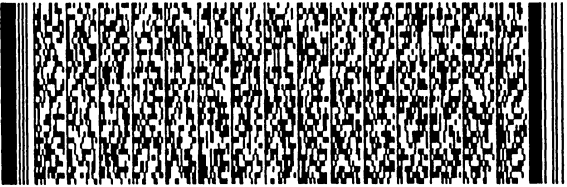


申請日期：87.9.25	案號：87115977	90年11月20日修正補充	公告本
類別：G01N 31/00. 33/00			

(以上各欄由本局填註)

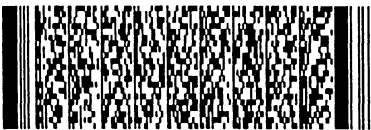
發明專利說明書		554170
一、 發明名稱	中文	用於自化合物存庫識別前置者之高通量篩選方法及自化合物存庫識別活性化合物之方法
	英文	HIGH THROUGHPUT SCREENING METHOD FOR THE IDENTIFICATION OF LEADS FROM A LIBRARY OF COMPOUNDS AND METHOD OF IDENTIFICATION OF ACTIVE COMPOUNDS FROM A LIBRARY OF COMPOUNDS
二、 發明人	姓名 (中文)	1. 金希爾瑞 2. 卻帕連畢翠斯
	姓名 (英文)	1. THIERRY, JEAN 2. BEATRICE CHAPELAIN
	國籍	1. 法國 2. 法國
	住、居所	1. 法國巴黎市達平路6號 2. 法國波堤市蘇卻路4號
三、 申請人	姓名 (名稱) (中文)	1. 法商喜瑞普公司
	姓名 (名稱) (英文)	1. CEREP
	國籍	1. 法國
	住、居所 (事務所)	1. 法國巴黎聖爵曼大道260號
	代表人 姓名 (中文)	1. 亞倫莫荷
	代表人 姓名 (英文)	1. ALAIN MAIORE
		

本案已向

國(地區)申請專利	申請日期	案號	主張優先權
歐洲專利機構 EP	1997/09/25	97402239.4	無

有關微生物已寄存於	寄存日期	寄存號碼
-----------	------	------

無



五、發明說明 (1)

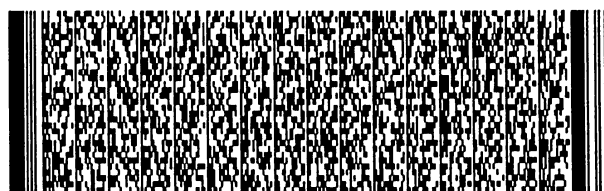
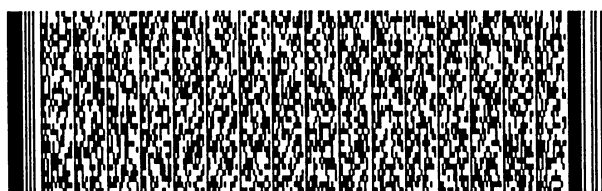
本發明係關於由存庫選擇前置者或活性化合物之方法。特別，本發明提供選擇對預定目標具有活性及選擇性之前置者或化合物之方法。本發明例如可用於藥物發現方法。

目前藥物發現方法需要篩選大量天然來源或經由組合化學方法獲得之化合物。

於單一藥物發現計畫常測試數萬種或數十萬種化合物存庫(圖1)。入選化合物亦即入選者數目極大。平均入選率為0.1%。如此，篩選100,000種化合物存庫可能產生100個入選者。由入選者至藥物候選者是一段漫長過程，需要多次合成及篩選焦點化合物存庫週期。此種前置化合物之最佳化過程極為耗時，且需大量預算。

確實，待追蹤的入選者常係基於其對被篩檢目標之強度選擇。各次前置最佳化週期須產生活性更高之化合物。當少數入選者具有預期強度時，通常係經過數次最佳化週期後，其變成前置者，然後測試其對大量生物目標之選擇性("前置者側錄(lead profiling)")。藥物候選者係基於其對選定目標之親和力，及其對目標之特異性而被保留(亦即不可對該計畫之病理項目無關的目標具有活性)。選定前置者證實非特異性，因而可能引起非期望之副作用並非罕見。隨後需要由強度較低之入選者重新開始整個過程。

本發明係關於由存庫識別前置者或活性化合物之改良方法。本發明亦係關於高通量(throughput)側錄方法，其允許由大量多樣化組合中篩選出選擇性化合物。本發明也提供包含多種具有結構多樣化但具有共通功能性質之化合物之新穎焦點存庫。



五、發明說明 (2)

本發明方法特別係關於於藥物發現過程之極為早期決定入選者特異性("側錄")。此等新穎方法允許識別具有改良性質(亦即合併對指定目標之強度及選擇性標準)之前置者,其可選擇性用於前置者最適化過程而識別具有較高預測度及較低成本之藥物候選者(drug candidates)。

因此,本發明之目的係提供一種由化合物存庫識別前置者之方法,該方法包含下列步驟:

(a)篩選一化合物存庫對預定目標之活性而獲得強力入選者;

(b)側錄步驟(a)之強力入選者獲得強力選擇性前置者。

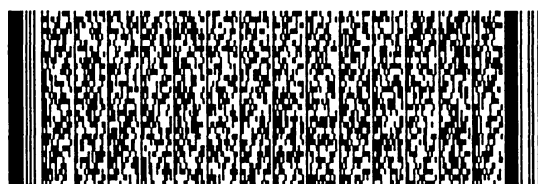
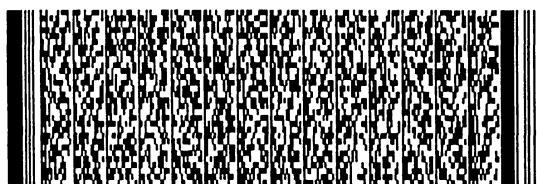
如前文說明,先前藥物發現方法或前置者選擇方法包括篩選化合物存庫有關對預定目標之活性,如此所得入選者隨後進一步經由前置者最佳化週期而產生前置者。但此等步驟僅係基於篩選存庫或焦點存庫對預定目標之活性,亦即基於選擇可與指定目標交互作用之化合物,但先前方法皆未包含根據本發明之側錄方法。本發明之高通量篩選方法可提供此種存庫之側錄步驟,因此獲得合併強度(可與指定目標交互作用能力)及選擇性(與其它目標交互作用程度低或缺乏)之雙重標準之前置者。

本發明之另一目的係提供一種由一化合物存庫識別活性化合物之方法,該方法包含:

(i)高通量篩選包含下列步驟:

(a)篩選一化合物存庫對預定目標之活性而獲得強力入選者;

(b)側錄步驟(a)之強力入選者獲得強力選擇性前置



五、發明說明 (3)

者；

(c) 製備結構上相關步驟(b)前置者之化合物之焦點存庫；

(ii) 使用步驟(c)之焦點存庫選擇性重複步驟(i)一次或數次而產生進一步焦點存庫，及

(iii) 對該目標篩選步驟(i)或(ii)之焦點存庫而獲得活性化合物。

此種方法示例說明於圖2，及包含前述前置者識別方法之循序步驟及前置者最佳化步驟而產生活性化合物。

為求清晰起見，"入選者"一詞於本發明之定義範圍內表示於主存庫經一次篩檢步驟後入選之化合物。因此，入選者為第一階段選擇所得化合物，其對預定目標而言至少具有最低強度。"前置者"為最佳化之入選者，亦即活性已經經過證實，更佳使用不同選擇試驗證實之入選者。因此前置者為至少兩次篩檢步驟後所得化合物。前置者表示進一步最佳化步驟之起始物料，進一步最佳化步驟包含設計焦點存庫，選擇活性化合物，其化學改質，功能測試等，而將產生藥物候選者。

本發明方法中，一存庫篩選其對指定目標之活性。概略而言，目標可為於醫藥或農用化學品領域之任一種分子例如受體，蛋白質，部分受體，抗體，配合基，傳染性顆粒例如病毒、細菌、真菌或核酸等。更佳目標為涉及生物或病理路徑之分子，例如受體，酶，核酸區，離子通道等。特定類型目標例如為受體如表I引述者，及酶如表II引述者。



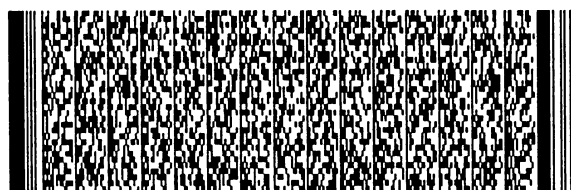
五、發明說明 (4)

如前述，本案申請專利方法之步驟(a)包含篩選一存庫對指定目標之活性。篩選對指定目標之活性之一般方式係有關選擇可與該目標交互作用之存庫中之任一種化合物。於本發明範圍內，"交互作用"一詞表示物理或功能交互作用。更佳本方法之步驟(a)中，篩選對預定目標具有活性之化合物包含篩選(或選擇)可結合至預定目標之化合物，修改酶活性或調節基因表現。

本發明之特定具體例中，步驟(a)包含篩選結合至目標之化合物。更佳具體例中，化合物結合至指定目標之能力係由該化合物抑制添加標記之參考分子結合至目標之能力測量。舉例言之，化合物結合至指定目標受體之能力係藉化合物抑制添加標記之受體配合基結合至目標受體之能力測量。特例中，篩選包含對各種化合物測定抑制添加標記之配合基結合至目標之百分比。

本發明之另一特定具體例中，步驟(a)包含篩選可修改活性之化合物。此等修改包括刺激或抑制酶活性，或改變特異性或調節酶活性(舉例)。

化合物對目標之活性可根據業界已知之多種方法檢定分析，例如酶學(特別免疫酶學)方法，基於螢光之檢測方法或放射性檢定分析(舉例)。至於基於螢光之檢測技術之特別適合例值得一提者為螢光偏振法，螢光校正光譜術(Elgen et al., PNAS 91 (1994) 5740)及時間解析螢光(舉例)。此等技術之較佳例包括例如PSA (Baum et al., Anal. Biochem. 237 (1996) 129)，HTRF (Mathis G., Clin. Chem. 39 (1993) 1953)。至於放射性免疫檢定分



五、發明說明 (5)

析之例例如可方便使用ELISA或IRA於本發明之範圍。

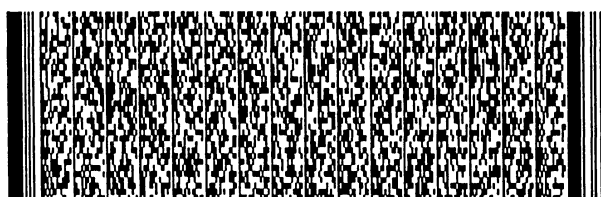
如實驗乙節所述，該等方法可於試管試驗系統或於基於細胞之檢定分析進行。特別，此等檢定分析通常係於容器如平板(微孔板)，其裝載適當反應劑(目標，緩衝液，試驗化合物)進行。適當板包括96孔板，以及具有較多孔數，特別384，864，1536或以上之板。此等板由市面可購得。

為了使篩選方法更為準確，進一步較佳證實化合物相對於目標之活性。證實可藉例如單純重複前述篩選方法，但使用分離或純化形式之化合物而非含於全存庫之化合物進行。

依據起始存庫大小而定，證實入選者數目可為5至500，通常為5至100種。

此外，較佳具體例中，步驟(a)之篩選進一步包含化合物結合預定目標之親和力，俾選擇具有最佳親和力之化合物作為強力入選者。為了測定親和力，經過證實之入選者通常再度合成及純化。然後藉業界已知方法如實例揭示之"史格查(Scatchard)"分析測定。又於此步驟中，由於化合物之化學結構式故可進一步拋棄化合物。

根據步(a)篩選之化合物通常為5至50種，隨後接受步驟(b)。側錄步驟(b)概略而言，包含檢定分析強力入選者對各種預定目標之活性，並選出對預定目標具特異性之化合物。因此，此步驟可保有對目標具有預期強度及良好選擇性側錄之前置者。步驟(b)通常包含決定被選上之入選者與多種目標交互作用，較佳結合至多種目標之能力。



五、發明說明 (6)

本發明之一特定具體例中，步驟(b)包含強力入選者對超過25種目標進行檢定分析。更為特定具體例中，側錄步驟(b)包含於超過50種目標檢定分析強力入選者。最佳具體例中，側錄步驟(b)包含於超過60種目標檢定分析強力入選者。可於步驟(b)檢定分析之目標之說明例列舉於下表I。本發明之較佳具體例中，側錄步驟(b)包含對下列目標篩選被選定之入選者，此等目標至少包含：

- 非肽G-偶合受體，包含腺苷受體，腎上腺激性受體，多巴胺受體，組織胺受體，褪黑激素受體，萆毒鹼受體，及 σ -受體；

- 肽類G-偶合受體，包含血管緊張肽素受體，bombesin受體，緩動激素受體，膽囊收縮激素受體，化學激素受體，內皮肽素受體，氫肽素受體，神經激素受體，神經肽Y受體及後葉加壓素受體；

- 離子通路偶合受體包含血清素受體；及

- 離子通路，包含鈣通路及鉀通路。

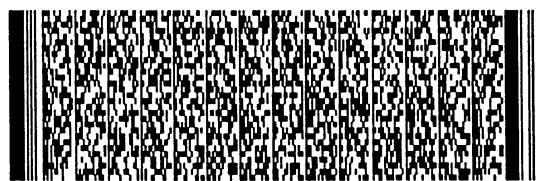
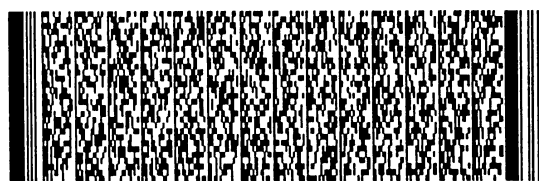
又更佳接受檢定分析之目標進一步包含：

- 酶，包括磷酸二酯酶及酪胺酸激酶及選擇性蛋白質激酶及蛋白解酶。

另一較佳具體例中，側錄步驟進一步包括一種或數種基於細胞之檢定分析選自：

- 細胞激素分泌檢定分析如用於人類單核細胞之TNF- α 分泌檢定分析；

- 自由基檢定分析，例如用於人類顆粒球(如HL60)之 O_2 分泌檢定分析；



五、發明說明 (7)

- 黏著檢定分析，特別人類單核細胞(如U937細胞與人類內皮細胞間之黏合)；

- 細胞毒性檢定分析，例如對人類單核細胞之毒性。

典型示例說明之本發明之特定具體例中，側錄步驟(b)包含篩選化合物對表III列舉之各種及每種目標之活性。

本發明之另一典型示例說明特例中，側錄步驟(b)包含篩選化合物對表I列舉之各種及每種目標之活性。

化合物與此等目標交互作用或結合能力可遵照步驟(a)之相同方法於試管試驗或於基於細胞之系統測定。本發明之主要方面為側錄大量化合物(強力入選者)，俾產生比先前技術方法更為改良之前置者。就此方面為言，為了加速側錄步驟(b)，申請人發展出一種高通量側錄("HTP")構想，其允許於如上揭示之大量目標於試管試驗中快速測試無數化合物(例如一百至兩百種範圍)。特別，此種HTP包括機械人系統，其每日可處理高達20個方案(每個目標一個方案)。此種方法之進一步細節揭示於實例。基本上，於本發明之特定具體例中，HTP係使用包括下列元件之裝置進行：

- 工作站包括：

- 數個培育器，較佳為2或3個
- 一或多個過濾站
- 試劑配送器

- 容器較佳為平板，及

- 移動容器之各個工作站至裝置。

特別試劑配送器可配送10-20個目標，及多於100種測試



五、發明說明 (8)

化合物。試驗配送器之活動可以人工或自動化進行。

如前述，HTP步驟使用之平板可為96-，384-，864-或1536孔平板。較佳含有96，384或864孔。

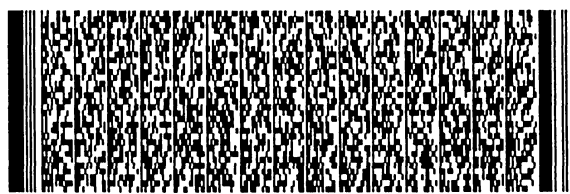
於此步驟(b)後保有之化合物為可與預定目標交互作用，而不會與任何其它目標或僅與少數目標交互作用或與其它目標極少交互作用者。選擇要求可隨目標而異，可由業界人士調整配合。特別依化合物之期望用途而定，只要化合物與其它不相關目標(例如組織胺受體)不具交互作用，則可忍受與若干相關目標(例如若干血清素激性受體)之交互作用。本發明之步驟(b)極為要緊，步驟(b)可決定藥物發現過程所尋求之選擇性程度。

最佳具體例中，本發明方法進一步包含恰於HTP步驟(b)之前或之後，一個高通量前置者開發步驟。此種高通量前置者開發("HTLD")步驟包含篩選入選者之藥理性質。特別HTLD包含篩選入選者之下列性質：

- 毒性
- 代謝，及/或
- 藥力學。

毒性較佳經由化合物接觸報告者細胞如人類單核細胞，及經由根據已知方法測量加標記報告者化合物(亦即Cr)之釋放測定。

代謝就預測該化合物於活體內將如何表現相當重要。化合物代謝之測定可經由化合物接觸胞色素P450，及測定所得代謝產物性質而於試管試驗或於基於細胞之檢定分析進行。



五、發明說明 (9)

藥力學較佳於腸腔細胞模式，特別Caco-2或MDCK細胞檢定分析。

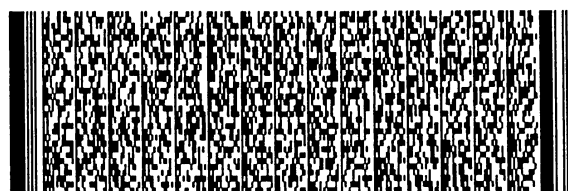
本發明之特定變化方法中，步驟(1)包含：

(a)篩選化合物存庫有關對預定目標之活性而獲得強力入選者；及

(b)側錄步驟(a)之強力入選者有關逐一對預定目標之選擇性及藥理性質而獲得強力選擇性前置者。

更佳步驟(b)包含側錄步驟(a)之強力入選者有關逐一對預定目標之選擇性及於試管試驗不含對人類細胞毒性。又更佳，步驟(b)包含側錄步驟(a)之強力入選者有關逐一對預定目標之選擇性，於試管試驗對人類細胞不具毒性，及可穿越腸腔模式。特佳具體例中，也測試化合物於胞色素P450存在下之代謝作用。此種方法之示意代表圖示於圖3。

如此所得前置者可直接用於藥物候選者選擇計畫，或用於方法步驟(c)作為模版供設計及合成結構關聯之化合物焦點存庫。焦點存庫可根據後文揭示及業界已知技術產生，可含數千種化合物。"結構關聯"一詞指示此等存庫設計成其化合物含有也存在於前置者之結構或要素。例如特別如實例之揭示，此等存庫含有前置者之特定單體或區塊。特別，焦點存庫之構成通常包括於第一步驟，分子特徵化前置者，俾決定其組成區塊。選擇性地，第一步驟也包括叢集具有共通結構特徵之前置者，俾合成有限數目之焦點存庫。由第一分析，最常見區塊及其類似物用於分子模式化步驟，俾產生焦點存庫。類似物之選擇可根據多種



五、發明說明 (10)

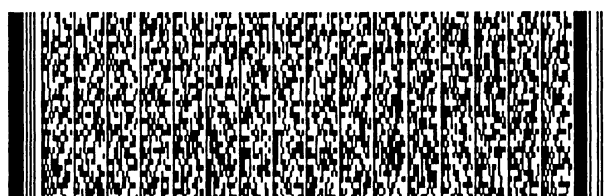
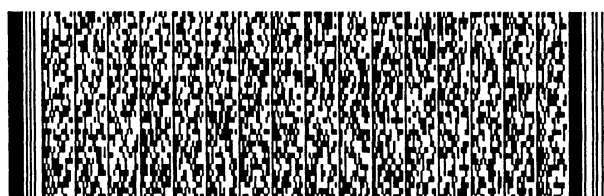
已知類比策略進行，包括類比單體或類比整個結構。此種類比例如可使用適當軟體藉虛擬篩選存庫進行。然後根據下述已知組合化學方法產生存庫。

由焦點存庫，重複步驟(a)至(c)而獲得進一步焦點存庫(步驟(ii))。依據尋求之選擇性或強度而定，此週期可重複0至10次，較佳1至5次。

最終對此等存庫篩選指定目標(步驟(iii))獲得活性化合物。步驟(iii)之篩選可根據業界已知方法進行。較佳步驟(iii)之篩選係以類似前述步驟(a)及(b)之篩選及側錄方式進行。此種篩選也可含有額外步驟，例如實例所述基因毒性檢定分析或功能檢定分析。

前述方法可應用於多種化合物存庫，包括天然來源或經由眾所周知之組合化學方法獲得之化合物存庫。此等組合化學方法包括始於單體或區塊，使用例如固體撐體-或液體合成、平行合成、微珠粒、分割偶合重組或任何其它業界已知方法合成隨機或焦點系統化合物(N.K. Terret, M. Gardner, D.W. Gordon, R. J. Kobylecki, J. Steele. "組合合成。化合物存庫之設計及其應用於藥物發現"。四面體第51卷，第30期(1995年)8135-8173頁)。因而化合物可為核酸，肽類，其它化學品或其組合。存庫例如包含5000至500,000種化合物，例如10,000至20,000種化合物。

本發明方法可有效用於識別各型活性化合物如藥物候選者，受體配合基。此等方法之優點為可產生強力且對目標具選擇性之候選者，因而避免追蹤不佳之前置者。

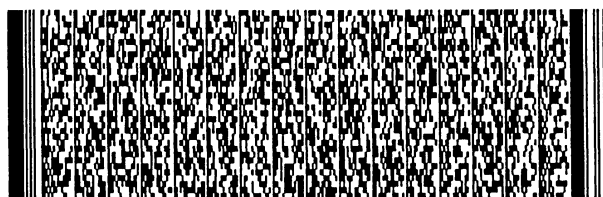
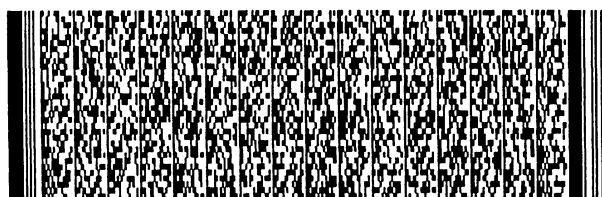


五、發明說明 (11)

就此方面而言，本發明亦係關於一種高通量側錄方法，包含篩選大量化合物有關其與大量目標中之指定目標交互作用的能力。更佳試驗化合物數目為5至500，又更佳5至100，例如5至50種。檢定分析之目標數目較佳高於25種，更佳高於50種。特佳使用高於60如62或73種目標。此等目標之示例說明表列示於表I。化合物之篩選通常係經由培育各化合物與各目標，接著決定交互作用(例如結合)進行。此種篩選例如可於微力價平板進行，因而僅可能於有限時間內進行多次篩選。就此方面而言，本發明描述一種機械人系統，允許快速進行篩選，此種機械人系統可自動化配送化合物於平板，接著測定化合物抑制配合基結合至目標之能力。為了進行此種方法，平板通常包含目標塗布於其表面及加標記之配合基。如實例所述，此種方法可於相當短時間內測定多種化合物對多種目標(73種)之作用。

本發明也提供改良化合物存庫。特別本發明提供包含複數化合物之焦點存庫，其中該等化合物具有結構多樣性且係衍生自可選擇性結合至一個共通預定目標之化合物。雖然先前技術之焦點存庫主要包含衍生自可結合至目標之化合物，但本發明提供更為明確界定之存庫，其包含衍生自不僅有能力結合至目標同時也對該目標具有特異性之入選者。如此，此等存庫比較先前存庫之焦點更集中，且可用作藥物發現計畫之化合物來源。本文中，"衍生"一詞表示根據業界已知方法藉由組合化學方法基於入選者結構獲得。

下列實例將揭示本發明之進一步細節，但此等實例僅供



五、發明說明 (12)

舉例說明之用而非限制本發明之範圍。

圖說

圖1：傳統藥物發現方法。

圖2：本發明之藥物發現方法。

圖3：本發明之藥物發現方法。

圖4：經選定之入選者對大鼠 μ 受體之IC50之測定。

參考化合物：DAGO。

圖5：12種前置者之結構式。

圖6：選定之入選者對人類 μ 受體之親和力之測定。

圖7：選定之入選者之HTP資料。由親和力研究選出之化合物對多重目標進行試驗。目標身分敘述於表I。各例中效果係以灰色強度表示，白色為無活性，黑色為最大效果。圖底報告表IV所得資料，亦即化合物對鴉片劑受體之親和力值。

圖8：功能檢定分析：天竺鼠迴腸收縮受選定之前置者之抑制之測定。

實例

實例1：對鴉片劑 μ 受體之入選者之選擇

使用傳統結合檢定分析系統於得自大鼠來源之鴉片劑 μ 受體模式中設計、合成及篩選10,000種化合物存庫。特別，化合物係於溶液以 10^{-5} M濃度於 $[^3\text{H}]$ DAMGO作為放射性配合基存在下對大鼠腦皮質均化物進行試驗。藉液體閃爍法於與拿洛松(naloxone)競爭下決定特異性結合作用。

初步篩選獲得無數入選者(圖4)：180種化合物抑制放射性配合基特異性結合至 μ 受體大於50%。111種抑制大於



五、發明說明 (13)

60%，及42種大於70%。為了獲得具有高強度活性化合物，最末42種化合物用於進一步步驟。

42種化合物之結構式經過分析。

42種化合物中，24種由於化學結構式（亦即與產業應用不相配）而被捨棄及18種被保留進行進一步分析。

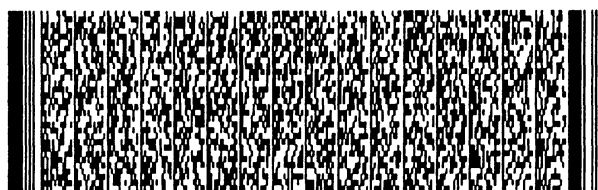
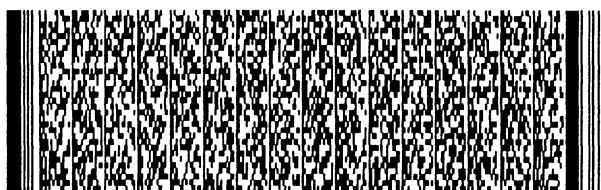
其中一種化合物（CER680827）於大鼠 μ 檢定分析證實不具有活性。其餘17種化合物再根據業界已知方法合成，純化，及於人類 μ ， δ 及 κ 受體結合檢定分析測量親和力。

如表II所示，證實5種化合物無活性（CER680435，CER728422，CER728428，CER829741，CER838941）可能原因為初步篩選所見效果可能來自於副產物（初步篩選係以未純化化合物進行）或因此等化合物之物種選擇性（初步篩選係使用大鼠受體進行，而親和力係使用人受體測定）。

但12種入選者對 μ 受體具有預期親和力，其中僅有一種（CER798967）對 δ 受體比對 μ 受體之活性更高。此12種化合物之結構式顯示於圖5。資料摘述於圖6及表IV。

然後此12種化合物於HTP系統試驗，亦即其選擇性側錄係如表I所述使用62種受體測定。用於該用途，10 μ M 各化合物係於表I所示先前塗布以目標之微力價平板於對各該目標具有特異性之加標記之參考配合基存在下培育。各化合物重複進行試驗。

所得結果摘述於圖7。HTP獲得寶貴的資訊，原因為其允許顯示已經基於對鴉片劑受體之相對親和力選擇之化合物中若干者證實對多種不相關目標具有活性。因此，此等化合物由於非特異性故被拋棄。



五、發明說明 (14)

組合強度(入選者對 μ 受體及其它雅片劑受體之親和力)及選擇性標準選出4種化合物(前置者)作為前置者最佳化過程之後續追蹤之候選者。此等化合物為CER704252, CER704261, CER704889及CER701830。

此外,為了證實根據本發明所得前置化合物之功能,各該化合物試驗其抑制天竺鼠迴腸收縮能力如下:

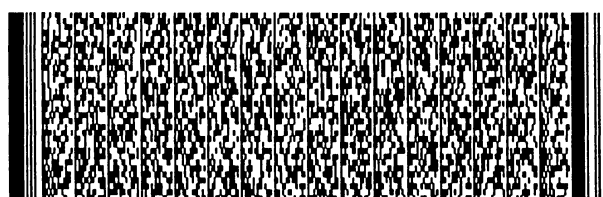
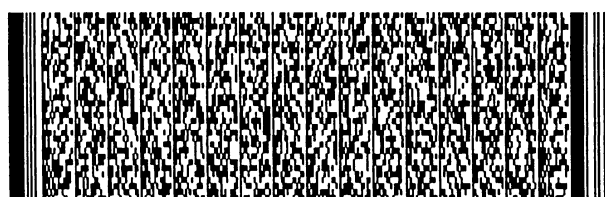
實驗程序:

迴腸段係得自體重300-350克之雄鄧肯哈特利天竺鼠。組織懸掛於兩根不鏽鋼鉤間置於含氧合且預溫熱生理鹽水之器官浴中,於此處聯結至力-位移轉換器進行等角張力測量。藉多通道穩定電流刺激器介於二鉑電極間輸送電場電磁極(單一脈衝,1毫秒時間,最大強度0.1赫茲)誘發抽搐收縮。組織被拉張至最佳靜止張力,然後任其平衡至少30分鐘,其間重複洗滌。抽搐收縮後加入藥物可再現該抽搐收縮幅度。

促效劑活性試驗:

組織最初曝露於有效濃度參考促效劑DAMGO而證實組織具有反應性。於洗滌及另一次平衡時間後,組織曝露於數種更高濃度試驗化合物或相同促效劑。不同濃度係累進增加,且保持接觸組織至獲得穩定反應為止。當獲得類似促效劑反應(抑制抽搐收縮)時,隨後加入參考拮抗劑拿洛松,並於此反應檢視牽涉 μ 受體之最高濃度試驗化合物之作用。

圖8所示結果證實選用之前置者可抑制天竺鼠迴腸收縮,其進一步驗證本發明方法之可信度。



五、發明說明 (15)

此第一週期前置者最適化步驟耗時6週(合成, 初步篩選, 確證, 對鴉片劑受體親和力及HTP)而可縮短為3週, 亦即藉由縮短HTP之週轉時間可縮短為3週。如此導致更快速更可靠地發現前置者, 換言之可避免後續追蹤不佳的前置候選者。



五、發明說明 (16)

表 I：HTP 系統包括之檢定分析表

高通量側錄 (HTP)

非肽類	GABA	血清素激性	生長因子
腺苷	組織胺	5-HT1A(h)	PDGF
A1(h)	H1	5-HT1B	IL-1(h)
A2a(h)	H2	5-HT2A(h)	TFN
A3(h)	褪黑激素 ML1	5-HT2C(h)	神經激素
腎上腺激性	萆毒鹼	5-HT3	NK1(h)
$\alpha 1$	M1(h)	5-HT5a(h)	NK2(h)
$\alpha 2$	M2(h)	5-HT6(h)	NK3(h)
$\beta 1$ (h)	M3(h)	5-HT7(h)	神經肽 Y
$\beta 2$ (h)	M4(h)	肽類	Y1(h)
NE 攝取	M5(h)	血管緊張肽素-II	Y2(h)
苯并二氮雜草	鴉片劑	AT-1(h)	神經緊張肽素
BZDc	δ	AT-2(h)	生長靜止素
BZDp	κ	Bombesin	VIP
Cannabinoid	μ	緩動激素	後葉加壓素
CB1(h)	Phencyclidine	CGRP	V1a(h)
CB2(h)			V2
多巴胺	類前列腺素	膽囊激素	離子通道
D1(h)	TXA2(h)	CCK-A(h)	鈣通道(L)
D2(h)	PGI2(h)	CCK-B(h)	鉀通道
D3(h)	嘌呤激性	內皮肽素	伏特-dpdt
D4(h)	P2X	ET-A(h)	鈣-dpdt
D5(h)	P2Y	ET-B(h)	鈉通道
攝取	σ	虱激素	位置 1
			位置 2
			氯離子基團
其他：			
ANP	Orphanin	PACAP	化學激素
	ORL1		CCR1



五、發明說明 (17)

表 II：含括於 HTP 系統之酶清單

族	名稱
磷酸二酯酶類	PDE II (h)
	PDE IV (h)
蛋白質激酶類	MAP 激酶(h)
	PKc
酪胺酸激酶類	EGF-tyr 激酶(h)
	p56-tyr 激酶
蛋白解酶類	血管緊張肽素轉化酶(ACE)(h)
	組織蛋白酶 B(h)
	彈力蛋白酶(h)

(h)表示該檢定分析係使用人類來源之酶進行



五、發明說明 (18)

表 III：HTP 系統之典型檢定分析表

受體偶合蛋白質 G

受體非肽類

腺苷

A₁(h)

腎上腺激性

 α_1 α_2 β_1 β_2

多巴胺

D₁(h)D₂(h)

組織胺

H₁

褪黑激素

ML₁

萆毒鹼

M₁(h)M₃(h)

鴉片劑

 μ (h)

血清素

5-HT_{1A}(h)5-HT_{1D}5-HT_{2C}(h)5-HT₆(h) σ σ_1

受體肽類

血管緊張肽素

AT₁(h)

Bombesin

BB

緩動激素

B₂

CGRP

CGRP(h)

膽囊激素

CCK_A(h)

五、發明說明 (19)

化學激素及細胞激素	LL-L β
	CCR ₂ (h)
內肽素	BTA(h)
虱激素	虱激素(h)
肝糖類肽	GLP-1(h)
神經激素	NK ₁ (h)
神經肽 Y	Y ₁ (h)
後葉加壓素	V _{1A} (h)
受體偶合離子通道	
苯并二氮雜草中心	BZD _C
血清素	5-HT ₃
運輸者	
新腎上腺素	NE 攝取(h)
多巴胺	DA 攝取(h)
血清素	5-HT 攝取
離子通道	
鈣通道	Ca(verapmil)
鉀通道	K(ATP 依賴型)
鈉通道	Na(位置 2)
氯通道	Cl 離子基團
酶	
磷酸二酯酶類	PDE II(h)
	PDE IV(h)



五、發明說明 (20)

蛋白質激酶類

MAP 激酶(h)

PK_C

酪胺酸激酶類

EGF-tyr 激酶(h)

p56-tyr 激酶

蛋白解酶類

血管緊張肽素轉化酶(ACE)(h)

組織蛋白酶 B(h)

彈力蛋白酶(h)

基於細胞之檢定分析

細胞激素

人類單核細胞之 TNF- α 之分泌

自由基

人類顆粒細胞(HL-60)之 O₂之分泌

黏著

人類單核細胞(U937)對人類內皮細胞

細胞毒性

人類單核細胞

(h：試驗係對人類蛋白質進行)



五、發明說明 (21)

表 IV：入選者對鴉片受體之親和力

化合物	μ	δ	κ	化合物	μ	δ	κ
CER680435	-	-	-	CER710830	328	7300	-
CER680827	-	-	-	CER728422	-	-	-
CER703950	1300	3300	3600	CER728428	-	-	-
CER704252	632	-	-	CER812221	2500	4800	4700
CER704261	257	-	-	CER829741	-	8400	-
CER704478	364	2400	-	CER838941	-	-	-
CER704889	53	1700	-	CER833240	1200	3600	-
CER709929	626	2500	10000	CER703696	512	1400	744
CER710110	1100	-	-	CER798967	640	400	1500

化合物之親和力係以nM表示。符號"- "指示於試驗濃度範圍(0.1至10,000 nM)不存在有效果。



圖式簡單說明



四、中文發明摘要 (發明之名稱：用於自化合物存庫識別前置者之高通量篩選方法及自化合物存庫識別活性化合物之方法)

本發明係關於由存庫選擇前置者(leads)或活性化合物之方法。特別，本發明提供選擇對預定目標(target)具有活性及選擇性之前置者或化合物之方法。特別，本發明提供一種由化合物存庫識別前置者之篩選方法，該方法包含下列步驟：

(a) 篩選對預定目標具有活性之化合物存庫而獲得強力入選者(hits)；

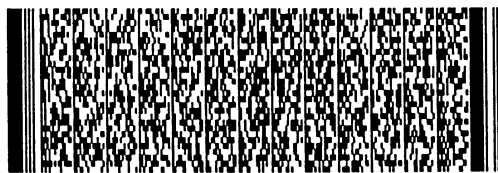
(b) 側錄(profiling)步驟(a)之強力入選者而獲得強力選擇性前置者。

本發明例如可用於藥物發現方法。

英文發明摘要 (發明之名稱：HIGH THROUGHPUT SCREENING METHOD FOR THE IDENTIFICATION OF LEADS FROM A LIBRARY OF COMPOUNDS AND METHOD OF IDENTIFICATION OF ACTIVE COMPOUNDS FROM A LIBRARY OF COMPOUNDS)

The invention relates to methods of selection of leads or active compounds from libraries. More specifically, the invention provides methods of selection of leads or compounds which are active and selective towards a desired target. In particular, the invention provides a screening method for the identification of leads from a library of compounds, said method comprising the steps of:

(a) screening a library of compounds for



四、中文發明摘要 (發明之名稱：用於自化合物存庫識別前置者之高通量篩選方法及自化合物存庫識別活性化合物之方法)

英文發明摘要 (發明之名稱：HIGH THROUGHPUT SCREENING METHOD FOR THE IDENTIFICATION OF LEADS FROM A LIBRARY OF COMPOUNDS AND METHOD OF IDENTIFICATION OF ACTIVE COMPOUNDS FROM A LIBRARY OF COMPOUNDS)

activity against a desired target, to obtain potent hits ;

(b) profiling the potent hits of step (a) to obtain potent and selective leads.

The instant invention can be used for instance in drug discovery processes.



六、申請專利範圍

1. 一種高通量篩選方法，其係用於由一化合物存庫識別前置者(leads)，該方法包含下列步驟：

(a) 篩選一化合物存庫有關其可結合預定目標或調節預定目標(target)：其中該篩選係由分別於一容器中混合該化合物及該目標及利用酵素性方法進行，螢光為基底之方法或放射性分析偵測該目標之結合或其活性，該目標係選自受體、蛋白質、受體之一部份、抗體、配位基、傳染性顆粒、黴菌及核酸，以得到可結合至目標或調節目目標活性之強力入選者；及

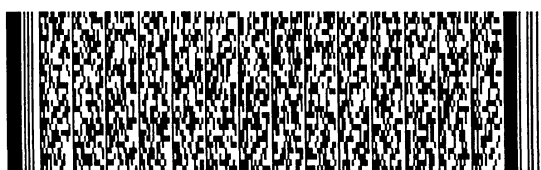
(b) 偵測步驟(a)中可結合至超過25個目標或調節超過25個目標活性之能力之所有強力入選者，該目標係選自至少：

- 非肽類G偶合受體，
- 肽類G偶合受體，
- 離子通路偶合受體；及
- 離子通路，

其係藉由於一容器中混合該化合物及該目標及利用酵素性方法進行，螢光為基底之方法或放射性分析偵測該目標之結合或其活性，及

(c) 選擇步驟(b)中具有可結合或調節步驟(a)之所欲目標之能力且不與步驟(b)中任何其他目標或僅與其中少數交互作用或與其他目標極少交互作用之強力入選者。

2. 一種由一化合物存庫識別活性化合物之方法，該方法包含：



六、申請專利範圍

(i) 高通量篩選包含下列步驟：

(a) 篩選一化合物存庫中可與預定目標互相作用者，其中該篩選係由分別於一容器中混合該化合物及該目標及利用酵素性方法進行，螢光為基底之方法或放射性分析偵測該目標之結合或其活性，該目標係選自受體、蛋白質、受體之一部份、抗體、配位基、傳染性顆粒、黴菌及核酸，以得到可結合至目標或調節目目標活性之強力入選者；及

(b) 偵測步驟(a)中所有強力入選者結合至超過25個目標或調節超過25個目標活性之能力，該目標係選自至少：

- 非肽類G偶合受體，
- 肽類G偶合受體，
- 離子通路偶合受體；及
- 離子通路，

其係藉由於一容器中混合該化合物及該目標及利用酵素性方法進行，螢光為基底之方法或放射性分析偵測該目標之結合或其活性，及

(c) 製備結構上與步驟(b)前置者相關之化合物之焦點存庫，其係藉將前置者分子特徵化，以決定其組成區塊，叢集具有共通結構特徵之前置者及利用最常見區塊及其類似物進行分子模式化；

(ii) 使用步驟(c)之焦點存庫重複步驟(i)一次或數次而產生進一步焦點存庫，及

(iii) 篩選及側錄步驟(ii)之焦點存庫而獲得可對抗



六、申請專利範圍

該目標活性之特定化合物。

3. 如申請專利範圍第2項之方法，其中該步驟(a)之篩選進一步包含測量可結合至預定目標之化合物之親和力，俾選擇具有最佳親和力之化合物作為強力入選者。

4. 如申請專利範圍第1或2項之方法，其中該側錄步驟(b)包含檢定分析強力入選者對多種目標之作用及選擇對預定目標具特異性之化合物。

5. 如申請專利範圍第4項之方法，其中該側錄步驟(b)包含檢定分析強力入選者對於超過50種目標之作用。

6. 如申請專利範圍第3項之方法，其中該側錄步驟(b)包含檢定分析強力入選者對於超過70種目標之作用。

7. 如申請專利範圍第1項之方法，其中於步驟(b)中側錄5至500種強力入選者。

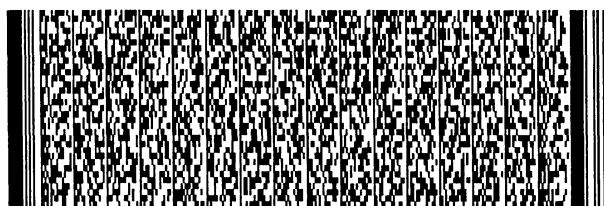
8. 如申請專利範圍第1或2項之方法，其中該化合物存庫包含5,000至500,000種化合物。

9. 如申請專利範圍第6項之方法，其中該化合物存庫包含10,000至20,000種化合物。

10. 如申請專利範圍第2項之方法，其中該活性化合物為藥物候選者。

11. 如申請專利範圍第2項之方法，其中該活性化合物為受體配合基。

12. 根據申請專利範圍第1或2項之方法，其中該步驟(a)之篩選包括選擇可結合至受體之化合物，其係藉由測量其抑制該受體之特異標籤化配位基之結合。



六、申請專利範圍

13. 根據申請專利範圍第1或2項之方法，其中該步驟(a)之篩選包括選擇可結合至受體之化合物，其係藉由測量其修飾酵素活性之能力。

14. 如申請專利範圍第1或2項之方法，其中該步驟(b)包括偵測步驟(a)中所有強力入選者結合至受體之能力，該受體選自至少：

- 非肽類G偶合受體，包括腺受體，腎上腺激性受體、多巴胺受體、組織胺受體、褪黑激素受體、萆毒鹼受體及 σ 受體；

- 肽類G偶合受體，包括血管緊張肽素受體、蛙皮素受體、緩動激素受體、膽囊激素受體、化學激素受體、內皮肽素受體、虱激素受體、神經激素受體、神經肽Y受體及後葉加壓素受體；

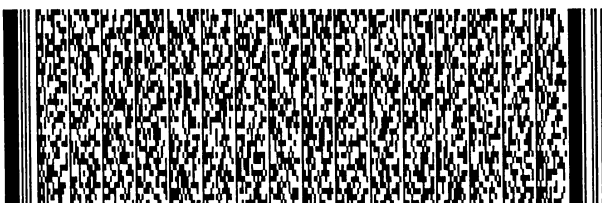
- 離子通道偶合受體，包括血清激素受體；及

- 離子通道，包括鈣通道及鉀通道。

15. 根據申請專利範圍第1或2項之方法，其中該步驟(b)包括至少偵測步驟(a)中所有強力入選者結合至如下所列目標或調節如下所列目標之活性：

高通量側錄(HTP)

非肽類	GABA	血清素激性	生長因子
腺苷	組織胺	5-HT1A(h)	PDGF
A1(h)	H1	5-HT1B	IL-1(h)
A2a(h)	H2	5-HT2A(h)	TFN
A3(h)	褪黑激素 ML1	5-HT2C(h)	神經激素
腎上腺激性	萆毒鹼	5-HT3	NK1(h)
$\alpha 1$	M1(h)	5-HT5a(h)	NK2(h)
$\alpha 2$	M2(h)	5-HT6(h)	NK3(h)
$\beta 1$ (h)	M3(h)	5-HT7(h)	神經肽 Y



六、申請專利範圍

$\beta 2(h)$	M4(h)	肽類	Y1(h)
NE 攝取	M5(h)	血管緊張肽素-II	Y2(h)
苯并二氮雜草	鴉片劑	AT-1(h)	神經緊張肽素
BZDc	δ	AT-2(h)	生長靜止素
BZDp	κ	Bombesin	VIP
Cannabinoid	μ	緩動激素	後葉加壓素
CB1(h)	Phencyclidine	CGRP	V1a(h)
CB2(h)			V2
多巴胺	類前列腺素	膽囊激素	離子通道
D1(h)	TXA2(h)	CCK-A(h)	鈣通道(L)
D2(h)	PGI2(h)	CCK-B(h)	鉀通道
D3(h)	嘌呤激性	內皮肽素	伏特-dpdt
D4(h)	P2X	ET-A(h)	鈣-dpdt
D5(h)	P2Y	ET-B(h)	鈉通道
攝取	σ	甾激素	位置 1
			位置 2
			氯離子基團
<u>其他：</u>			
ANP	Orphanin	PACAP	化學激素
	ORL1		CCR1

16. 根據申請專利範圍第1或2項之方法，其中該容器為



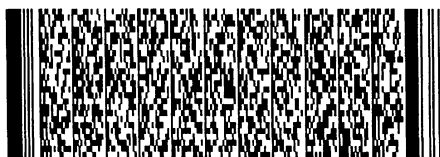
六、申請專利範圍

平板。

17. 根據申請專利範圍第16項之方法，其中該平板係為微滴孔平板。

18. 根據申請專利範圍第17項之方法，其中該微滴孔平板為96孔平板，以及具有較高孔數之平板。

19. 根據申請專利範圍第18項之方法，其中之孔數係為384、864、1536或更多。



圖式

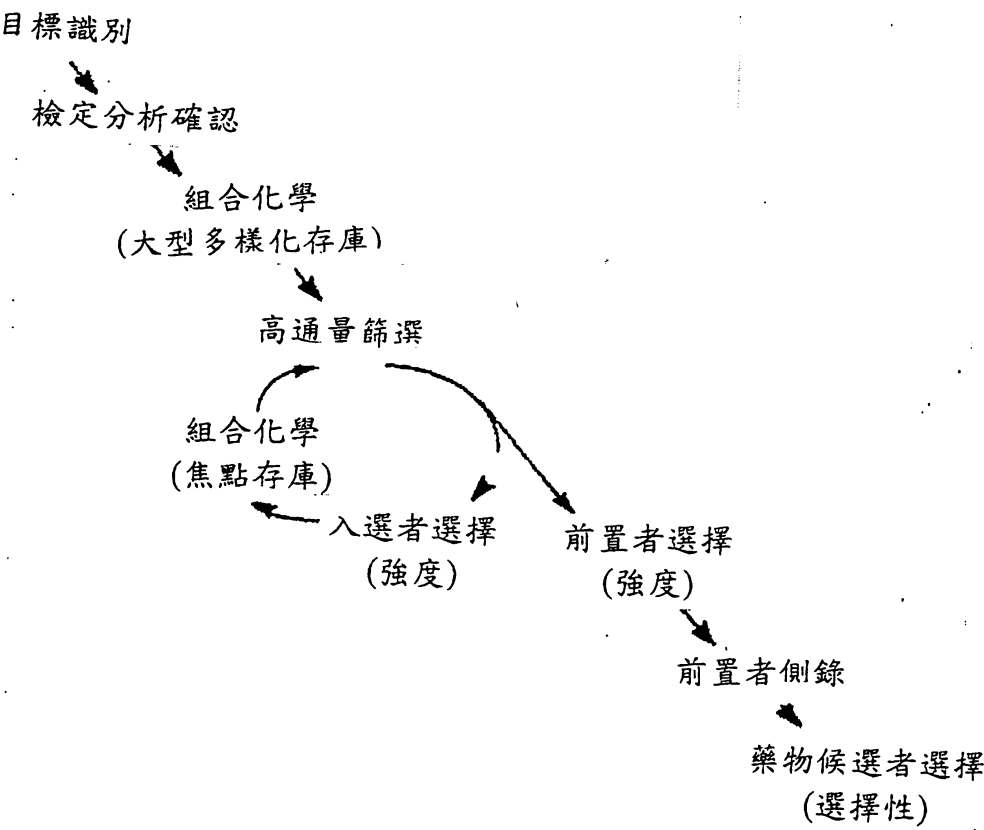


圖 1

圖式

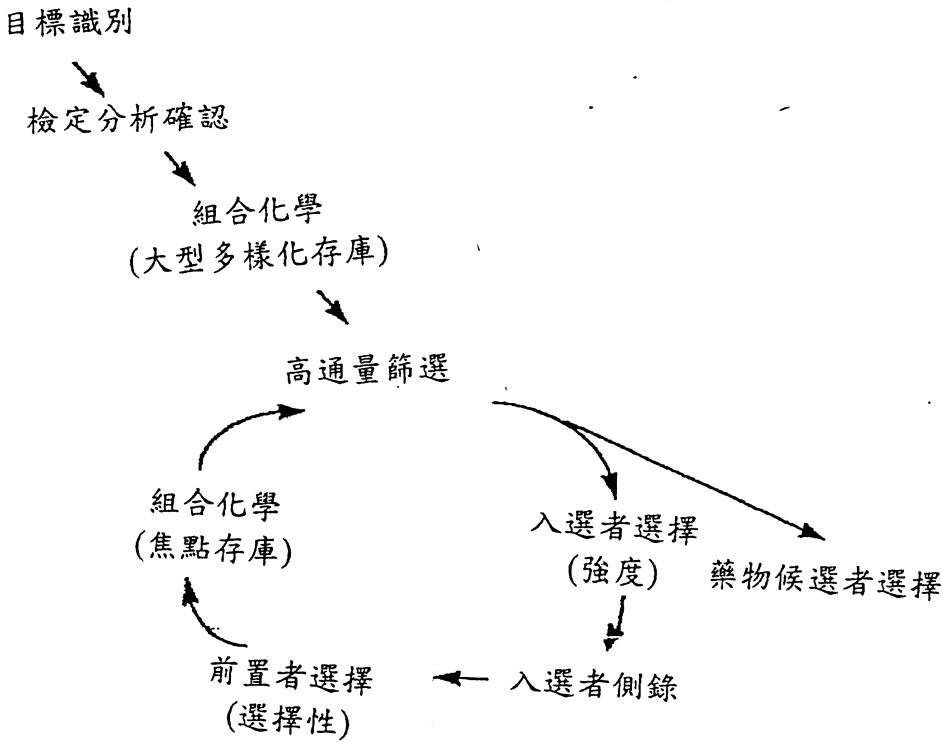


圖 2

圖式

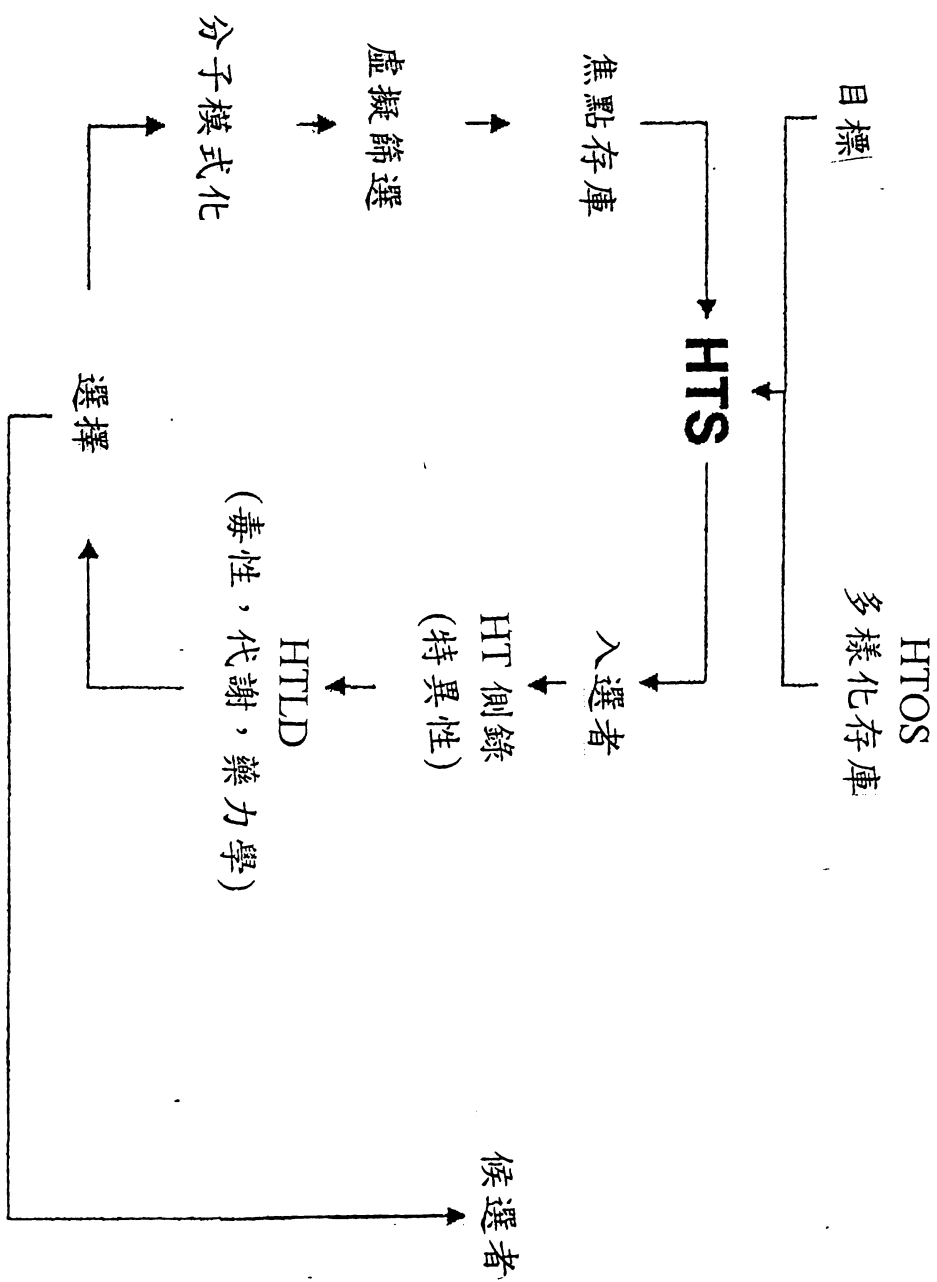
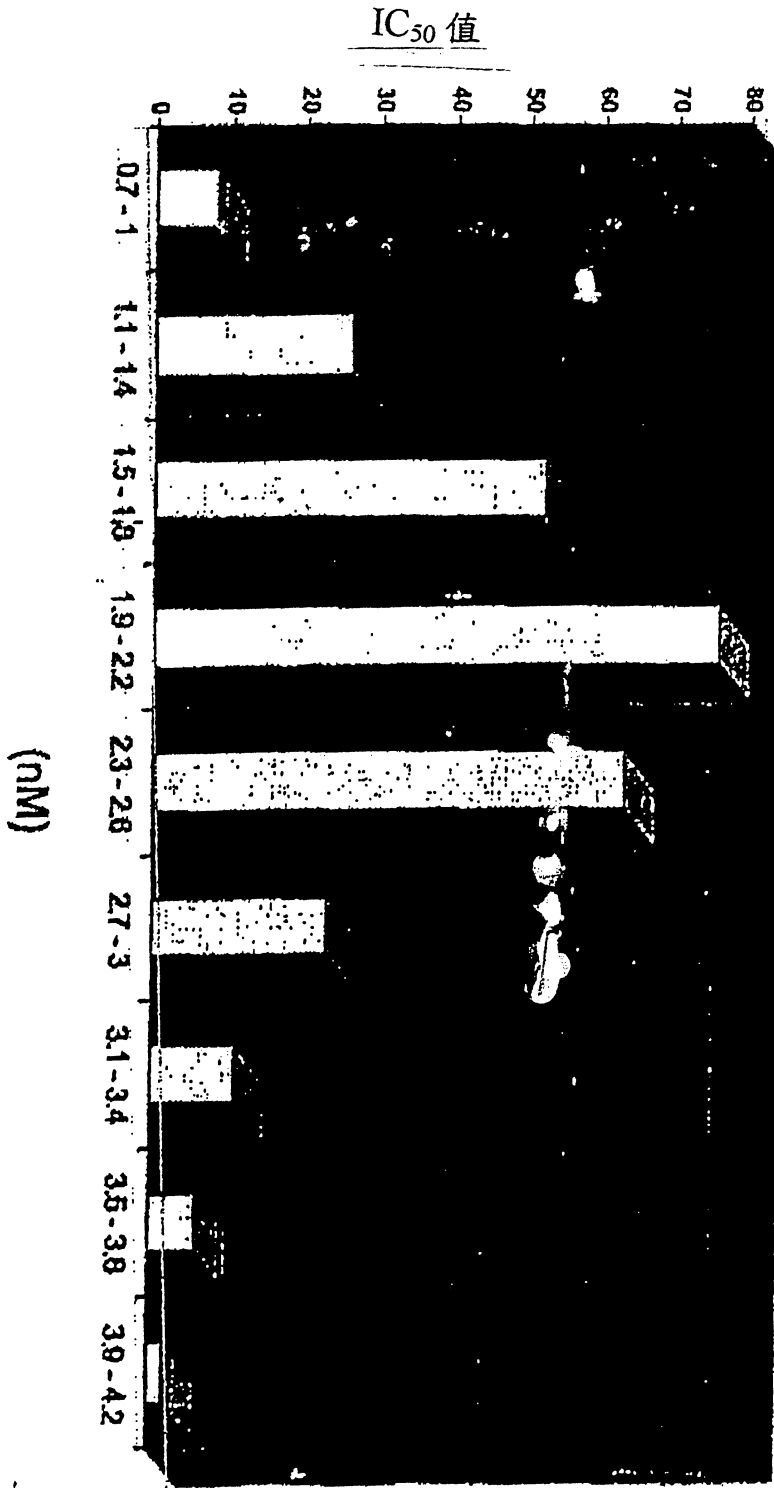


圖 3



圖式

圖 4



圖式

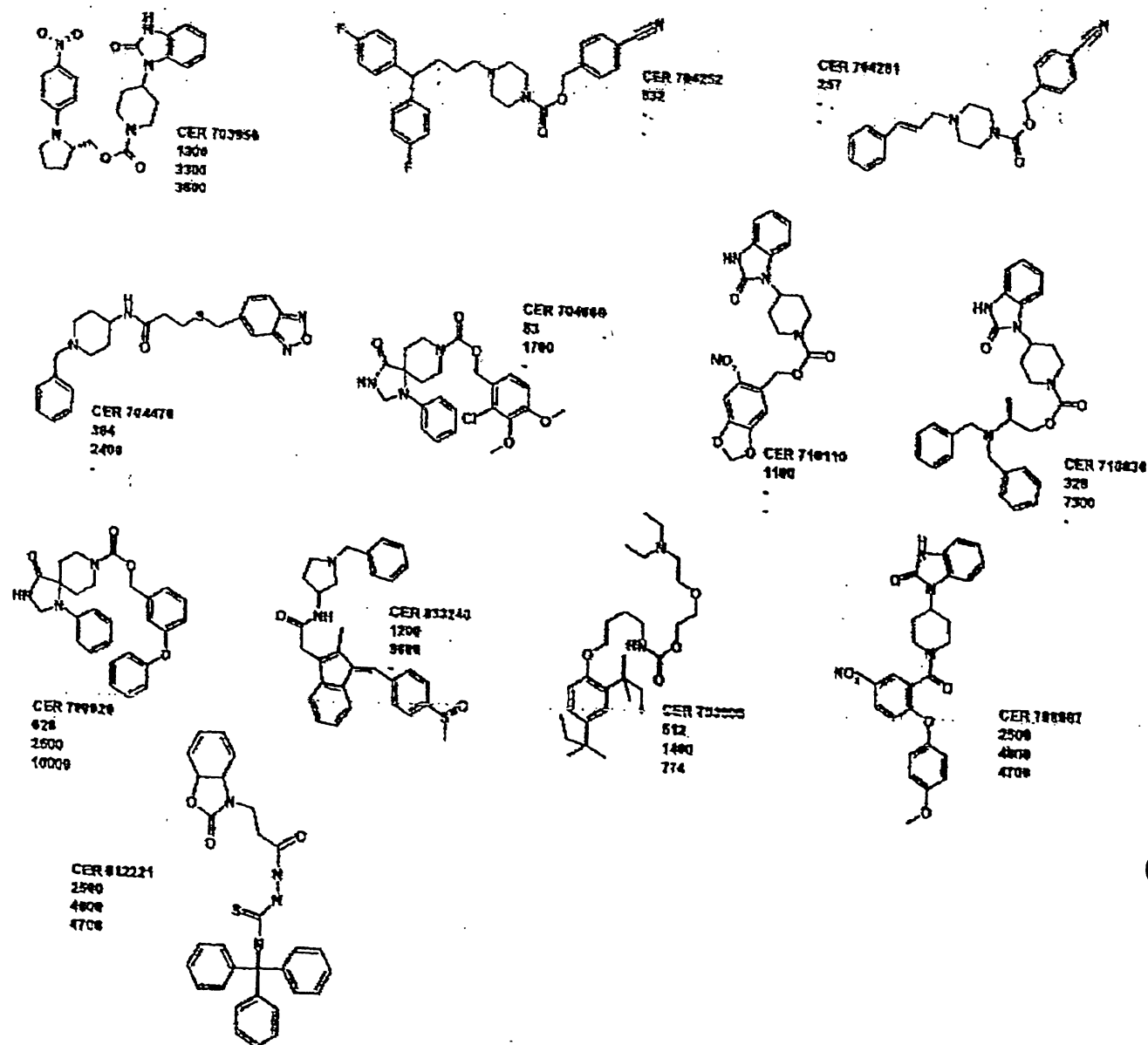


圖 5

圖式

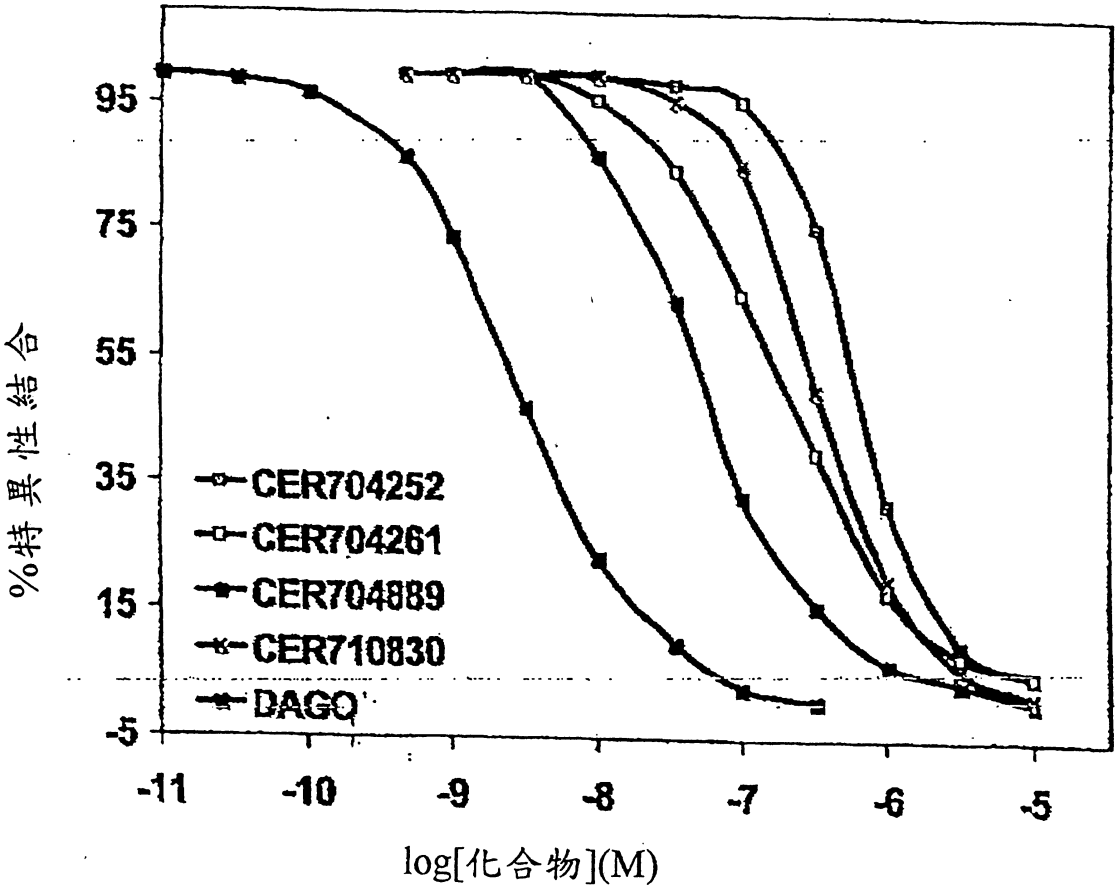


圖 6

圖式

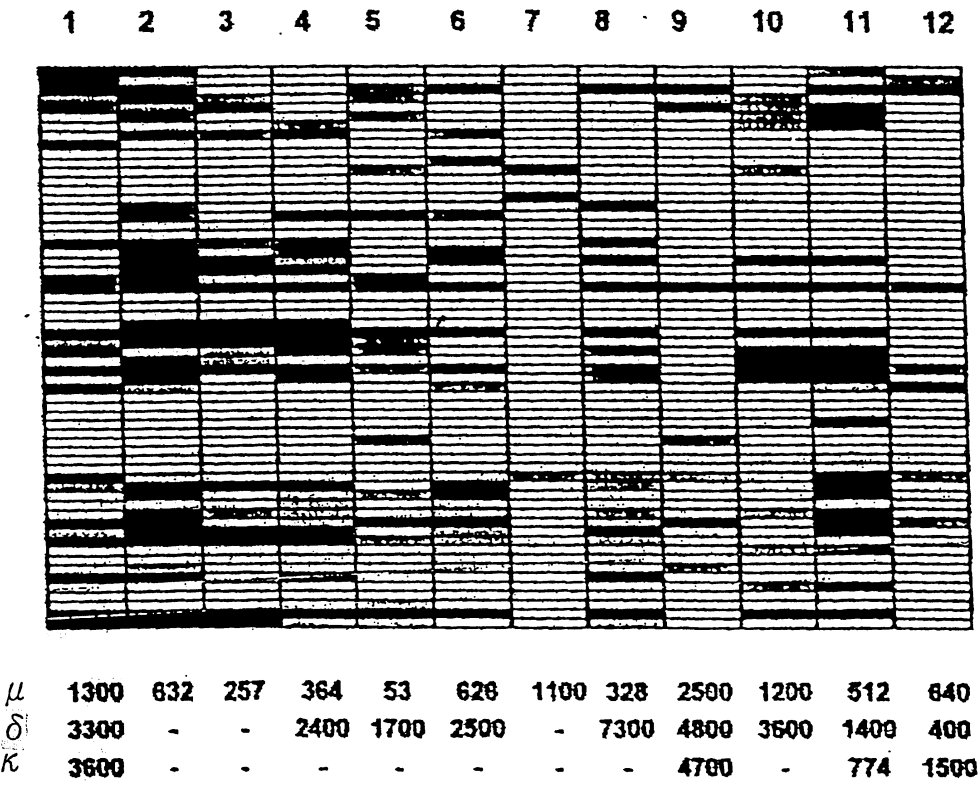


圖 7

圖式

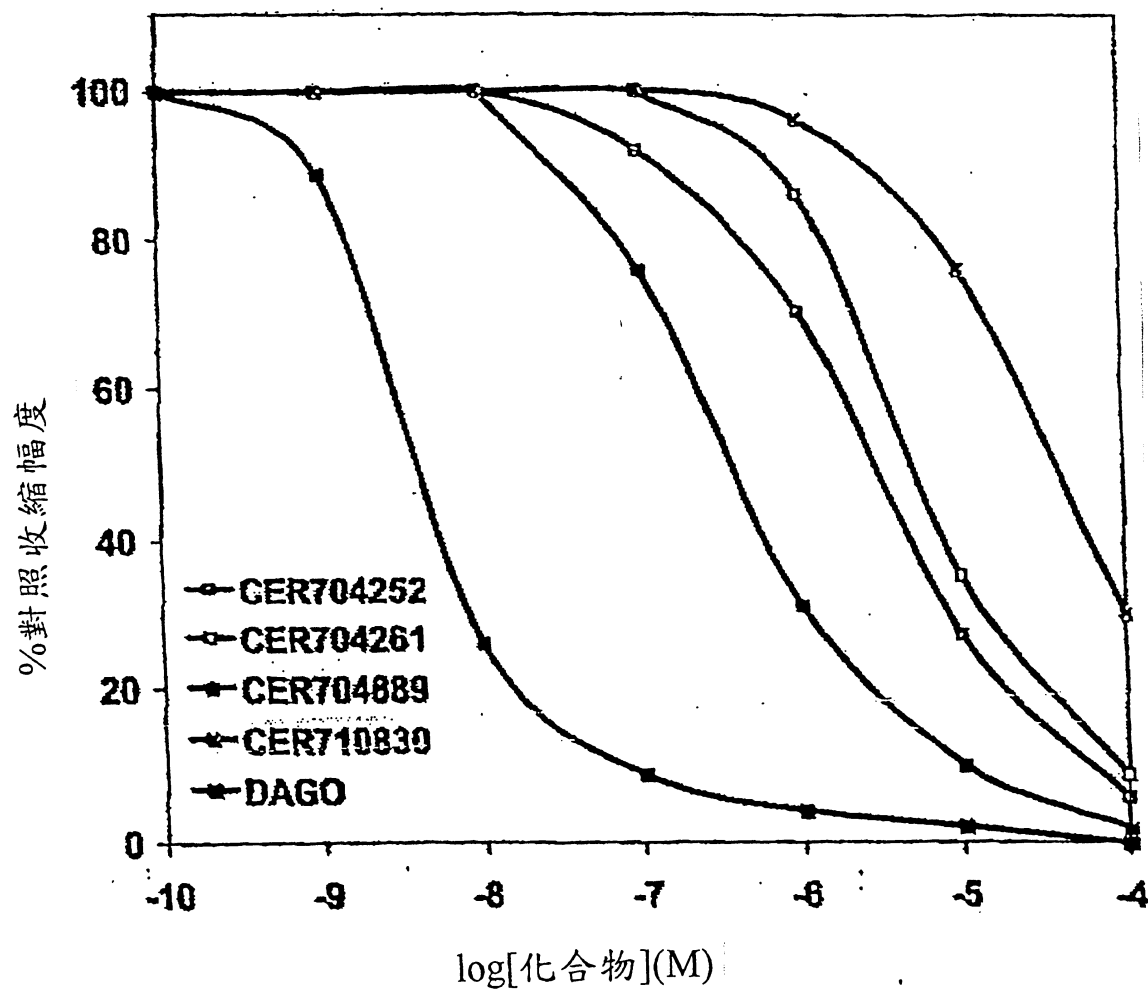


圖 8