

發明專利說明書

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※ 申請案號： 97/00934

※ 申請日期： 97-01-10

※IPC 分類：

C12Q 1/26 (2006.01),

一、發明名稱：(中文/英文)

於半卡肼-敏感的胺氧化酶存在下偵測有機亞甲基胺類之穩定性的方法
METHOD FOR DETERMINING THE STABILITY OF ORGANIC
METHYLENEAMINES IN THE PRESENCE OF
SEMICARBAZIDE-SENSITIVE AMINE OXIDASE

二、申請人：(共 1 人)

姓名或名稱：(中文/英文)

賽諾菲阿凡提斯公司

SANOFI-AVENTIS

代表人：(中文/英文)

桑瑞德/THOURET-LEMAITRE, ELISABETH

住居所或營業所地址：(中文/英文)

法國巴黎市法國大道 174 號

174, Avenue De France, F-75013 Paris, France

國 籍：(中文/英文)

法國/France

三、發明人：(共 7 人)

姓 名：(中文/英文)

1. 艾德朵/ADEDOYIN, ADEDAYO
2. 安傑拉/ANGELASTRO, MICHAEL R.
3. 畢朱利/BICK, JULIE ANN
4. 凱倫斯/CAIRNS, JENNIFER
5. 黃永清/HUANG, YONGQING
6. 梁谷岩/LIANG, GUYAN

7. 林恆康/LIM, HENG-KEANG

國 籍：(中文/英文)

1.、2.及 5.-7.均為美國/U.S.A.

3.-4.均為英國/U.K.

四、聲明事項：

☐ 主張專利法第二十二條第二項☐第一款或☐第二款規定之事實，其事實發生日期為： 年 月 日。

☒ 申請前已向下列國家（地區）申請專利：

【格式請依：受理國家（地區）、申請日、申請案號 順序註記】

☒ 有主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

美國；西元 2007 年 01 月 10 日；60/884,263

☐ 無主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

☐ 主張專利法第二十九條第一項國內優先權：

【格式請依：申請日、申請案號 順序註記】

☐ 主張專利法第三十條生物材料：

☐ 須寄存生物材料者：

國內生物材料 【格式請依：寄存機構、日期、號碼 順序註記】

國外生物材料 【格式請依：寄存國家、機構、日期、號碼 順序註記】

☐ 不須寄存生物材料者：

所屬技術領域中具有通常知識者易於獲得時，不須寄存。

7. 林恆康/LIM, HENG-KEANG

國 籍：(中文/英文)

1.、2.及 5.-7.均為美國/U.S.A.

3.-4.均為英國/U.K.

四、聲明事項：

☐ 主張專利法第二十二條第二項 ☐ 第一款或 ☐ 第二款規定之事實，其事實發生日期為： 年 月 日。

☒ 申請前已向下列國家（地區）申請專利：

【格式請依：受理國家（地區）、申請日、申請案號 順序註記】

☒ 有主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

美國；西元 2007 年 01 月 10 日；60/884,263

☐ 無主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

☐ 主張專利法第二十九條第一項國內優先權：

【格式請依：申請日、申請案號 順序註記】

☐ 主張專利法第三十條生物材料：

☐ 須寄存生物材料者：

國內生物材料 【格式請依：寄存機構、日期、號碼 順序註記】

國外生物材料 【格式請依：寄存國家、機構、日期、號碼 順序註記】

☐ 不須寄存生物材料者：

所屬技術領域中具有通常知識者易於獲得時，不須寄存。

九、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明提供在半卡肼敏感性胺氧化酶(SSAO)或具有 SSAO 活性的生物樣本存在條件下，測定亞甲胺、亞甲胺類
5 化合物或含亞甲胺基化合物之穩定性的一些方法。所披露的方法可被設計成一種適合於高通量篩選應用的分析形式。

【先前技術】

半卡肼敏感性胺氧化酶(SSAO)廣泛地分佈於組織中，
10 尤其是血管中，從而提示這種酶在使循環亞甲胺失活過程中的作用(Lyles, Prog. Brain Res., 106:293-303, 1995)。許多研究人員將他們的精力集中於尋找 SSAO 的內源性配體，集中於尋找這種酶的抑制劑(Precious et al., Biochem. Pharmacol., 37:707-713, 1988; Crosbie and Callingham, J. Neural Transm. Suppl., 41:427-432, 1994; Elliot et al., Biochem. Pharmacol. 15 38:1507-1515, 1989; Boomsma et al., Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol., 126:69-78, 2000; Yraola et al., J. Med. Chem. 49:6197-6208; WO 02/066669)。另一些人則探索了 SSAO 的其他生理學作用。例如，業已顯示 SSAO，又稱為血管粘附蛋白-1 (VAP-1)，在炎症條件下被向上調節，並介導淋巴細胞的結合(WO 98/53049)。本發明利用 SSAO 的酶
20 活性來測量試驗藥劑在細胞和生物樣本中的代謝穩定性。

試驗藥劑的代謝穩定性已經成為藥物開發過程中的一個關鍵因素，因此，本發明解決了鑒別能被 SSAO 代謝的潛

在試驗藥劑的問題。化學、分子生物學以及高通量技術的進步，為藥物開發計劃提供了針對大量鑒別先導化合物的目標而篩選無數化合物的能力。然後，這些先導化合物經過更多選擇標準的檢驗，以鑒別出那些具有最佳「藥物般」特性（即足夠的生理—化學穩定性、溶解性、安全性、功效、體內分佈）的化合物。顯著的努力集中於在開發的早期階段鑒別和排除那些不大可能具有「藥物般」特性的化合物（或化合物族）。一種藥物在臨床試驗階段失敗的三個主要原因是缺乏功效、不可接受的不良事件以及不良的 ADME（即吸收、分佈、代謝、排泄）特性。因此，一種化合物的最終成功不僅取決於其生物活性和效能，還取決於其 ADME 特性/毒性。結果，先進的優選計劃將選擇其 ADME 特性/毒性符合要求的藥物之篩選過程包括在內，以提高新型先導化合物在臨床方面獲得成功的可能性。藥物分子的代謝轉化代表了藥物得以從體內清除的關鍵過程。鑒於 SSAO 在許多器官內的廣泛分佈，我們相信 SSAO 也許是一種重要的影響藥物潛在的代謝可能性的酶。因此，本發明採用測定與 SSAO 接觸的試驗藥劑代謝穩定性的方法。藉由涉及生物轉化的酶尤其是 SSAO 來測定藥物或其他試驗藥劑之代謝過程的方法，對藥物開發具有重要的牽連。

在體外研究中，化合物 A（美國第 6,977,263 B 號專利）與各種動物包括人的血漿一起培育。據觀察，與羊、豚鼠、大鼠及小鼠作比較，化合物 A 在人的血漿中更為穩定，可達一小時。此外，在人的血漿內，無論是否有半卡肼存在，

在長達 4 小時內均未觀察到顯著的代謝或降解現象。然而，首次人體臨床研究的藥代動力學數據顯示，同樣的化合物代謝迅速，而且其程度比用人和其他動物的血漿進行的體外試驗所顯示的遠為激烈。隨後的研究證實，膜結合形式的 SSAO 對該化合物在人體內的代謝起主要作用。這些數據說明，在人體血漿中發現的可溶性 SSAO 在生理條件下不具有同樣水準的酶活性和/或酶底物特異性。因此，如化合物 A 所顯示，測定人的血漿穩定性並不能預測人體內 SSAO 的穩定性，故此方法在選擇藥劑作為臨床候選藥物的過程中作用有限。

【發明內容】

本文引用的所有出版物均為參考文獻。除非另行定義，本文使用的所有技術術語和科學術語的含義均與本發明相關領域內一般專業人士通常所理解的意義相同。

本說明書所用術語及所附專利申請範圍僅是為了說明特定的諸實施例，並非意在限制本發明之範圍。除非上下文另行明確指出，一個詞語的單數形式意在包括其複數形式。例如，單數形式的「一個」、「一種」以及「該」意在包括其複數形式。而且，「一種試劑」的提法也可能包括兩種或多種試劑的混合物。因此，「一種試劑」這一術語涵蓋多種試劑，包括其混合物和/或對映異構體。還應說明，除非上下文另行明確指出，「或」字具有籠統的含義，其包括「和/或」。需要進一步理解的是，當用於本說明書時，術語「包含」和

/或「包含了」規定了所述特徵、步驟、要素和/或組分的存在，但並不排除一種或多種其他特徵、步驟、要素、組分和/或基團的存在或結合。

此外，依照本發明，在本領域的技術範圍內，可能會採用常規分子生物學、微生物學、重組 DNA 技術以及分析技術。這些技術在文獻中均有充分說明。例如，可參考 Sambrook, Fritsch & Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (分子克隆：實驗室手冊), Second Edition (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (本文稱為「Sambrook 等, 1989」); *DNA Cloning: A Practical Approach* (DNA 克隆：實用方法), Volumes I and II (D. N. Glover ed. 1985); *Oligonucleotide Synthesis* (低聚核苷酸合成) (M. J. Gait ed. 1984); *Nucleic Acid Hybridization* (核酸雜化) [B. D. Hames & S. J. Higgins eds.(1985)]; *Transcription and Translation* (轉錄與轉譯) [B. D. Hames & S. J. Higgins, eds. (1984)]; *Animal Cell Culture* (動物細胞培養) [R. I. Freshney, ed. (1986)]; *Immobilized Cells and Enzymes* (固定化細胞與酶) [IRL Press, (1986)]; B. Perbal, *A Practical Guide to Molecular Cloning* (分子克隆實用指南) (1984); F. M. Ausubel et al. (eds.), *Current Protocols in Molecular Biology* (分子生物學實驗手冊), John Wiley & Sons, Inc. (1994); *A Handbook of Bioanalysis and Drug Metabolism* (生物分析與藥物代謝手冊), G. Evans (2004)。

本發明的一個實施例是一種藉由半卡肼敏感性胺氧化

酶(SSAO)催化代謝作用鑑定試驗藥劑之代謝穩定性的方法，該方法包括：(a) 培養表達 SSAO 的細胞；(b) 將一種試驗藥劑加入該細胞；(c) 按照預定的一段時間，將該試驗藥劑與細胞一起培育；(d) 在該預定時間內，在含有所表達 SSAO 的細胞存在條件下測量剩餘的試驗藥劑含量；以及(e) 將該預定時間內試驗藥劑的含量與對照物中試驗藥劑的含量作比較，以得出一數值；該數值則表明在含有所表達 SSAO 細胞存在的條件下該試驗藥劑之代謝穩定性。

本領域專業人士將會認識到採用此方法時可用細胞裂解液來代替細胞。因此，本發明的一個實施例是一種藉由半卡肼敏感性胺氧化酶(SSAO)催化代謝作用鑑定試驗藥劑之代謝穩定性的方法，該方法包括：(a) 培養表達 SSAO 的細胞；(b) 裂解細胞以形成細胞裂解液；(c) 將一種試驗藥劑加入該細胞裂解液；(d) 按照預定的一段時間，將該試驗藥劑與細胞裂解液一起培育；(e) 在該預定時間內，在含有所表達 SSAO 的細胞裂解液存在條件下測量剩餘的試驗藥劑含量；以及(f) 將該預定時間內試驗藥劑的含量與對照物中試驗藥劑的含量作比較，以得出一數值；該數值則表明在含有所表達 SSAO 細胞裂解液存在的條件下該試驗藥劑之代謝穩定性。另一個實施例則將步驟(b)和步驟(c)結合為單一步驟。

本發明的另一個實施例是一種藉由 SSAO 在生物樣本中的催化代謝作用來鑑定試驗藥劑之代謝穩定性的方法，該方法包括：(a) 獲取一種含 SSAO 的生物樣本；(b) 將一種

試驗藥劑加入該生物樣本；(c) 按照預定的一段時間，將該試驗藥劑與生物樣本一起培育；(d) 在該預定時間內，測量試驗藥劑的含量；以及(e) 將該預定時間內試驗藥劑的含量與對照物中試驗藥劑的含量作比較，以得出一數值；該數值則表明在含有 SSAO 的生物樣本存在條件下該試驗藥劑之代謝穩定性。

本發明的一個實施例採用原代細胞或市售的細胞係。作為一種非限制性實例，所用的細胞可購自美國組織培養公司 (American Tissue Culture Company)。在一個實施例中，使用了 CHO 細胞。細胞可以是原核細胞或真核細胞。本發明的範圍不受所用細胞類型的限制。

生物樣本可包括但不限於組織或體液、組織切片例如活檢或屍檢樣本，以及出於組織學目的而取得的冷凍切片。這些樣本包括血液、痰液、組織、培養的細胞（例如原代培養物、外植體以及轉化細胞）、部分或整個器官（例如肝臟、肺臟、迴腸、動脈、臍帶）、大便、尿液等等。生物樣本可以取自真核生物體，包括哺乳動物如靈長類（例如猩猩、獼猴或人類）、奶牛、狗、貓、齧齒動物（例如豚鼠、大鼠、小鼠、兔子）、或鳥類、爬行動物，或魚類。本發明一個實施例的一個非限制性實例是研究是否一種具體的試驗藥劑或化合物具有發生代謝的較高風險，或反言之，是否在一種組織內比其他組織內具有較高的代謝穩定性，例如是否一種化合物在肝臟內比肺臟內具有較高的代謝穩定性。此外，生物樣本可加工成其細胞成份的懸浮液或用於細胞成份的原

代培養。

本發明的一個實施例是使用一種獲自人類受試者或非人類受試者的生物樣本，以定量測定試驗藥劑的代謝穩定性。生物樣本可以是取自動物或人類一種或一種以上器官的器官樣本、取自動物或人類一種或一種以上組織的組織樣本，以及取自動物或人類一種或一種以上細胞或細胞培養物的細胞樣本。對於動物實驗，生物樣本可包括通過屍檢或活檢而取得的目標器官組織，也可以是體液如血液。對於臨床使用，樣本可包括體液，如血液、血清、血漿、尿液、唾液、脊髓液、腦脊液、精液或淋巴液，以及取自活檢的身體組織。參照物或對照物是本領域專業人士所熟知的。參照物或對照物可包括但不限於取自無恙受試者的生物樣本，該受試者可以是動物或人類。此外，參照物或對照物還可以是取自未經治療受試者的生物樣本。或者，參照物或對照物可取自治療前、治療中及治療後的同一受試者。參照物或對照物可取自同一受試者，但可以是與鑑定試驗藥劑代謝穩定性所用的細胞源、組織源或器官源不同的細胞、組織或器官樣本。參照物或對照物不一定非得是生物樣本，也可以是一種具有已知程度 SSAO 活性的樣本。參照物或對照物可以是一種不被 SSAO 代謝的試劑，或能被 SSAO 代謝但易被 SSAO 代謝的程度已知的試劑。

本發明提供了鑑定試驗藥劑之代謝穩定性和易代謝性的一些方法。本文所用的「試驗藥劑」是指任何能受 SSAO 酶活性影響或影響 SSAO 酶活性的分子，例如蛋白、非蛋白

有機化合物或藥物。對於可被分析的試驗藥劑，並無特別限制。在本發明的一個實施例中，試驗藥劑是一種化合物。試驗藥劑的實例包括單一試劑或低、中或高分子量化學分子庫。一種試劑可採取試驗藥劑庫的形式，例如組合庫或隨機庫，後者可充分提供各種各樣的試劑，或相反地只局限於相似5 的結構或特徵。作為一種選擇，試劑也可以與一種融合配偶體相連，例如靶向化合物、解救化合物、二聚體化合物、起穩定作用的化合物、可定址的化合物以及其他官能團。傳統上，通過鑒別具有某些所需特性或活性（例如抑制活性或調節活性）的試驗藥劑（稱為「先導化合物」或「先導」），10 可產生具有有用特性的新化學實體。然後，先導化合物作為一種基礎構架，被用於產生該先導化合物的變異體，並進一步評價這些變異體化合物的特性及活性。本領域專業人士將會理解，通過鑑定代謝穩定性和潛在先導化合物的易代謝性以及鑒別或選擇那些被 SSAO 代謝可能性最低的化合物，可15 利用本發明來優化化合物的選擇。

本發明的 SSAO 是全長的 SSAO 或其保留全部或部分酶活性的片段。所謂部分酶活性可以是總酶活性的 30% 或以上，例如 40% 或 50%。一個非限制性實例是從非人類物種中20 分離出來的 SSAO。其他物種的非限制性實例包括齧齒類動物如大鼠、小鼠及豚鼠，或非人類靈長目動物例如猴子或猩猩。一個進一步非限制性實例是如序列號 1 所披露的全長的人類 SSAO，或其具有亞甲胺氧化酶活性的片段。

代謝穩定性或易代謝性是本領域專業人士理解的術

語。代謝穩定性是指一種試驗藥劑或藥物分子在一定條件下承受代謝的敏感性或程度。因此，代謝程度越高，則代謝穩定性越低。代謝穩定性是決定藥物、化合物或試驗藥劑的口服生物利用率和全身清除率的若干主要決定因素之一。作為一個非限制性例子，當藥物經口服之後，它首先在胃腸內然後又在腸上皮遇到代謝酶。當它經由腸上皮被吸收進血液之後，又通過肝門靜脈被送到肝臟。藥物在它進入全身循環系統之前可被腸道和肝臟的代謝作用有效地清除，此過程被稱為首度代謝。藥物在肝內及肝外組織內的代謝穩定性或易代謝性將最終決定全身循環系統內的藥物濃度，並影響其半衰期及在體內的停留時間。通常被稱為第一期代謝的生物轉化類型包括氧化、還原以及水解，其主要作用是通過將一個極性官能團展開或納入分子（OH、SH、NH₂、或 CO₂H）而增加其親水性並加強藥物的排泄。第二期反應或共軛反應通過改造官能團以形成 O-或 N-葡糖苷酸、硫酸酯、α-羧醯胺以及谷胱甘肽加成物而進一步提高了藥物的極性。本發明的一個實施例是一種藥物、化合物或試驗藥劑對 SSAO 代謝的代謝穩定性或易代謝性。

本發明的一個實施例從人類和其他物種選擇關係最密切的生物樣本，以檢驗與 SSAO 代謝作用相關的代謝穩定性。例如，以肝為基礎的代謝負責大部分藥物的代謝清除，因此，關於首度代謝的考慮可集中於肝臟代謝，有時也可集中於腸道代謝。SSAO 在組織和生物體液內的普遍存在以及它在許多組織（如肺和血管）中特別高的活性，使得必須使

用包括肝臟在內或取代肝臟的適當生物樣本來檢驗試驗藥劑在 SSAO 存在條件下的代謝穩定性。除了腸道和肝臟的首度代謝以外，試驗藥劑與 SSAO 的接觸在除了腸道和肝臟組織以外的部位（例如肝門靜脈、血管以及肺臟）也可受首度代謝的限制。試驗藥劑針對不同形式的 SSAO 可顯示出不同的代謝穩定性。不同的生物樣本可含有不同形式的 SSAO。一個非限制性實例是，試驗藥劑對於人體血漿內的可溶性 SSAO 可顯示出相對的代謝穩定性，但相對於組織內膜結合形式的 SSAO 可顯示出高得多的代謝穩定性。此外，在可比較的試驗條件下，動物可顯示出比人體內所發現的可溶性 SSAO 活性高得多或低得多的血漿內可溶性 SSAO 活性。

本發明的一個實施例使用各種各樣的化學抑制劑以抑制各種形式的胺氧化酶活性，並將觀察到的代謝穩定性歸結為 SSAO 催化的或單胺氧化酶(MAO)-A 或 MAO-B 催化的代謝作用。一個非限制性實例是添加胍苯噻嗪作為一種非針對性胺氧化酶抑制劑，添加氯吉林(clorgyline)作為特定的 MAO-A 抑制劑，添加帕吉林(pargyline)作為混合的 MAO-A 和 MAO-B 抑制劑，以及添加半卡胍和溴乙基胺作為特定的 SSAO 抑制劑。

本發明另一個非限制性實例是測定某些接受藥物或複合藥物治療的患者體內試驗藥劑的代謝穩定性，以確定這些患者體內試驗藥劑的代謝穩定性與對照受試者相比是否有變化。本領域專業人士將會理解從患有一種或一種以上疾病、或經處理誘發一種或一種以上疾病、或接受手術或基因

改變、或用某種藥物、化合物或試驗藥劑預處理的人類或非人類受試者身上獲得生物樣本的有用性。一個非限制性實例包括利用本發明來測定可能受疾病影響的器官內試驗藥劑的代謝穩定性，並與健康器官相比。作為另一個非限制性實例，化合物的代謝穩定性可在獲自患哮喘的人類受試者的肺組織內測定，並與年齡相仿或對照受試者健康的肺組織內化合物的代謝穩定性作比較。另一個非限制性實例是研究生物樣本（例如「年輕」的肝臟）中化合物的代謝穩定性，並與「年老」的或「老化」的肝臟作比較；其中所謂的「年輕」、「年老」和「老化」均按照所研究的具體物種來定義。

本發明的一個實施例使用了同質的細胞群或一種生物樣本。本發明的另一實施例使用異質細胞群或一種以上生物樣本的結合。為了實現本發明的方法，所用的細胞或生物樣本可以是任何類型或以任何比例使用。

本發明的一個實施例使用表達 SSAO 的重組細胞。本發明的一種重組表達載體包括一種核酸分子，它以適合於該核酸在宿主細胞中表達的形式存在。因此，本發明的一種重組表達載體可包括一條或多條調控序列，選擇該調控序列的基礎是擬用於表達的宿主細胞，該調控序列與被表達的核酸以可操作的方式連接。在重組表達載體中，「以可操作的方式連接」意在表示該核苷酸序列是以便於該核苷酸序列表達（例如，在一個體內轉錄/轉譯系統內表達或當載體被引入寄主細胞時在寄主細胞內表達）的方式與調控序列連接。術語「調控序列」意在包括啟動子、增強子以及其他表達調控

元件(例如聚腺苷酸化信號)。這類調控序列在 Goeddel, Gene Expression Technology(基因表達技術)中有所敘述: Methods in Enzymology Vol. 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990)。調控序列包括那些在許多種宿主細胞中指導核苷酸序列組成表達的調控序列(例如,組織特異性調控序列)。

5 本領域專業人士將會理解,表達載體的設計可取決於這樣一些因素:例如擬轉化的宿主細胞的選擇、所希望的蛋白質表達水準等等。本發明的表達載體可被導入寄主細胞,以產生如本文所述的由核酸編碼的蛋白質或肽。

10 本文所用的術語「過表達」係指在通常表達多肽的細胞中,表達多肽的水準超過了正常水準,或在通常不表達多肽的細胞中表達了多肽。例如,與通常表達該多肽的野生型細胞中該多肽的表達相比,該多肽的表達可能增加了 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70、80%、90%、100%或更多。

15 該多肽的突變體、變異體或同型物也可能被過表達。

本文所用的術語「短暫」表達是指與細胞染色體分離的外源性核酸分子的表達。短暫表達一般在引入外源性核酸之後 2-3 天內達到其最高峰,然後又會降低。

20 本文所用的術語「穩定」表達是指已成為細胞染色體一組成部分的外源性核酸分子的表達。通常,基因穩定表達的載體包括一種或多種選擇標記。

轉化細胞、非轉化細胞、原代培養物以及生物樣本的細胞培養技術是本領域內眾所周知的。生物標本或培養細胞可儲存起來直至需要使用時。培養基可特別設計或經商業管道

購買。

本發明的一個實施例涉及裂解細胞。可通過加入含有洗滌劑的裂解緩衝液來裂解細胞。但是，本發明並不限於在裂解緩衝液中使用洗滌劑的方法，而可包括適合於裂解細胞的任何方法。例如，可通過採用高滲性緩衝液、聲裂法或凍融法來裂解細胞。裂解細胞的這些方法及其他方法是本領域專業人士眾所周知的。

本發明的一個實施例使用了一種對照。對照這一術語是本領域專業人士非常理解的。一種恰當的對照可能取決於所用的分析參數或所研究的實驗問題。作為對照的可以是一組特定的試驗條件或在試驗中添加或除去一種特定的化合物。因此，對照的一個非限制性實例是指這樣一種情況，其中試驗藥劑是在表達 SSAO 的細胞或細胞裂解液不存在的條件下培育。若該試驗條件或所添加的對照化合物導致了預期的反應，則該對照可被認為是陽性對照。例如，如果預期所研究的試劑能發生代謝，則陽性對照將是一種能被 SSAO 代謝的化合物。此外，陽性對照可以是一種被 SSAO 代謝為已知代謝副產物的化合物。陽性對照的一個非限制性例子是添加苯甲胺。對照也可以是陰性對照。作為陰性對照的可以是一組特定的試驗條件或在試驗中添加或除去一種不會導致預期反應的特定化合物。例如，如果預期所研究的試劑能發生代謝，則陰性對照將是一種預期不會發生代謝的化合物。陰性對照的一個非限制性實例是添加不含亞甲胺基且不被 SSAO 代謝的苯甲酸。陰性對照的一個非限制性實例可以

是添加一種靶向 SSAO 酶活性的抑制劑如胍苯噻嗪，其中 SSAO 活性被抑制。對照也可以是「溶劑」對照。例如，如果試驗藥劑能溶於 DMSO，則溶劑對照將是不含試驗藥劑的 DMSO。對照也可以是僅僅使用歷史資料。

5 本發明的一個實施例是在預定時間內，測量在 SSAO 存在條件下培育的試驗藥劑的含量，並將該預定時間內試驗藥劑的含量與對照物中試驗藥劑的含量作比較，以測定在 SSAO 存在條件下該試驗藥劑之代謝穩定性。對本領域專業人士很明顯的是，試驗藥劑之代謝穩定性可通過該試驗藥劑
10 的消失程度來測定，或者，通過該試驗藥劑的一種或一種以上代謝產物的出現程度來測定。本發明一個進一步實施例是除了測定該試驗藥劑的含量以外，還測定該試驗藥劑的一種或一種以上代謝產物的出現程度，或根本不測定該試驗藥劑的含量。

15 試驗藥劑的含量或該試驗藥劑的一種或一種以上代謝產物的出現程度，可通過本領域專業人士所具備的一系列技術來測定。一些非限制性實例包括質譜、高壓液相色譜 (HPLC)、液相色譜/質譜、液相色譜/質譜/質譜以及液相色譜/放射性檢測。此外，試驗藥劑的含量或該試驗藥劑的一種
20 或一種以上代謝產物的出現程度，可通過使用指示劑分子如放射性同位素、螢光染料或抗體來測定。本發明並不受該試驗藥劑或該試驗藥劑的任何一種或一種以上代謝產物的測量方法的限制。

該試驗藥劑可用放射性同位素加以標記，例如但不限於

^3H 或 ^{14}C 。因此，本發明的一個實施例是一種藉由半卡肼敏感性胺氧化酶(SSAO)催化代謝作用鑑定帶放射性標記試驗藥劑之代謝穩定性的方法，該方法包括：(a) 培養表達 SSAO 的細胞；(b) 將一種帶放射性標記的試驗藥劑加入該細胞；
5 (c) 按照預定的一段時間，將該帶放射性標記試驗藥劑與細胞一起培育；(d) 在該預定時間內，在含有所表達 SSAO 的細胞存在條件下測量剩餘的帶放射性標記試驗藥劑含量；尚未代謝的帶放射性標記試驗藥劑之百分比則表明在含有所表達 SSAO 的細胞存在條件下該帶放射性標記試驗藥劑之
10 代謝穩定性。本領域專業人士將會認識到採用此方法時可使用細胞裂解液來代替細胞。此外，本發明不限於使用同位素，還可使用本領域內所有標記試驗藥劑的任何方法。

本發明的另一個實施例一種藉由 SSAO 在生物樣本中的催化代謝作用鑑定帶放射性標記試驗藥劑之代謝穩定性的方法，該方法包括：(a) 獲取一種含 SSAO 的生物樣本；
15 (b) 將一種帶放射性標記的試驗藥劑加入該生物樣本；(c) 按照預定的一段時間，將帶放射性標記試驗藥劑與生物樣本一起培育；(d) 在該預定時間內，測量帶放射性標記試驗藥劑的含量，尚未代謝的帶放射性標記試驗藥劑之百分比則表明在含 SSAO 的生物樣本存在條件下該試驗藥劑之代謝穩定性。
20

本領域專業人士能夠理解將細胞或細胞裂解液中試驗藥劑的代謝穩定性與生物樣本中試驗藥劑的代謝穩定性作比較的有用性。因此，本發明的一個實施例包括一種測定試

驗藥劑代謝穩定性狀況的方法，該方法包括：(a) 獲得在含有所表達 SSAO 的細胞或細胞裂解液存在條件下培育的試驗藥劑之代謝穩定性數值；以及 (b) 獲得在含有所表達 SSAO 的生物樣本存在條件下培育的試驗藥劑之代謝穩定性數值。其中，將在含有所表達 SSAO 的細胞或細胞裂解液存在條件下試驗藥劑之代謝穩定性數值與在含 SSAO 的生物樣本存在條件下試驗藥劑之代謝穩定性數值作比較，即得出該試驗藥劑的代謝穩定性狀況。

某些改良，例如與高通量篩選(HTS)方法結合使用本發明的方法，完全屬於本領域專業人士的知識與能力範圍之內，並被認為也屬於本發明的實施例。本發明的一個實施例是採用高通量篩查(HTS)方法。HTS 是在某些設計用於類比疾病病理的生物學機制或某些方面的分析中，對成千上萬種不同化合物進行的自動化同時檢測。可以同時檢測一種以上化合物，即數種化合物。在一個實施例中，HTS 篩選這一術語是指這樣一些分析方法，它們測試多種生物樣本中一種化合物的代謝穩定性，或測試一種或一種以上生物樣本中多種化合物的代謝穩定性。

本發明的一個實施例包括一組容器，它們能容納細胞、細胞裂解液、身體樣本或其他物質例如亞甲胺或亞甲胺類試劑。所謂一組容器可以是至少一個或一個以上任何數量的容器，它們適合於盛放本發明範圍內述及的物質。其例子包括但不限於培養瓶、培養皿、玻璃載片、試管，例如 1.5 mL 試管、12 孔培養皿、96 孔培養皿、384 孔培養皿以及或許

具有 4000 孔的微型微孔板（美國專利申請號 20050255580）。這些容器的排列方式應適合於添加防護罩，以防污染物的進入或內容物的蒸發。

這些容器的進一步特點是便於進行分析。某些非限制性實例包括用質譜或 HPLC 進行分析。但是，鑒於可將樣本轉移至適合於進一步分析的另一容器，對本發明範圍內可用的容器並無限制。一個非限制性實例是修改方法使得該方法進一步包括提供第二組容器，而一個或一個以上的步驟就在這第二組容器內執行。

液體操作系統、分析設備，例如螢光計或閃爍計數器以及用於細胞培養與樣本操作的機器人技術，是本領域內眾所周知的。本領域專業人士可以採用某些機械系統，例如機器臂或「摘取」裝置。有市售的讀板儀可用於分析常規的 96 孔或 384 孔板。可以用單樣本、多樣本或板儲樣本讀取裝置來分析預定的樣本孔，並產生原始數據報告。原始數據可以轉換並以多種方式呈現。

本發明的另一實施例為一種試劑盒，包括實現本文所披露方法之分析系統的至少一個要素及使用說明。因此，該分析系統的組成部分可單獨提供或以這種試劑盒的形式同時提供。該分析系統的組分可按照能儘量提高單一組分穩定性的方法製備並包括在試劑盒中。這樣的方法是本領域內專業人士很熟悉的。例如，分析系統的細胞可以懸浮液的形式提供，或者細胞可以被凍結或凍幹。也可以包括該分析系統的其他組分，例如緩衝液、用於混合分析組分的容器（例如微

升板或試管)。該分析系統可以試劑盒的形式提供，該試劑盒包括分析說明以及數據處理與解讀的說明。

以下實例進一步說明了本發明。這些例子並未限制專利申請範圍中所述的發明範圍。對於本領域專業人員而言，本發明就如何生產及使用本發明已經做了足夠細緻的描述及舉例說明；同時，應該很明顯的是，在不背離本發明的精神及範圍的前提下，可以採取各種不同的可選方案、修改及改進。本領域專業人員很容易理解，本發明很適合於達到預定目的，並取得所述及的結果及優點，以及該發明固有的結果及優點。以下實例是對於實施例的描述，並非是意圖限制本發明之範圍。本領域專業人士會做一些修改並將其用於其他用途。這些修改均包括在本發明的精神之內，並在專利申請範圍內加以限定。

本文舉例說明的本發明可在缺少任何成分及無任何限制的情況下實施，本文並未特別披露這些成分及限制。所採用的術語及表述是為了說明，而非限制。使用這些術語及表述並不排除與所顯示和所描述的特徵或其某些部分對等的術語。但是，應該認識到，在本發明之範圍內，各種不同的修改均是可能的。因此，應該理解，儘管通過實施例和某些可選的特徵已經明確地披露了本發明，但是本領域專業人員可對本文披露的概念做出修改或變動，而這些修改或變動均被認為是屬於所附專利申請範圍限定的發明範圍之內。

【實施方式】**實例 1****A.人的 SSAO 的克隆和表達**

1) 為了促進表達載體的構建，按如下步驟產生了一種起始
5 的 pDONR221 全長 SSAO 質粒：

使用如下所示的基因特異性引物執行了第一次 PCR。
該正向引物含有一半 *att* 位點(Invitrogen)及一條以黑體字母
顯示的 Kozak 序列。反向引物含有以黑體字母顯示的其餘
一半 *att* 位點。以人的臍帶作為 DNA 模板(從購自 Biochain
10 的 RNA 和 Invitrogen 的 RT-PCR superscript II 試劑盒製備)
進行 PCR。

起始克隆引物：

正向(SEQ ID NO: 3)：

15 5'-AAAAGCAGGCTTAGGAATGAACCAGAAGACAATCCTC-3'

反向(SEQ ID NO: 4)：

5'-CAAGAAAGCTGGGTCCTAGTTGTGAGAGAAGCCCC-3'

然後使用如下所示的通用型引物進行第二次 PCR。正
向引物和反向引物包括 *att* 位點序列(以黑體字母顯示)和
20 載體序列。

通用型引物序列：

正向(SEQ ID NO: 5)：

5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTAGGA-3'

反向 (SEQ ID NO: 6) :

5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTC-3'

利用 Invitrogen 的 BP 反應，將這第二次 PCR 產物克隆
 5 進 pDONR221。利用此載體作為模板，製備了人的 SSAO
 表達載體的 6 種變體；3 種無標籤形式（一種全長和兩種截
 短的）以及 3 種帶羧基端 6xHIS 標籤。

2) 全長 SSAO

10 正向引物和反向引物上以黑體字母顯示的序列表示 *att*
 位點序列。

用於克隆無標籤、全長 SSAO 的引物序列：

正向 (SEQ ID NO: 7) :

15 5'-AAAAGCAGGCTTAGGAATGAACCAGAAGACAATCCTC-3'

反向 (SEQ ID NO: 8) :

5'-CAAGAAAGCTGGGTCCTAGTTGTGAGAGAAGCCCCCGTGG-3'

為了在終止密碼子前添加 3' 6xHIS，使用了下列引物：

20 正向引物和反向引物上以黑體字母顯示的序列表示 *att*
 位點序列，反向引物上帶下劃線的序列表示 6xHIS 標籤。

用於克隆帶 C-端 6xHIS 標籤的全長 SSAO 的引物序列：

正向(SEQ ID NO: 9) :

5'-AAAAGCAGGCTTAGGAATGAACCAGAAGACAATCCTC-3'

反向(SEQ ID NO: 10) :

5'-CAAGAAAGCTGGGTCCTAATGGTGATGGTGATGGTGTTGTGAG
AGAAGCCCCCGTGG-3'

3) 代表缺乏膜錨定區域的酶之 T₁ (Gly27-Asn763) :

正向引物和反向引物上以黑體字母顯示的序列表示 *att* 位點序列，正向引物上帶下劃線的序列表示另外的 N-端 Met。

用於克隆 N-端截短、無標籤 SSAO 的引物序列：

正向(SEQ ID NO: 11) :

5'-AAAAGCAGGCTTAGGAATGGGCAGGGGTGGAGATGGGGGTG-3'

反向(SEQ ID NO: 12) :

5'-CAAGAAAGCTGGGTCCTAGTTGTGAGAGAAGCCCC-3'

為了在終止密碼子前添加 3' 6xHIS，使用了下列引物：

正向引物和反向引物上以黑體字母顯示的序列表示 *att* 位點序列，正向引物上帶下劃線的序列表示另外的 N-端 Met，反向引物上帶下劃線的序列表示 6xHIS 標籤。

用於克隆 N-端截短、C-端 6xHIS 標籤 SSAO 的引物序列：

正向(SEQ ID NO: 13) :

5'-AAAAGCAGGCTTAGGA**AT**GGGCAGGGGTGGAGATGGGGGTG-3'

反向 (SEQ ID NO: 14) :

5'-CAAGAAAGCTGGGTCCTA**ATGGTGATGGTGATGGT**GGTTGTGAGA
GAAGCCCCCGTGG-3'

5

4) 代表假定催化域的 T₂ (Met211-Asn763)。

正向引物和反向引物上以黑體字母顯示的序列表示 *att* 位點序列，正向引物上帶下劃線的序列表示另外的 N-端 Met。

10

用於克隆無標籤 SSAO 催化域的引物序列

正向 (SEQ ID NO: 15) :

5'-AAAAGCAGGCTTAGGA**AT**GACCACGGCTCCCCGTGGTC-3'

反向 (SEQ ID NO: 16) :

15

5'-CAAGAAAGCTGGGTCCTAGTTGTGAGAGAAGCCCC-3'

為了在終止密碼子前添加 3' 6xHIS，使用了下列引物：

正向引物和反向引物上以黑體字母顯示的序列表示 *att* 位點序列，正向引物上帶下劃線的序列表示另外的 N-端 Met，反向引物上帶下劃線的序列表示 6xHIS 標籤。

20

用於克隆帶 C-端 6xHIS 標籤的 SSAO 催化域的引物序列：

正向 (SEQ ID NO: 17) :

5'-AAAAGCAGGCTTAGGA**AT**GACCACGGCTCCCCGTGGTC-3'

反向(SEQ ID NO: 18)：

5'-CAAGAAAGCTGGGTCCTAATGGTGATGGTGATGGTGTTGTGAGA
GAAGCCCCCGTGG-3'

5 通過將這些 PCR 產品克隆進 pCDNA5-FRT-To-DEST
載體(Invitrogen, Gateway System™)製備了表達載體。每個
載體的正向和反向 DNA 序列均被確認，包括表達序列和每
側至少 100 對鹼基對。按照製造廠的說明使用這 6 個載體，
生成了 Flp-In CHO、Flp-In CHO T-Rex 以及 Flp-In HEK 293
10 (Invitrogen, Flp-In system™)的穩定細胞係。按照製造廠的說
明使用 Lipfectamine (Invitrogen)，用調控載體 pOG44 以及
每種 pCDNA5-FRT-To-DEST 載體共轉染細胞。這樣，就產
生了 18 種細胞係：CHO Flp-In 全長 SSAO；CHO Flp-In 全
長 SSAO 帶 C-端 6xHIS 標籤；CHO Flp-In T₁ SSAO；CHO
15 Flp-In T₁ SSAO 帶 C-端 6xHIS 標籤；CHO Flp-In T₂ SSAO；
CHO Flp-In T₂ SSAO 帶 C-端 6xHIS 標籤；CHO T-Rex Flp-In
全長 SSAO；CHO T-Rex Flp-In 全長 SSAO 帶 C-端 6xHIS
標籤；CHO T-Rex Flp-In T₁ SSAO；CHO T-Rex Flp-In T₁
SSAO 帶 C-端 6xHIS 標籤；CHO T-Rex Flp-In T₂ SSAO；
20 CHO Flp-In T₂ SSAO 帶 C-端 6xHIS 標籤；HEK 293 Flp-In
全長 SSAO；HEK 293 Flp-In 全長 SSAO 帶 C-端 6xHIS 標
籤；HEK 293 Flp-In T₁ SSAO；HEK 293 Flp-In T₁ SSAO 帶
C-端 6xHIS 標籤；HEK 293 Flp-In T₂ SSAO；HEK 293
Flp-In T₂ SSAO 帶 C-端 6xHIS 標籤。

黏附 CHO 細胞是於 37 °C、5% CO₂ 條件下在含有 Ham's F12、10%胎牛血清、2 mM L-穀氨醯胺、1%青黴素/鏈黴素、300 μM 效高黴素 B 的培養基中培養的。黏附 HEK 293 細胞是於 37 °C、5% CO₂ 條件下在 D-MEM (高葡萄糖)、10%胎牛血清、2 mM L-穀氨醯胺以及 200 μM 效高黴素 B 中培養的。穩定的轉化體是通過 zeocin 抗性的消失來鑒別的。一旦細胞達 80%融合，即通過添加四環素至 1 μg/mL 誘導 SSAO 表達。18 小時後，收穫細胞於室溫用胰蛋白酶處理 3 分鐘。將細胞在磷酸鹽緩衝鹽水中洗滌 3 次，再在液氮中速凍。

為了製備用於活性測試的細胞裂解液，將凍存的細胞團塊重新懸浮於含 10 mM Tris-HCl (pH 7.2)、150 mM NaCl、1.5 mM MgCl₂、1% v/v NP-40 的裂解緩衝液中，再在冰上培養 15 分鐘。於 4 °C 和 800 x g 將裂解液離心 10 分鐘，分成等份於-80 °C 儲存直至使用。按照製造廠說明，用 Pierce Coomassie 蛋白試劑測定蛋白。

B. 測試重組蛋白的酶活性

(i) 樣本準備

每次分析，將 1 mL 細胞裂解液 (1.5 mg/mL 蛋白) 與苯甲胺混合至最終濃度 2000 ng/mL。在每個對應時刻，將 20 μL 培養混合物轉移至微離心管(1.7 mL)內並與 50 μL 乙腈混合。以旋渦混合方式使微離心管迅速地混合以確保完

全混合，然後於 10,000 x g 離心 5 分鐘。除去上清液並轉移 50 μ L 至一自動取樣瓶內，與 50 μ L 水混合再進行 LC/MS/MS 分析。用 LC/MS/MS 法分析裂解液中剩餘的苯甲胺。

5

(ii) 分析

在如下以及表 1 和表 2 所列的條件下，用 PE Sciex API 3000 質譜儀進行 LC/MS/MS 分析。

分析柱： Jupiter C-4，5 μ M，50x2.1 mm

10

柱溫度： 室溫

流量： 0.2 mL/min

注入體積： 15 μ L

表 1：流動相梯度

時間 (min)	溶液 A (%)	溶液 B (%)
0	40	60
0.1	95	5
2.9	95	5
3.0	40	60
6.0	40	60

溶液 A 是 90% 甲醇水溶液，溶液 B 是 10 mM 乙酸銨緩衝液，pH 7.0。

15

換向閥：0-1.5 min 至廢水處理，1.5 - 5 min 至 MS 檢測器

表 2：LC/MS/MS

化合物	RT (min)	質量遷移			
苯甲胺	2.74	108.1	至	65.1	+Ve

(iii) 細胞裂解液 LC/MS/MS 分析結果如表 3 所示。

5 表 3：表達全長或截短 SSAO 的細胞係中 SSAO 酶活性

細胞裂解液來源	所表達 SSAO	標 籤	剩餘苯甲胺(%)		
			0 min	10 min	2 h
對照 CHO	無	無	100	111	110
對照 CHO Flp-In	無	無	100	104	99
CHO Flp-In	全長	無	100	1	1
CHO Flp-In	全長	C-端 6xHIS	100	101	73
CHO Flp-In	T1	無	100	109	103
CHO Flp-In	T1	C-端 6xHIS	100	101	98
CHO Flp-In	T2	無	100	105	98
CHO Flp-In	T2	C-端 6xHIS	100	108	102
CHO Flp-In T-Rex	無	無	100	104	99
CHO Flp-In T-Rex	全長	無	100	6	0
CHO Flp-In T-Rex	全長	C-端 6xHIS	100	94	59
CHO Flp-In T-Rex	T1	1	100	104	92
CHO Flp-In T-Rex	T1	C-端 6xHIS	100	95	93

CHO Flp-In T-Rex	T2	無	100	97	83
CHO Flp-In T-Rex	T2	C-端 6xHIS	100	100	97
HEK293 對照	無	無	100	106	123
HEK293	全長	無	100	58	2
HEK293	全長	C-端 6xHIS	100	105	98
HEK293	T1	無	100	105	102
HEK293	T1	C-端 6xHIS	100	111	103
HEK293	T2	無	100	113	101
HEK293	T2	C-端 6xHIS	100	100	117

隨後測定獲自表達全長 SSAO（無標籤）的 CHO Flp-In、CHO Flp-In T-Rex 或 HEK293 Flp-In 的活性裂解液，活性得到證實（表 4）。由於大多數活性 SSAO 細胞係都是表達全長（無標籤）SSAO 的 CHO Flp-In，故此製劑被用於隨後的活性分析。

表 4：表達全長 SSAO 的細胞係中的 SSAO 酶活性

表達全長 SSAO（無標籤） 的細胞類型	剩餘苯甲胺(%)		
	0 min	10 min	30 min
HEK293 Flp-In	100	50	9
CHO Flp-In	100	9	1
CHO Flp-In T-Rex	100	16	1

實例 2

優化 LCMS/MS 分析條件

Amplex Red 分析法（一種市場上供應的分析方法）被用來測量重組的人類 SSAO 的比活性。Amplex Red 是二氫-9-羥基-3-異吩噁唑酮(dihydroresorufin)的無色非螢光衍生物。在胺氧化酶和 SSAO 存在條件下，Amplex Red 與 H_2O_2 反應產生強螢光產物 9-羥基-3-異吩噁唑酮(resorufin)。9-羥基-3-異吩噁唑酮的最高激發參數為 563 nm，最高發射參數為 587 nm；讀取微量滴定盤參數 587 nm 即得定量分析結果。重組 SSAO 的比活性經測量為 280 pmol/min/mg 蛋白，這相當於在人體肺組織內測得的 SSAO 比活性。在隨後以 LC/MS/MS 分析研究化合物的分析中，在如此定義的比活性條件下使用了重組的人類 SSAO (rhSSAO)。

如上所述的 LC/MS/MS 分析被用來評估化合物 A 被 rhSSAO 代謝的容易程度。化合物 A 的化學結構如圖 3 所示（美國第 6,977,263 B2 號專利一般地敘述了其分子結構及其製備方法）。表 5 中所示的化合物 A 於 37 °C 與 rhSSAO（如上所述具有相當於在人體組織中測得的比活性）一起培育 4 小時或 24 小時。在開始時和第 4 小時（或第 24 小時），各取出一份樣本並用乙腈終止培育過程。然後用 LC/MS/MS 分析樣本以測出第 24 小時那一刻剩餘的母體化合物含量，並與開始時的含量作比較。

表 5 中顯示的數值是母體化合物與 rhSSAO 一起培育後各個時刻的剩餘含量百分比。

表 5：與 rhSSAO 一起培育之後剩餘母體化合物百分比

剩餘母體化合物 %			
化合物	0 h (%)	4 h (%)	24 h (%)
A	100	25	3.2

實例 3

在人類和動物組織勻漿的上清液製劑中測試化合物 A 的代謝穩定性

(i) 所用的組織

使用了下列組織：豚鼠、獼猴和人的肺、肝、迴腸；豚鼠和猴的動脈；以及人的臍帶。

(ii) 組織準備

處理組織以獲得上清液。簡言之，切取組織後立即用大量生理鹽水（預冷至 4 °C）沖洗以除去血液。用 Polytron 均化器將合併後的組織在冷的 0.01 M 磷酸鈉緩衝液中於 pH 7.4 製成勻漿（10 mL/g 組織）。用 Triton X-100 在約 1 % 濃度處理勻漿，於 4 °C 連續輕搖 2 小時，然後離心分離（4 °C，15 分鐘，3000 x g）。小心地將上清液分出並等分為每份 2 mL，於約 -80 °C 冷凍保存直至使用。

(iii) 用試驗化合物優化培育條件

所有培育過程均在預熱水浴中於 37 °C 進行。分別於 1 uM 或 10 uM 培育帶 ^{14}C -放射性標記的試驗化合物。對每對組織/化合物組合均進行初步培育，以選擇適當的培育時間。然後，選定培育時間為 1.5 至 6 小時。採用了充分的培育容積以便在培育期間培育至少 5 個系列的樣本。從培育混合物中取出等份樣本(1 mL)立即用乙腈終止培育過程，並將終止後的混合物凍乾。將凍乾的樣本立即重組以進行樣本分析，或者於約 -80 °C 儲存直至進行分析。用 500 uL 混合物（90% 20 mM 乙酸銨，pH 4.0 和 10% 甲醇(v/v)）進行重組。離心之後，注入 100 uL 重組樣本進行高效液相色譜(HPLC)分離，再進行放射性檢測。

(iv) 數據分析和計算

培育後的重組樣本先以 HPLC 分析，再進行放射性檢測。通過將保留時間與母體化合物及它們相應代謝產物的參照標準進行比較，試驗化合物及相應的苯甲醛及代謝產物的成分得到了證實。剩餘試驗化合物的含量以母體化合物放射性峰值占重組樣本放射色譜總放射性的百分比表示。剩餘試驗化合物的百分比與培育時間之間的關係在對數一直線座標上呈一級動力學關係。每次培育過程一級速率常數的計算結果以剩餘試驗化合物含量的對數相對於以最小二乘線性回歸分析為基礎的時間之斜率表示。

(v) 試驗化合物在組織製劑中代謝穩定性的結果

試驗化合物的代謝降解過程的一級速率常數的(1/h)列入表 6。假設代謝過程遵循 Michaelis-Menten 動力學模型，與一級動力學 M 的近似性提示，酶反應的 $K_m \gg 10\text{ }\mu\text{M}$ 時的反應速率常數。

5

表 6：組織製劑中化合物 A 的代謝穩定性

物種	組織	化合物 A	
		1 μM	10 μM
人類	肝臟	0.418	0.365
	迴腸	0.352	0.353
	肺臟	0.675	0.706
	臍帶	0.688	0.697
豚鼠	肝臟	0.318	0.305
	迴腸	0.0775	0.0782
	肺臟	0.747	0.709
	動脈	0.127	0.111
猴	肝臟	2.05	2.64
	迴腸	0.328	0.277
	肺臟	0.177	0.208
	動脈	0.835	0.673

如表 6 所示，本發明顯示了化合物 A 的組織測試數據

與所觀察臨床代謝狀況之間的相關性。與只使用人的血漿穩定性測量結果相比，本發明之方法能更好地反映藥劑在人類生理條件下的 SSAO 穩定性，且是一種更合適的指導臨床候選藥物的選擇和醫藥開發的預測工具。

5

【圖式簡單說明】

圖 1 顯示了人的 SSAO 胺基酸序列(Genbank Accession No. Q16853; SEQ ID NO: 1)。

10

圖 2 顯示了人的 SSAO 核苷酸序列(Genbank Accession No. NM_00374; SEQ ID NO: 2)。

圖 3 顯示了化合物 A 的化學結構。

【主要元件符號說明】

無

15

<110> sanofi-aventis US LLC
 ADEDOYIN, Adedayo
 ANGELASTRO, Michael R
 BICK, Julie Ann
 CAIRNS, Jennifer
 HUANG, Yongqing
 LIANG, Guyan
 LIM, Heng-Keang

<120> 於半卡胍敏感之胺氧化酶存在下偵測有機亞甲基胺類之穩定性的方法

<130> US2005/172 WO PCT

<160> 18

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 763

<212> PRT

<213> 人類

<400> 1

Met Asn Gln Lys Thr Ile Leu Val Leu Leu Ile Leu Ala Val Ile Thr
 1 5 10 15

Ile Phe Ala Leu Val Cys Val Leu Leu Val Gly Arg Gly Gly Asp Gly
 20 25 30

Gly Glu Pro Ser Gln Leu Pro His Cys Pro Ser Val Ser Pro Ser Ala
 35 40 45

Gln Pro Trp Thr His Pro Gly Gln Ser Gln Leu Phe Ala Asp Leu Ser
 50 55 60

Arg Glu Glu Leu Thr Ala Val Met Arg Phe Leu Thr Gln Arg Leu Gly
 65 70 75 80

Pro Gly Leu Val Asp Ala Ala Gln Ala Arg Pro Ser Asp Asn Cys Val
 85 90 95

Phe Ser Val Glu Leu Gln Leu Pro Pro Lys Ala Ala Ala Leu Ala His
 100 105 110

Leu Asp Arg Gly Ser Pro Pro Pro Ala Arg Glu Ala Leu Ala Ile Val
 115 120 125

Phe Phe Gly Arg Gln Pro Gln Pro Asn Val Ser Glu Leu Val Val Gly
 130 135 140

Pro Leu Pro His Pro Ser Tyr Met Arg Asp Val Thr Val Glu Arg His
 145 150 155 160

Gly Gly Pro Leu Pro Tyr His Arg Arg Pro Val Leu Phe Gln Glu Tyr
 165 170 175

Leu Asp Ile Asp Gln Met Ile Phe Asn Arg Glu Leu Pro Gln Ala Ser
 180 185 190

US2005_172_WO_SEQ

Gly Leu Leu His His Cys Cys Phe Tyr Lys His Arg Gly Arg Asn Leu
 195 200 205

Val Thr Met Thr Thr Ala Pro Arg Gly Leu Gln Ser Gly Asp Arg Ala
 210 215 220

Thr Trp Phe Gly Leu Tyr Tyr Asn Ile Ser Gly Ala Gly Phe Phe Leu
 225 230 235 240

His His Val Gly Leu Glu Leu Leu Val Asn His Lys Ala Leu Asp Pro
 245 250 255

Ala Arg Trp Thr Ile Gln Lys Val Phe Tyr Gln Gly Arg Tyr Tyr Asp
 260 265 270

Ser Leu Ala Gln Leu Glu Ala Gln Phe Glu Ala Gly Leu Val Asn Val
 275 280 285

Val Leu Ile Pro Asp Asn Gly Thr Gly Gly Ser Trp Ser Leu Lys Ser
 290 295 300

Pro Val Pro Pro Gly Pro Ala Pro Pro Leu Gln Phe Tyr Pro Gln Gly
 305 310 315 320

Pro Arg Phe Ser Val Gln Gly Ser Arg Val Ala Ser Ser Leu Trp Thr
 325 330 335

Phe Ser Phe Gly Leu Gly Ala Phe Ser Gly Pro Arg Ile Phe Asp Val
 340 345 350

Arg Phe Gln Gly Glu Arg Leu Val Tyr Glu Ile Ser Leu Gln Glu Ala
 355 360 365

Leu Ala Ile Tyr Gly Gly Asn Ser Pro Ala Ala Met Thr Thr Arg Tyr
 370 375 380

Val Asp Gly Gly Phe Gly Met Gly Lys Tyr Thr Thr Pro Leu Thr Arg
 385 390 395 400

Gly Val Asp Cys Pro Tyr Leu Ala Thr Tyr Val Asp Trp His Phe Leu
 405 410 415

Leu Glu Ser Gln Ala Pro Lys Thr Ile Arg Asp Ala Phe Cys Val Phe
 420 425 430

Glu Gln Asn Gln Gly Leu Pro Leu Arg Arg His His Ser Asp Leu Tyr
 435 440 445

Ser His Tyr Phe Gly Gly Leu Ala Glu Thr Val Leu Val Val Arg Ser
 450 455 460

Met Ser Thr Leu Leu Asn Tyr Asp Tyr Val Trp Asp Thr Val Phe His
 465 470 475 480

Pro Ser Gly Ala Ile Glu Ile Arg Phe Tyr Ala Thr Gly Tyr Ile Ser
 485 490 495

Ser Ala Phe Leu Phe Gly Ala Thr Gly Lys Tyr Gly Asn Gln Val Ser
500 505 510

Glu His Thr Leu Gly Thr Val His Thr His Ser Ala His Phe Lys Val
515 520 525

Asp Leu Asp Val Ala Gly Leu Glu Asn Trp Val Trp Ala Glu Asp Met
530 535 540

Val Phe Val Pro Met Ala Val Pro Trp Ser Pro Glu His Gln Leu Gln
545 550 555 560

Arg Leu Gln Val Thr Arg Lys Leu Leu Glu Met Glu Glu Gln Ala Ala
565 570 575

Phe Leu Val Gly Ser Ala Thr Pro Arg Tyr Leu Tyr Leu Ala Ser Asn
580 585 590

His Ser Asn Lys Trp Gly His Pro Arg Gly Tyr Arg Ile Gln Met Leu
595 600 605

Ser Phe Ala Gly Glu Pro Leu Pro Gln Asn Ser Ser Met Ala Arg Gly
610 615 620

Phe Ser Trp Glu Arg Tyr Gln Leu Ala Val Thr Gln Arg Lys Glu Glu
625 630 635 640

Glu Pro Ser Ser Ser Ser Val Phe Asn Gln Asn Asp Pro Trp Ala Pro
645 650 655

Thr Val Asp Phe Ser Asp Phe Ile Asn Asn Glu Thr Ile Ala Gly Lys
660 665 670

Asp Leu Val Ala Trp Val Thr Ala Gly Phe Leu His Ile Pro His Ala
675 680 685

Glu Asp Ile Pro Asn Thr Val Thr Val Gly Asn Gly Val Gly Phe Phe
690 695 700

Leu Arg Pro Tyr Asn Phe Phe Asp Glu Asp Pro Ser Phe Tyr Ser Ala
705 710 715 720

Asp Ser Ile Tyr Phe Arg Gly Asp Gln Asp Ala Gly Ala Cys Glu Val
725 730 735

Asn Pro Leu Ala Cys Leu Pro Gln Ala Ala Ala Cys Ala Pro Asp Leu
740 745 750

Pro Ala Phe Ser His Gly Gly Phe Ser His Asn
755 760

<210> 2
<211> 2292
<212> DNA
<213> 人類

<400> 2

atgaaccaga agacaatcct cgtgtctctc attctggccg tcatcaccat ctitgccttg	60
gtttgtgtcc tgctgggtgg caggggtgga gatgggggtg aaccagacca gcttccccat	120
tgcccccttg tatctcccag tgcccagcct tggacacacc ctggccagag ccagctgttt	180
gcagacctga gccgagagga gctgacggct gtgatgcgt ttctgacca gcggtctggg	240
ccagggctgg tggatgcagc ccaggcccgg ccctcggaca actgtgtctt ctacgtggag	300
ttgcagctgc ctcccaaggc tgcagccctg gctcacttgg acagggggag cccccacct	360
gcccgggagg cactggccat cgtcttcttt ggacggcaac ccagcccaa cgtgagttag	420
ctggtgttgg ggccactgcc tcacccctcc tacatgcggg acgtgactgt ggagcgtcat	480
ggaggcccc tgccctatca ccgacgcccc gtgctgttcc aagagtacct ggacatagac	540
cagatgatct tcaacagaga gctgccccag gcttctgggc ttctccacca ctgtgtcttc	600
tacaagcacc ggggacggaa cctggtgaca atgaccacgg ctccccgtgg tctgcaatca	660
ggggaccggg ccacctggtt tggcctctac tacaacatct cgggcgctgg gttcttctg	720
caccacgtgg gcttggagct gctagtgaac cacaaggccc ttgacctgc ccgctggact	780
atccagaagg tgttctatca aggccgctac tacgacagcc tggcccagct ggaggcccag	840
tttagggccg gcctggtgaa tgtggtgctg atcccagaca atggcacagg tgggtcctg	900
tcctgaagt cccctgtgcc cccgggtcca gctccccctc tacagticta tcccaaggc	960
ccccgttca gtgtccaggg aagtcgagtg gcctcctcac tgtggacttt ctcttttggc	1020
ctcggagcat tcagtggccc aaggatcttt gacgttcgct tccaaggaga aagactagtt	1080
tatgagataa gcctccaaga ggccttggcc atctatggtg gaaattcccc agcagcaatg	1140
acgacctgct atgtggatgg aggccttggc atgggcaagt acaccacgcc cctgacctgt	1200
ggggtggact gcccctactt ggccacctac gtggactggc acttctttt ggagtcccag	1260
gccccaaaga caatacgtga tgcttttgt gtgtttgaac agaaccaggg cctccccctg	1320
cggcgacacc actcagatct ctactcgac tactttggg gtcttgcgga aacggtgctg	1380
gtcgtcagat ctatgtccac ctgtctaac tatgactatg tgtgggatac ggtcttccac	1440
cccagtgggg ccatagaaat acgattctat gccacgggct acatcagctc ggcatctctc	1500
tttgggtgta ctgggaagta cgggaaccaa gtgtcagagc acacctggg cacggtccac	1560
accacagcg ccacttcaa ggtggatctg gatgtagcag gactggagaa ctgggtctgg	1620
gccgaggata tggcttttgt cccatggct gtgccctgga gccctgagca ccagctgcag	1680
aggctgcagg tgaccggaa gctgctggag atggaggagc aggccgcctt cctcgtggga	1740
agcgccacc ctcgtacct gtacctggcc agcaaccaca gcaacaagt gggtcacccc	1800
cggggctacc gcatccagat gctcagcttt gctggagagc cgtgcccca aaacagctcc	1860
atggcgagag gcttcagctg ggagaggtag cagctggctg tgaccagcg gaaggaggag	1920
gagcccagta gcagcagcgt tttcaatcag aatgacctt gggccccac tgtggatttc	1980
agtacttca tcaacaatga gaccttgcgt ggaaaggatt tgggtggcctg ggtgacagct	2040
ggttttctgc atatcccaca tgcagaggac attcctaaca cagtactgt gggaacggc	2100
gtgggttct tctccgacc ctataacttc tttagcgaag accctcctt ctactctgcc	2160
gactccatct acttccgagg ggaccaggat gctggggcct gcgaggtaa cccctagct	2220
tgctgcccc aggtgctgc ctgtgcccc gacctccctg ccttctccca cgggggttc	2280

tctcacaact ag 2292

<210> 3
<211> 37
<212> DNA
<213> 人造

<220>
<223> 起始選殖引子-正向

<400> 3
aaaagcaggc ttaggaatga accagaagac aatcctc 37

<210> 4
<211> 35
<212> DNA
<213> 人造

<220>
<223> 起始選殖引子-逆向

<400> 4
caagaaagct gggtcctagt tgtgagagaa gcccc 35

<210> 5
<211> 34
<212> DNA
<213> 人造

<220>
<223> 萬用引子-正向

<400> 5
ggggacaagt ttgtacaaaa aagcaggctt agga 34

<210> 6
<211> 30
<212> DNA
<213> 人造

<220>
<223> 萬用引子-逆向

<400> 6
ggggaccact ttgtacaaga aagctgggtc 30

<210> 7
<211> 37
<212> DNA
<213> 人造

<220>
<223> 用於選殖未標記之全長 SSAO 之正向引子序列

<400> 7
aaaagcaggc ttaggaatga accagaagac aatcctc 37

<210> 8
<211> 40
<212> DNA
<213> 人造

<220>
<223> 用於選殖未標記之全長 SSAO 之逆向引子序列

<400> 8
caagaaagct gggtcctagt tgtgagagaa gccccgtgg 40

<210> 9
<211> 37
<212> DNA
<213> 人造

<220>

<223> 用於選殖於 C 端 6xHIS 標記之全長 SSAO 之正向引子序列

<400> 9

aaaagcaggc ttaggaatga accagaagac aatcctc

37

<210> 10
<211> 58
<212> DNA
<213> 人造

<220>

<223> 用於選殖於 C 端 6xHIS 標記之全長 SSAO 之逆向引子序列

<400> 10

caagaaagct gggtcctaataat ggtgatgggtg atgggtgggtg tgagagaagc ccccggtg

58

<210> 11
<211> 41
<212> DNA
<213> 人造

<220>

<223> 用於選殖 N 端被截短之未標記 SSAO 之正向引子序列

<400> 11

aaaagcaggc ttaggaatgg gcaggggtgg agatgggggt g

41

<210> 12
<211> 35
<212> DNA
<213> 人造

<220>

<223> 用於選殖 N 端被截短之未標記 SSAO 之逆向引子序列

<400> 12

caagaaagct gggtcctagt tgtgagagaa gcccc

35

<210> 13
<211> 41
<212> DNA
<213> 人造

<220>

<223> 用於選殖 N 端被截短且 C 端 6xHIS 標記之 SSAO 之正向引子序列

<400> 13

aaaagcaggc ttaggaatgg gcaggggtgg agatgggggt g

41

<210> 14
<211> 58
<212> DNA
<213> 人造

<220>

<223> 用於選殖 N 端被截短且 C 端 6xHIS 標記之 SSAO 之逆向引子序列

<400> 14
caagaaagct gggtcctaataa ggatgatggat atggatggat tgagagaagc ccccgatg 58

<210> 15
<211> 38
<212> DNA
<213> 人造

<220>
<223> 用於選殖未標記 SSAO 催化部位之正向引子序列

<400> 15
aaaagcaggc ttaggaatga ccacggctcc ccgatgac 38

<210> 16
<211> 35
<212> DNA
<213> 人造

<220>
<223> 用於選殖未標記 SSAO 催化部位之逆向引子序列

<400> 16
caagaaagct gggtcctagt tggagagaa gcccc 35

<210> 17
<211> 38
<212> DNA
<213> 人造

<220>
<223> 用於選殖具有 C 端 6xHIS 標記之 SSAO 催化部位之正向引子序列

<400> 17
aaaagcaggc ttaggaatga ccacggctcc ccgatgac 38

<210> 18
<211> 58
<212> DNA
<213> 人造

<220>
<223> 用於選殖具有 C 端 6xHIS 標記之 SSAO 催化部位之逆向引子序列

<400> 18
caagaaagct gggtcctaataa ggatgatggat atggatggat tgagagaagc ccccgatg 58

五、中文發明摘要：

5 本發明提供在半卡肼敏感性胺氧化酶(SSAO)或具有
SSAO 活性的生物樣本存在條件下，測定亞甲胺、亞甲胺
類化合物或含亞甲胺基化合物之穩定性的一些方法。所披
露的方法可被設計成一種適合於高通量篩選應用的分析形
式。

10

六、英文發明摘要：

15 The present invention provides methods for
determining the stability of methyleneamine, methyleneamine
-like compounds or compounds containing an methyleneamine
moiety in the presence of semicarbazide-sensitive amine
oxidase (SSAO) or a biological sample containing SSAO
activity. The disclosed methods may be configured in an
assay format for high throughput screening applications.

20

十、申請專利範圍：

1. 一種藉由半卡肼敏感性胺氧化酶(SSAO)催化代謝作用
鑑定試驗藥劑之代謝穩定性的方法，該方法包括：

- a) 培養表達 SSAO 的細胞；
- b) 將一種試驗藥劑加入該細胞；
- c) 按照預定的一段時間，將該試驗藥劑與細胞一起培育；
- d) 在該預定時間內，在含有所表達 SSAO 的細胞存在
條件下測量剩餘的試驗藥劑含量；以及
- e) 將該預定時間內剩餘試驗藥劑的含量與對照物中
試驗藥劑的含量作比較，以得出一數值；

該數值則表明在含有所表達 SSAO 的細胞存在條件下
該試驗藥劑之代謝穩定性。

2. 一種藉由半卡肼敏感性胺氧化酶(SSAO)催化代謝作用
鑑定帶放射性標記試驗藥劑之代謝穩定性的方法，該方
法包括：

- a) 培養表達 SSAO 的細胞；
- b) 將一種帶放射性標記的試驗藥劑加入該細胞；
- c) 按照預定的一段時間，將該帶放射性標記試驗藥劑
與細胞一起培育；以及
- d) 在含有所表達 SSAO 的細胞存在條件下，測量該預
定時間內剩餘的帶放射性標記試驗藥劑的含量；
尚未代謝的帶放射性標記試驗藥劑之百分比則表明在
含有所表達 SSAO 的細胞存在條件下該帶放射性標記

試驗藥劑之代謝穩定性。

3. 申請專利範圍第 1 項或第 2 項所述之方法，其中表達 SSAO 的細胞是用編碼 SSAO 的 DNA 進行瞬間或穩定的細胞轉染而產生的。

5 4. 申請專利範圍第 1 項或第 2 項所述之方法，其中表達 SSAO 的細胞是原核細胞。

5. 申請專利範圍第 1 項或第 2 項所述之方法，其中表達 SSAO 的細胞是真核細胞。

10 6. 一種藉由 SSAO 在生物樣本中的催化代謝作用鑑定試驗藥劑之代謝穩定性的方法，該方法包括：

a) 獲取一種含 SSAO 的生物樣本；

b) 將一種試驗藥劑加入該生物樣本；

c) 按照預定的一段時間，將該試驗藥劑與該生物樣本一起培育；

15 d) 在該預定時間內，測量該試驗藥劑的含量；以及

e) 將該預定時間內的試驗藥劑含量與對照物中試驗藥劑的含量作比較，以得出一數值；

該數值則表明在含 SSAO 的生物樣本存在條件下該試驗藥劑之代謝穩定性。

20 7. 一種藉由 SSAO 在生物樣本中的催化代謝作用鑑定帶放射性標記試驗藥劑之代謝穩定性的方法，該方法包括：

a) 獲取一種含 SSAO 的生物樣本；

b) 將一種帶放射性標記的試驗藥劑加入該生物樣本；

- c) 按照預定的一段時間，將該帶放射性標記試驗藥劑與該生物樣本一起培育；以及
- d) 在該預定時間內，測量該帶放射性標記試驗藥劑的含量；

5 尚未代謝的帶放射性標記試驗藥劑之百分比則表明在含 SSAO 的生物樣本存在條件下該試驗藥劑之代謝穩定性。

- 8. 申請專利範圍第 6 項或第 7 項所述之方法，其中該生物樣本是選自血液、血漿、血清、動脈、臍帶、肝臟、迴腸以及肺臟。
- 9. 申請專利範圍第 8 項所述之方法，其中該生物樣本是取自於人類受試者。
- 10. 申請專利範圍第 8 項所述之方法，其中該生物樣本是取自於非人類受試者。
- 11. 申請專利範圍第 9 項或第 10 項所述之方法，其中在獲取該生物樣本之前該人類受試者或非人類受試者先要接受預處理。
- 12. 申請專利範圍第 11 項所述之方法，其中對人類受試者或非人類受試者的預處理手段是選自以一種或多種藥物治療、誘發病症的一個或多個方面、手術處理和基因改變等手段。
- 13. 申請專利範圍第 1 項或第 6 項所述之方法，其中，該試驗藥劑的含量是通過下列技術測定的：質譜、高壓液相色譜、液相色譜/質譜、液相色譜/質譜/質譜以及液相色

譜/放射性檢測。

14. 申請專利範圍第 1 項或第 6 項所述之方法，其中一個或一個以上的步驟是由一種機器人裝置完成的。

5 15. 申請專利範圍第 1 項或第 6 項所述之方法，其中，除了採取測定該試驗藥劑含量的方式外，該試驗藥劑之代謝穩定性還可通過測定該試驗藥劑的一種或一種以上代謝產物而測定，或根本不採取測定該試驗藥劑含量的方式。

10 16. 一種測定試驗藥劑之代謝穩定性狀況的方法，該方法包括：

a) 使用申請專利範圍第 1 項所述之方法，獲取在含有所表達 SSAO 的細胞存在條件下培育的試驗藥劑之代謝穩定性數值；

b) 獲取一種含 SSAO 的生物樣本；

15 c) 將一種試驗藥劑加入該生物樣本；

d) 按照預定的一段時間，將該試驗藥劑與該生物樣本一起培育；

e) 在該預定時間內，測量該試驗藥劑的含量；以及

20 f) 將該預定時間內測定的試驗藥劑含量與對照物中試驗藥劑的含量作比較，以得出一數值，該數值表明在含 SSAO 的生物樣本存在條件下該試驗藥劑之代謝穩定性；

其中，將在含有所表達 SSAO 的細胞存在條件下試驗藥劑之代謝穩定性數值與在含 SSAO 的生物樣本存在條

件下試驗藥劑之代謝穩定性數值作比較，即得出該試驗藥劑的代謝穩定性狀況。

17. 一種測定帶放射性標記試驗藥劑之代謝穩定性狀況的方法，該方法包括：

- a) 使用申請專利範圍第 2 項所述之方法，獲取在含有所表達 SSAO 的細胞裂解液存在條件下培育的帶放射性標記試驗藥劑之代謝穩定性數值；
- b) 獲取一種含 SSAO 的生物樣本；
- c) 將一種帶放射性標記的試驗藥劑加入該生物樣本；
- d) 按照預定的一段時間，將該帶放射性標記試驗藥劑與該生物樣本一起培育；
- e) 在該預定時間內，測量該帶放射性標記試驗藥劑的含量；以及
- f) 根據該預定時間內尚未代謝的帶放射性標記試驗藥劑之百分比來鑑定帶放射性標記試驗藥劑之代謝穩定性；

其中，將在含有所表達 SSAO 的細胞裂解液存在條件下帶放射性標記試驗藥劑之代謝穩定性數值與在含 SSAO 的生物樣本存在條件下帶放射性標記試驗藥劑之代謝穩定性數值作比較，即得出該試驗藥劑的代謝穩定性狀況。

人的 SSAO 氨基酸序列

編號 Q16853

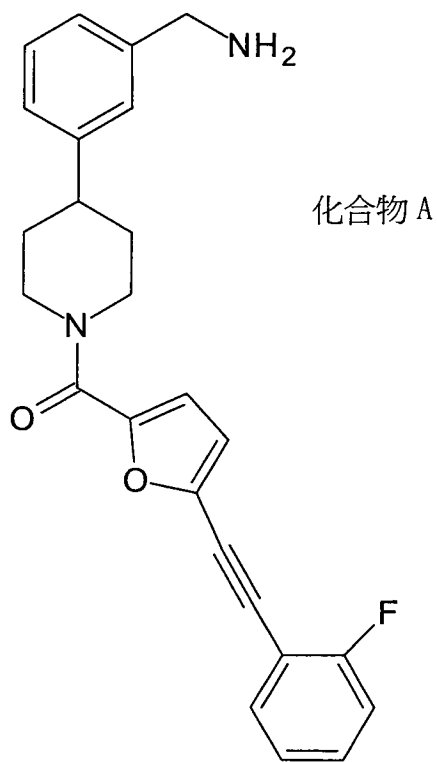
MNQKTILVLL ILAVITIFAL VCVLLVGRGG DGGEPSQLPH CPSVSPSAQP
WTHPGQSQLF 60
ADLSREELTA VMRFLTQRLG PGLVDAAQAR PSDNCVFSVE LQLPPKAAAL
AHLDRGSPPP 120
AREALAIVFF GRQPQPNVSE LVVGPLPHPS YMRDVTVERH GGPLYHRRP
VLFQEYLDID 180
QMIFNRELPQ ASGLLHHCCF YKHRGRNLVT MTTAPRGLQS GDRATWFGLY
YNISGAGFFL 240
HHVGLELLVN HKALDPAWWT IQKVIFYQGRY YDSLAQLEAQ FEAGLVNVVL
IPDNGTGGSW 300
SLKSPVPPGP APPLQFYPPQ PRFSVQGSRV ASSLWTFSG LGAFSGPRIF
DVRFQGERLV 360
YEISLQEALA IYGGNSPAAM TTRYVDGGFG MGKYTTPLTR GVDCPYLATY
VDWHFLLESQ 420
APKTIRDAFC VFEQNQGLPL RRHSDLYSH YFGGLAETVL VVRSMSTLLN
YDYVWDTVFH 480
PSGAIEIRFY ATGYISSAFL FGATGKYGNQ VSEHTLGT VH THSAHFKVDL
DVAGLENWW 540
AEDMVFPMA VPWSPEHQLQ RLQVTRKLE MEEQAAFLVG SATPRYLYLA
SNHSNKWGHP 600
RGYRIQMLSF AGEPLPQNSS MARGFSWERY QLAVTQRKEE EPSSSSVFNQ
NDPWAPTVD 660
SDFINNETIA GKDLVAWVTA GFLHIPHAED IPNTVTVGNG VGFFLRPYNF
FDEDPSFYSA 720
DSIYFRGDQD AGACEVNPLA CLPQAAACAP DLPAFSHGGF SHN

圖 1

人的 SSAO 核苷酸序列 (NM_003734)

ATGAACCAGA AGACAATCCT CGTGCTCCTC ATTCTGGCCG TCATCACCAT
CTTTGCCTTG 60
GTTTGTGTCC TGCTGGTGGG CAGGGGTGGA GATGGGGGTG AACCCAGCCA
GCTTCCCCAT 120
TGCCCCTCTG TATCTCCCAG TGCCCAGCCT TGGACACACC CTGGCCAGAG
CCAGCTGTTT 180
GCAGACCTGA GCCGAGAGGA GCTGACGGCT GTGATGCGCT TTCTGACCCA
GCGGCTGGGG 240
CCAGGGCTGG TGGATGCAGC CCAGGCCCGG CCCTCGGACA ACTGTGTCTT
CTCAGTGGAG 300
TTGCAGCTGC CTCCCAAGGC TGCAGCCCTG GCTCACTTGG ACAGGGGGAG
CCCCCACCT 360
GCCCGGGAGG CACTGGCCAT CGTCTTCTTT GGCAGGCAAC CCCAGCCCAA
CGTGAGTGAG 420
CTGGTGGTGG GGCCACTGCC TCACCCCTCC TACATGCGGG ACGTGACTGT
GGAGCGTCAT 480
GGAGGCCCCC TGCCCTATCA CCGACGCCCC GTGCTGTTCC AAGAGTACCT
GGACATAGAC 540
CAGATGATCT TCAACAGAGA GCTGCCCCAG GCTTCTGGGC TTCTCCACCA
CTGTTGCTTC 600
TACAAGCACC GGGGACGGAA CCTGGTGACA ATGACCACGG CTCCCCGTGG
TCTGCAATCA 660
GGGGACCGGG CCACCTGGTT TGGCCTCTAC TACAACATCT CGGGCGCTGG
GTTCTTCCTG 720
CACCACGTGG GCTTGGAGCT GCTAGTGAAC CACAAGGCCC TTGACCCTGC
CCGCTGGACT 780
ATCCAGAAGG TGTTCTATCA AGGCCGCTAC TACGACAGCC TGGCCCAGCT
GGAGGCCCAG 840
TTTGAGGCCG GCCTGGTGAA TGTGGTGCTG ATCCCAGACA ATGGCACAGG
TGGGTCCTGG 900
TCCCTGAAGT CCCCTGTGCC CCGGGGTCCA GCTCCCCCTC TACAGTTCTA
TCCCCAAGGC 960
CCCCGCTTCA GTGTCCAGGG AAGTCGAGTG GCCTCCTCAC TGTGGACTTT
CTCCTTTGGC 1020
CTCGGAGCAT TCAGTGGCCC AAGGATCTTT GACGTTGCT TCCAAGGAGA
AAGACTAGTT 1080
TATGAGATAA GCCTCCAAGA GGCCTTGGCC ATCTATGGTG GAAATTCCCC
AGCAGCAATG 1140
ACGACCCGCT ATGTGGATGG AGGCTTTGGC ATGGGCAAGT ACACCACGCC
CCTGACCCGT 1200
GGGGTGGACT GCCCCTACTT GGCCACCTAC GTGGACTGGC ACTTCCTTTT
GGAGTCCCAG 1260
GCCCCCAAGA CAATACGTGA TGCCTTTTGT GTGTTTGAAC AGAACCAGGG
CCTCCCCCTG 1320
CGGCGACACC ACTCAGATCT CTA CTGCGCAC TACTTTGGGG GTCTTGCGGA
AACGGTGCTG 1380

GTCGTCAGAT CTATGTCCAC CTTGCTCAAC TATGACTATG TGTGGGATAC
GGTCTTCCAC 1440
CCCAGTGGGG CCATAGAAAT ACGATTCTAT GCCACGGGCT ACATCAGCTC
GGCATTCTC 1500
TTTGGTGCTA CTGGGAAGTA CGGGAACCAA GTGTCAGAGC ACACCCTGGG
CACGGTCCAC 1560
ACCCACAGCG CCCACTTCAA GGTGGATCTG GATGTAGCAG GACTGGAGAA
CTGGGTCTGG 1620
GCCGAGGATA TGGTCTTTGT CCCCATGGCT GTGCCCTGGA GCCCTGAGCA
CCAGCTGCAG 1680
AGGCTGCAGG TGACCCGGAA GCTGCTGGAG ATGGAGGAGC AGGCCGCCTT
CCTCGTGGGA 1740
AGCGCCACCC CTCGCTACCT GTACCTGGCC AGCAACCACA GCAACAAGTG
GGGTCACCCC 1800
CGGGGCTACC GCATCCAGAT GCTCAGCTTT GCTGGAGAGC CGCTGCCCCA
AAACAGCTCC 1860
ATGGCGAGAG GCTTCAGCTG GGAGAGGTAC CAGCTGGCTG TGACCCAGCG
GAAGGAGGAG 1920
GAGCCCAGTA GCAGCAGCGT TTTCAATCAG AATGACCCTT GGGCCCCCAC
TGTGGATTTC 1980
AGTGAATTCA TCAACAATGA GACCATTGCT GGAAAGGATT TGGTGGCCTG
GGTGACAGCT 2040
GGTTTTCTGC ATATCCCACA TGCAGAGGAC ATTCCTAACA CAGTGACTGT
GGGGAACGGC 2100
GTGGGCTTCT TCCTCCGACC CTATAACTTC TTTGACGAAG ACCCCTCCTT
CTACTCTGCC 2160
GACTCCATCT ACTTCCGAGG GGACCAGGAT GCTGGGGCCT GCGAGGTCAA
CCCCCTAGCT 2220
TGCCTGCCCC AGGCTGCTGC CTGTGCCCCC GACCTCCCTG CCTTCTCCCA
CGGGGGCTTC 2280
TCTCACAAGT AG 2292



七、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第 (1) 圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

無

八、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

無