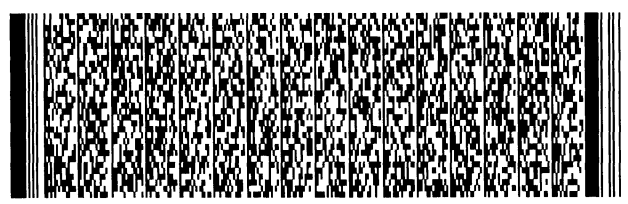


申請日期:	90.9.21	案號:	90116629
類別:	601N 33/50. 33/543.		C12Q 1/68.

(以上各欄由本局填註)

### 發明專利說明書

一、發明名稱	中文	鑑定本體組合物以作為藥物之方法
	英文	METHODS FOR IDENTIFYING COMBINATIONS OF ENTITIES AS THERAPEUTICS
二、發明人	姓名 (中文)	1. 伯瑞克 R. 史塔克威爾 2. 艾爾克斯 鮑瑞司 3. 麥克 A. 弗雷伊
	姓名 (英文)	1. Brent R. Stockwell 2. Alexis Borisy 3. Michael A. Foley
	國籍	1. 美國 2. 美國 3. 美國
	住、居所	1. 美國麻州02114, 波士頓, 塞達西街59號4棟 2. 美國麻州02114, 波士頓, 瑞弗爾街31號2棟 3. 美國麻州02467, 雀斯紐特谷, 渥卡特路93號
三、申請人	姓名 (名稱) (中文)	1. 康拜那托雷克斯股份有限公司
	姓名 (名稱) (英文)	1. CombinatoRx, Incorporated
	國籍	1. 美國
	住、居所 (事務所)	1. 美國麻州02118, 波士頓, 愛巴尼街650號
	代表人姓名 (中文)	1. 丹尼爾 奎恩
代表人姓名 (英文)	1.	



本案已向

國(地區)申請專利

申請日期

案號

主張優先權

美國 US

2000/07/07 09/611,835

有

有關微生物已寄存於

寄存日期

寄存號碼

無



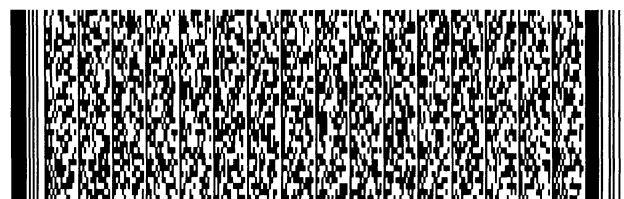
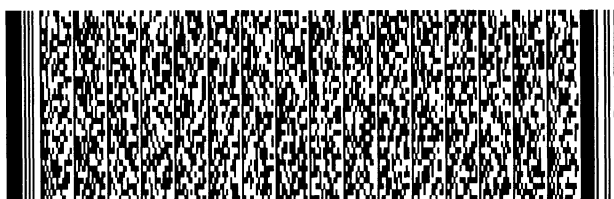
## 五、發明說明 (1)

背景技術

許多疾病的進程與其多面相的表現型改變有關。長久以來，臨床上已觀察到其關聯性，但近來基因體學的進展才在分子層次證實此觀察。例如對癌細胞的表現觀察紀錄已經發現百種以上的基因表現改變是由體細胞多突變造成。而且，人類細胞及組織已進化出恆定性機制，例如通常細胞與組織含有冗贅及自體緩衝之訊息系統。自然訊息在細胞層次造成之改變往往不只傳遞到一個標的，而是到準確的一組標的物。因此，在複數變因下適度的改變可以產生一高度特異的反應。

反過來說，由於歷史演進及技術上的原因，目前藥學、化學、及生物學界已經將焦點集中於單分子、個體分子造成生物反應的研究。歷史演進至今，已經鑑定出許多會影響特殊蛋白的小型有機分子，為生物學及醫學提供有價值的反應劑。這些分子也可以成為有用的蛋白質生物學功能探針而能具有治療作用，以及以其化學蛋白質功能缺失之動物的研究而對於闡明訊息傳遞系統有幫助。此外，由於這些小分子物質與特殊生物標的交互作用以及影響特殊生物學功能的作用，在研發治療藥物時，小分子物質也成為潛在的標的。

由於無法憑空推測出何種小分子可以與一生物標的反應，許多研究致力於直接針對大量有機小分子的研發。這些研究成果被合稱為該化合物之函式庫(libraries)，以依適當需求特徵而構建一「多樣性函式庫」(diverse

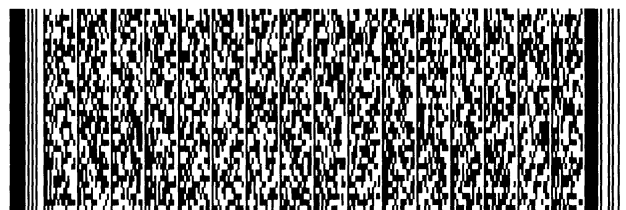
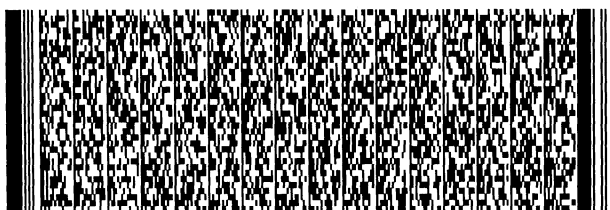


## 五、發明說明 (2)

library) 為目標。這樣的多樣性函式庫可以收集現存小分子而構建，或是採用「組合化學」(combinatorial chemistry) 而生產出新分子。這些分子函式庫可與敏感試驗篩檢聯合而鑑定活性分子(Stockwell et al. Chem. Biol. 1999, 6, 71-83)。

許多例子顯示，研究者已發展出有特殊偏向的分子函式庫，其中之小分子都共享某一特徵，例如與某一標的蛋白反應之功能，或是特別設計出某一特徵構造是類似於某一族自然界化合物的特徵。例如，有一群分子函式庫是被設計為類似自然胜肽之一個或數個特徵。這種「似胜肽顯性」函式庫包括有酞醯亞胺基函式庫(phthalimido libraries)(W0 97/22594)、噻吩函式庫(thiophene libraries)(W0 97/40034)、苯甲醯基氮甲苯基苯聯二氮草酮(benzodiazepine libraries)(USP 5,288,514)。另外，一具有類似自然產物構造特徵，且有小規模細胞基礎試驗之函式庫已被合成(Tan et al. J. Am. Chem. Soc. 1998, 120. 8565)。

現代化的藥物研發過程大都奠基於快速測試化合物在生物進程效果之能力。在藥學工業，研發都集中於鑑定化合物對生物分子之交互作用的阻斷、減弱、或甚至增強。特別是，在生物系統中，不論直接或間接經某些下游反應，受體與其蛋白配位子之交互作用通常對系統，甚至最後對尋求治療方法的病患，可能會造成有害或有益的效果。因此，研究者長久以來就是想尋求會減弱、阻斷、亦



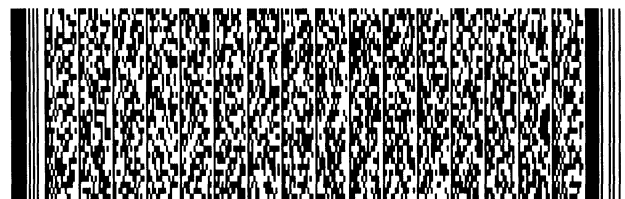
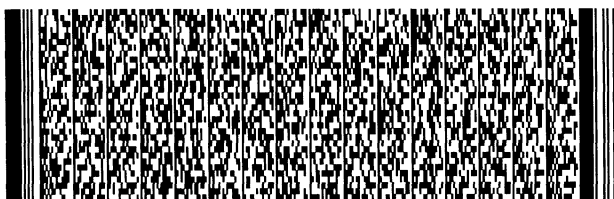
## 五、發明說明 (3)

或是增強這種受體/配位子間之交互作用的化合物。

高產量之篩檢系統已被設計來克服對現存生化及細胞試驗流程在技術上的限制。傳統合成有機化合物及傳統生物試驗需要特定時間、勞力及技巧。篩檢大量化合物必需減少每一篩檢過程對時間與勞力的需求。

因此，聚集不同類分子的高產量篩檢成為研發新藥時尋找領導化合物的重心。輸入這些高產量篩檢系統的是由現存化學合成分子(例如由藥物治療公司所擁有之化合物函式庫來)、自然產物(例如由微生物發酵培養液來)、以及由新組合化學技術產生之化合物函式庫(Tan et al. J. Am. Chem. Soc. 1998, 120, 8565)得來之已被組合的化合物函式庫。此函式庫包括高達一百萬個化合物，這些化合物可以增加找到具有所需特性而可以成為某類主要候選藥物的可能性(Tan et al J. Am. Chem. Soc. 1999, 121, 9073-9087)。

由於可增強傳統藥物研發的方法，重組化學已戲劇性的增加可利用於篩選的化合物數目，而且人類基因體研究也揭露大量新的、可用於篩選的分子標的。篩選可以在很多方面採用這些新標的物，以找尋酵素抑制物、受體顯效劑或拮抗劑。傳統的目的是找到可減輕、抑制或促進生物系統中一單獨決定性反應的化合物(Weber et al., Angew. Chem. Int. Ed. Eng., 1995, 34, 2280-2282)。此外，有一群研究者也改良以表現型為基礎的偵測系統，該偵測系統之篩選是在完整活細胞內進行，



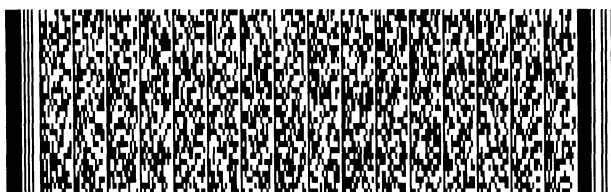
## 五、發明說明 (4)

且篩選結果之讀取是在細胞中可偵測到的特性(Stockwell et al. Chem. Biol. 1999, 6, 71-83; Mayer et al. Science, 1999, 286, 971-974)。

高產量篩檢方法發展至今已經依據「一藥物一標的」設計出可支配藥學工業上的流程表。基於歷史上的因素，以及因調節上的考量與察覺到的危險因素，現代藥物研發過程主要著眼於找到一活性分子在特定時間當作一候選藥物。臨床醫師長期鑑定的結果發現「一藥物一標的」的方法並不足以應用於治療許多疾病。他們已測試過一些顯著的治療同樣症狀、或是具有清楚邏輯上關聯之藥劑組合。以愛滋病毒治療及化學治療為例，多種活性劑組合已成為顯學。其中一種每次都最有希望的藥物組合是Premarin，該藥物是用來治療女性停經後複雜的生理改變，且包括有超過22種不同且重要的組成物。

發明概要

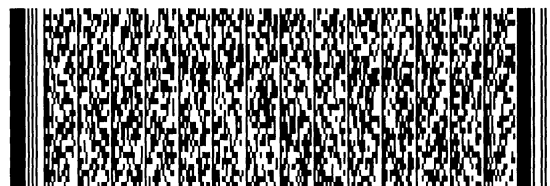
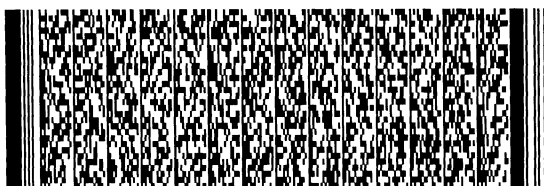
本發明研究者已發現一種效果驚人的新式擾動生物系統之方法。該方法引發執行系統性地對化合物組合物，即混合物或無化學鍵結之組合物，的高產量篩檢，以發現可協同交互作用生物系統的組合物。本發明的方法可以識別出有效的化合物治療組合物，並表現之前未知的治療效果，甚至組合物中每個化合物可能之前並未被識別出來的生物效果，亦或是之前未被使用於組合物作為明顯候選藥物的化合物及組合物。



## 五、發明說明 (5)

而且，一方面，本發明提供一種採用至少七種本體，在至少七種乘七種的組合陣列，也就是至少49種獨立本體組合物，對於生物活性篩檢二元或以上本體組合物的方法。該方法包括下列步驟：(a)提供本體，(b)構建出本體組合物之陣列，(c)提供一測試元件，包括一種或以上獨立生物嵌段，(d)將本體組合物陣列於各本體與測試元件之接觸為獨立於其他本體與測試元件之接觸的狀態下接觸測試元件，(e)偵測或測量測試元件之特性，以及(f)鑑定本體組合物在測試元件上造成不同於與組合物中成分本體單獨造成之效果。

在另一次級相關方面，本發明之特徵為一篩檢二元或以上之本體組合物生物活性之方法。該方法包括下列步驟：(a)構建出至少200種不同之二元或以上之本體組合物的陣列，(b)提供一測試元件，包括一種或以上獨立的生物嵌段，(c)將待側藥物組合物陣列於各本體或是測試元件之接觸為獨立於其他本體與測試元件之接觸的狀態下接觸測試元件，(d)偵測或測量測試元件之特性，(e)鑑定本體組合物在測試元件上造成不同於與組合物中成分本體單獨造成之效果。此測試之組成物可以依上述第一個試驗作相關的改變。在較佳的實施例中，此方法更包括步驟(f)重複步驟(a)至(e)至少二次，其中，在步驟(a)構建出之至少200種組合物在每一重複試驗中都是不同的。在另一較佳實施例中，該陣列包括至少400或1540個獨立的組合物。步驟(f)中之兩個重複試驗最好相隔時間不超過十天



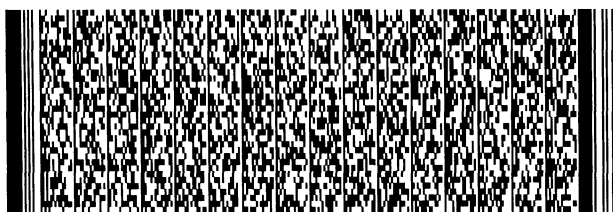
## 五、發明說明 (6)

內。

在第三級相關方面，本發明之特徵為一種篩檢二元或以上之本體組合物生物活性的方法。該方法包括以下步驟：(a) 構建出至少49種獨立的二元或以上之本體組合物的陣列，(b) 提供一測試元件，包括一種或以上獨立的生物嵌段，(c) 將待側藥物組合物陣列於各本體或是測試元件之接觸為獨立於其他本體與測試元件之接觸的狀態下接觸測試元件，(d) 偵測或測量測試元件之特性，(e) 鑑定本體組合物在測試元件上造成不同於與組合物中成分本體單獨造成之效果，以及(f) 於一星期內重複步驟(a)至(e)至少25次，並於每次重複採用不同之陣列。此試驗之組成物可以依上述試驗作相關的改變。

在第四級相關方面，本發明之特徵為一種篩檢二元或以上之本體組合物生物活性的方法。該方法包括以下步驟：(a) 構建出至少49種不同之二元或以上之本體組合物的陣列，(b) 提供一測試元件，包括一種或以上獨立的生物嵌段，(c) 將待側藥物組合物陣列於各本體或是測試元件之接觸為獨立於其他本體與測試元件之接觸的狀態下接觸測試元件，(d) 偵測或測量測試元件之特性，(e) 鑑定本體組合物在測試元件上造成不同於與組合物中成分本體單獨造成之效果，以及(f) 於一個月內重複步驟(a)至(e)至少100次，並於每次重複採用不同之陣列。此試驗之組成物可以依上述試驗作相關的改變。

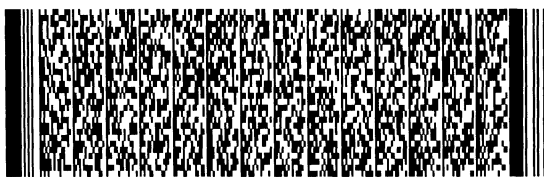
在第五級相關方面，本發明之特徵為一種篩檢二元或



## 五、發明說明 (7)

以上之本體組合物生物活性的方法。該方法包括以下步驟：(a) 構建出至少10,000種獨立的二元或以上之一組本體組合物陣列，(b) 提供一測試元件，包括一種或以上獨立的生物嵌段，(c) 將待側藥物組合物陣列於各本體或是測試元件之接觸為獨立於其他本體與測試元件之接觸的狀態下接觸測試元件，(d) 偵測或測量測試元件之特性，(e) 鑑定本體組合物在測試元件上造成不同於與組合物中成分本體單獨造成之效果，以及(f) 於十天以內重複步驟(a)至(e)至少兩次，其中步驟(a)在二次或以上重複採用不同的至少10,000種之二元本體組合物。

在第六級相關方面，本發明之特徵為一種篩檢本體組合物生物活性的方法。該方法包括以下步驟：(a) 提供一測試元件，包括一種或以上獨立的生物嵌段，(b) 將至少100種本體於各本體或是測試元件之接觸為獨立於其他本體與測試元件之接觸的狀態下接觸測試元件，(c) 偵測或測量測試元件之特性，(d) 選擇會造成相關於前述測試元件未接觸該本體之特性的改變的本體，(e) 構建出至少49種不同於該鑑定出之藥物的二元或以上本體的組合物之陣列，(f) 將待側藥物組合物陣列於各本體或是測試元件之接觸為獨立於其他本體與測試元件之接觸的狀態下接觸測試元件，(g) 偵測或測量步驟(f)中之測試元件的特性，以及(h) 鑑定本體組合物在步驟(g)造成不同於與組合物中成分本體單獨造成之效果。最好是步驟(a)之測試元件與步驟(f)之測試元件相同，但是由於可能需要在不同步驟採

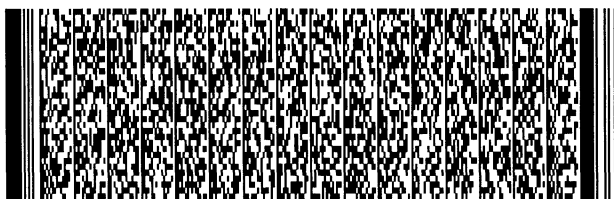


## 五、發明說明 (8)

用不同測試元件(即於步驟(a)為培養細胞和於步驟(f)為整個動物體)。相同的,步驟(c)之特性最好與步驟(g)之測試元件相同,但是也可能需要在每個步驟採用不同特性。

對於所有的試驗而言,會採用某些活性讀取技術,包括一細胞點墨試驗、一報導基因試驗、螢光共振能量轉移試驗(FRET assay)、一螢光鈣結合指示染劑、螢光顯微技術、或是表現觀察紀錄。該試驗最好是自動式,採用機器人手臂系統以及384與1536孔盤。該試驗也可以構建成部份或全部的過程採用微流系統(microfluidics)進行。或是替代性的採用受訓過的技術人員以及有效率的生產線流程執行此試驗。

本發明中作為組合物中測試之較佳本體為化合物(即非聚合性有機化合物,特別是小分子;脂肪;碳水化合物;胜肽;無機化合物;以及寡核苷酸,包括DNA與RNA分子),離子(即金屬離子),以及放射線(即可見光、可見光範圍外之光,微波放射線、紅外放射線、或是離子化放射線如X射線以及加碼射線(gamma rays))。其中試驗之組合物中的本體為化合物,最好是採用純化過之型態,但是也可以混合物之組成物型態被提供,即如自然產物之萃取物。例如一次組合(一種或以上化合物)可以為純化型態,化合物中之每種化合物都為純化型態。最好是每個本體或是測試元件之接觸是在一體積小於 $200\ \mu\text{L}$ ,更佳的是小於 $100\ \mu\text{L}$ ,以及最佳的是小於 $50\ \mu\text{L}$ 或甚至 $25\ \mu\text{L}$ 。在某種狀



## 五、發明說明 (9)

態下，採用體積小至 $10\ \mu\text{L}$ 或是甚至 $500\text{nL}$ 或以下。此外，該化合物之體積以 $100\ \mu\text{L}$ 以下為佳，以 $1\ \mu\text{L}$ 以下更佳，且以 $100\text{nL}$ 以下或甚至 $50\text{nL}$ 以下最佳。任何熟習於此技藝人士將認知可採用最小體積(即 $10\text{nL}$ 或甚至 $1\text{nL}$ )。

較佳的測試元件有全細胞(即轉型細胞或非轉型細胞)如神經元、纖維母細胞、平滑肌細胞、心肌細胞、骨骼肌細胞、神經膠細胞、胚胎幹細胞、血源幹細胞、肥大細胞、脂細胞、原蟲、細菌細胞、酵母菌細胞、神經幹細胞、以及包括T細胞與B細胞的免疫細胞)、細胞群、組織、動物、以及再造無細胞培養環境；在某些例子中，測試元件可以一單獨生物相關分子例如一蛋白質或一寡核苷酸代替。

由所期待的組合物於測試元件造成之效果最好為對於測試元件之一特性的協同作用，例如造成DNA合成之增加或減少。替代性的，組合物可以作為自然之添加物但具有較少之副作用，或一種本體可能對於其他本體引發一負向但有用的效果，即一化合物相對作用另一化合物之毒性作用。

本體可以與測試元件以任何序列接觸，即一種本體可以加入測試元件，再接著加入第二種本體，或替代性地在在本體與測試元件接觸前先結合二種本體。

本發明之高產量篩檢方法顯示快速且有效力之替代傳統採用於藥學工業上藥物研發的方法。本發明可以鑑定之前未知，而且治療上具有強效之組合物，例如由小分子，



## 五、發明說明 (10)

其中某些可能為新合成、某些可能為已知FDA 認證之藥物。其中有效之組合物全是由二種、三種、四種、或更多種藥物形成，全部都是FDA 認證過的藥物，新組合物更具有容易通過FDA 認證流程的優點。

本發明之其他特徵及優點將於下列以及申請專利之範圍詳細說明。

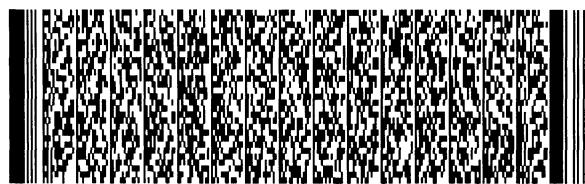
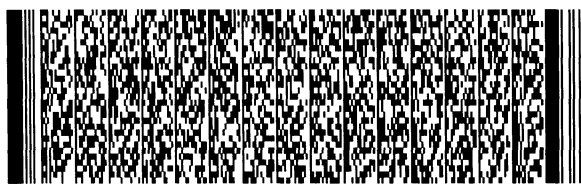
定義

「組合化學函式庫」：在此，一「組合化學函式庫」為一複數之複雜分子，在每個多樣的基本構造之不同階段採用不同反應物由多樣性基本構造合成之自然產物為佳。

「多樣性函式庫」：在此，一「多樣性函式庫」為一複數之複雜分子，由任何複數潛在來源組合而得，包括現存之化學合成分子(例如由藥學公司現有之函式庫)、自然產物(例如為生物發酵培養液)、以及由組合化學技術產生之新式函式庫。

「多樣性基本構造」：在此，一「多樣性基本構造」為一合成自模板構造之化合物，具有進一步與合成反應劑反應以產生至少一種新功能之潛在或活化功能。如此處所述的「潛在功能」(latent functionality)乃是指現存、但暫時無活性。一旦活化反應劑釋放出來，該潛在功能即活性化，而可以進行下一步多樣反應。

「測試元件」(test element)：在此，一「測試元件」為與本體組合物之系統相接觸，並觀察該本體組合物



## 五、發明說明 (11)

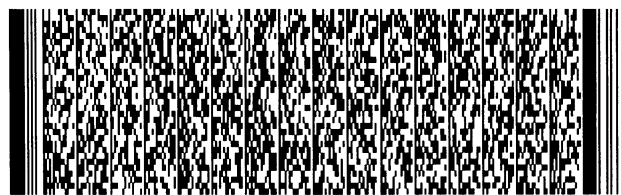
之效果。一測試元件最好是包括細胞內二種或以上之生物嵌段。

「化合物列印」(Compound printing)：在此，「化合物列印」是指採用高準確度機器手臂，例如採用於cDNA微陣列中者，將化合物施於(例如玻璃之)表面(J. Am. Chem. Soc. 1999, 121, 7967-7968)。該化合物點可以為直徑250微米或以下，且該化合物可以為共價鍵或經靜電性或疏水性反應而貼附於表面。

「微流系統」(microfluidics)：在此，「微流系統」裝置為由任何微影成像術(photolithography)形成通道構造，包括傳統微影成像術(例如卡利柏科技(Caliper Technologies), Mountain View, CA; <http://www.calipertech.com>)或非傳統方法(例如軟式微影成像術，由例如Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 1998, 37, 550-575所記載者)。

「噴墨」(ink-jet)：在此，「噴墨」技術是指同時採用熱噴墨與壓縮電力噴霧技術以分送小量液體。

「小分子」：在此，「小分子」是指一實驗室合成或自然界獲得之有機化合物。典型之小分子以具有數個碳與碳之鍵結為特徵，並且分子量小於每莫耳1500克，但該特徵並非用以限定本發明之目的。自然界獲得之「小分子」有例如taxol、dynemicin、以及rapamycin，但並不限於此。



## 五、發明說明 (12)

圖示之簡單說明

圖1為顯示兩個不同反應劑如何在一細胞內經由與不同標的物結合進行協同作用之概括圖。

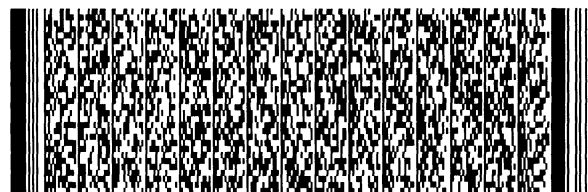
圖2為顯示兩個不同反應劑如何於一生物體經由於不同細胞或組織與不同標的物結合進行協同作用之概括圖。

圖3為由本發明之組合物篩檢獲得之實施例實驗數據。顯示出五種不同384孔盤之結果。結果顯示為孔盤形式，其中16行由A至P標示，24列由1至24標示。活性程度在每一孔以數字表示，其中1代表基礎活性(無活性)，而5代表發現具有活性組合。

圖4為採用現有商品化之技術進行組合物篩檢。

較佳實施例的詳細說明

本發明為提供一種組合了以二元、三元、四元或高階個別分子組合物之函式庫於一高產量篩檢系統，該系統採用相關生物試驗以鑑別特殊組合時才會出現的效果。這種組合物將可作為探針而用以研究附加生物系統，該系統可直接作為生物應用，以及作為新式人類治療學之活化分子或是其他人類方面之應用。這些組合物亦可以被利用於增進特定農產品，包括動植物之生長、繁殖、成熟、或其他特別的用途。還可以應用於創造化妝品產品、香水類、食物保存劑、或營養添加劑等。因此，本發明為提供系統化高產量篩檢化合物組合物以發現對於生物系統具有增進功能之組合物的強效方法。



## 五、發明說明 (13)

假定藥學物質會與複雜的系統相互反應，例如人類細胞與組織含有複數之活性物質與其複數分子標的物反應時，常會更有效率。對於藥學物質如何操作的了解，形成對於如何設計或發展該物質的新策略基礎。這種新的方法也預示了在現存治療方法將會產生戲劇性的改進，並對於目前難治療之疾病提供有效的治療方法，特別是對於會時時變化的疾病需要隨時調整治療方法。

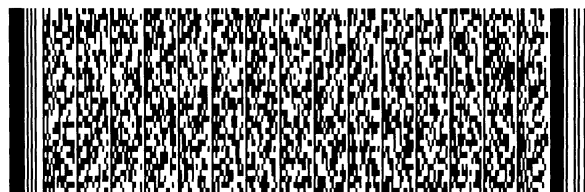
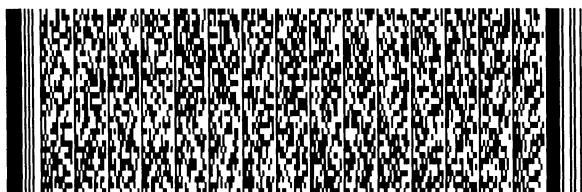
現在藥學工業的顯學之一為設計一種藥物以拮抗一標的物。本發明研究人等以我們對於複數變因設計需求的了解作為基礎而開創出系統性發展藥學物質之新紀元。

在組合物中被測試的本體

如上述，依本發明之組合物可以測試廣範圍多樣之本體。在此更詳細說明所採用的本體。

化合物與離子

普遍作為本發明篩檢用之化合物為小型有機分子。這些化合物可以是人工合成或是自然產物(例如前列腺素、植物凝血素(lectins)、自然發生之二次產物、激素等)。這些分子純化過之型態的大型函式庫可以由藥學公司、化學品公司、以及學術機構之實驗室取得；而這些函式庫也可以經已知組合化學技術合成。這些化合物可能亦可能不具有已知生物活性。本發明之化合物及組合物函式庫可以



## 五、發明說明 (14)

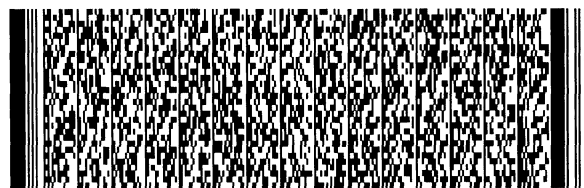
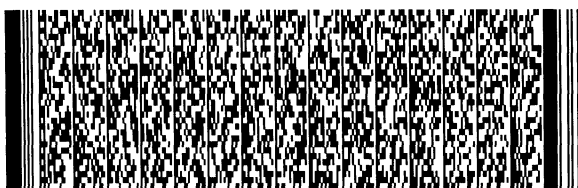
由與多樣性固態支持物結合之結構合成，例如以一由一莽草酸為基之環氧醇模板或是吡啶為基之模板異煙醯胺作為多樣性結構合成之化合物與函式庫。除了小有機分子，其他可以本發明篩檢組合物之分子有生物聚合物，包括寡核苷酸(DNA與RNA)；多胜肽(抗體、酵素、受體、配位體、構造蛋白、人類蛋白突變同功異質體、以及胜肽激素)；脂肪；碳水化合物；以及多糖。無機分子也可以篩檢，可以是潛在的生物活化離子例如金屬離子，即銅離子、鐵離子、銀離子、鋅離子、鎂離子、錳離子、鈣離子、及金離子。

其他本體

其他具有影響生物系統之潛能的非化學品本體亦可以本發明篩檢，不論是與其他非化學品本體之組合物或是與化學品本體之上述組合物。可以被篩檢之非化學品本體包括光(可見光或可見光外的範圍，例如紅外線及紫外線)；離子化放射線如X射線及加瑪射線；高比重壓力；增加或減少溫度或酸鹼值；氣態物質如氧氣、氮氣、一氧化碳等，以及任何頻率之聲學變化(聲音)。

測試元件

採用於檢測組合物效果之生物試驗通常由複數個組成物組合而得。在某些試驗，測試元件為一完整細胞，特別

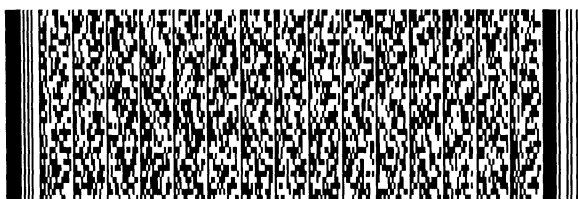


## 五、發明說明 (15)

是試驗為以表現型為基之試驗時。這種全細胞試驗提供完整的類似形成以複數變因治療性化合物效果為基之複雜分子反應機制。其他試驗採用一再造的，無細胞但具有許多所需的複雜系統之培養環境，並具有一些對於可能組合物效果試驗後有報導作用的機制。其他試驗採用更高層級的生物系統如細胞團、組織團、及動物模式以進行複數變因組合物篩檢。

任何對於個體化合物試驗有用之生物試驗都可以應用於本發明之組合物篩檢系統。試驗之測量可以包括如傳送一化合物經過細胞膜，電位差，動作電位之產生，細胞增殖，細胞死亡，細胞特化，細胞分化，細胞移行，基因表現或蛋白表現程度(之測量，例如測得mRNA、蛋白質、或一報導基因)，酵素活性，磷酸化，甲基化，乙烯化，一蛋白之遷移至細胞核(或其他蛋白位置之改變)，抵抗一病原(例如一病毒或一細菌)之能力，以及產生一免疫反應之能力。在完整生物體試驗時，動物行為可以作為一報導系統。

於一實施例中，試驗為一非破壞性試驗(例如一以細胞為基之試驗中，測試化合物效果過程不會傷害到細胞)。這種試驗可以施以複數濃度之複數個組合物於一孔。例如以漸增之濃度加入化合物A於一孔，並於每次加入化合物後測量。當達到一化合物A的適當濃度時(以一所欲試驗反應或已知特性(例如毒性，溶解度)為準)，以漸增濃度加入化合物B，並於每次加入化合物後測量。這個



## 五、發明說明 (16)

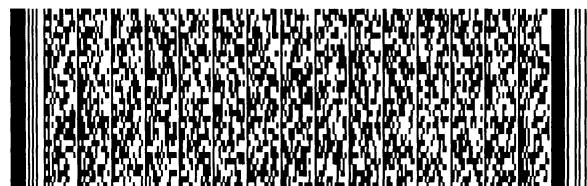
過程可以於一孔內重複數次，可使之於一盤內進行數百、數千、甚至百萬次試驗。

最好同時進行一對照試驗以鑑別組合物可能的副作用。例如，篩檢化合物組合物對於殺死或減少腫瘤細胞增殖的能力時可同時篩檢對於正常、非腫瘤細胞之作用。對於腫瘤細胞表現所欲活性以及對於正常細胞具有微小或無作用之化合物組合物為較適當之組合物。顯示對於正常細胞具有一不欲之效果的組合物較不適用。然而，後述之組合物(或具有相似構造之化合物組合物)可能在不同濃度會有效果，故不應被排除於後續的研究。

具有複雜生物分子，如蛋白質、碳水化合物、以及脂質之無細胞培養基為由已知方法製得，例如由溶解哺乳類、青蛙、酵母菌、或是細菌細胞以提供一完整細胞的溶解物，或由一細胞溶解物純化一特別部分，例如由一市售兔網織球溶解物(常用於進行體外之轉錄及/或轉譯反應)、或由未溶解之哺乳類、酵母菌、或細菌細胞取得之培養上清液。

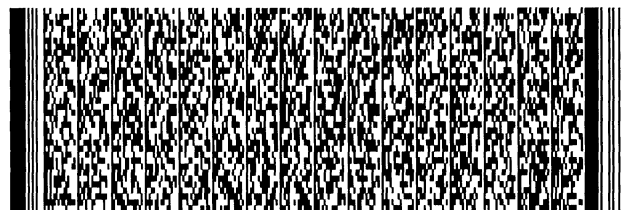
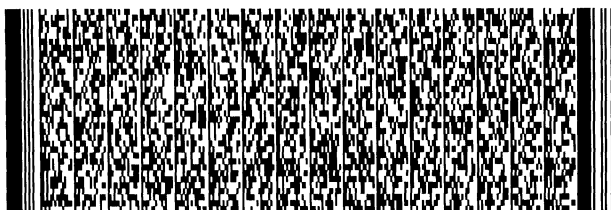
#### 細胞點墨試驗

測試活性的一種方法為細胞點墨試驗。這個方法中，細胞分種於一試驗盤的孔洞中。細胞以貼附性細胞為佳，如此細胞將可貼附並生長於孔洞之底部。以上述之方法將化合物加入孔盤中。例如，可以進行細胞點墨試驗以測量



## 五、發明說明 (17)

BrdU 得知增殖情形。於此實施例中，細胞培養於一組時間間隔(例如4到72小時)。培養基以如機械手臂液體轉移器或是以十六爪或八爪微量吸管抽吸。細胞加入含70%乙醇之磷緩衝液(phosphate-buffered saline, PBS)於4℃固定1小時。之後移除固定液並以PBS清洗細胞一次。以PBS清洗後，每孔加入含0.5% Tween 20之2N HCl靜置20分鐘。再以一含體積百分比10% 2N NaOH之漢克氏平衡液(Hank's balanced salt solution, HBSS)中和鹽酸。移除此溶液，以HBSS清洗細胞兩次，再以含0.5%小牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)與0.1% Tween 20之PBS清洗一次。除去清洗液，加入含0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 小鼠抗-BrdU抗體於含0.5% BSA與0.1% Tween 20的PBS作為抗-BrdU抗體。此抗體溶液亦包含一可辨認小鼠免疫球蛋白抗體(即小鼠抗BrdU抗體)之二次抗體(1:2000之稀釋度)；此二次抗體結合至酵素馬蘿蔔過氧化酶(horseradish peroxidase, HRP)。1小時之孵育後，移除抗體溶液並以PBS清洗細胞兩次。在第二次PBS清洗後，每孔加入HRP受質(其中含有魯米諾(luminol)、過氧化氫、以及一增強劑如對-碘苯酚(para-iodophenol))。每孔的發光度再以曝光於底片上(以一片底片放置於孔盤上)或於標準狀態下(例如每孔曝光0.3秒)以測光儀(luminometer)或發光盤讀取機(luminescence plate reader)讀取每孔之發光度。每孔讀取得的光輸出代表該孔之DNA合成量。所欲組合物藥劑即是對應於對照組會增加或是減少光輸出者。例如，一組

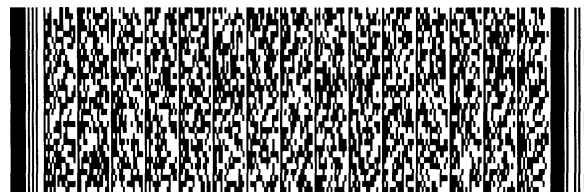


## 五、發明說明 (18)

合物會減少光輸出可能會減少DNA合成率，因此可能對於抑制或防止腫瘤細胞增殖有效。反過來說，一會增加光輸出者代表增加DNA合成。又例如，可以採用初代細胞於一 $200 \times 1$ 組合陣列(其中一固定組成物會阻斷DNA合成，因此對於細胞有毒性)。以此陣列可以篩檢一第二反應劑可防止第一化合物之毒性作用。在許多免疫不全疾病，免疫細胞不能反應一異體或自體抗原而增殖。採用培養之免疫細胞及前述方法，可以篩檢促進免疫細胞增殖之組合物藥劑。或者是，可以篩檢自體免疫抑制劑。於此例中，一種免疫細胞之族群(由周邊血液細胞分離出之一B細胞或一T細胞)可以被異體或自體抗原刺激。化合物組合物若會特異性地抑制對自體抗原反應性的增殖但不影響對異體抗原之反應將可以作為自體免疫治療的候選藥物。

*其他測試活性的方法*

前述細胞點墨試驗已不只適用於檢測BrdU，還可測試其他抗原。此外，也可以測試細胞內多種後轉譯修飾。例如，對於磷酸化之核仁素(nucleolin)或組織蛋白H3之抗體可以偵測細胞週期為分裂期(mitosis phase, M phase)的細胞。化合物組合物會造成以細胞點墨法測得核仁素或組織蛋白H3的增加將會是可休止細胞於M期且可作為抗腫瘤劑之組合物。也可以採用細胞點墨法以對乙烯化組織蛋白H4有特異性之抗體偵測組織蛋白H4乙烯化的增加。化合



## 五、發明說明 (19)

物或是化合物組合物會造成過乙烯化之組織蛋白H4增加也可以作為抗腫瘤劑。

前述例中，其步驟可以改變移除培養基及加入一固定劑(含70%乙醇或4%甲醛之PBS或Tris-buffered saline)。之後細胞膜將因除去固定液並加入一滲透劑(例如Tween 20、triton X-100或甲醇)而具可滲透性。移除膜滲透劑，再以PBS或Tris-buffered saline清洗細胞，加入一次抗體。通常其他細胞點墨試驗不會有酸變性的步驟。

#### 報導基因試驗

對於測試元件之特性的測量可以採用一報導基因。此方法提供之優點為一旦備好反應物(例如一穩定轉移基因細胞株)，則很容易進行試驗，且比起如細胞點墨法而言，只須極少時間。報導基因包括一報導元件，編碼具有顏色、螢光、冷光、或酵素特性而可被偵測之多胜肽，以及一具有對該報導基因表現特異性之加強子/啟動子元件。報導元件包括蟲螢光素酶(luciferase)、 $\beta$ 丙氨醯酶( $\beta$  lactamase)、綠色螢光蛋白、藍色螢光蛋白、氯黴素乙醯轉移酶(chloramphenicol acetyltransferase, CAT)、 $\beta$ 半乳糖苷酶( $\beta$  galactosidase)、以及鹼性磷酸酶，但並不限於此。增強子/啟動子元件包括，例如對於NFAT、p53、TGF- $\beta$ 或任何其他訊息傳導路徑會反應者，亦或是已知刺激物(stimulus)之反應性增強子/啟動子。

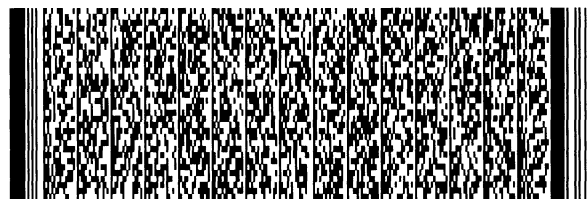
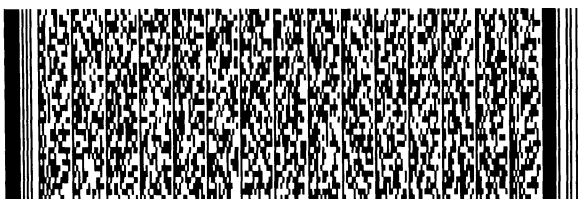


## 五、發明說明 (20)

*NF*  $\kappa$  B

一商品化之報導基因為pNF  $\kappa$  B，一種當NF  $\kappa$  B活化時會產生冷光之蟲螢光素酶報導基因(Stratagene, La Jolla, CA)。這個報導基因可以轉移感染(transfection)，不論是永久穩定或暫時性，至目標細胞株(例如A549人類肺癌細胞)。產生永久穩定轉移感染之細胞株是將pNF  $\kappa$  B質體DNA與一G418抵抗性質體(resistance plasmid)及一轉移感染劑(例如脂感染胺(lipofectamine)，Life Technologies, Inc., Rockville, MD)混合，加入一含附著生長約40%滿的A549或其他細胞之10公分培養盤。含有DNA/脂感染胺之培養盤於37°C、5%CO<sub>2</sub>存在下孵育4-16小時。移除培養液，以無血清培養液清洗細胞二次，再加入含10%小牛血清之培養液。加入足以殺死全部偽轉移感染之細胞的量(約700  $\mu$ g/mL)的G418(即不含G418抵抗性質體之轉移感染)。細胞再於37°C、5%CO<sub>2</sub>存在下孵育2週，每三天換一次培養液。永久穩定轉移感染株在2週後會生長成小細胞聚落；這些純種系以環狀選殖(ring-cloning)分別增殖。抗G418之種株以測量細胞溶胞產物光輸出篩檢含有或不含有暫時轉移感染NF  $\kappa$  B之報導基因表現。一旦鑑定出一永久穩定轉移感染pNF  $\kappa$  B之種株，就分細胞於試驗盤以用於篩檢。

對於暫時轉移感染試驗，pNF  $\kappa$  B質體DNA與一轉移感染劑混合，加入含例如附著生長約70%滿的A549之10公分培養盤。含有DNA/脂感染胺之培養盤於37°C、5%CO<sub>2</sub>存在



## 五、發明說明 (21)

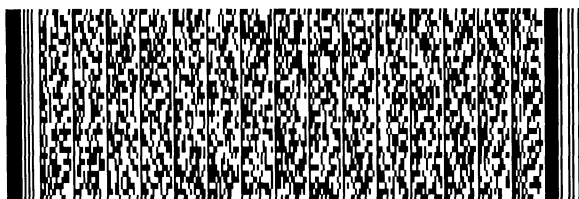
下孵育4-16小時。移除培養液，以無血清培養液清洗細胞二次，再加入含10%小牛血清之培養液。細胞於37°C、5%CO<sub>2</sub>存在下培養24小時，再分裝於試驗盤篩檢。

報導基因也可以經由其他技術送入細胞，包括病毒或反轉錄病毒感染、基因槍植入，以及細胞直接吞入裸DNA，但不限於此。任何熟習於此技藝者以其所習知之送報導基因入細胞以進行試驗的方法皆可採用於本發明篩檢系統。

一旦可生產具有報導基因的細胞，將以定量滴管、多爪定量滴管、384孔盤注入器(384 well Multidrop platefiller, Labsystems, Franklin, MA)或其他液體處理裝置(liquid handling device)使細胞分種於試驗盤(96孔，384孔)。化合物將以某一方法加入形成組合物。4-72小時後，移除培養液，細胞以HBSS清洗二次，加入溶解緩衝液(lysis buffer, 見Stockwell et al., J. Amer. Chem. Soc. 1999, 121:10662-10663)，再加入ATP/luciferin以試驗盤讀取機或螢光偵測儀(例如LJL BioSystems Inc., Analyst AD, Sunnyvale, CA)測量釋出冷光。

**螢光共振能量轉換試驗**

於另一實施例，採用螢光共振能量轉換(FRET)以偵測及測量兩個目標蛋白之間的交互反應。於實施例中，以標



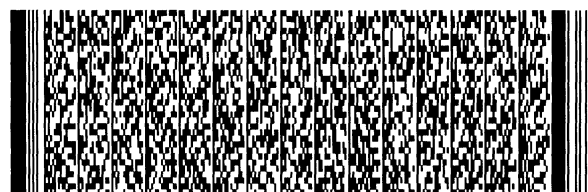
## 五、發明說明 (22)

準分子生物技術將第一與第二蛋白分別和綠色螢光蛋白 (green fluorescent protein, GFP) 與藍色螢光蛋白 (BFP) 融合。具有此二融合蛋白之DNA構築體以前述轉移感染技術或其他類似技術同時表現於哺乳動物細胞、酵母菌、蟲或其他細胞或生物體。加入化合物組合物。試驗盤置於一試驗盤讀取機以下述步驟測量螢光。供給螢光體 (即BFP) 被激發並且測量接受螢光體 (即GFP) 之激發量。增進二蛋白之接近將造成接受螢光體之激發量。因此，以增加接受螢光體之螢光量來鑑定化合物組合物造成此二蛋白靠近彼此。

例如，得到具有Smad2與Smad4之表現載體。GFP之cDNA與Smad2之5端融合，而BFP之cDNA與Smad4之5端融合。這些表現載體暫時或永久穩定轉移感染哺乳動物細胞，細胞再以化合物組合物處理，試驗盤以光刺激激發BFP，但不激發GFP。測量GFP的螢光 (即512nm光) 及鑑定化合物組合物造成此波長範圍光激發量的增加。這種組合物會造成Smad2與Smad4接近彼此，而且可以活化TGF-beta訊息傳遞，因此對於治療癌症化學療法之黏膜炎及自體免疫疾病可能有效。

*螢光鈣指示染劑*

另外一種讀出測試元件特性變化之方法採用螢光鈣指示染劑，例如flou-3 (Molecular Probes, Eugene WA; <http://www.molecularprobes.com>)、fura-2、以及



## 五、發明說明 (23)

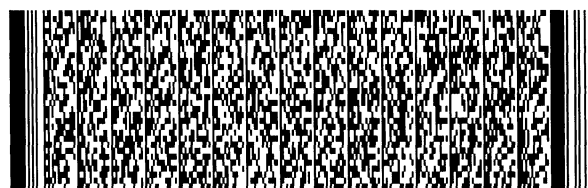
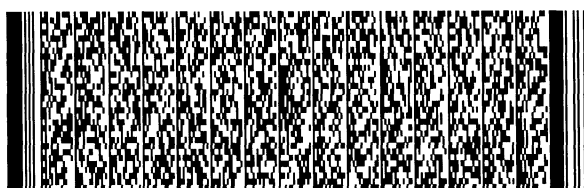
indo-1。Fluo-3 本來並沒有螢光，除非與 $\text{Ca}^{2+}$  結合，當飽和鈣離子為約0.14時才會表現出一螢光產量。因此完整的 fluo-3 AM 乙醯氧基甲基酯衍生物 (fluo-3 AM) 也沒有螢光。與 $\text{Ca}^{2+}$  結合之 fluo-3 的綠色螢光激發 (~525nm) 傳統上是以為螢光設計之適當濾鏡 (FITC) 來偵測。依據業者所言，fluo-3 表現出至少100倍 $\text{Ca}^{2+}$  結合依賴性之螢光的強度。

細胞分種於各孔，依業者指示加入 fluo-3 至細胞，加入化合物，再以一孔盤讀取機測量螢光。會造成螢光增加的化合物組合物 (但非本身的螢光) 即是造成細胞內鈣濃度增加。

#### 螢光顯微鏡

另一種試驗是利用傳統螢光顯微鏡以偵測細胞與化合物組合物接觸造成螢光程度的改變或螢光位置改變。於一實施例，採用一穩定表現一GFP標示Smad 2之轉移感染細胞株。細胞分種，化合物加入並培養1小時，之後以一自動式螢光顯微鏡對每孔之細胞進行顯影。鑑定出會造成標示蛋白改變位置之化合物組合物。例如，鑑定出會造成 GFP-Smad 2 由細胞核外轉移至細胞核內的組合物。這些組合物可以活化TGF-beta的訊息傳道，而且可能可以被用於治療癌症、自體免疫疾病、以及黏膜炎。

#### 以 cDNA 陣列紀錄表現情形



## 五、發明說明 (24)

另一偵測化合物造成測試元件之轉變的試驗方法為表現情形的紀錄。於實施例中，細胞分種，加入化合物組合物，並培養細胞2-24小時。以標準程序由各孔取得Poly A RNA，再以標準程序將RNA反轉錄為cDNA，但在反轉錄過程摻入螢光染劑(即Cy3-dUTP)。Cy3標示之cDNA與由未處理細胞得到之Cy5標示cDNA混合，與一DNA微陣列雜交(即由Affymetrix, Santa Clara, CA或Incyte, Palo Alto, CA等公司販售之DNA微陣列，如Nature Genet. Suppl. 21, Jan 1999之回顧性論文)。在微陣列中每一點的Cy3與Cy5相對螢光代表每一基因表現的改變。本方法是用以鑑定會造成基因表現出所欲求之改變的組合物，例如將一疾病基因表現情形轉變為一健康情形。替代性地，決定由所給之訊息分子造成之表現情形，例如胰島素，並發現會造成胰島素之出現的化合物組合物，代表這些組合物擬似胰島素之功效。

**完整生物體**

另一足以與篩檢試驗比擬之生物試驗採用了完整生物體。實施例中，線蟲*C. elegans*分別放入各孔(以每孔多於一隻線蟲為佳)，化合物活性以偵測生物體特徵性改變來測得。例如，線蟲可以經遺傳工程處理而在生命週期的特定階段，或是只在dauer階段，表現綠色螢光蛋白。採用一自動顯微鏡系統顯像每孔的線蟲並測量綠色螢光蛋白，或偵測由特殊組合物造成蟲體型態上的改變。

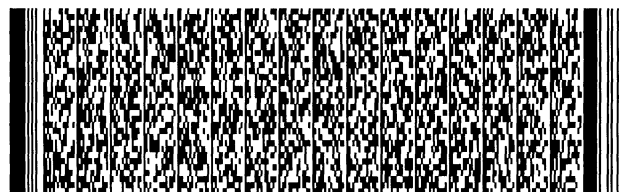
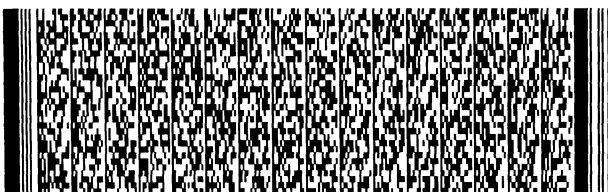


## 五、發明說明 (25)

另一全動物試驗採用大型動物，例如裸鼠，皮膚上或靠近皮膚處具有腫瘤。化合物組合物可以為DMSO混合物，以擦入皮膚、滲入皮膚、並到達腫瘤。替代性地，化合物可以經靜脈注入、肌肉注射、或口服。其他全生物體偵測活性的方法可包括採用由一固定培養基孵化Xenopus受精卵得到的小蝌蚪，於一固定培養基培養一器官某段時間之器官型培養(由小鼠或其他動物得到之人工培育器官)，以及各種動物之卵(受精或未受精)。另一試驗測量拉起二端之心臟組織或肌肉組織的張力；會調節收縮之化合物組合物可能會造成組織張力的增加或減少。

化合物標定

雖然某些試驗可以不用標定任何組合整體就可進行，某些實施例中一個或以上的組合整體仍需要標定以偵測或測量組合物造成測試元件之效果。任何已知標定方法可以採用，例如普遍用於生物化學之蛋白質親和力色層分析之生物素-鏈抗生物素(biotin-streptavidine)交互反應或六組胺酸(hexahistidine)標示蛋白等技術(Janknect et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1991, 88:8972; Wilcheck et al. Methods in Enzymology, Wilcheck, M; Bayer, E.A. Eds. Academic Press Inc. San Diego, 1990; pp.123-129)。

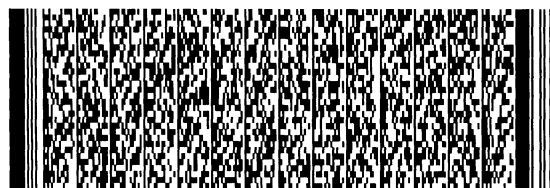
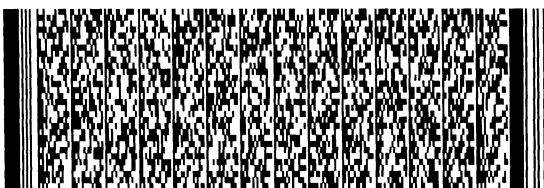
分子之組合

## 五、發明說明 (26)

本發明之方法可採用現行機器人手臂系統，96孔、384孔、1536孔或其他高密度製就盤，以及96、384、或1536孔或其他高密度試驗盤，如此將可以於單週篩檢大於150,000化合物或更多。自動技術可以依本發明配合篩檢分子組合物。本發明之方法亦可以採用如傳統微影成像術或非傳統方法(例如軟式微影成像術或接近田野光學微影成像術(near-field optical lithography))的微流系統以模擬過程。本發明之方法也可以採用噴墨列印或化合物列印技術。此外，本發明方法可以採用受訓過之技術人員以人力達到與機器人手臂系統同樣的結果。化合物組合物可以於與測試元件接觸前先行調製，或是可以於與測試元件同位置調製。這些分盤方法將詳述於下。

*手動分盤*

化合物可以手動分盤(即，加入待測細胞)。實施例中，純化化學化合物於一7X7組合陣列以手動組合並測試。化合物，於此包括7種化合物，置於一製就盤。化合物於一試驗盤組合。操作者由製就盤取得並於試驗盤第一行分孔加入第一化合物(或複數個化合物)，再加入第一列。再以製就盤中第二孔之化合物分孔加入試驗盤之第二行與第二列。重複此步驟直到組合物全加完。

*機器手臂分盤*

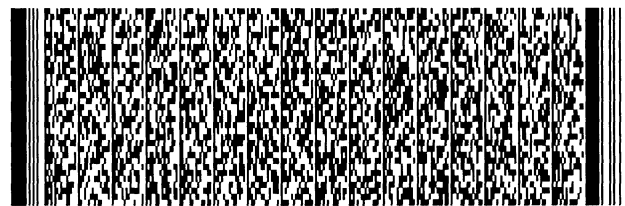
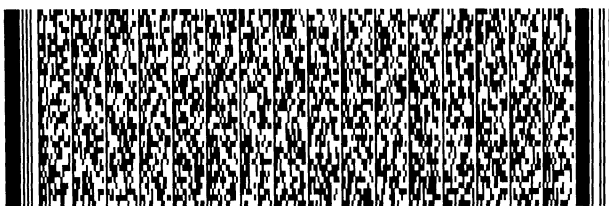
## 五、發明說明 (27)

有多種方法可加化合物入孔盤中以形成組合陣列，任何熟習於此技藝人士將了解以下所述實施例乃是為了說明本發明之目的，而不是用以限制本發明。

於一機器手臂分盤之實施例中，採用一機械式液體移轉系統。移轉系統為市售可取得，例如Beckman Coulter(Fullerton, CA)，Tecan (Research Triangle Park, NC)或Zymark (Hopkinton, MA)。機器人手臂系統以特定容量之第一組化合物分盤加入所給之行中各孔，如此則第一行都是同一化合物，第二行都是同一化合物等等。接著，液體移轉裝置分盤同一組化合物但改依列進行，如此同一列將接收到同一化合物(但是不同列之化合物不同)。移轉系統可以調整至移轉微小容量(例如1nL)。

另一有效移轉利用噴墨列印技術(Gordon et al., J. Med. Chem. 1994, 13:1385-1401; Lemmo et al., Curr. Opin. Biotechnol. 1998, 9:615-617)。噴墨列印機以含試驗化合物之複數管噴出；由一來源孔取得之每一化合物印出或噴出到每一行與每一列的表面。如上述，下一化合物印到下一行與下一列，重複該步驟直到整個微晶片的表面具有化合物組合物之陣列。

還有另一種加入化合物到試驗盤的方法採用了如史丹福大學之派翠克布朗(Patrick Brown)設計用以點出DNA的微陣列點裝置。這個裝置採用一八管筆型印出頭以及八線狀管頭以由一製就盤汲取化合物並將之印出於每一行。接著，可以是試驗盤旋轉90度角或是噴頭旋轉90度角，例



## 五、發明說明 (28)

如，二、四或十六個噴頭可以提供標準之384孔盤，以及更多數目的噴頭提供給更高密度的試驗盤。

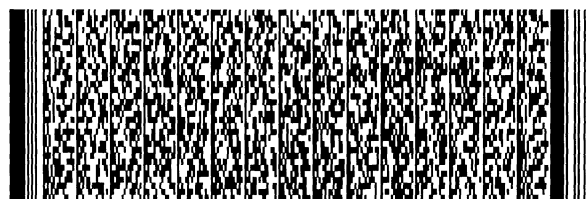
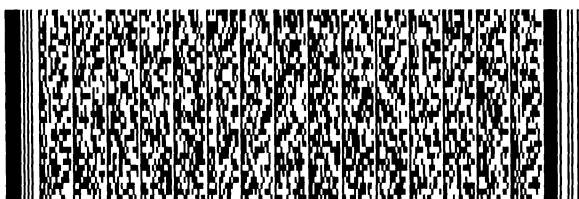
還有另一種加入化合物到試驗盤的方法採用一市售工具名為Hydra(Robbons Scientific, Sunnyvale, CA)，該工具可以配備有384個分離的注射針筒而能由一標準製就盤滴出已知容量的化合物。

還有一替代性分注試驗化合物之方法採用微流系統例如市售之Caliper Technologies(Mountain View, CA)以及直接施用該系統以創造出一具有組合物之陣列。如此，創造出微規模之組合物陣列採用微管流以分散化合物液體至基質上分隔的各點。

#### 替代性分盤方法

任何熟習於此技藝者皆可理解任何盤之構造可以調整以適用本發明之篩檢方法。例如，一 $16 \times 16$ 方形盤可以具有256孔以代替 $16 \times 24$ 盤之384孔。這可以讓任何人都能設計任何液體施加系統，液體只能順著行加，或是只能順著列，因為任何人都可以簡單的90度旋轉方形盤就得以以另一方向加入液體。任何人也都可以在於此設計再加入一試驗盤握持部具有標準的96孔或是384孔微滴管盤之方向或足跡以調整微方形盤適合任何現存的試驗盤液體加入系統。

另一提供化合物或元件以測試其組合物的方法是提供固態而非液態的組合物，例如小量的乾粉末。因此，二乾燥之組成分(或一濕一乾組成份)可以混合並將組合物加入



## 五、發明說明 (29)

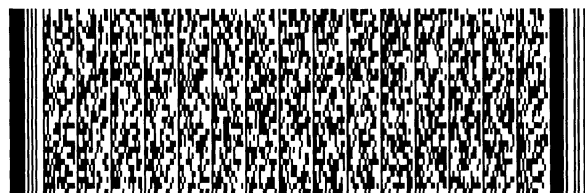
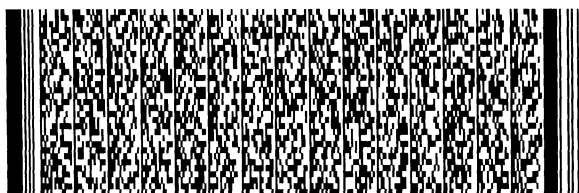
培養基中的細胞(其中組合物為可溶性)。固態化合物包括由一組合式合成的粒子可以加入不同化合物。例如，粒子可以粒子攫取器加入。實施例中，粒子為磁性而以一磁鐵加入。

在本發明之機器人手臂操作系統的高產量試驗，每一孔必須單獨立體定位，而且避免同時由一製就盤取出大量(大至100  $\mu$ L)與小量(小至1nL)化合物。以下詳述一實施例機器人手臂平台以施予本發明之組合式篩檢試驗。

設計出一雙機器人手臂平台。第一機器人手臂具有一簡單XYZ機器人手臂與一如由VWR(cat#62409-608)之市售相連的針移轉裝置。於平台置入一製就盤與一試驗盤，以機器人手臂將針伸入該製就盤吸取液體再移轉針至試驗盤，依針的大小而傳送1-1000nL的液體(一般為傳送50nL)。不同的針裝置可以傳送不同化合物組合物，如上述之實施例。第二機器人手臂為一壓電分配器，可以由製就盤的孔內吸取大量(大到10  $\mu$ L)單一化合物，再以小量分配到每一試驗盤的孔內。例如，Ivek Digispense 2000系統(<http://www.ivek.com/digi2000.htm>)具有10 nL的解析度而足以利用於此。

#### 非化合物組合物反應劑

若一應用於試驗盤之組合劑並非一化合物(即，若為某種放射性物質)，則具有細胞且已加入化合物之試驗盤



### 五、發明說明 (30)

可經過一放射源，而完成組合過程。其他非化合物形式之組合物的反應劑包括，例如高比重壓與熱。

某些非化合物反應劑可以改變型式以近似於加入一化合物。例如，改變酸鹼值，加入不同量的鹼或酸於孔中。同樣的，可以任何加入化合物的方法加入離子。

#### 函式庫容量

可以採用此處所述的系統測試小型化學庫(<1000個化合物)，所有二元(大至50萬個組合物)及三元組合物(大至幾億個組合物)。

組合物之效果很快地產生有系統的資料庫以鑑定複數變因治療。複數變因治療資料庫的大小勝過且超出任何傳統可得到的多樣性或非多樣性資料庫。一200個化合物的資料庫以成對組合產生19,900個組合物的複數變因治療資料庫，比現今採用以鑑定影響細胞分裂之新化合物的自然產物資料庫大很多(Mayer et al. Science, 1999, 286, 971-974)。一300個化合物的資料庫以三化合物組成產生具有約4.5百萬不同的組合物之複數變因治療資料庫，比現今最大的組合化學資料庫還大，也具有更大潛力的多樣性。

#### 活性排比篩檢

一多樣性資料庫可能採用標準程序開始分別測試。以一生物試驗篩檢化合物並排比其活性。資料庫中最具活性



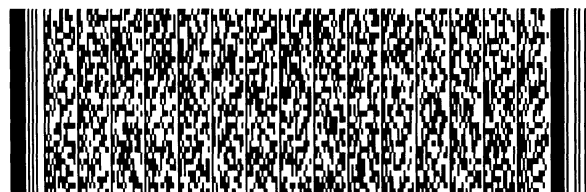
## 五、發明說明 (31)

之化合物(例如20個最具活性或千個最具活性，依被測試組合物的總量而定)再以成對或三個一組的組合物來測試。依需要，這些組合物再以活性排比，重複該步驟至四個一組的組合，五個一組的組合等，直到鑑定出所需數目的有效組合物。

## 基因演算法(genetic algorithms)

採用基因演算法提供另一種鑑定不同於其他藥劑之具有所欲生物活性的藥劑組合物的方法。此方法中每一藥劑配有一獨特的條碼，可能是一系列數目字、字母、或其他標誌。於較佳實施例中，該條碼為二元編碼(零與一)。由可能的對組合物族群中選擇成對組合物(隨機或基於一些其他特徵)之一特別數目字( $N$ 為族群大小)，組合物中每一個的活性已被確認。選擇組合物族群中最具活性者之數目為 $X$ ( $X$ 小於 $N$ )。由 $X$ 個活性組合物採用一系列步驟包括(i)複製(原組合物被簡單地選取)，(ii)突變(一條碼被突變為不同種)，以及(iii)重組(於一中心點將二條碼分別分離並將不同端點連接成為二新雜交條碼)以形成 $N$ 個新組合物。這個選擇的過程、增殖、突變、以及重組會重複好幾個循環，直到循環結束時每一藥劑之組合物的活性被確認。如此提供測試限制數目的組合物的方法，同時又允許高效能藥劑組合物之發現。

一基因演算法(或其他演算法)調整最適測量方法為： $N$ 個藥劑中選擇 $C$ 個組合物來研究。確認



## 五、發明說明 (32)

$(N!)/((N-C)!(C!))$  個組合物中每一組之活性。進一步確認全部低階組合物。由這些完整的活性數據，可以評估多種演算法，或是未加入"濕"實驗室作業之一單獨演算法的多種前突變之成功率與效果。所有的策略都是為了找出可以在矽上(in silico)比較之活性組合物，及其較適條件。

製就溶液

製備兩種製就溶液。每一化合物都放入兩種製就溶液中。第一個製就溶液含有溶解於100  $\mu$ L之二甲基亞砜(DMSO)的化合物，使其最終濃度為4mM，且儲存於384孔聚丙烯盤(Matrix technologies)。第二種製就溶液含有溶解於1500  $\mu$ L之二甲基亞砜(DMSO)的化合物，使其最終濃度為4mM，且儲存於深孔96孔聚丙烯盤。每一種製就盤都做許多備份。一個製就盤備份儲存於-20  $^{\circ}$ C以備日常使用，其他備份長期儲存於-80  $^{\circ}$ C。

試驗盤

採用三種試驗盤。前述針移轉裝置之針大小可調整適用於每一種大小的試驗盤。

- 1) 市售384孔盤(例如那聚那克(音譯, 那聚那克)白色不透明聚乙烯細胞培養含蓋滅菌盤, cat# 164610)
- 2) 市售1536孔盤(例如葛雷那(音譯, Greiner)或康寧(Corning))



## 五、發明說明 (33)

3) 習知1536或6144孔盤(由聚二甲基矽氧烷製得，道氏康寧(Dow Corning))以及道爾蘭盤(delran molds)和全盤(Omni trays)。

處理化合物添加物之軟體

採用微軟visual basic或程式語言，以傳統程式技術來寫軟體以操作上述裝置。軟體可以允許裝置讀取製就盤或試驗盤之條碼，追溯試驗桌上試驗盤的位置，並移轉適當量正確化合物至正確試驗孔。因此篩檢全組合物將預先確認或選擇，且裝置是採用自動操作方式進行組合物之篩檢，只須簡單操作步驟，例如放置特定試驗盤至試驗桌以及由試驗桌移除特定試驗盤至一培養箱。

條碼讀取機與印表機

採用一條碼讀取機，以標準技術為每個試驗盤製造一獨特的鑑識號碼，將條碼印至標籤上，把標籤貼到試驗盤或製就盤。軟體紀錄辨識每一試驗盤或製就盤每一孔中的每一化合物。條碼讀取機連到試驗桌以掃描每一個進入或離開試驗桌的試驗盤。

以下將以具體實施例說明本發明目的，但並非用以限定本發明。

## 實施例1

圖1為一概念圖，說明二不同藥劑如何在一細胞內進

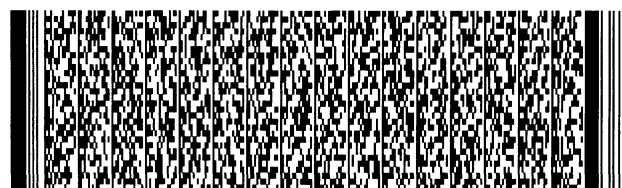
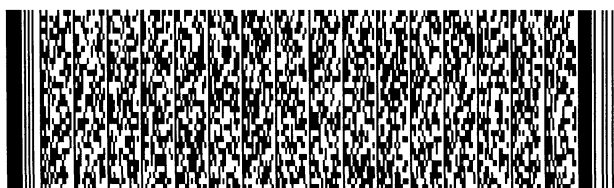


## 五、發明說明 (34)

行協同作用，在同一細胞中藥劑與不同標的物結合。圖中，化合物A10與化合物B12穿越細胞膜14並擴散進入該哺乳類細胞之細胞溶體區。化合物A結合於一激酶蛋白質X16以抑制其活性。激酶X正常時會以加入一磷酸基至Y而不活化轉錄因子Y 18。一旦化合物A抑制了激酶X，轉錄因子Y就會活化，且Y會移轉至核內，與一治療用基因，例如胰島素，之增強子位置的DNA緊密結合。然而轉錄因子Y缺乏第二轉錄因子Z 20時不能活化胰島素的表現。可是，由圖中，化合物B結合於轉錄因子Z，移除該轉錄因子上之一自體抑制環，因此造成轉錄因子Z移轉至核內，並結合於轉錄因子Y。Y與Z共同啟動治療用基因，即胰島素，表現的活化，但不能單獨啟動。

圖2為一概念圖，說明二不同藥劑如何在一生物體內進行協同作用，在不同細胞或組織中藥劑與標的物結合。圖中，化合物A 50擴散至胰臟54的beta胰島細胞52。化合物A造成一編碼為胰島素56之治療用基因於這些細胞表現。然而胰島素在脂肪組織沒有胰島素受體的標的脂肪細胞沒有效用。同時，化合物B擴散至脂肪組織60之脂肪細胞58，並轉開這些細胞中胰島素受體62之表現。A與B共同允許胰島素活性於該個體中重新啟動，但不能單獨啟動。

圖3為一實施例實驗數據，為本發明中所說明之一種組合性篩檢。結果顯示出五個不同的384孔盤。且結果是以盤之形式表示，其中16行由A標示至P，24列由1標示至24。活性之程度在每一孔是以數字表示，其中1代表基礎



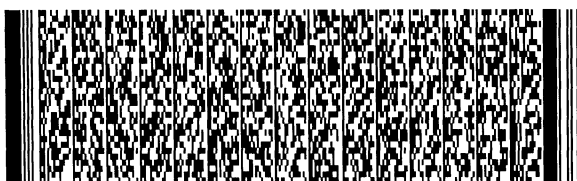
## 五、發明說明 (35)

活性(即無效果)而5代表活性組合。第一盤顯示當採用A549人類癌症細胞於一溴去氧尿嘧啶細胞點墨試驗測試細胞週期休止活性之 $4 \mu\text{g}/\text{mL}$ 的化合物1-384之活性(說明於下)。第二盤顯示同樣試驗條件下之 $2 \mu\text{g}/\text{mL}$ 的化合物1-384之活性。第三盤顯示同樣試驗條件下之 $4 \mu\text{g}/\text{mL}$ 的化合物385-768之活性。第四盤顯示同樣試驗條件下之 $2 \mu\text{g}/\text{mL}$ 的化合物385-768之活性。注意在第1-4盤中沒有一個化合物顯示任何活性。第五盤顯示 $2 \mu\text{g}/\text{mL}$ 化合物1-78-68之384成對組合物的活性(即是化合物1-384與385-768同時加入試驗盤以每一試驗盤加 $2 \mu\text{g}/\text{mL}$ 各化合物,造成384種不同隨機配對的組合物)。注意第A1孔顯示出活性。這代表化合物1(化合物1-384時之第A1孔)單獨沒有活性,且化合物385(化合物385-768時之第A1孔)單獨也沒有活性,但化合物1與化合物385共同可以產生協同作用而造成一活性組合物。

## 實施例2

## 一般方法

圖4顯示一採用現行商品化之技術施行組合篩檢的方法。人類A549肺癌細胞為由美國種株收集中心(American Type Culture Collection, ATCC, 編號CCL185)取得,並培養於 $37^\circ\text{C}$ 、 $5\%\text{CO}_2$ 之含 $10\%$  FBS、 $100 \text{unite}/\text{mL}$  penicillin G sodium、 $100 \mu\text{g}/\text{mL}$  streptomycin sulfate以及 $2 \text{mM}$  glutamate(GibcoBRL, Rockville, MD)

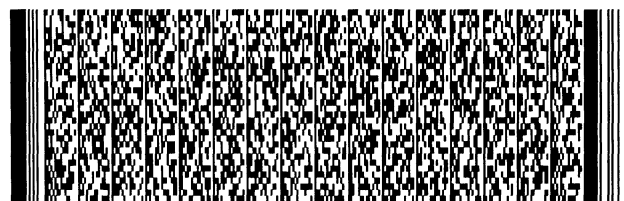
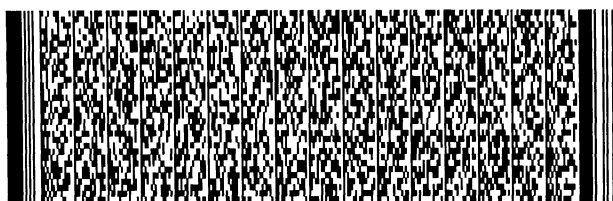


## 五、發明說明 (36)

之Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM)培養液。四千個細胞以一多滴管分散器110(Labsystems Microplate Instrumentation Division, Franlin, MA)被分種於一白色、不透明384孔盤100(國際那聚那克, Rochester, NY)的每一孔。細胞以40  $\mu$ L之含10%FBS培養液分種。

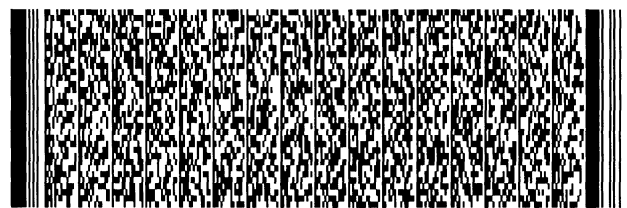
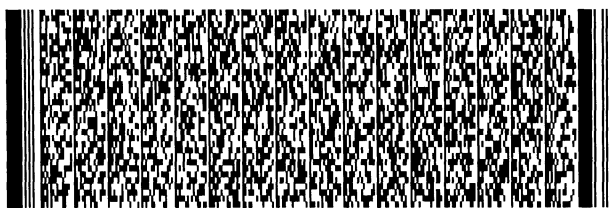
於37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>培養16小時後，由50  $\mu$ M之待測化合物製就液取10  $\mu$ L於10%培養液中加入每一孔，使每孔總容積達到40  $\mu$ L，且該化合物之最終濃度為10  $\mu$ M。加入之前或之後，或是數小時或數天後，加入第二組化合物，採用針陣列130之小針由製就盤140或150每孔吸取，在加入試驗盤100之各孔中。基質技術針移轉裝置(Matrix Technologies Pin Transfer device)130(384或96針與尖頭，貨號350500130與350510203)。這樣的兩步驟可在許多成對組合物試驗一特定化合物抗另一大量化合物的情形。也需要具有一無原先之化合物(即每一盤中皆有的化合物)的對照試驗盤試驗一組針移轉之化合物，以鑑別該組合物的確達到某種新的特性。

另一方法也可以利用以提供化合物組合物接觸測試元件用。例如，不採用上述固定一化合物以配對組合物的方法，而以針移轉一組化合物達到每一組之配對組合物。一組16個化合物由製就盤140以針移轉至384孔試驗盤100之16行。同一組16個化合物再移轉至同一試驗盤之16列，提供一具有不同配對組合物之256孔基質。



## 五、發明說明 (37)

在前述各實施例(或類似實驗)，一旦待測化合物都加入試驗盤，具有A549細胞與化合物之試驗盤於37°C、5%CO<sub>2</sub>之培養箱120培養48小時。之後由-50 μL製就培養液(PBS之10mM製就液，pH7.4)以多滴管384 110吸取10 μL之BrdU加入試驗盤，使最終濃度為10 μM BrdU。細胞再於37°C、5%CO<sub>2</sub>之培養箱120培養12-16小時。以一另一端連接到真空吸引源之24滴管(24-channel wand, V&P Scientific)，試驗流程中皆以該種方式吸取液體，將每一孔中的上清液移除。以50 μL冰(4°C)70%酒精/30%PBS固定細胞，再於冰上培育一小時，以90 μL冰(4°C)PBS清洗，再加入25 μL之2M HCl/0.5% Tween20/ddH<sub>2</sub>O。細胞於室溫靜置20分鐘，再以90 μL之10% 2M NaOH/90% 漢克氏平衡液(HBSS, GibcoBRL)清洗，以90 μL之HBSS清洗兩次，以75 μL之PBSTB(PBS, 0.1% Tween 20(Sigma), 0.5% BSA(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO))清洗一次。之後，加入20 μL之含0.5 μg/mL小鼠抗BrdU抗體(1:1000製就液之稀釋液，(BD Biosciences-PharMingen San Diego, CA)的抗體液與抗小鼠Ig抗體標定HRP之1:2000製就液於PBSTB之稀釋液(安麥順法瑪西亞生技公司(音譯, Amersham Pharmacia Biotech Inc.), Piscataway, NJ)。細胞於室溫靜置一小時，以90 μL之PBS清洗兩次，再於各孔加入20 μL之HRP受質溶液。HRP受質溶液是由混合等量之安麥順ECL偵測套組內的溶液1與2而得來。試驗盤置於一LJL生物系統(音譯, Biosystems Inc.,



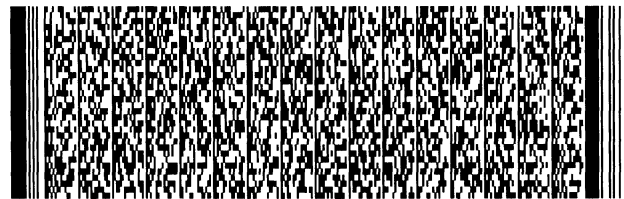
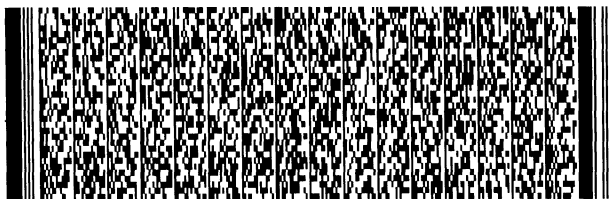
## 五、發明說明 (38)

Sunnyvale, CA) 分析儀AD 試驗盤讀取器160，以各孔讀取0.3秒得到冷光量。組合物活性再與兩者原始濃度或N次原始濃度之單獨試劑時的活性比對，其中N等同於活性化合物篩檢的數目。若一組合物顯示的活性大於兩者原始濃度或N次原始濃度之單獨試劑時的活性，就是一協同作用。即使協同作用並沒有被觀察到，組合物仍然可能具有某些相較於個別化合物時之優點(例如減低副作用)。

前述方法可以做某些修飾，例如兩種不同化合物可以在第一步驟時加入，以便於進行三種化合物組合物之試驗。同樣地，三種化合物可以在第一步驟時加入，以便於進行四種化合物組合物之試驗等等。採用這種方法可以試驗高階化合物組合物。

鑑定一化合物組合物抑制增殖的方法說明如下。該方法乃是為了說明之目的，並非用以限制本發明。

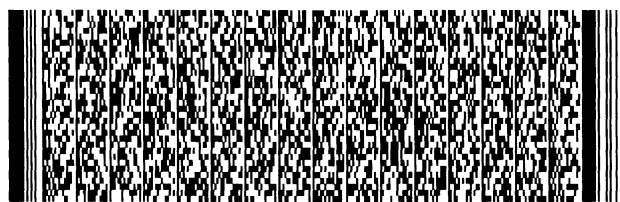
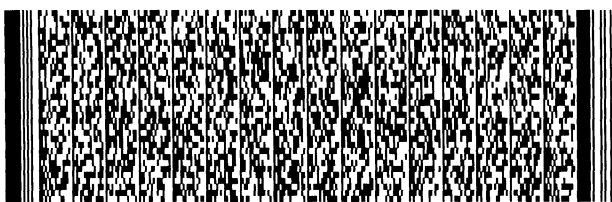
七種化合物以BrdU細胞點墨試驗單獨與21可能配對組合物進行試驗對細胞週期進程的效力。該七種化合物(podophyllotoxin, paclitaxel, quinacrine, bepridil, dipyridamole, promethazine 與 agroclavine；皆購自Sigma Aldrich Corp., St. Louis, MO) 秤重置入微量玻璃管並溶解於二甲基亞礪以製成4mg/mL之製就液。六千個A549肺癌細胞以30  $\mu$ L之10%培養液(含10% FBS、100unite/mL penicillin G sodium、100  $\mu$ g/mL streptomycin sulfate以及2 mM glutamate之 Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM) 培養液(皆購



## 五、發明說明 (39)

自GibcoBRL, Rockville, MD))分種於384孔、白色不透明那聚那克細胞培養盤(cat# 164610)之各孔。各化合物皆稀釋四次於10%培養液達到最終試驗濃度(最終試驗濃度為0.25% DMSO, 240nM podophyllotoxin, 60 nM paclitaxel, 420 nM quinacrine, 25  $\mu$ M bepridil, 400nM dipyridamole, 25  $\mu$ M promethazine, 840nM agroclavine)。以15  $\mu$ L之培養液內的各化合物4倍製就液加入一八行八列方形之中的一行與一列(第八行只有載液DMSO), 如此所有可能之七化合物的二元組合物都被試驗到, 且亦試驗到各化合物本身。細胞於37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>培養48小時。由一10%培養液中含BrdU之50  $\mu$ L製就液取15  $\mu$ L加入試驗盤, 使最終濃度為10  $\mu$ M BrdU。細胞再於37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>培養隔夜。

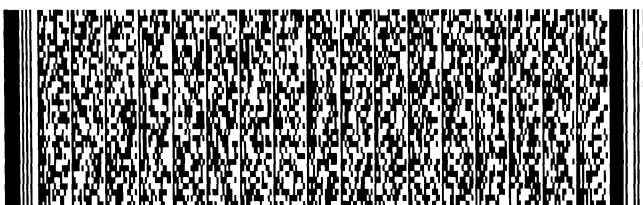
培養16小時後, 以一另一端連接到真空吸引源之24滴管(24-channel wand, V&P Scientific), 試驗流程中皆以該種方式吸取液體, 將每一孔中的上清液移除。以一多管滴管384試驗盤注入器(Labsystems), 試驗流程中皆以該注入器注入液體, 將50  $\mu$ L之70%酒精/30%PBS(4 $^{\circ}$ C)加入各孔。將試驗盤於室溫培育一小時, 吸乾各孔, 再加入25  $\mu$ L之2M HCl/0.5% Tween20於各孔中。試驗盤於室溫靜置20分鐘。加入25  $\mu$ L之2M NaOH於各孔。吸除各孔之液體並以75  $\mu$ L之HBSS清洗各孔。再以75  $\mu$ L之PBSTB(PBS與0.5%BSA及0.1% Tween 20)清洗各孔。各孔加入20  $\mu$ L之抗體液(含0.5  $\mu$ g/mL小鼠抗BrdU抗體(PharMingen)與抗小鼠



## 五、發明說明 (40)

Ig 抗體標定HRP之1:2000稀釋液(安麥順)。加入抗體液之試驗盤於室溫靜置一小時，吸除抗體液並以PBS清洗各孔一次。最後，於各孔加入20  $\mu$ L之ECL偵測試劑(混合等量之安麥順ECL偵測套組內的溶液1與2而得來)。試驗盤置於一LJL分析與試驗盤讀取器，以各孔之0.2秒之間隔時間讀取冷光量。重複試驗於二試驗盤，且各配對組合物於一共有十六個重複試驗進行測試。顯示於下表之數據代表各化合物組合物之平均抗增殖活性。五個具有統計上顯著差異( $p < 0.001$ )的組合物被粗黑框標示。所有結果皆以一組含細胞但不被處理之試驗標準化。因此，一代表不活化受質之數值與一大之數值皆代表某種程度的抗增殖活性。

	DMSO	Podophyllotoxin	Paclitaxel	Quinacrine	Bepridil	Dipyridamole	Promethazine	Agroclavin
DMSO	1.0							
Podophyllotoxin	6.5	6.5						
Paclitaxel	6.3	6.3	7.7					
Quinacrine	1.7	6.6	6.9	2.3				
Bepridil	1.8	15.2	3.1	3.0	14.4			
Dipyridamole	1.5	8.9	8.8	2.3	2.4	2.0		
Promethazine	1.3	3.9	6.4	2.4	15.2	1.8	4.8	
Agroclavin	1.0	5.7	5.8	1.6	1.9	1.5	1.2	1.0

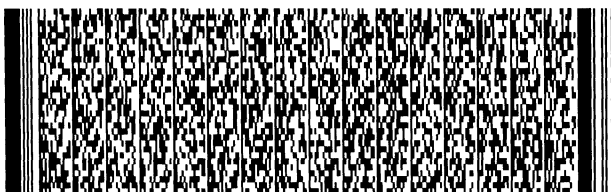


## 五、發明說明 (41)

表中顯示現存FDA認證之藥物的組合物以及其異於個別化合物的抗增殖活性。Podophyllotoxin與paclitaxel皆為可休止細胞於分裂期的微管(microtubule)穩定物，dipyridamole為一抗血小板物質，bepridol為一鈣通道阻斷劑，而promethazine為一H1組織蛋白受體結抗劑且為一CNS抑制劑與抗膽鹼劑。Dipyridamole通常被認為具有相當高的安全性而可作為人類治療藥物，特別是與paclitaxel及podophyllotoxin之毒性副作用相較時。因此，於此試驗中，dipyridamole增強了paclitaxel及podophyllotoxin兩者對人類肺癌細胞的抗增殖作用。而且，bepridil增強了podophyllotoxin的效果，卻抑制了paclitaxel的效果。這個結果並沒有預期一結果與著重於組合物在經驗上高產量試驗的重要性以觀察未預期的藥物間交互反應。例如，不論是bepridil或promethazine在現行治療適應症上都沒有被用來作為抗增殖劑，即是組合以強力抑制肺癌細胞的增殖。

產業上利用的可能性

本說明書中所提到的申請書與專利都有參考文獻。任何習於此技藝人士以不脫離本發明範圍與精神皆可以對本發明中所提到的方法或系統進行各種修飾或改變。雖然本發明已以一特定實施例揭露於上，但本發明並不限於該實施例。因此，熟習於藥物研發或相關領域者嘗試對於本發明中所揭露之上述模式的種種修飾皆不脫離本發明之範



## 四、中文發明摘要 (發明之名稱：鑑定本體組合物以作為藥物之方法)

本發明是有關於一種採用組合式陣列篩檢二元或高階組合物之生物活性的方法。此方法包括以下步驟：(a) 提供本體，(b) 本體組合物產生一陣列，(c) 提供一測試元件，包括一或以上之獨立生物嵌段，(d) 將本體組合物之陣列與測試元件接觸，確保在每一本體與測試元件之接觸皆是分離於其他之接觸的條件下進行，(e) 偵測或測量測試元件之特性，以及(f) 鑑定本體組合物對測試元件之特性造成的效果是不同於組合物之成分本體單獨的效果。

## 英文發明摘要 (發明之名稱：METHODS FOR IDENTIFYING COMBINATIONS OF ENTITIES AS THERAPEUTICS)

The invention features a method of screening two-entity or higher order combinations for biological activity using combinational arrays. The method includes the steps of:(a) providing the entities, (b) creating an array of combinations of entities, (c) providing a test element that includes one or more distinct biological moieties, (d) contacting the array of combinations of entities with the test element under conditions that ensure that each entity/tset element



四、中文發明摘要 (發明之名稱：鑑定本體組合物以作為藥物之方法)

英文發明摘要 (發明之名稱：METHODS FOR IDENTIFYING COMBINATIONS OF ENTITIES AS THERAPEUTICS)

contacting is segregated from the others, (e) detecting or measuring a property of the test element, and (f) identifying combinations of entities that cause an effect on the property of the test element that is different from the effect of an entity of the combination by itself.



盤 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

第 3A 圖

盤 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

第 3B 圖

盤 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

第 3C 圖

盤 4

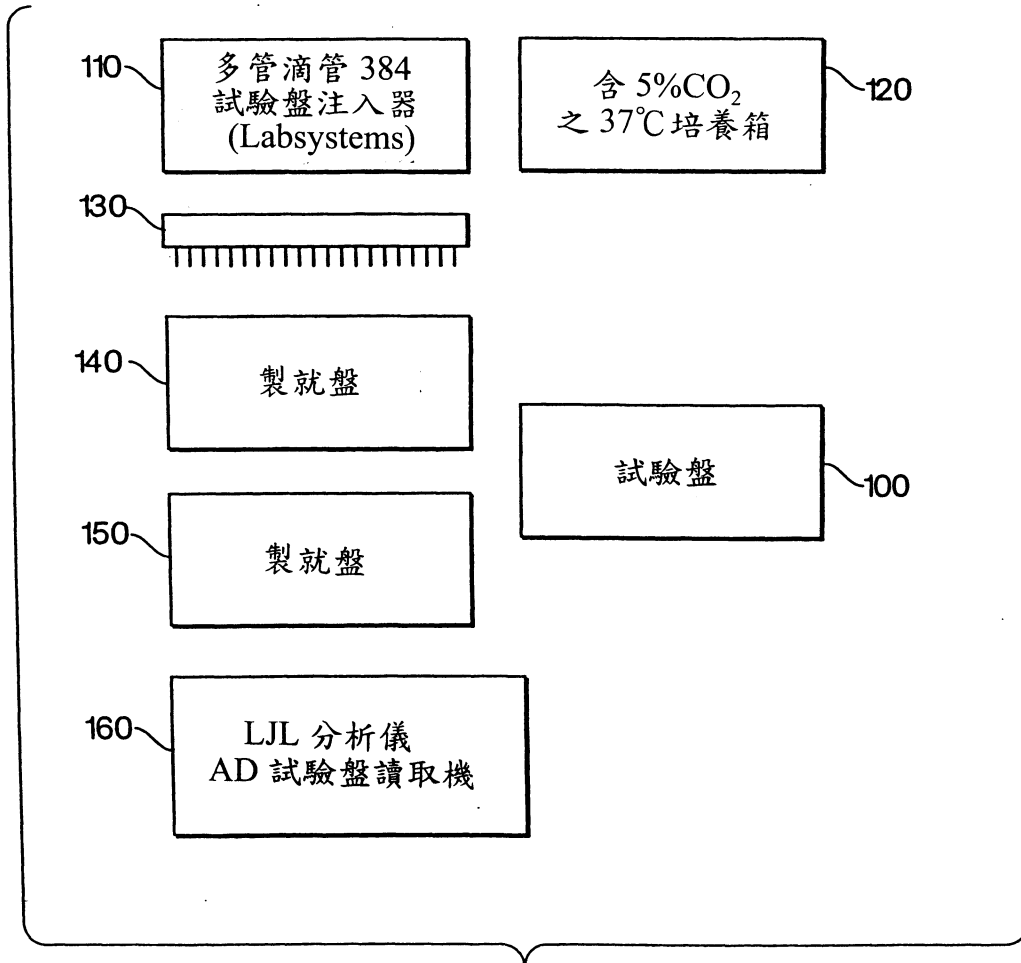
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
A	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
C	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
D	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
E	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	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

第 3D 圖

盤 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

第 3E 圖



第 4 圖

## 五、發明說明 (42)

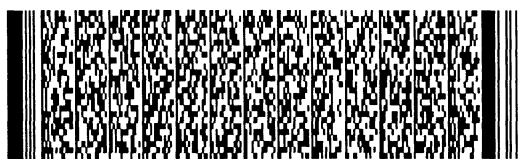
修正

91 &gt; 21

疇。

## 符號說明：

10~ 化合物A	12~ 化合物B
14~ 細胞膜	16~ 蛋白質X
18~ 轉錄因子Y	20~ 轉錄因子Z
22~ 自體抑制環	24~ 基因表現
26~ 細胞核	28~ 增強子區
30~ 胰島素治療基因	50~ 化合物A
52~ $\beta$ 胰島細胞	54~ 胰臟
56~ 胰島素	58~ 脂肪細胞
60~ 脂肪組織	62~ 化合物B



## 六、申請專利範圍

1. 一種篩檢化合物之組合以作為有效治療組合的方法，其包含下述步驟：

(a) 提供一全細胞試驗之全細胞，

(b) 將該全細胞與至少100個化合物接觸，確保每一化合物/全細胞之接觸是獨立於其他接觸的狀態，

(c) 偵測或測量該化合物對於該全細胞產生之效果，

(d) 選擇出相對於未接觸該化合物之全細胞特性而言，對全細胞特性產生改變之化合物，

(e) 由選擇出之化合物建立一陣列，包括至少49個不同之二或高階組合，

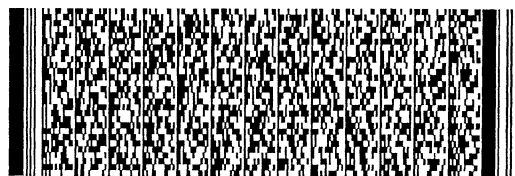
(f) 將上述化合物組合之陣列與該全細胞試驗之全細胞接觸，確保每一組合/全細胞之接觸是獨立於其他接觸的狀態，

(g) 偵測或測量化合物之組合對於步驟(f)之全細胞產生之效果，以及

(h) 鑑別對步驟(g)產生之效果的化合物組合係不同於組合之一化合物本身之效果，且其可作為新人類治療方法之活性分子。

2. 如申請專利範圍第1項所述之篩檢化合物之組合以作為有效治療組合的方法，其中步驟(e)包括建立一陣列，包括二個或多個化合物的至少200個不同的化合物之組合。

3. 如申請專利範圍第2項所述之篩檢化合物之組合以作為有效治療組合的方法，其中步驟(e)包括建立一陣列，包括二個或多個化合物的至少400個不同的化合物之



## 六、申請專利範圍

組合。

4. 如申請專利範圍第3項所述之篩檢化合物之組合以作為有效治療組合的方法，其中步驟(e)包括建立一陣列，包括二個或多個化合物的至少1540個不同的化合物之組合。

5. 如申請專利範圍第1項所述之篩檢化合物之組合以作為有效治療組合的方法，其中該偵測步驟(g)為以一細胞點墨試驗施行。

6. 如申請專利範圍第1項所述之篩檢化合物之組合以作為有效治療組合的方法，其中該偵測步驟(g)為以一報導基因試驗施行。

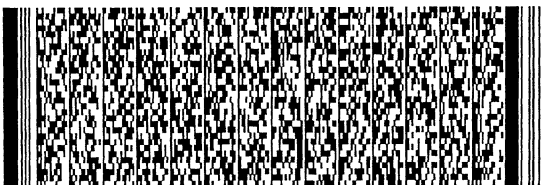
7. 如申請專利範圍第1項所述之篩檢化合物之組合以作為有效治療組合的方法，其中該偵測步驟(g)為以一螢光共振能量轉移試驗施行。

8. 如申請專利範圍第1項所述之篩檢化合物之組合以作為有效治療組合的方法，其中該偵測步驟(g)為以一螢光鈣結合指示染劑施行。

9. 如申請專利範圍第1項所述之篩檢化合物之組合以作為有效治療組合的方法，其中該偵測步驟(g)採用螢光顯微鏡。

10. 如申請專利範圍第1項所述之篩檢化合物之組合以作為有效治療組合的方法，其中該偵測步驟(g)採用表現廓視法。

11. 如申請專利範圍第1項所述之篩檢化合物之組合以作為有效治療組合的方法，其中該全細胞為人類細胞。



## 六、申請專利範圍

12. 如申請專利範圍第1項所述之篩檢化合物之組合以作為有效治療組合的方法，其中該全細胞乃是由癌症細胞、免疫細胞、神經細胞、纖維母細胞、細菌細胞、以及真菌細胞所組成之族群中所選擇出。

13. 如申請專利範圍第1項所述之篩檢化合物之組合以作為有效治療組合的方法，其中步驟(e)與(g)係採用機器人手臂系統操作。

14. 如申請專利範圍第1項所述之篩檢化合物之組合以作為有效治療組合的方法，其中步驟(e)與(g)係採用微流系統操作。

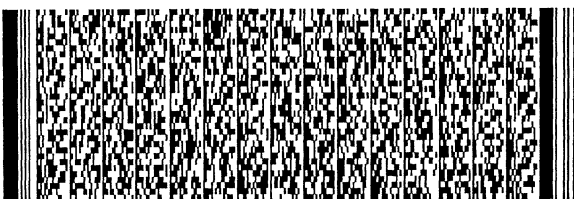
15. 如申請專利範圍第1項所述之篩檢化合物之組合以作為有效治療組合的方法，其中步驟(e)與(g)係採用噴墨式列印技術操作。

16. 如申請專利範圍第1項所述之篩檢化合物之組合以作為有效治療組合的方法，其中該化合物為由非聚合性有機化合物、脂質、碳水化合物、胜肽、無機化合物、以及寡核苷酸所組成之族群中選擇出。

17. 如申請專利範圍第1項所述之篩檢化合物之組合以作為有效治療組合的方法，其中該化合物至少有一為一純化形式。

18. 如申請專利範圍第17項所述之篩檢化合物之組合以作為有效治療組合的方法，其中每一該化合物為純化形式。

19. 如申請專利範圍第1項所述之篩檢化合物之組合以作為有效治療組合的方法，其中該化合物為以混合物之組



## 六、申請專利範圍

成成分所提供。

20. 如申請專利範圍第19項所述之篩檢化合物之組合以作為有效治療組合的方法，其中該混合物為自然產物萃取物。

21. 如申請專利範圍第1項所述之篩檢化合物之組合以作為有效治療組合的方法，其中該效果為一協同作用。

22. 如申請專利範圍第1項所述之篩檢化合物之組合以作為有效治療組合的方法，其中該化合物至少有一為具有小於1500克/莫耳之分子量的分子。

23. 如申請專利範圍第22項所述之篩檢化合物之組合以作為有效治療組合的方法，其中該分子為一美國食品藥物管理局(FDA)認可之藥物。

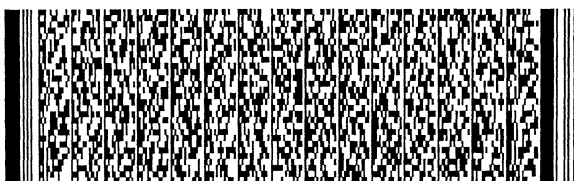
24. 如申請專利範圍第22項所述之篩檢化合物之組合以作為有效治療組合的方法，其中該每一化合物為一具有小於1500克/莫耳之分子量的分子。

25. 如申請專利範圍第24項所述之篩檢化合物之組合以作為有效治療組合的方法，其中該每一化合物為一美國食品藥物管理局(FDA)認可之藥物。

26. 如申請專利範圍第1項所述之篩檢化合物之組合以作為有效治療組合的方法，其中該有效治療組合篩檢出的組合為一二化合物之組合。

27. 如申請專利範圍第1項所述之篩檢化合物之組合以作為有效治療組合的方法，其中該有效治療組合篩檢出的組合為一三化合物之組合。

28. 如申請專利範圍第1項所述之篩檢化合物之組合以



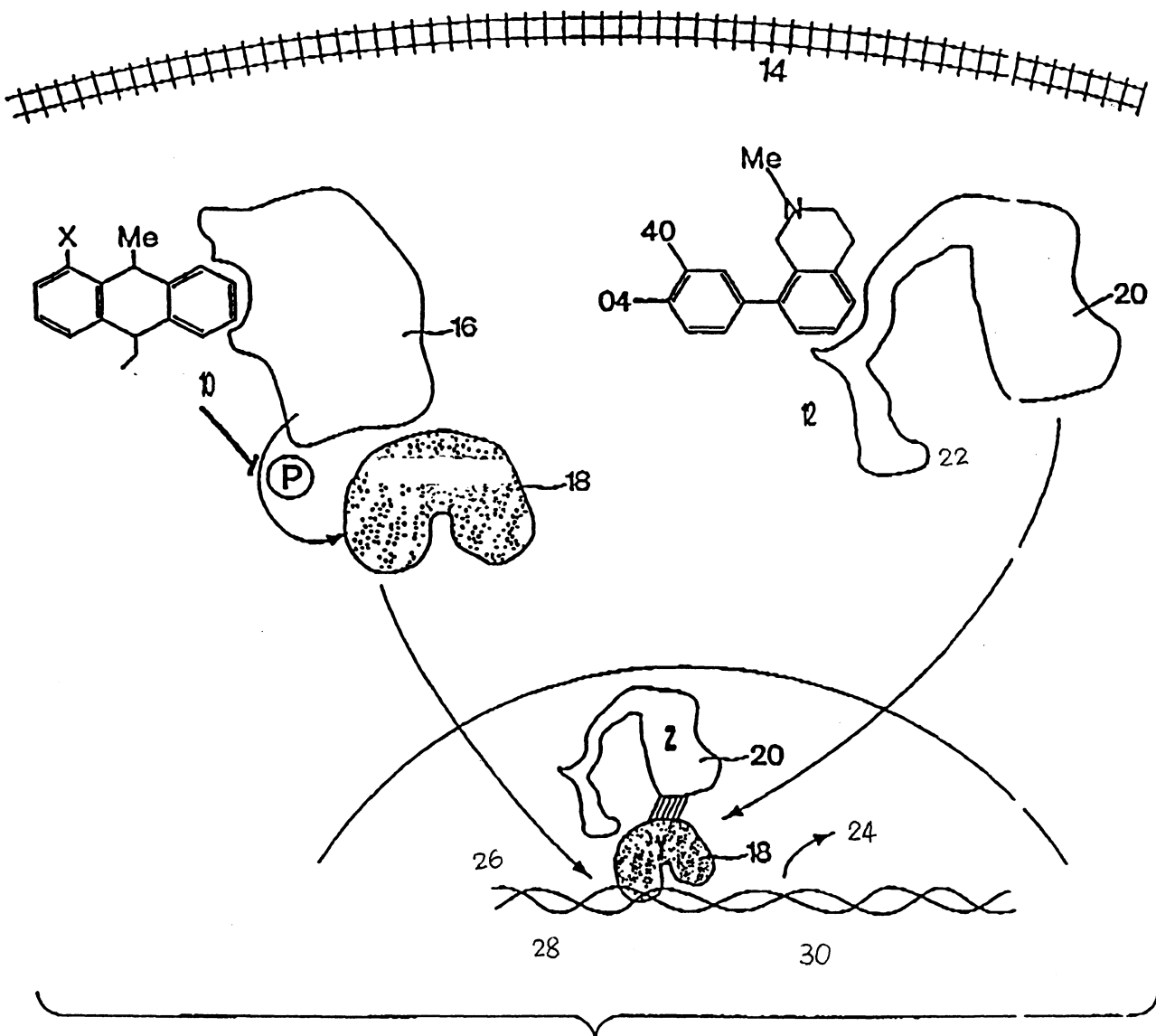
## 六、申請專利範圍

作為有效治療組合的方法，其中該全細胞試驗中之全細胞特性係將一化合物轉移經過該細胞膜，電子電位，動作電位之產生，細胞增生，細胞死亡，細胞具體化(cell specification)，細胞分化，細胞移行，基因表現，蛋白表現程度，酵素活性，磷酸化，甲基化，乙醯化，蛋白轉位至細胞核，或產生免疫反應之能力。

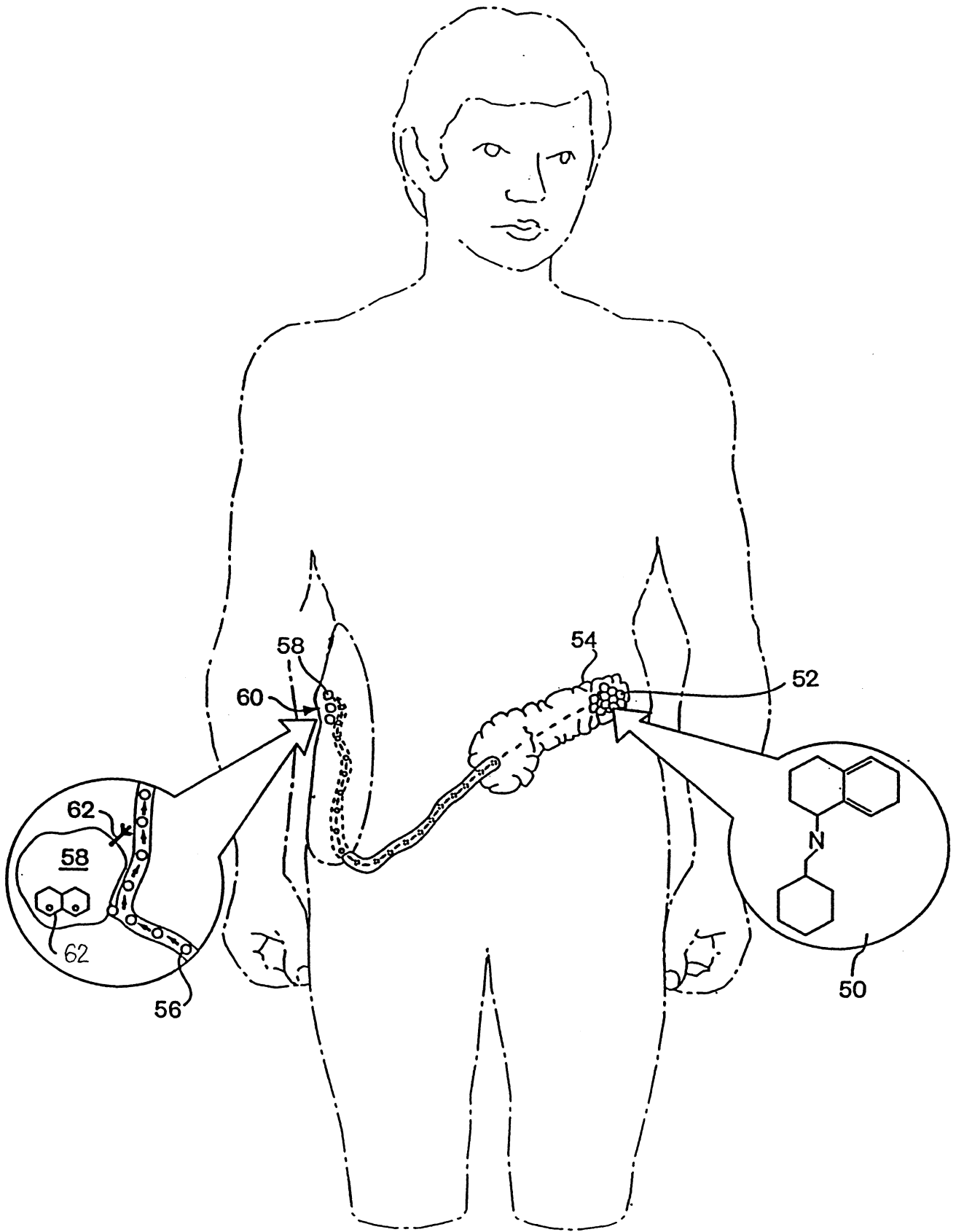


公告本

修正  
補充 本91年2月7



第 1 圖



第 2 圖