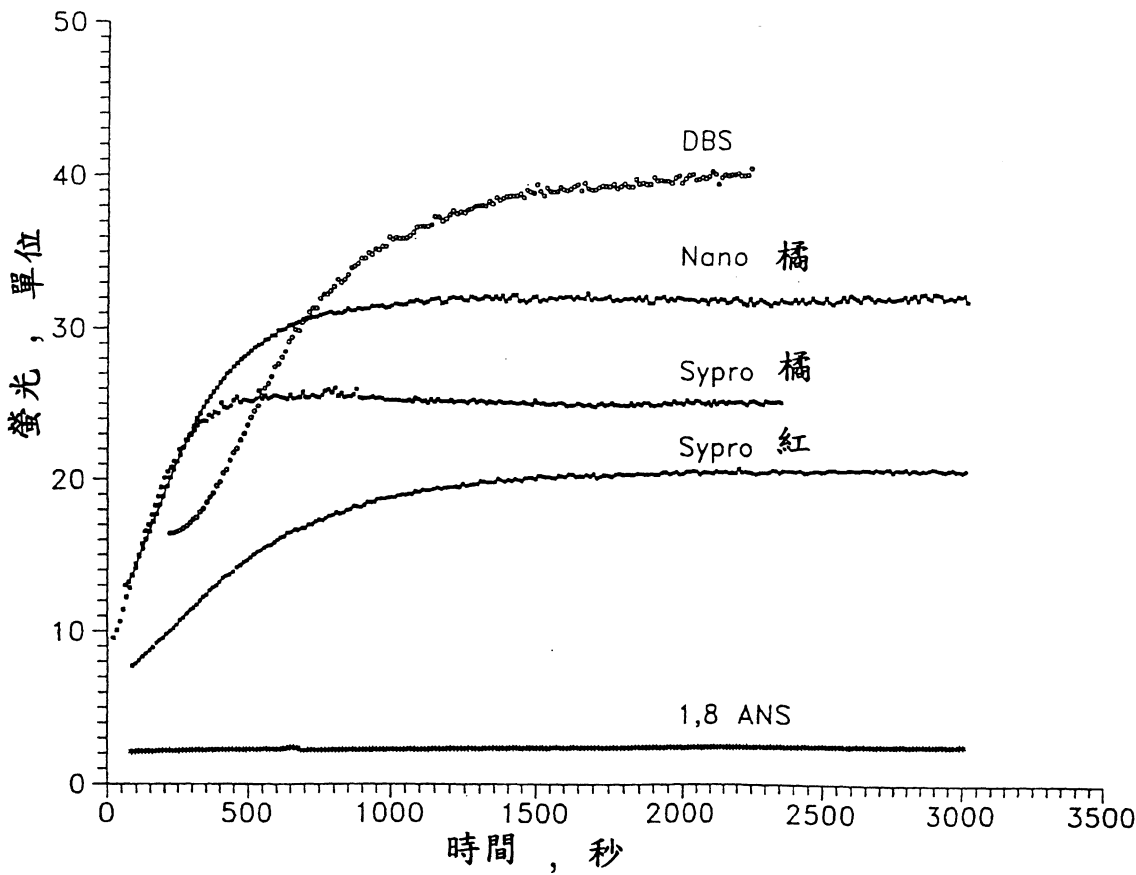


圖 3

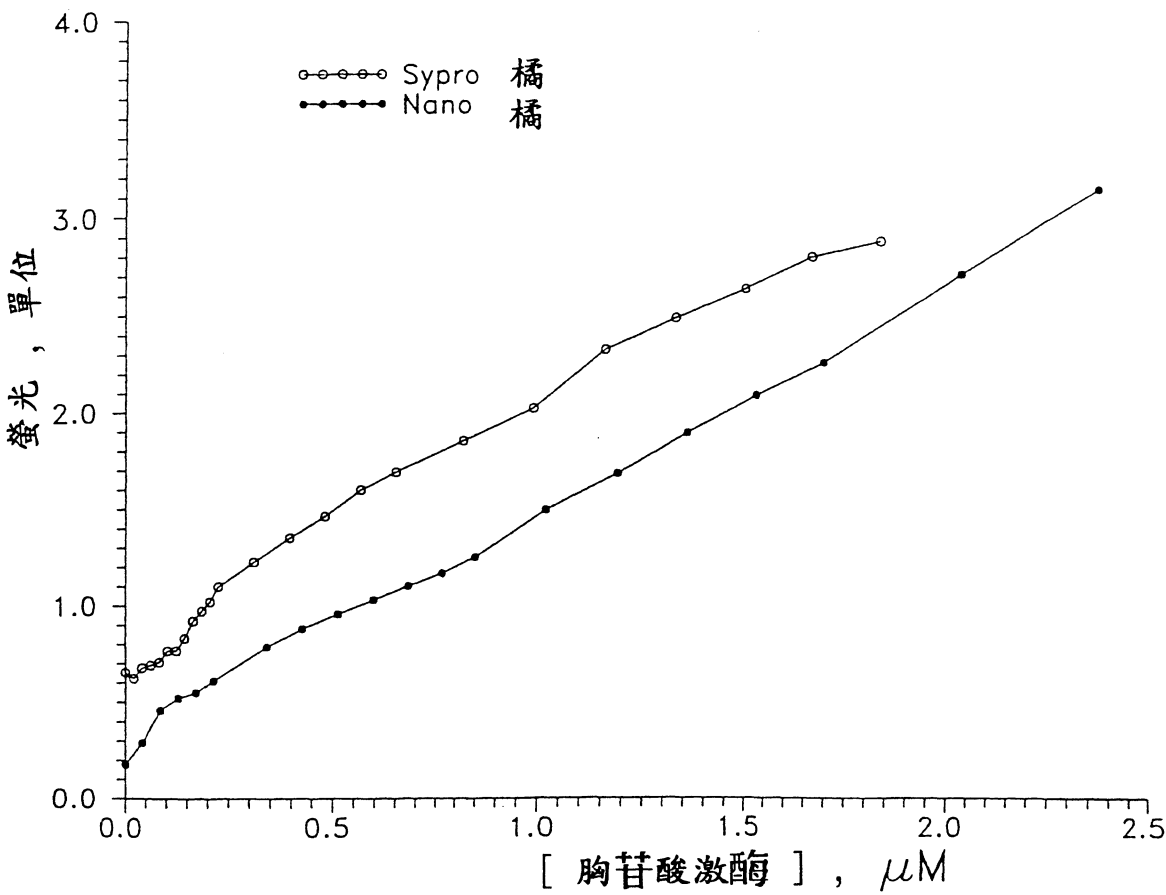


圖 4

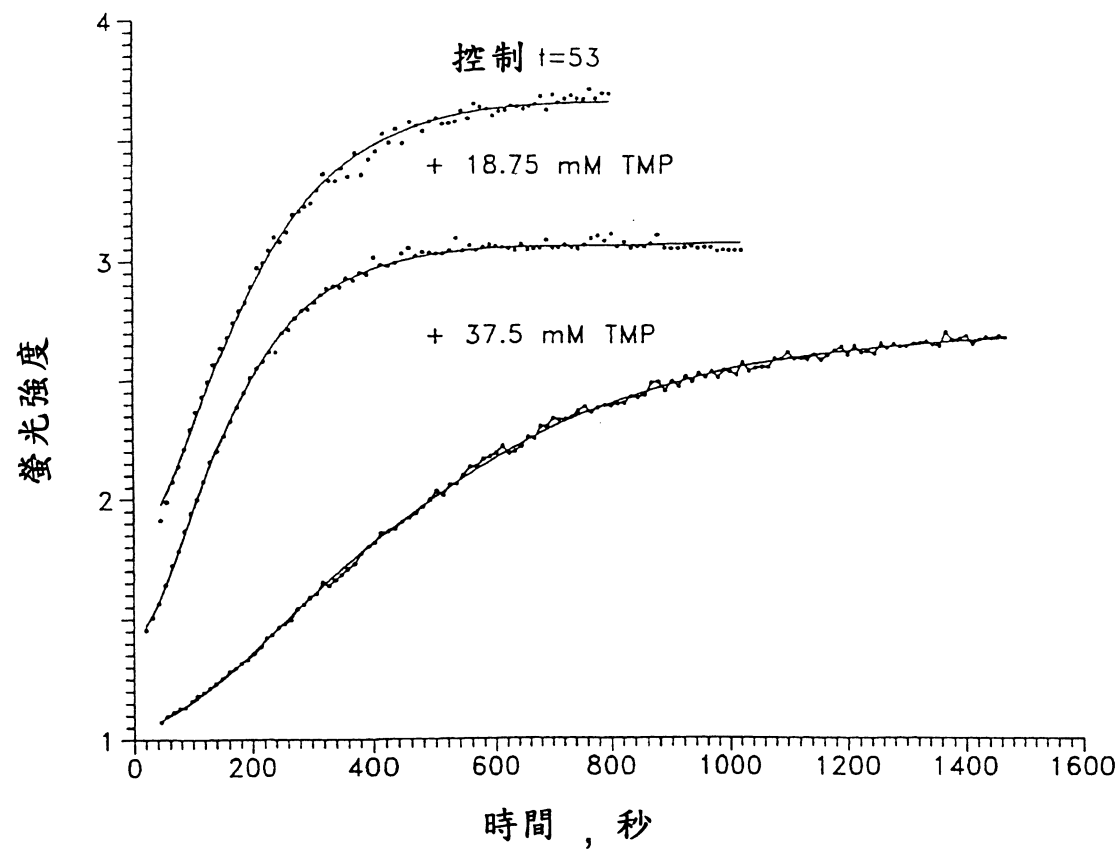
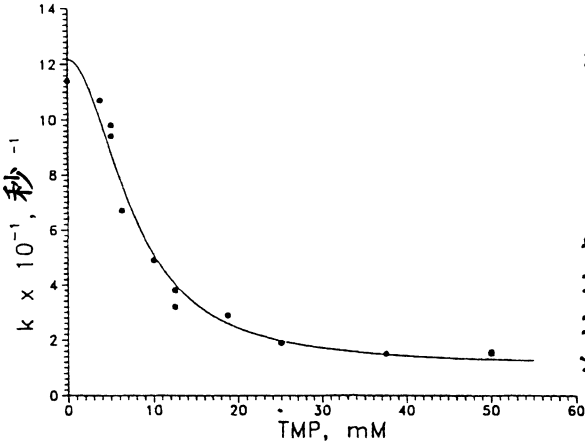


圖 5

A



B

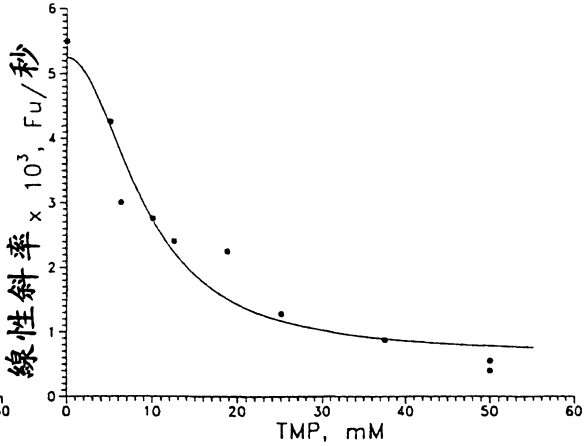


圖 6

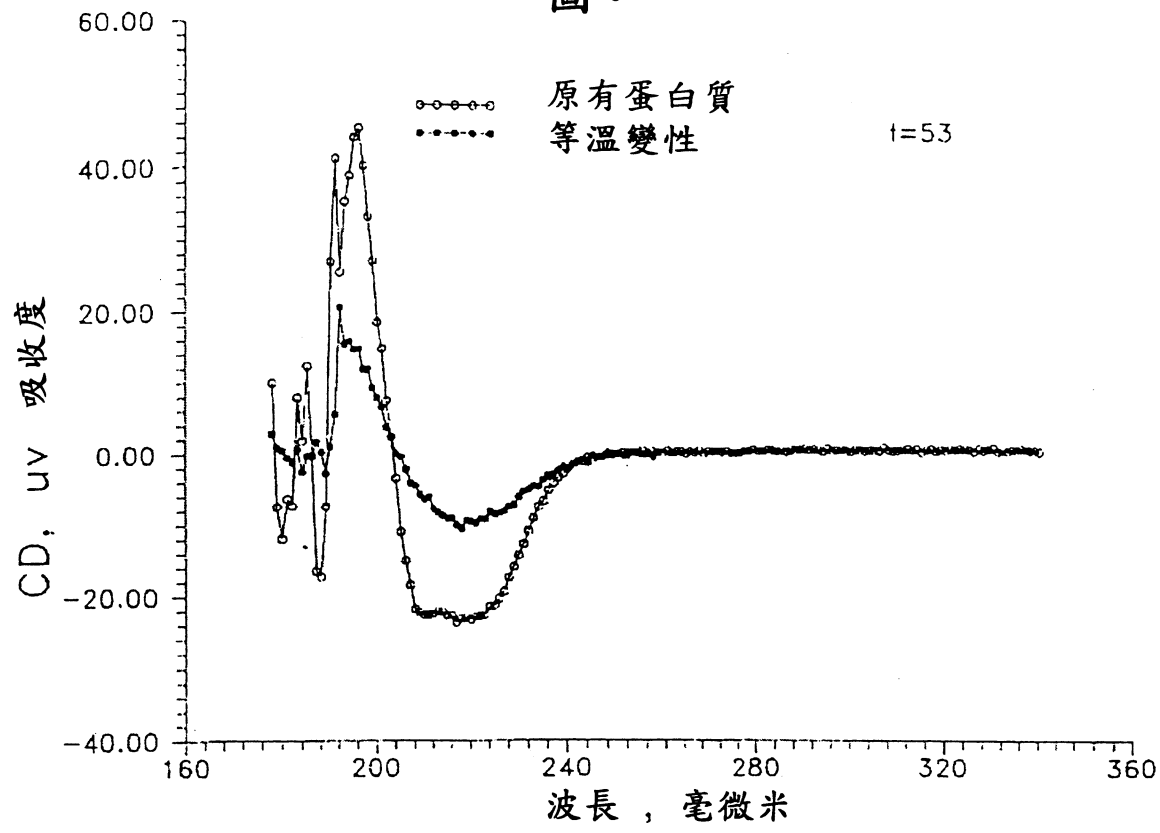


圖 7

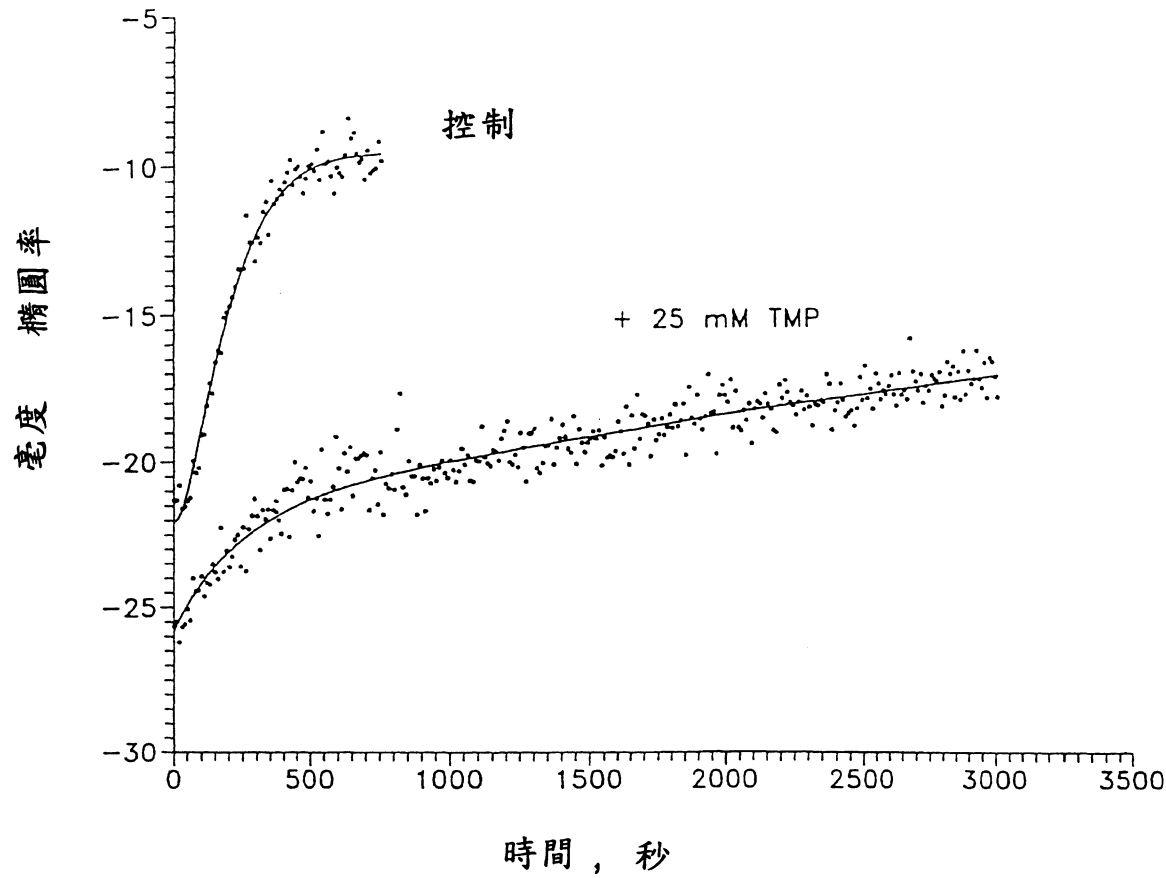


圖 8

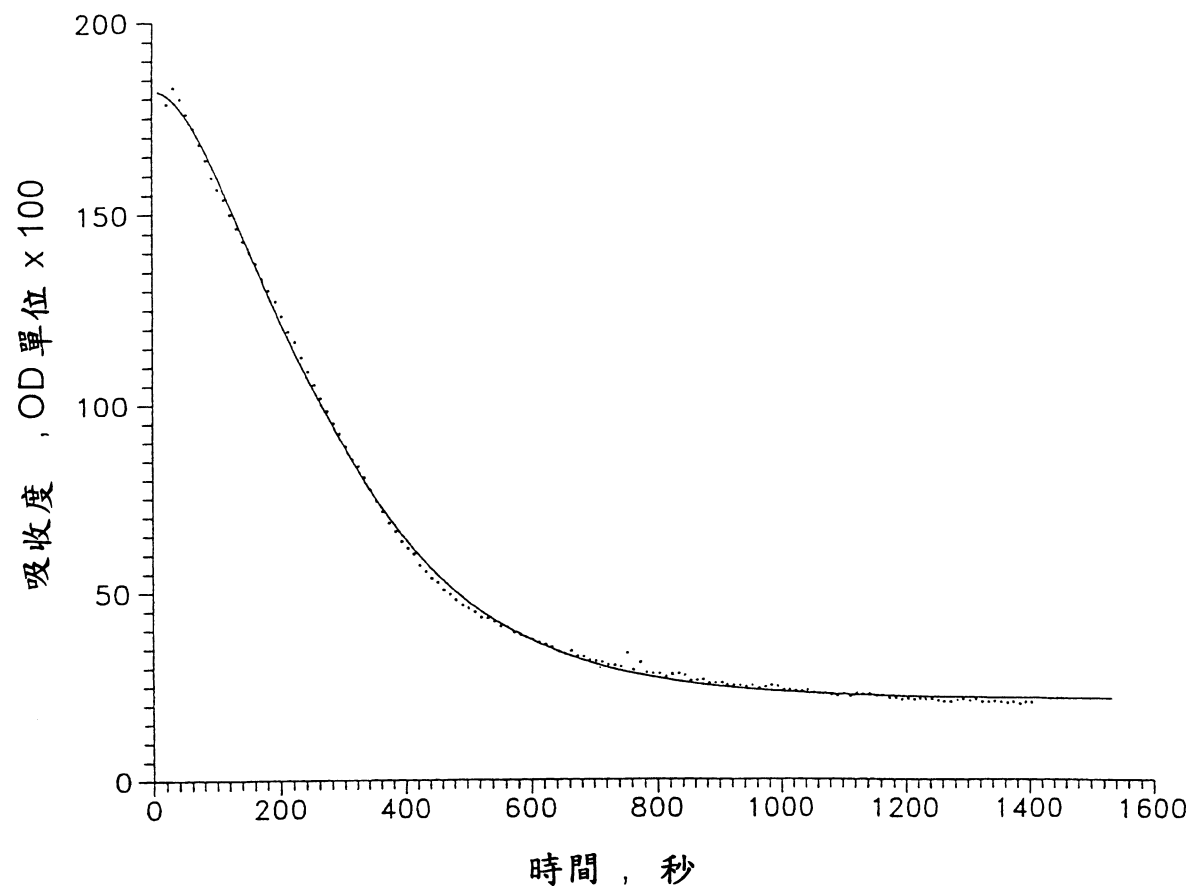


圖 9

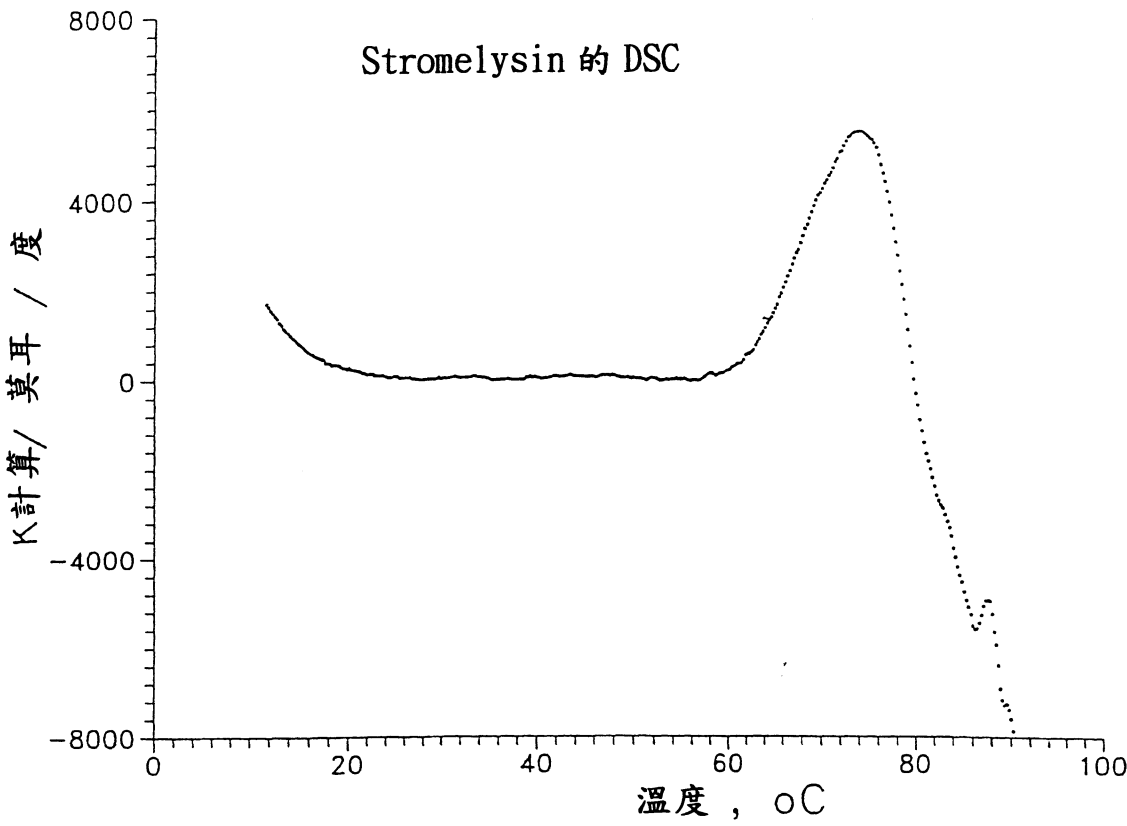


圖 10

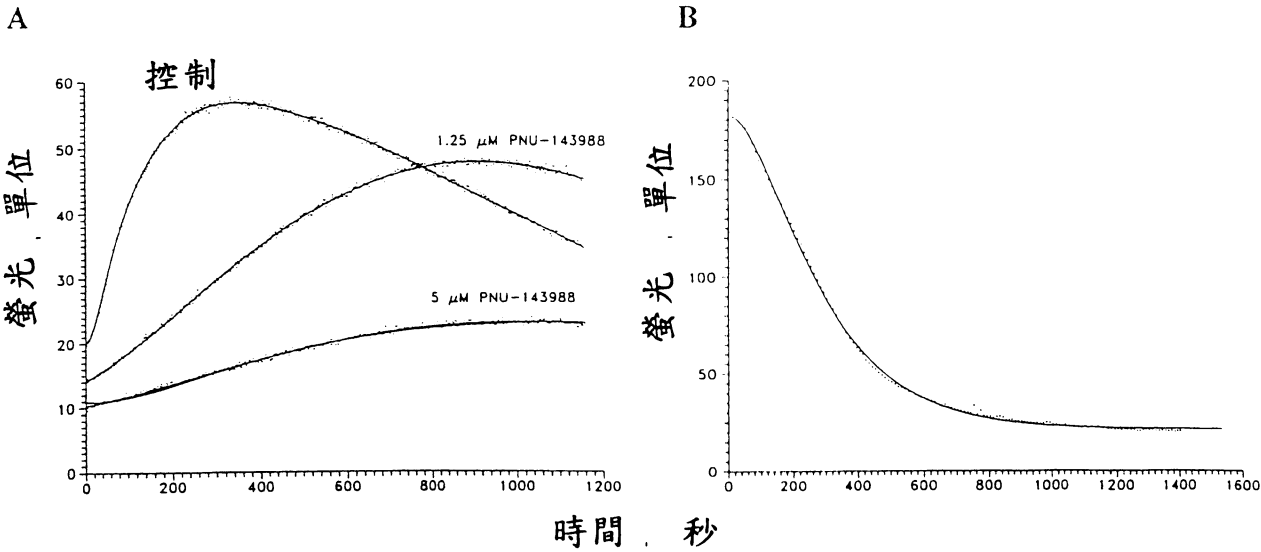
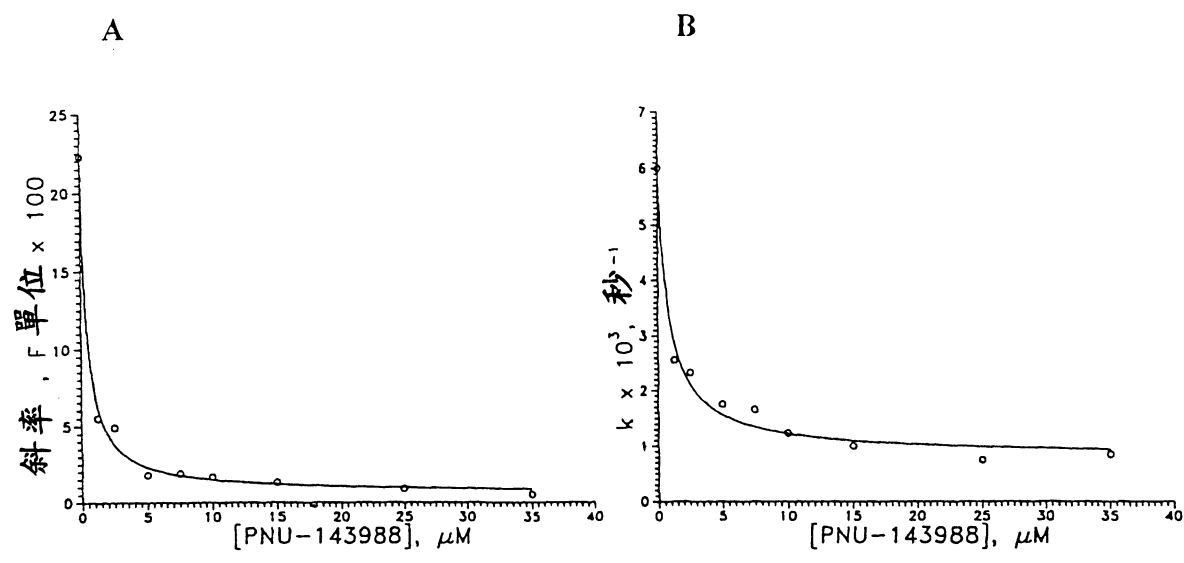


圖 11



申請日期	89.12.04
案號	89125804
類別	601N 33/53.

A4
C4

(90年6月修正頁)

(以上各欄由本局填註)

發明專利說明書

一、發明 名稱	中 文	於等溫變性條件下鑑定結合至標的物種上之化合物的方法
	英 文	METHODS OF IDENTIFYING COMPOUNDS THAT BIND TO TARGET SPECIES UNDER ISOTHERMAL DENATURING CONDITIONS
二、發明 人	姓 名	1. 保羅·湯米奇 TOMICH, PAUL K. 2. 丹尼斯·艾比思 EPPS, DENNIS E. 3. 法蘭克·凱茲迪 KEZDY, FERENC J.
	國 籍	均美國
	住、居所	1. 美國密西根州卡拉馬如黑莓路3703號 2. 美國密西根州波提吉波因特歐伍茲大道240號 3. 美國密西根州卡拉馬如羅賓路3805號
三、申請人	姓 名 (名稱)	法瑪西亞 - 普強公司 PHARMACIA & UPJOHN COMPANY
	國 籍	美國
	住、居所 (事務所)	美國密西根州卡林麻梅族市漢瑞特街301號
	代 表 人 姓 名	詹姆士 D. 達恩利二世

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

裝

訂

線

五、發明說明 (5)

圖 1. 胸苷酸激酶(TK)之 DSC 掃描。如方法中所述般測定胸苷酸催化酶之熱熔化輪廓。

圖 2. 利用各種螢光染料監測 TK 之等溫變性。此等溫變性實驗係如方法中所述般在 53 °C 的溫度下利用濃度為 0.5 μ M 之蛋白質完成。DBS 的濃度為 1 μ M、1,8-ANS 是 2 μ M，而蛋白質染料如下：Nano 橘的稀釋倍數為 1 : 650，SYPRO 橘及 SYPRO 紅的稀釋倍數為 1 : 10,000。

圖 3. 以 TK 滴定 SYPRO 橘及 Nano 橘。在 T=23 °C 下以漸增的胸苷酸激酶量滴定固定量之染料，250nM DBS 及以 1 : 2600 稀釋過之 Nano 橘並記錄螢光的增加量。所使用的放射/激發波長係列於表 1 中。

圖 4. 在單磷酸胸苷(TMP)的存在下，利用 SYPRO 橘監測 TK 之等溫變性隨時間而變化。利用 SYPRO 橘螢光監測 TK 之等溫變性的實驗變性條件係描述於實例中。反應混合物於 2 毫升緩衝溶液中包含 0.5 μ M 蛋白質，經稀釋 20,000 倍之 SYPRO 橘及所示濃度之 TMP。添加蛋白質時，TMP 係存在於此反應混合物中。利用方程式 11 分析數據，而且實線代表理論配合實驗數據。

圖 5. 對 TMP 所造成之等溫變性，TK 的安定性係隨劑量而改變。如結果所描述般，利用動力曲線之直線斜率及一級速率常數計算 TMP/TK 作用力受劑量的影響。由斜率及速率常數值可利用二級 Langmuir 模式計算解離常數。實線代表理論配合實驗數據點。利用一級速率常數所測得胸苷

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

約

五、發明說明 (6)

酸激酶隨TMP劑量而變之安定性係表示於圖5A及藉由初速率所測得之安定性係表示於圖5B中。

圖6. TK之CD(環狀兩色性)結構的等溫變性作用。如實例中所述般，測量原有及已等溫變性之TK的CD光譜：虛環=原有蛋白質；實環=在 $T=53^{\circ}\text{C}$ 下等溫變性過之TK。

圖7. 利用CD監測TK等溫變性隨時間而變。如實例中所述般，利用CD追蹤 53°C 下有或無添加25mM TMP時TK等溫變性隨時間的變化。利用一級速率模式分析數據，而且實線代表理論配合實驗數據點。

圖8. 利用UV增色性監測TK等溫變性隨時間的變化。如實例中所述般，利用280毫微米下吸收度的增加量監測TK等溫變性隨時間的變化。利用方程式4(下方)分析數據，而且實線代表理論配合實驗數據點。

圖9. 基質溶解素(Stromelysin)之DSC掃描。如實例中所述般，測定Stromelysin的熱熔化輪廓。

圖10A. 利用SYPRO橘螢光監測Stromelysin之等溫變性隨時間的變化。如實例中所述般，利用SYPRO橘螢光的增加量追蹤 75°C 下有或無添加競爭抑制劑PNU-143988時Stromelysin等溫變性隨時間的變化。利用方程式4分析控制反應的數據並利用方程式11分析這些抑制反應的數據。也顯示出在1.5及 $5\mu\text{M}$ PNU-143988存在下的代表性數據。實線代表理論配合實驗數據點。

圖10B. 利用色氨酸螢光監測Stromelysin之等溫變性隨

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

始

五、發明說明 (7)

時間的變化。在 $T=75^{\circ}\text{C}$ 下利用內在色氨酸螢光之降低量的測定監測 Stromelysin 的等溫變性。利用方程式 11 分析數據。實線代表理論配合實驗數據點。

圖 11. PNU-143988 對 Stromelysin 之等溫變性初速率及速率常數的影響，其中其係藉 SYPRO 橘監測得到。如實例中所述般，利用 SYPRO 橘螢光的增加量追蹤 75°C 下有或無添加競爭抑制劑 PNU-143988 時 Stromelysin 等溫變性隨時間的改變。圖 11A=初速率；圖 11B=速率常數。

較佳具體實例之細節描述

本發明係關於等溫變性的用途。可使用方法學以篩選結合至種類廣泛的分子，特別是蛋白質，包括這些具有未知功能之蛋白質的配位基。重要地，本發明方法消除急遽升高及降低溫度的必要性，並容許極快速地進行分析且在 HTS 或 UHTS 自動操作環境中具有較高產量。該技術可容易地擴展至尋找結合至，例如 RNA、DNA、 α -酸醣蛋白及血清蛋白之化合物。

等溫變性提供一種監測變性(如標的物種之展開)及鑑定結合配位基之吸引人的替換方法。其遵從 HTS 及 UHTS。而且，變性程序是容易控制、可複製且不受加熱速率影響。

等溫變性中所用溫度之選擇可在一系列溫度下(如在約 45°C 至約 75°C 範圍內)藉測量標的物種之變性速率來決定。這些測量可，例如，利用螢光報告分子結合至標的分子並報告與該標的分子之展開有關的構型變化而完成。或者

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

裝

六、申請專利範圍

1. 一種用於鑑定結合至標的物種上之測試化合物的高產量篩選法，該方法包括：

在等溫變性條件下培養許多測試混合物，各測試混合物包含至少一種測試化合物及至少一種標的物種，其中該等溫變性條件可有效地引起至少一部份標的物種變性至可測量的程度；

偵測各標的物種在至少一種測試化合物存在下之變性訊號；及

比較各標的物種在至少一種測試化合物存在下之變性訊號與相同標的物種在相同等溫變性條件下至少一種測試化合物不存在下之變性訊號，從而以標的物種在至少一種測試化合物存在下之變性訊號相較於該物種在該至少一種測試化合物不存在下之變性訊號的變化為標的物種與該至少一種測試化合物間之結合的指標。

2. 根據申請專利範圍第1項之方法，其中該標的物種是多肽或多核苷酸。
3. 根據申請專利範圍第2之方法，其中該標的物種是蛋白質。
4. 根據申請專利範圍第1項之方法，其中該化合物專一性結合至該標的物種。
5. 根據申請專利範圍第1項之方法，其中該化合物係經由

六、申請專利範圍

共價、疏水性、離子或氫鍵交互作用結合至標的物種。

6. 根據申請專利範圍第1項之方法，其中偵測變性訊號包括偵測螢光訊號、UV吸收度之改變、莫耳橢圓率之變化、紅外線光譜之光譜偏移、NMR光譜之光譜偏移或支撐物質上移動性之改變。
7. 根據申請專利範圍第6項之方法，其中偵測變性訊號包括偵測螢光訊號。
8. 根據申請專利範圍第1項之方法，其中該等溫變性條件包括等於或超過或低於示差掃描熱量法所測得標的物種之 T_m 值約 10°C 之溫度。
9. 根據申請專利範圍第8項之方法，其中該等溫變性條件包括等於或低於示差掃描熱量法所測得標的物種之 T_m 值高達約 10°C 之溫度。
10. 根據申請專利範圍第1項之方法，另包括在等溫變性條件下培育至少一種測試化合物、至少一種標的物種及至少一種報告分子。
11. 根據申請專利範圍第1項之方法，其中該測試化合物及該報告分子之濃度係屬於同等大小。
12. 根據申請專利範圍第11項之方法，其中該測試化合物之濃度係相對於標的物種之濃度至少過量10倍。
13. 根據申請專利範圍第10項之方法，其中該報告分子是

六、申請專利範圍

螢光報告分子。

14. 根據申請專利範圍第1項之方法，其中各測試混合物包含一種標的物種。
15. 根據申請專利範圍第1項之方法，其中各測試混合物包含至少兩種測試化合物。
16. 根據申請專利範圍第15項之方法，其中各測試混合物包含2至10種測試化合物。
17. 一種用於鑑定結合至蛋白質上之測試化合物的高產量篩選法，該方法包括：

在等溫變性條件下培養許多測試混合物，各測試混合物包含至少一種測試化合物，至少一種報告分子及至少一種蛋白質，其中該等溫變性條件可有效地引起至少一部份標的蛋白質變性至可測量的程度；

偵測各蛋白質在至少一種測試化合物存在下之變性訊號；及

比較各蛋白質在至少一種測試化合物存在下之變性訊號與相同蛋白質在相同等溫變性條件下至少一種測試化合物不存在下之變性訊號。

18. 根據申請專利範圍第17項之方法，其中該報告分子螢光報告分子。
19. 根據申請專利範圍第1項之方法，其中各測試混合物包含一種標的物種。

六、申請專利範圍

20. 根據申請專利範圍第1項之方法，其中各測試混合物包含至少兩種測試化合物。
21. 一種測定測試化合物在等溫變性條件下是否可結合標的物種之裝置，其包括
- (a) 一包含混合物之隔室，該混合物包含：
 - (i) 至少一種測試化合物；及
 - (ii) 至少一種標的物種；
 - (b) 提供等溫變性條件之工具，其中該等溫變性條件係有效引起至少標的物種之至少一部分變性至可測量的程度；
 - (c) 在至少一種測試化合物之存在下，可偵測每一標的物種之變性訊號之裝置，藉此比較各標的物種在至少一種測試化合物存在下之變性訊號與相同標的物種在相同等溫變性條件下至少一種測試化合物不存在下之變性訊號。
22. 根據申請專利範圍第21項之裝置，其中該標的物種為多肽或多核苷酸。
23. 根據申請專利範圍第22項之裝置，其中該標的物種為蛋白質。
24. 根據申請專利範圍第21項之裝置，其中該化合物專一性結合至標的物種。
25. 根據申請專利範圍第21項之裝置，其中該化合物經由

六、申請專利範圍

共價鍵、疏水性、離子性、或氫鍵交互作用結合至標的物種。

26. 根據申請專利範圍第21項之裝置，其中該偵測變性訊號包括偵測螢光訊號、UV吸收度之改變、莫耳橢圓率之變化、紅外線光譜之光譜偏移、NMR光譜之光譜偏移或支撐物質上移動性之改變。
27. 根據申請專利範圍第26項之裝置，其中該偵測變性訊號包括偵測螢光訊號。
28. 根據申請專利範圍第21項之裝置，其中該等溫變性條件包括等於或超過或低於示差掃描熱量法所測得標的物種之 T_m 值約 10°C 之溫度。
29. 根據申請專利範圍第28項之裝置，其中該等溫變性條件包括等於或低於示差掃描熱量法所測得標的物種之 T_m 值高達約 10°C 之溫度。
30. 根據申請專利範圍第21項之裝置，另包括在等溫變性條件下培育至少一種測試化合物、至少一種標的物種及至少一種報告分子。
31. 根據申請專利範圍第21項之裝置，其中該測試化合物及該報告分子之濃度係屬於同等大小。
32. 根據申請專利範圍第31項之系統，其中該測試化合物之濃度係相對於標的物種之濃度至少過量10倍。
33. 根據申請專利範圍第30項之裝置，其中該報告分子是

六、申請專利範圍

螢光報告分子。

34. 根據申請專利範圍第21項之裝置，其中各測試混合物包含一種標的物種。
35. 根據申請專利範圍第21項之裝置，其中各測試混合物包含至少兩種測試化合物。
36. 根據申請專利範圍第35項之裝置，其中各測試混合物包含2至10種測試化合物。