

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200580038616.7

[51] Int. Cl.

G01N 33/58 (2006.01)
G01N 33/533 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)
G01N 33/574 (2006.01)

[43] 公开日 2007年10月17日

[11] 公开号 CN 101057146A

[22] 申请日 2005.11.15

[21] 申请号 200580038616.7

[30] 优先权

[32] 2004.11.16 [33] US [31] 60/628,242

[86] 国际申请 PCT/US2005/041766 2005.11.15

[87] 国际公布 WO2006/055753 英 2006.5.26

[85] 进入国家阶段日期 2007.5.11

[71] 申请人 贝林格尔·英格海姆药物公司

地址 美国康涅狄格州

[72] 发明人 E·迈克尔·奥古斯特

丹尼尔·拉乔特

[74] 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

代理人 张平元 赵仁临

权利要求书 2 页 说明书 13 页 序列表 4 页

[54] 发明名称

用于测定组氨酸脱羧酶活性的荧光极化测定

[57] 摘要

用于测定候选化合物的 HDC 调节活性的荧光极化测定方法，包括下述步骤：a) 提供反应混合物，包括 HDC、组氨酸、荧光标记的组胺探针、候选化合物以及抗组胺抗体，所述的抗组胺抗体对组胺相对于组氨酸的选择性大于至少 10 倍；b) 孵育反应混合物；c) 测定在测试化合物存在下是否发生了 HDC 的抑制，其中荧光极化信号的增加表明测试化合物抑制 HDC 的活性。

1. 用于测定候选化合物的 HDC 调节活性的荧光极化测定方法，包括下述步骤：

a)提供反应混合物，包括 HDC、组氨酸、荧光标记的组胺探针、候选化合物以及抗组胺抗体，所述的抗组胺抗体对组胺的选择性比组氨酸大至少 10 倍；

b)孵育反应混合物；

c)测定在测试化合物存在下是否发生了 HDC 的抑制，其中荧光极化信号的增加表明测试化合物抑制 HDC 的活性。

2. 权利要求 1 的测定方法，其中抗组胺抗体对组胺的选择性比组氨酸大至少 100 倍。

3. 权利要求 1 的荧光极化测定方法，其中反应混合物孵育多于 15 分钟。

4. 权利要求 3 的荧光极化测定方法，其中反应混合物孵育 60 至 120 分钟。

5. 权利要求 4 的荧光极化测定方法，其中反应混合物孵育约 80 至 100 分钟。

6. 权利要求 1 的方法，其中 HDC 为 SEQ ID. No.1 的多肽。

7. 权利要求 1 的方法，其中 HDC 为重组酶。

8. 权利要求 1 的方法，其中 HDC 为部分纯化的。

9. 权利要求 1 的方法，其中组胺探针对抗组胺抗体的亲和力大于 $1\mu\text{m}$ 。

10. 权利要求 1 的方法，其中使用的抗组胺抗体利用通过连接基区域桥连至载体的组胺免疫小鼠产生，并且其中所述的连接基在结构上类似于荧光探针。

11. 权利要求 10 的方法，其中所述的连接基区域为偶联至载体的 1,4-苯醌。

12. 权利要求 10 的方法，其中所述的载体为白蛋白。

13. 权利要求 1 的方法，其中荧光标记的组胺探针选自 FITC、罗丹明、四甲基罗丹明和 Cy5。

14. 权利要求 1 的方法，其中组氨酸浓度介于 $10\mu\text{M}$ 至 5mM 之间。

15. 权利要求 10 的方法，其中组氨酸浓度介于 $100\mu\text{m}$ 和 1mM 之间。

16. 一种作为疾病诊断工具的检测患者样品中 HDC 活性的方法，其中所述的方法包括：

a) 将所述的样品与反应混合物接触，所述的反应混合物包括组氨酸、荧光标记的组胺探针以及抗组胺抗体，所述的抗组胺抗体对组胺的选择性比组氨酸至少大 10 倍；

b) 孵育反应混合物；

c) 测定与对照样品中的 HDC 活性水平相比，患者样品中是否发生 HDC 活性增加，其中相对于对照样品的荧光极化的下降表明患者样品处于所述疾病的风险中。

17. 权利要求 16 的方法，其中使用的抗组胺抗体利用通过连接基区域桥连至载体的组胺免疫小鼠产生，并且其中所述的连接基结构上类似于荧光探针。

18. 权利要求 16 的方法，其中所述的疾病选自癌症、哮喘、肥大细胞瘤、免疫疾病、骨疾病以及胃肠道疾病。

19. 权利要求 18 的方法，其中所述的疾病为癌症。

用于测定组氨酸脱羧酶活性的荧光极化测定

相关申请

本申请要求 2004 年 11 月 16 日提交的美国临时申请 60/628,242 的优先权，其内容这里引入作为参考。

发明背景

1. 技术领域

本发明的领域涉及用于检测 HDC 活性的荧光极化测定方法，可以用于疾病诊断以及确证 HDC 抑制剂。

2. 背景技术

组胺是一种强效生物活性胺，在多种病理以及生理状态中具有活性 (Jutel M, Watanabe T, Akdis M, Blaser K, Akdis CA: Immune regulation by histamine. *Curr. Opin. Immunol* 2002;14:735-740)。除了已经良好表征的对急性炎性以及过敏性反应的活性外，组胺调节抗原-特异免疫反应的多个方面 (Schneider E, Rolli-Derkinderen M, Arock M, Dy M: Trends in histamine research: new functions during immune responses and hematopoiesis. *Trends Immunol* 2002;23:255-263)。最近的发现，例如在免疫活性细胞上发现新的组胺受体(H4)以及 H1 和 H2 受体对 T 辅助细胞极化中作用的证实，引起了人们对组胺触发的免疫调节机制的极大兴趣 (Schneider E, Rolli-Derkinderen M, Arock M, Dy M.; *Trends Immunol.* 2002 May; 23(5): 255-63)。

组氨酸脱羧酶(HDC)是组胺生物合成中的限速酶(Watanabe T, Yamatodani A, Maeyama K, Wada H: Pharmacology of α -fluoromethylhistidine, a specific inhibitor of histidine decarboxylase. *Trends Pharmaceutical Sci* 1990;11:363-367.)。哺乳动物 HDC 是吡哆醛 5-磷酸(PLP)-依赖酶大家族中的成员 (Christen P, Mehta P: From Cofactor to enzymes. The molecular evolution of pyridoxal-5'-phosphate-dependent enzymes. *Chemical Record* 2001; 1:

436-447.)。HDC 在大多数组织中表达但是最高的水平见于皮肤、GI 道以及气道。HDC 是 74 Kd 酶，能转化为更短的 54 Kd 形式(Yatsunami K, Tsuchikawa M, Kamada M, Hori K, Higuchi T: Comparative studies of human recombinant 74- and 54- kDa L-histidine decarboxylase. *J. Biol. Chem.* 1995; 270: 30813-30817)。二种形式在体外都具有活性，但是二者不同时出现在亚细胞室中；74 Kd 形式主要见于内质网中(Tanaka S, Nemoto K, Yamamura E, Ohmura S, Ichikawa A: Degradation of the 74 kDa form of l-histidine decarboxylase via the ubiquitin-proteasome pathway in a rat basophilic/mast cell line (RBL-2H3). *FEBS Letters* 1997; 417:203-207)。

最近得到的 HDC-缺乏小鼠为内源性组胺在广泛的正常以及疾病过程中作用的研究提供了良好的系统(Ohtsu H, Watanabe T: New functions of histamine found in histidine decarboxylase gene knockout mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 443-447)。HDC^{-/-} 小鼠具有下降数目的肥大细胞以及下降的粒状含量如肥大细胞蛋白酶(Ohtsu H, Tanaka S, Terui T, Hori Y, Makabe-Kobayashi Y, Pejler G, Tchougounova E, Hellman L, Gertsenstein M, Hirasawa N, Sakurai E, Buzas E, Kovacs P, Csaba G, Kittel A, Okada M, Hara M, Mar L, Numayama-Tsuruta K, Ishigaki-Suzuki S, Ohuchi K, Ichikawa A, Falus A, Watanabe T, Nagy A: Mice lacking histidine decarboxylase exhibit abnormal mast cells. *FEBS* 2001; 502:53-56.)。这些小鼠显示了下降的气道高反应性(Kozma GT, Losonczy G, Keszei M, Komlosi Z, Buzas E, Pallinger E, Appel J, Szabo T, Magyar P, Falus A, Szalai C: Histamine deficiency in gene-targeted mice strongly reduces antigen-induced airway hyper-responsiveness, eosinophilia and allergen-specific IgE. *International Immunol.* 2003;15:963-973, 下降的血管通透性(Ohtsu 等 Plasma extravasation induced by dietary supplemented histamine in histamine-free mice. *Eur J Immunol.* 2002; 32:1698-708)、下降的皮肤炎症(Ghosh AK, Hirasawa N, Ohtsu H, Watanabe T, Ohuchi K: Defective angiogenesis in the inflammatory granulation tissue in histidine decarboxylase-deficient mice but not in mast cell-deficient mice. *J. Exp. Med.* 2002;195:973-982.)以及增加的骨密度(Fitzpatrick LA, Buzas E, Gagne TJ, Nagy A, Horvath C, Ferencz V, Mester A, Kari B, Ruan M, Falus A, Barsony J. Targeted deletion of histidine decarboxylase gene in mice increases bone

formation and protects against ovariectomy-induced bone loss. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003; 100(10):6027-32)。因此，强效的 HDC 活性抑制剂可能可以用于过敏、炎性、免疫性、骨以及心血管疾病。组胺也已经证实是一些类型的癌症增殖的积极的调节剂(Hegyesi H, Somlai B, Varga VL, Toth G, Kovacs P, Molnar EL, Laszlo V, Karpati S, Rivera E, Falus A, Darvas Z. Suppression of melanoma cell proliferation by histidine decarboxylase specific antisense oligonucleotides. *J Invest Dermatol*. 2001 Jul;117(1):151-3)。

组胺的生物作用已经进行了深入的研究，利用组胺受体特异性激动剂或者拮抗剂的药理学方法。尽管 HDC 在过敏性以及炎性响应中的重要的作用，目前几乎没有该酶的小分子抑制剂。这些抑制剂中的大多数都是通过合理设计策略发现的并且为组氨酸类似物。表征良好的 HDC 抑制剂为不可逆抑制剂 α -氟甲基组氨酸 (Watanabe T, Yamatodani A, Maeyama K, Wada H. Pharmacology of alpha-fluoromethylhistidine, a specific inhibitor of histidine decarboxylase. *Trends Pharmacol Sci*. 1990 11:363-7)。

识别新类型的 HDC 抑制剂的能力受限于缺乏适合用于 HTS 的测定。最常使用用来 HDC 活性的测定基于 o-苯二醛(OPT)方法(Roskoski R, Roskoski LM: A rapid histidine decarboxylase assay. *Analytical Biochem*. 1978;87:293-297)。这种测定对组胺相对于组氨酸不具有选择性并且涉及酶产物与底物的层析分离。另外一种更加敏感的 HDC 测定利用[14C]-标记的组氨酸转化为[14C]-标记的-组胺。然后利用薄层层析分离底物以及产物。组胺 ELISA 试剂盒可以潜在地适于用来测量 HDC 活性。但是，这些测定需要乙酰化步骤(乙酰化的组胺)以实现任何有用的选择性以及灵敏度。此外，这些步骤需要大量的洗涤步骤，而这与 HTS 不符合。

发明概述

用于测定候选化合物的 HDC 调节活性的荧光极化测定方法，包括下述步骤：

a)提供反应混合物，包括 HDC、组氨酸、荧光标记的组胺探针、候选化合物以及抗组胺抗体，所述的抗组胺抗体对组胺相对于组氨酸的选择性大于至少 10 倍；

b)孵育反应混合物；

c)测定在测试化合物存在下是否发生了 HDC 的抑制，其中荧光极化信号的增加表明测试化合物抑制 HDC 的活性。

在本发明的另一实施方案中，抗组胺抗体对组胺相对于组氨酸的选择性大于至少 100 倍。

在本发明的另一实施方案中，孵育反应混合物多于 15 分钟，并且更优选地介于 60 至 120 分钟之间并且最优选地介于约 80 至 100 分钟之间。

在本发明的另一实施方案中，使用人 HDC。

在本发明的另一实施方案中，HDC 为重组酶或者部分纯化的。

在本发明的另一实施方案中，组胺探针对抗组胺抗体的亲和力大于 $1\mu\text{M}$ 。

在本发明的另一实施方案中，使用的抗组胺抗体利用通过连接基区域桥连至载体的组胺通过免疫小鼠产生，并且其中所述的连接基结构上类似于荧光探针。

在本发明的另一实施方案中，连接基区域为 1,4-苯醌并且载体为白蛋白。

在本发明的另一实施方案中，荧光标记的组胺探针选自 FITC、罗丹明、TAMRA 或者 Cy5。

在本发明的另一实施方案中，组氨酸浓度介于 $10\mu\text{M}$ 和 5mM 之间并且更加优选地介于 $100\mu\text{M}$ 和 1mM 之间。

本发明另外一方面提供了一种检测患者样品中 HDC 活性作为诊断疾病的工具的方法，其中所述的方法包括：

a)将所述的样品与反应混合物接触，所述的反应混合物包括 HDC、组氨酸、荧光标记的组胺探针以及抗组胺抗体，所述的抗组胺抗体对组胺的选择性比组氨酸至少大 10 倍；

b)孵育反应混合物；

c)测定与对照样品中的 HDC 活性水平相比，患者样品中是否发生 HDC 活性的增加，其中相对于对照样品的荧光极化信号的下降表明患者样品处于患所述疾病的风险中。

在本发明的另一实施方案中，使用的抗组胺抗体利用通过连接基区域桥连至载体的组胺通过免疫小鼠产生，并且其中所述的连接基结构上类似于组胺-荧光探针。

在本发明的另一实施方案中，所述的疾病选自癌症、哮喘和肥大细胞瘤、免疫疾病以及胃肠道疾病。

附图简述

图 1A 显示了组胺的结构。

图 1B 显示了 N-[3',6'-二羟基-3-氧代螺[异苯并咪喃-1(3H),9'-[9H]口占吨-5(或 6)-基]-N'-[2-(1H-咪唑-4-基)乙基]-2,4-二甲基硫脲，二钠盐(FITC-组胺)探针分子的结构。

图 2 显示了 FITC-组胺与抗-组胺抗体的结合。测定如在方法中所述在 96-孔板中一式两份运行，FITC-组胺浓度为 6nM。这些数据利用 SAS 拟合并且测定的 Kd 值为 3.9nM。

图 3 显示组胺(●)或者组氨酸(□)对结合至抗-组胺抗体的 FITC-组胺的置换。如在方法中所述的，在 96-孔板中进行一式三份测定，利用 6nM FITC-组胺，50nM 抗-组胺抗体以及标示的竞争性配体浓度。

图 4A 显示在不同酶浓度下的 HDC 时间进程。在 384-孔板中的一式三份反应通过加入标示浓度的 HDC 而启动，并且在孵育 0 至 180 分钟的时间点测定荧光极化。探针、底物以及抗体浓度如在标准测定中所述。

图 4B 在 90 分钟时候的 HDC 滴定。测定(384-孔)一式四份的形式进行，利用标示浓度的 HDC 在 37°C 在 Allegro™系统上进行 90 分钟。测定窗定义为在空白(无酶)以及反应孔之间的 mP 差值。

图 5 显示组氨酸甲基酯(A)、 α -氟甲基组氨酸(B)以及二肽组氨酸-苯丙氨酸(C)对 HDC 的抑制。反应利用在方法中描述的标准条件以及标示的抑制剂浓度进行。利用 XLFit4(IDBS 软件)拟合数据得到 IC50 值。误差线显示一式三份测定的平均值 \pm SD。

图 6 显示从单天筛选的 90 块板(384 孔)得到的空白(●)以及阳性对照(□)值的散布图。

发明详述

荧光标记的组胺探针。本发明提供了荧光探针。优选的探针为 FITC-组胺(硫脲，N-[3',6'-二羟基-3-氧代螺[异苯并咪喃-1(3H),9'-[9H]口占吨-5(或 6)-基]-N'-[2-(1H-咪唑-4-基)乙基]-2,4-二甲基，二钠盐)，其从 Molecular Probes

(Eugene, OR)得到。其他的合适的探针包括用罗丹明、TAMRA 或者 Cy5 标记的组胺。

抗组胺抗体。本发明提供了一种使用抗组胺抗体的测定。能够使用的一种合适的单克隆抗体是组胺抗体 D22.12, 能够从 Argene (Varilhes, France) 得到。D22.12 抗体利用偶联至白蛋白的 2-组胺基-1,4-苯醌免疫小鼠而得到 (Guesdon JL, Chevrier D, Mazie JC, David B, Avrameas S: Monoclonal anti-histamine antibody. Preparation, characterization and application to enzyme immunoassay of histamine. *J. Immunol. Methods* 1986; 87:69-78.), 而我们检测的所有其他的抗体利用偶联至白蛋白的组胺或者乙酰化组胺免疫得到。D22.12 对组胺-荧光的高亲和力源自用来得到 D22.12 的免疫原(组胺基苯醌)和组胺-荧光探针之间的结构上的类似性。适用于本发明的其他的抗组胺抗体能够利用也具有与组胺探针结构类似的具有相似连接基的免疫原得到。取决于用作探针的荧光团, 可以使用不同的抗-组胺抗体。

组氨酸能够从 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO)得到。

HDC 酶的来源

a)重组-在本发明的优选的实施方案中, 使用人 HDC 酶。包括可以使用全长蛋白或者截短形式如 53KD 形式, 只要截短形式保持组氨酸脱羧酶活性。优选地, 使用人 HDC 蛋白(SEQ ID. 1)或其片段。HDC 蛋白也可以融合到蛋白标记物上, 如谷胱甘肽 S-转移酶(GST)以有利于纯化。

b)纯化-本发明的方法可以利用纯化的 HDC 酶实施。如这里所述, 术语部分纯化包括已经部分纯化的 HDC 酶以使其含量高于可以见于人体细胞的 HDC 酶。HDC 的纯化方法是本领域公知的, 并且得到 Watabe A, Fukui T, Ohmori E, Ichikawa A: Purification and properties of L-histidine decarboxylase from mouse stomach. *Biochem. Pharmacol.* 1992;43:587-593 的教导, 其内容这里引入作为参考。

用于检测抑制剂的测定

在标准的测定中，在 HDC 缓冲液中稀释的 HDC(所述的缓冲液包含还原剂如 DTT 和酶辅因子 PLP)，加入到样品板中。将在 HDC 缓冲液中的测试化合物以及合适量的 DMSO 或者单独的缓冲液加入到板中。荧光标记的-组胺和组氨酸在 FP 缓冲液中混合并且以 10 μ L 转移到板中。最终，将 90 nM 抗-组胺抗体加入到 20 μ L 的 FP 缓冲液中。因此，在测定中的最终浓度为：HDC 25 至 50nM，FITC-组氨酸 3 至 6nM，组氨酸 300 至 600 μ M，抗-组胺抗体 25 至 50nM，以及 DMSO 1 至 5%。然后将板在 37 $^{\circ}$ C 孵育至少 15 分钟。在获取荧光极化的合适的仪器上读数荧光极化信号，如 LJI Analyst(Molecular Devices, Sunnyvale, CA)，激发波长 485nm，发射波长 530nm，荧光分色镜在 505nm 并且 G 系数设定为 1。荧光信号的下降为测试化合物抑制 HDC 活性的表征。

用于检测候选抑制剂的步骤的改良-参数的优化

本发明提供了一种 HDC 测定，用于测定候选化合物的 HDC 调节活性以及一种用于测定患者样品中的 HDC 水平的诊断方法。可以预期本领域的普通技术人员可以实施本发明，通过改变许多参数以使测定适于自身的使用。可以改变的一些参数包括：抗-组胺抗体浓度、底物组氨酸的浓度、探针浓度、HDC 酶的来源以及浓度、测试化合物浓度、加入组分的顺序、单个成分的体积、反应的总体积、反应之前的 HDC 与测试化合物的预孵育步骤的加入、反应的持续时间、反应的温度、测定板的类型、冷却或者加热步骤、终止酶反应的加入步骤(例如：酸、碱、盐、已知的 HDC 抑制剂或者其他)、用来读取荧光极化信号的仪器类型以及相关的参数。

荧光探针对其受体靶分子的选择性

在本发明的一个实施方案中，抗-组胺抗体对组胺的选择性相对于组氨酸大于 100X。合适的候选抑制剂预期 IC₅₀<10 μ M。

诊断疾病的标准测定

从正常或者疾病样品中提取以及制备组织或者血清以测定 HDC 活性的方法是本领域中公知的。例如：(1) 1- Sieja K, Stanosz S, von Mach-Szczypinski J, Olewniczak S, Stanosz M. Concentration of histamine in

serum and tissues of the primary ductal breast cancers in women. *Breast*. 2005 Jun;14(3):236-41; (2)E. Masini,V. Fabbroni, L. Giannini,A.Vannaccil, L.Messerini, F. Perna, C. Cortesini and F. Cianchi Histamine and histidine decarboxylase up-regulation in colorectal cancer: correlation with tumor stage *Inflamm. res.* 54, *Supplement 1* (2005)S80–S81; (3)3- Fogel WA, Dudkowska M, Wagner W, Grzelakowska-Sztabert B, Manteuffel-Cymborowska M.Ornithine and histidine decarboxylase: activities in hypertrophic and hyperplastic mouse kidney. *Inflamm Res.* 2005 Apr; 54 Suppl 1:S62-3.

这些方法可以适用于制备样品以用于在这里描述的荧光HDC测定中的检测。我们的方法容许高通量测定正常靶或者疾病组织或者血浆或者血液样品中的HDC活性。

实施例

试剂

FITC-组胺(硫脲, N-[3',6'-二羟基-3-氧代螺[异苯并咪唑-1(3H),9'-[9H]口占吨-5(或6)-基]-N'-[2-(1H-咪唑-4-基)乙基]-2,4-二甲基, 二钠盐)得自 Molecular Probes (Eugene, OR)。组胺单克隆抗体 22.12 获自 Argene (Varilhes, France)。L-组氨酸、组胺、磷酸钾(1M 单- 以及二碱溶液)、聚乙二醇 400 分子量、乙二醇四乙酸(EGTA)、二硫苏糖醇、吡哆醛-5-磷酸以及氯化钠得自 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO)。3-[(3-Cholamidopropyl)二甲基氨基]-1-丙磺酸(CHAPS)得自 Pierce Chemical Co. (Rockford, IL)。二甲亚砜由 Baker Chemical Corp 提供。黑色不透明的聚苯乙烯 384-孔板购自 Corning-Costar。已知的HDC抑制剂组氨酸-甲基酯,以及 His-Phe 得自 Sigma Chemical Co 以及 α -氟甲基组氨酸得自 Boehringer Ingelheim Pharmaceuticals 化合物库。

缓冲液

HDC 缓冲液由 200mM 磷酸钾(pH 6.8), 2% PEG-400, 0.2mM EGTA 以及 0.03% CHAPS 组成。FP 缓冲液为 16.6mM Tris-HCl (pH 7.5)和 50mM NaCl。

组胺含量的 HPLC 测定

HPLC 分离在装配了二极管阵列检测器的 Agilent 1090M 上进行。使用 Delta-Pak HPI C4 300Å, 2.0 x 150mm 柱(Waters)。流动相由 20ml PIC® B-8 Low UV Reagent (Waters)的 1000ml 10mM 三乙胺磷酸盐, pH 3.0 组成。所有的分离在室温下(22°C)进行, 流速 0.2ml/分钟并且在 215nm 波长处监测。

利用浓度对响应面积的标准曲线计算组胺浓度。标准曲线利用一式二份注射组胺的对照缓冲液中的溶液产生, 浓度为 0 至 200 或者 600µM。使用 6 个等间距的浓度。在 TI-68 计算器上利用线性回归计算浓度(µM)对响应面积的标准曲线。相关系数大于 0.999。

人 HDC 的克隆

相应于全长人 HDC 的截短的 53 Kd 形式(索取号:NM_002112)的 cDNA 通过 PCR 扩增, 利用源自人肥大细胞系 HMC-1 的总 RNA(Maeda K, Taniguchi H, Ohno I, Ohtsu H, Yamauchi K, Sakurai E, Tanno Y, Butterfield JH, Watanabe T, Shirato K: Induction of L-histidine decarboxylase in a human mast cell line, HMC-1. *Exp Hematol.* 1998;26:325-31.)。使用的引物为 : 5'-atgatggagcctgaggagtacagag 以及 3'-acactactgactcaggatgagagt。将 HDC cDNA(1.5 Kb)克隆到 pcDNA4.1 载体上。克隆 pcDNA 4.1-HDC 用作模板以得到 PCR 产物, 包含 HDC 的首先的 1431 个碱基(氨基酸残基 1-477)并且插入凝血酶裂解位点 5' 并且邻近首先的碱基。该 PCR 产物克隆到 pDEST 20 中, 利用 Gateway 克隆技术(Invitrogen Life Technologies), 按照厂商的操作规程。从最终的表达克隆纯化的 DNA 进行测序证实并且然后转化成 DH10Bac E.coli 用于转座成杆粒。重组的杆粒 DNA 从单一的菌落纯化并且转座利用 PCR 分析证实。

GST-HDC 的杆状病毒表达以及纯化

将 20 L 体积的 SF900II-SFM (Invitrogen cat# 10902-088)灭菌过滤到 30 L MBR 的搅拌的罐生物反应器中。将 MBR 生物反应器装配 pH、溶解的氧气以及温度探针并且控制设置参数为: pH 6.2、DO 50%、温度 27°C、RPM 110。将四份 1L 的 SF9 细胞振荡瓶生长至细胞密度介于 2.5×10^6 和 3×10^6 细胞/mL

之间并且用来接种生物反应器，得到 24 L 的培养基，细胞密度约为 4×10^5 至 5×10^5 细胞/mL。对接种的生物反应器每天取样以检测细胞密度、生存力以及细胞直径，利用 Cedex 细胞计数器(Innovatious)。利用 Bioprofile 100 分析器(Nova Biomedical)也每天进行有营养的(葡萄糖、谷氨酸)以及废物(氨)分析。在初始细胞接种后 24 小时，将生物反应器用 GST-HDC 杆状病毒感染得到 0.1 的 MOI。在感染前取样 1.5 mL 的细胞上清液样品(离心，倾析以及冷冻)并且每 24 小时进行一次直至富集进行 SDS-PAGE 和 WESTERN 分析。感染后 24 小时，将 25 mg 的 Leupeptin 溶解在 SF900II-SFM 培养基中，过滤灭菌并且注射到生物反应器中。感染后 48 小时富集。在 12 L 的离心机(Sorvall BP12)中每次旋转@ 3000 rpm, 4°C 离心 10 分钟沉淀感染的细胞。将沉淀合并到一个离心管中并且进行最终的离心：在 4°C 在 3500 rpm 离心 10 分钟。称量沉淀并且在 -80°C 冷冻直至使用。标准的沉淀为 300 克。

进行蛋白纯化的时候，所有的缓冲液制备自蒸馏以及去离子水并且所有的步骤在 4°C 进行。将细胞沉淀与裂解缓冲液(20 mM Hepes, pH 7.5, 150 mM KCl, 10%甘油, 2 mM DTT, 1 mM EGTA, Roche 蛋白酶抑制剂混合物片, 以及 0.01 mM PLP)以 5 ml/g 细胞沉淀的比例混合。将细胞在冰上利用 PolyTron PT 2100 (Kinematica AG, Switzerland)匀浆，然后利用 Branson Sonifier 450 (Converter, USA)以 50%工作循环超声 3 次，每次 5 分钟。将细胞裂解液在 18,600g 离心 30 分钟，然后在 225,071g 离心 60 分钟。将澄清的裂解液直接负载到 50 mL Glutathione Sepharose 4B 柱(Amersham, Sweden)上，利用 AKTA Prime 层析系统(Amersham, Sweden)。负载后，将柱用 4 柱体积(CV)的洗涤缓冲液(20 mM Hepes, pH 7.5, 150 mM KCl, 10%甘油, 2 mM DTT, 0.5 mM EDTA, 0.5 mM PMSF 和 0.01 mM PLP)洗涤，并且然后利用 10 CV 的洗脱缓冲液(20 mM 还原的 GTH, 2 mM DTT 以及洗涤缓冲液, pH 8.0)洗涤。富集从柱上洗脱的 HDC 产物，根据 SDS-PAGE 凝胶的视觉观察。标准收率为 33 mL 的 HDC，浓度 1.8 mg/mL。将富集的产品相对于 5 L 的缓冲液 1 (20 mM Hepes, pH 7.5, 0.1 mM EGTA, 0.2 mM PMSF, 0.25 mM DTT, 10%甘油和 0.01mM PLP)透析 4 小时，然后相对于 5 L 的缓冲液 2 (0.1 M 磷酸钾, pH 7.5, 2% PEG-400, 0.1 mM EGTA, 2 mM PMSF, 10%甘油和 0.02 mM PLP)透析 17 小时。将最终的产物等分，在液氮中快速冻结并且储存在 -80°C。

组氨酸脱羧酶测定

在标准的测定中, HDC, 在 HDC 缓冲液中稀释至 90nM 以及 0.9mM DTT 和 99 μ M PLP, 以 20 μ L 加入到黑色不透明的 384-孔板中。以 10 μ L 将测试化合物在 HDC 缓冲液溶液以及 6% DMSO 中的溶液或者单独的缓冲液加入到板中。将 36nM FITC-组氨酸和 3.6mM 组氨酸在 FP 缓冲液中混合并以 10 μ L 转移到板中。最后, 将 90nM 抗-组氨酸抗体以在 20 μ L 的 FP 缓冲液中的溶液加入。因此, 在测定中的最终浓度为: HDC 30nM、FITC-组氨酸 6nM、组氨酸 600 μ M、抗-组胺抗体 30nM、DMSO 1%。将板在 37°C 孵育 90 分钟。在 LJI Analyst (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) 上获取荧光极化信号, 激发波长 485nm, 发射波长 530nm, 荧光分色镜设置在 505nm 并且 G 因子设定为 1。用于测定开发中的 96-孔板的测定形式, 如上描述进行, 使用的体积是 384-孔板中标示的两倍。

高通量筛选

测定在 Zymark Allegro™ 机器人系统 (Caliper-Zymark, Hopkinton, MA) 上自动化, 利用 Multidrop 以加入酶, Sciclone 以加入底物/探针以及测试化合物, 并且 Multidrop 以加入抗体。将板在潮湿环境中在 37° C 孵育, 并且在集合到 Allegro 系统的 LJI Analyst 中读取荧光极化, 利用上述设定。化合物以 5 μ g/mL 的浓度筛选。计算相对于测定空白(除了 HDC 以外包含全部的反应), 以及 100% 对照(包含 HDC 缓冲液以及 1% DMSO 代替化合物)的 POC 值。

结果

HDC 酶产物(组胺)以及组胺探针(FITC-组胺)的结构显示在图 1 中。我们首先开始检测数种商业化的抗组胺抗体与 FITC-组胺探针之间的相互作用(数据未显示)。这些抗体中的一种(D22.12), 显示了通过荧光极化测定的强烈的探针结合并且保留用于进一步的表征。

我们首先测定探针对抗体的亲和力以及相互作用的特异性, 二者对建立竞争模式的强有力的测定是至关重要的。图 2 显示了利用各向异性测量测定的探针和抗体的结合曲线。探针浓度保持在 6nM 并且抗体浓度以约 3 个 logs 变化。在拟合数据的基础上, 测定解离常数为 3.9nM。抗体对组胺

相对于组氨酸的特异性如图 3 中所示证明。探针和抗体浓度分别保持恒定在 6 和 50nM, 而组胺和组氨酸的浓度随所显示的变化。在检测的 5 个 log 范围之内, 组氨酸不能与 FITC-组胺竞争结合抗体。然而组胺自由地与探针竞争结合抗体, 得到 135 μ M 的 IC₅₀。因此, FITC-组胺与组胺单克隆抗体的紧密以及特异结合以及与酶反应的产物竞争结合的能力暗示可能开发针对 HDC 的强有力的竞争性 FP 测定。

图 4A 显示了在不同浓度的 HDC 酶反应的时间过程。600uM 的组氨酸, 约为报道的 K_m 200-400uM 的两倍(Watabe 等 1992)。在 HDC 浓度>100nM 的时候, 反应保持线性只有约 30 分钟。为了平衡随大规模筛选酶需求导致的测定窗的大小以及反应的线性, 我们选择在标准的测定中使用 25-50nM 的 HDC 以及 90 分钟的孵育时间。图 4B 进一步完善, 其显示了在 Allegro 机器人系统进行的在 90 分钟孵育时候的 HDC 滴度。从该实验中, 我们得到酶浓度为 30nM。因此, 最终的测定条件设定为 30nM HDC、30nM 抗体以及 6nM FITC-组胺, 总体积 60 μ L, 在 37 $^{\circ}$ C 反应 90 分钟。PLP 浓度设定在 33 μ M 以保持酶的饱和。

图 5 显示了 3 种已知的 HDC 抑制剂在标准测定中的行为: 组氨酸甲基酯、 α -氟甲基组氨酸以及二肽组氨酸-苯丙氨酸。我们测得 3 种化合物的 IC₅₀ 分别为 7.7 μ M、1.4 μ M 和 228.1 μ M。这些数值与利用 HPLC 测定得到的数值较好地一致。

然后将如上描述的测定用来筛选库中的化合物, 最终浓度为 5 μ g/mL。将 384-孔板设置包含 352 个化合物孔, 16 个对照孔(无化合物)以及 16 空白孔(无酶)每板。在纯净 DMSO 中的化合物, 在缓冲液种稀释以得到测定中最终 DMSO 的浓度为 1%。该 DMSO 浓度显示对酶活性或者稳定性没有影响(数据未显示)。该测定在 Allegro 自动体系中完全自动化, 能够每天处理约 100 块板的通量。图 6 显示了 90 块板的单一筛选循环的空白以及对照孔的散射图, 平均的 Z' 为 0.6 并且测定窗为 80-100mP。在测定中筛选超过 600,000 种化合物, 确证的命中率为 0.05%, 利用 60%的对照作为命中标准。确证的命中化合物随后进行 10 点剂量效应测定以评价功效。

讨论

对 FP 测定的性能发挥作用的重要的参数为荧光探针对其受体或者靶分

子的亲和力。通常的规则是，探针结合至其受体的 K_d 与结合的级分成反比。因此，高亲和力结合允许最佳的荧光-配体/受体化学计量学以及强烈的 FP 信号。我们筛选了多种抗-组胺抗体以寻求发现一种对我们的组胺-荧光探针具有合适的亲和力。在这些抗体中只有一种，D22.12，具有足够高的亲和力用于开发 FP 测定。D22.12 抗体是利用偶联至白蛋白的 2-组胺基-1,4-苯醌通过免疫小鼠产生的(Guesdon 等; 1986)，而我们检测的所有的其他的抗体利用偶联至白蛋白的组胺或者乙酰化组胺免疫产生的。D22.12 对组胺-荧光的高度结合亲和力源自用于得到 D22.12 的免疫原(组胺基苯醌)以及组胺-荧光探针之间的结构类似性。

HDC(54Kd 形式)与其底物的组氨酸的 K_m 为 $275\mu\text{M}$ (数据未显示)。因此，开发 HDC 测定的重要的必要条件是组胺相对于组氨酸的选择性。我们的 FP 测定显示组胺的选择性超过对组氨酸选择性的 100-倍。但是，如图 3 中所示，由于 FP 信号中的非特异性增加，组氨酸浓度应该保持低于 2mM。这种限制在测定 HDC 活性的大多数应用中不是问题，因为酶的 K_m 远低于测定耐受的组氨酸的最大量。

脱羧酶构成了发挥重要生理作用的大的酶家族(Christen 等; 2001)。例如，DOPA 脱羧酶负责关键神经递质多巴胺以及血清紧张素的合成，分别地通过对 L-3,4-二羟基苯丙氨酸(L-DOPA)和 L-5-羟基色氨酸脱羧基。目前用于测定递质如血清紧张素和多巴胺的方法与组胺检测技术类似。因此，这里描述的针对 HDC 的测定可以适用于相关的酶如多巴脱羧酶并且使开发具有更好的药理特性的新的抑制剂成为可能。

<110> 贝林格尔·英格海姆药物公司 (Boehringer Ingelheim Pharmaceuticals, Inc.)
 AUGUST, E. Michael
 RAJOTTE, Daniel

<120> 用于测定组氨酸脱羧酶活性的荧光极化测定

<130> 9/327 PCT

<140> PCT/US2005/041766

<141> 2005-11-15

<150> 60/628,242

<151> 2004-11-16

<160> 1

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 662

<212> PRT

<213> 人 (Homo sapiens)

<400> 1

Met Met Glu Pro Glu Glu Tyr Arg Glu Arg Gly Arg Glu Met Val Asp
 1 5 10 15

Tyr Ile Cys Gln Tyr Leu Ser Thr Val Arg Glu Arg Arg Val Thr Pro
 20 25 30

Asp Val Gln Pro Gly Tyr Leu Arg Ala Gln Leu Pro Glu Ser Ala Pro
 35 40 45

Glu Asp Pro Asp Ser Trp Asp Ser Ile Phe Gly Asp Ile Glu Arg Ile
 50 55 60

Ile Met Pro Gly Val Val His Trp Gln Ser Pro His Met His Ala Tyr
 65 70 75 80

Tyr Pro Ala Leu Thr Ser Trp Pro Ser Leu Leu Gly Asp Met Leu Ala
 85 90 95

Asp Ala Ile Asn Cys Leu Gly Phe Thr Trp Ala Ser Ser Pro Ala Cys
 100 105 110

Thr Glu Leu Glu Met Asn Val Met Asp Trp Leu Ala Lys Met Leu Gly
 115 120 125

Leu Pro Glu His Phe Leu His His His Pro Ser Ser Gln Gly Gly Gly
 130 135 140

Val Leu Gln Gln Thr Val Ser Glu Ser Thr Leu Ile Ala Leu Leu Ala
 145 150 155 160

Ala Arg Lys Asn Lys Ile Leu Glu Met Lys Thr Ser Glu Pro Asp Ala
 165 170 175

Asp Glu Ser Cys Leu Asn Ala Arg Leu Val Ala Tyr Ala Ser Asp Gln
 180 185 190

Ala His Ser Ser Val Glu Lys Ala Gly Leu Ile Ser Leu Val Lys Met
 195 200 205

Lys Phe Leu Pro Val Asp Asp Asn Phe Ser Leu Arg Gly Glu Ala Leu
 210 215 220

Gln Lys Ala Ile Glu Glu Asp Lys Gln Arg Gly Leu Val Pro Val Phe
 225 230 235 240

Val Cys Ala Thr Leu Gly Thr Thr Gly Val Cys Ala Phe Asp Cys Leu
 245 250 255

Ser Glu Leu Gly Pro Ile Cys Ala Arg Glu Gly Leu Trp Leu His Ile
 260 265 270

Asp Ala Ala Tyr Ala Gly Thr Ala Phe Leu Cys Pro Glu Phe Arg Gly
 275 280 285

Phe Leu Lys Gly Ile Glu Tyr Ala Asp Ser Phe Thr Phe Asn Pro Ser
 290 295 300

Lys Trp Met Met Val His Phe Asp Cys Thr Gly Phe Trp Val Lys Asp
 305 310 315 320

Lys Tyr Lys Leu Gln Gln Thr Phe Ser Val Asn Pro Ile Tyr Leu Arg
 325 330 335

His Ala Asn Ser Gly Val Ala Thr Asp Phe Met His Trp Gln Ile Pro
 340 345 350

Leu Ser Arg Arg Phe Arg Ser Val Lys Leu Trp Phe Val Ile Arg Ser
 355 360 365

Phe Gly Val Lys Asn Leu Gln Ala His Val Arg His Gly Thr Glu Met
 370 375 380

Ala Lys Tyr Phe Glu Ser Leu Val Arg Asn Asp Pro Ser Phe Glu Ile
 385 390 395 400

Pro Ala Lys Arg His Leu Gly Leu Val Val Phe Arg Leu Lys Gly Pro
 405 410 415

Asn Cys Leu Thr Glu Asn Val Leu Lys Glu Ile Ala Lys Ala Gly Arg
 420 425 430

Leu Phe Leu Ile Pro Ala Thr Ile Gln Asp Lys Leu Ile Ile Arg Phe
 435 440 445

Thr Val Thr Ser Gln Phe Thr Thr Arg Asp Asp Ile Leu Arg Asp Trp
 450 455 460

Asn Leu Ile Arg Asp Ala Ala Thr Leu Ile Leu Ser Gln His Cys Thr
 465 470 475 480

Ser Gln Pro Ser Pro Arg Val Gly Asn Leu Ile Ser Gln Ile Arg Gly
 485 490 495

Ala Arg Ala Trp Ala Cys Gly Thr Ser Leu Gln Ser Val Ser Gly Ala
 500 505 510

Gly Asp Asp Pro Val Gln Ala Arg Lys Ile Ile Lys Gln Pro Gln Arg
 515 520 525

Val Gly Ala Gly Pro Met Lys Arg Glu Asn Gly Leu His Leu Glu Thr
 530 535 540

Leu Leu Asp Pro Val Asp Asp Cys Phe Ser Glu Glu Ala Pro Asp Ala
 545 550 555 560

Thr Lys His Lys Leu Ser Ser Phe Leu Phe Ser Tyr Leu Ser Val Gln
 565 570 575

Thr Lys Lys Lys Thr Val Arg Ser Leu Ser Cys Asn Ser Val Pro Val
 580 585 590

Ser Ala Gln Lys Pro Leu Pro Thr Glu Ala Ser Val Lys Asn Gly Gly
 595 600 605

Ser Ser Arg Val Arg Ile Phe Ser Arg Phe Pro Glu Asp Met Met Met
 610 615 620

Leu Lys Lys Ser Ala Phe Lys Lys Leu Ile Lys Phe Tyr Ser Val Pro
 625 630 635 640

Ser Phe Pro Glu Cys Ser Ser Gln Cys Gly Leu Gln Leu Pro Cys Cys
 645 650 655

Pro Leu Gln Ala Met Val
 660

专利名称(译)	用于测定组氨酸脱羧酶活性的荧光极化测定		
公开(公告)号	CN101057146A	公开(公告)日	2007-10-17
申请号	CN200580038616.7	申请日	2005-11-15
[标]申请(专利权)人(译)	百灵佳殷格翰国际股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	贝林格尔·英格海姆药物公司		
当前申请(专利权)人(译)	贝林格尔·英格海姆药物公司		
[标]发明人	E迈克尔奥古斯特 丹尼尔拉乔特		
发明人	E·迈克尔·奥古斯特 丹尼尔·拉乔特		
IPC分类号	G01N33/58 G01N33/533 G01N33/53 G01N33/574		
CPC分类号	G01N2500/02 G01N33/573 G01N2333/988 C12Q1/34 G01N33/542		
优先权	60/628242 2004-11-16 US		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

用于测定候选化合物的HDC调节活性的荧光极化测定方法，包括下述步骤：a)提供反应混合物，包括HDC、组氨酸、荧光标记的组胺探针、候选化合物以及抗组胺抗体，所述的抗组胺抗体对组胺相对于组氨酸的选择性大于至少10倍；b)孵育反应混合物；c)测定在测试化合物存在下是否发生了HDC的抑制，其中荧光极化信号的增加表明测试化合物抑制HDC的活性。