

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2008-520977

(P2008-520977A)

(43) 公表日 平成20年6月19日(2008.6.19)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 Z N A Q	2 G O 4 3
GO 1 N 33/542 (2006.01)	GO 1 N 33/542 A	2 G O 4 5
GO 1 N 33/50 (2006.01)	GO 1 N 33/50 Z	2 G O 5 4
GO 1 N 33/15 (2006.01)	GO 1 N 33/15 Z	4 B O 5 0
GO 1 N 21/78 (2006.01)	GO 1 N 21/78 C	4 B O 6 3
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求		(全 15 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2007-541490 (P2007-541490)	(71) 出願人	500091335
(86) (22) 出願日	平成17年11月15日 (2005.11.15)		ベーリンガー インゲルハイム ファーマ
(85) 翻訳文提出日	平成19年5月10日 (2007.5.10)		シューティカルズ インコーポレイテッド
(86) 国際出願番号	PCT/US2005/041766		アメリカ合衆国 コネチカット州 068
(87) 国際公開番号	W02006/055753		77 リッジフィールド リッジバリー
(87) 国際公開日	平成18年5月26日 (2006.5.26)		ロード 900
(31) 優先権主張番号	60/628, 242	(74) 代理人	100082005
(32) 優先日	平成16年11月16日 (2004.11.16)		弁理士 熊倉 禎男
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100084009
			弁理士 小川 信夫
		(74) 代理人	100084663
			弁理士 箱田 篤
		(74) 代理人	100093300
			弁理士 浅井 賢治
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 ヒスチジンデカルボキシラーゼ活性を測定するための蛍光偏光アッセイ

(57) 【要約】

以下の工程を含む候補化合物のHDC調節活性を測定するための蛍光偏光法： a) HDC、ヒスチジン、蛍光標識したヒスタミンプローブ、候補化合物及びヒスタミンに対する選択性がヒスチジンよりも少なくとも10倍大きい抗ヒスチジン抗体を含む反応混合物を調製する工程； b) 前記反応混合物をインキュベートする工程； c) 試験化合物の存在下でHDCの阻害が起こるか否かを決定する工程であって、蛍光シグナルの増加は、試験化合物がHDCの活性を阻害することを示す、工程。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

以下の工程を含む候補化合物のHDC調節活性を測定するための蛍光偏光アッセイ：

- a) HDC、ヒスチジン、蛍光標識したヒスタミンプローブ、候補化合物及びヒスタミンに対する選択性がヒスチジンよりも少なくとも10倍大きい抗ヒスタミン抗体を含む反応混合物を調製する工程、
- b) 前記反応混合物をインキュベートする工程、
- c) 試験化合物の存在下でHDCの阻害が起こるか否かを決定する工程であって、蛍光偏光シグナルの増加は、試験化合物がHDCの活性を阻害することを示す、工程。

【請求項 2】

抗ヒスタミン抗体のヒスタミンに対する選択性がヒスチジンよりも少なくとも100倍大きい、請求項 1 記載の方法。

10

【請求項 3】

反応混合物を15分よりも長い時間インキュベートする、請求項 1 記載の方法。

【請求項 4】

反応混合物を60～120分間インキュベートする、請求項 3 記載の方法。

【請求項 5】

反応混合物を約80～100分間インキュベートする、請求項 4 記載の方法。

【請求項 6】

HDCが配列番号 1 のポリペプチドである、請求項 1 記載の方法。

20

【請求項 7】

HDCが組み換え酵素である、請求項 1 記載の方法。

【請求項 8】

HDCが部分的に精製される、請求項 1 記載の方法。

【請求項 9】

ヒスタミンプローブが抗ヒスタミン抗体に対して1 μmよりも大きい親和力を有する、請求項 1 記載の方法。

【請求項 10】

リンカー領域で担体に結合されたヒスタミンでマウスを免疫することによって、使用される抗ヒスタミン抗体が生成され、前記リンカーがフルオレセインプローブと構造的に類似している、請求項 1 記載の方法。

30

【請求項 11】

リンカー領域が担体に結合された1,4-ベンゾキノンである、請求項 10 記載の方法。

【請求項 12】

前記担体がアルブミンである、請求項 10 記載の方法。

【請求項 13】

蛍光標識したヒスタミンプローブがFITC、ローダミン、テトラメチルローダミン及びCy 5から選ばれる、請求項 1 記載の方法。

【請求項 14】

ヒスチジン濃度が10 μM～5 mMである、請求項 1 記載の方法。

40

【請求項 15】

ヒスチジン濃度が100 μM～1 mMである、請求項 10 記載の方法。

【請求項 16】

疾病の診断手段として患者サンプル中のHDC活性の検出方法であって、

- a) ヒスチジン、蛍光標識したヒスタミンプローブ及びヒスタミンに対する選択性がヒスチジンよりも少なくとも10倍大きい抗ヒスタミン抗体を含む反応混合物と前記サンプルを接触させ、
- b) 前記反応混合物をインキュベートし、
- c) コントロールサンプルにおけるHDC活性のレベルと比較して、患者サンプルにおいてHDC活性の増加が起こるか否かを決定し、コントロールサンプルに対する蛍光偏光の増加は

50

、患者サンプルが疾病の危険があることを示す、前記方法。

【請求項 17】

リンカー領域で担体に結合されたヒスタミンでマウスを免疫することによって、使用される抗ヒスタミン抗体が生成され、前記リンカーがヒスタミン-フルオレセインプローブと構造的に類似している、請求項 16 記載の方法。

【請求項 18】

疾病が癌、喘息、肥満細胞腫、免疫学的疾患、骨疾患及び胃腸疾患から選ばれる、請求項 16 記載の方法。

【請求項 19】

疾病が癌である、請求項 18 記載の方法。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(関連出願)

この出願は、2004年11月16日に出願された米国仮出願第60/628,242号の利益を主張する(その内容は本明細書に組み込まれる)。

(発明の背景)

1. 技術分野

本発明の分野は、疾病の診断及びHDC阻害剤の同定で使用できる、HDC活性を検出する蛍光偏光アッセイに関するものである。

20

【背景技術】

【0002】

2. 背景情報

ヒスタミンは、病理学上及び生理学上の種々の条件で複数の活性をもつ強力なバイオアミンである(Jutel M, Watanabe T, Akdis M, Blaser K, Akdis CA: Immune regulation by histamine. *Curr. Opin. Immunol* 2002;14:735-740)。急性炎症及びアレルギー反応へのその十分に特徴付けられた影響に加えて、ヒスタミンは、抗原特異的免疫応答のいくつかの局面を調節する(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)。最近の研究結果、例えば免疫担当細胞における新規ヒスタミン受容体(H4)の発見及びTヘルパー細胞極性におけるH1及びH2受容体の役割の証明のような結果は、ヒスタミンによって引き金が引かれる免疫調節機構への大きな関心をもたらした(Schneider E, Rolli-Derkinderen M, Arock M, Dy M. ; *Trends Immunol.* 2002 May; 23(5):255-63)。

30

【0003】

ヒスチジンデカルボキシラーゼ(HDC)は、ヒスタミンの生合成における律速酵素である(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)。哺乳類のHDCは、ピリドキサル5-リン酸(PLP)-依存性酵素の大きなファミリーのメンバーである(Christen P, Mehta P: From Cofactor to enzymes. *The molecular evolution of pyridoxal-5'-phosphate-dependent enzymes. Chemical Record* 2001;1:436-447)。DHCは、たいていの組織で発現されるが、最も高いレベルは皮膚、GIトラック及び気道で見出される。HDCは、短い54Kdフォームに変換される74Kd酵素である(Yatsunami K, Tsuchikawa M, Kamada M, Horii K, Higuchi T: Comparative studies of human recombinant 74- and 54- kDa L-histidine decarboxylase. *J. Biol. Chem.* 1995;270:30813-30817)。両フォームともインビトロで活性を示すが、同じ細胞内コンパートメントでは見出されず、74Kdフォームは、小胞体で主に見出されている(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)。

40

50

【 0 0 0 4 】

HDC-欠損マウスの最近の産生は、多様な正常及び疾病過程における内因性ヒスタミンの役割を研究するためのよいシステムを提供した (Ohtsu H, Watanabe T: New functions of histamine found in histidine decarboxylase gene knockout mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 443-447)。HDC^{-/-}マウスは、肥満細胞の数を減らし、肥満細胞プロテアーゼのような顆粒状含有量を減らす (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)。これらのマウスは、気道過敏症 (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)、血管透過性 (Ohtsu et al. Plasma extravasation induced by dietary supplemented histamine in histamine-free mice. *Eur J Immunol.* 2002; 32:1698-708)、皮膚炎症 (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;195:973-9) を低減し、骨密度を増大する (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)。このように、HDC活性の強力な阻害剤は、アレルギー性、炎症性、免疫学的、骨及び心臓血管障害において有用であることがわかるであろう。また、ヒスタミンは、いくつかのタイプの癌において増殖の正の制御因子であることがわかっている (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)。

【 0 0 0 5 】

ヒスタミンの生物学上の役割は、ヒスタミン受容体特異的アゴニスト又はアンタゴニストを用いる薬理的なアプローチによって広範囲に研究されている。アレルギー及び炎症反応におけるHDCの役割が重要であるにもかかわらず、この酵素の非常に少ない小さい分子阻害剤が知られているだけである。これらの阻害剤のほとんどは、合理的なデザインストラテジーによって発見され、ヒスチジン類似化合物である。十分に特徴付けられたHDC阻害剤は、不可逆的阻害剤である -フルオロメチルヒスチジンである (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)。

【 0 0 0 6 】

HDC阻害剤の新規クラスを同定する能力は、HTSに適しているアッセイの欠如によって制限される。HDC活性を測定するための最も一般的に使用されるアッセイは、o-フタルアルデヒド (OPT) 法に基づく (Roskoski R, Roskoski LM: A rapid histidine decarboxylase assay. *Analytical Biochem.* 1978;87:293-297)。このアッセイは、ヒスチジンと比較してヒスタミンに対して選択性ではなく、基質からの酵素生成物のクロマトグラフィーによる分離に関する。別のより敏感なHDCアッセイは、[14C]-標識ヒスチジンの[14C]-標識ヒスタミンへの変換を利用する。薄層クロマトグラフィーは、基質と生成物とを分離するために使用される。ヒスタミンELISAキットは、HDC活性を測定するのに適合する可能性を持っている。しかしながら、これらのアッセイは、任意の有用な選択性及び感受性を達成するために、アセチル化工程 (アセチル化ヒスタミン) を必要とする。さらに、これらの

手順は、HTSの影響をあまり受けないようにするために、多くの洗浄工程を必要とする。

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

【0007】

(発明の要約)

以下の工程を含む候補化合物のHDC調節活性を測定するための蛍光偏光アッセイ：

- a) HDC、ヒスチジン、蛍光標識したヒスタミンプローブ、候補化合物及びヒスタミンに対する選択性がヒスチジンよりも少なくとも10倍大きい抗ヒスタミン抗体を含む反応混合物を調製する工程、
- b) 前記反応混合物をインキュベートする工程、
- c) 試験化合物の存在下でHDCの阻害が起こるか否かを決定する工程であって、蛍光偏光シグナルの増加は、試験化合物がHDCの活性を阻害することを示す、工程。

10

【0008】

本発明の別の実施態様では、抗ヒスタミン抗体のヒスタミンに対する選択性は、ヒスチジンよりも少なくとも100倍大きい。

本発明の別の実施態様では、反応混合物を15分よりも長い時間、より好ましくは60～120分間、最も好ましくは約80～100分間インキュベートする。

本発明の別の実施態様では、ヒトHDCを使用する。

本発明の別の実施態様では、HDCは、組み換え酵素であるか、あるいは部分的に精製される。

20

本発明の別の実施態様では、ヒスタミンプローブは、抗ヒスタミン抗体に対して1 μm よりも大きい親和力を有する。

本発明の別の実施態様では、リンカー領域で担体に結合されたヒスタミンでマウスを免疫することによって、使用される抗ヒスタミン抗体が生成され、前記リンカーは、フルオレセインプローブと構造的に類似している。

本発明の別の実施態様では、前記リンカー領域は、1,4-ベンゾキノンであり、担体はアルブミンである。

本発明の別の実施態様では、蛍光標識したヒスタミンプローブは、FITC、ローダミン、TAMRA又はCy5から選ばれる。

本発明の別の実施態様では、ヒスチジン濃度は、10 μM ～5 mMであり、より好ましくは100 μM ～1 mMである。

30

【0009】

本発明の別の局面は、疾病の診断手段として患者サンプル中のHDC活性の検出方法を提供し、この方法は、

- a) HDC、ヒスチジン、蛍光標識したヒスタミンプローブ及びヒスタミンに対する選択性がヒスチジンよりも少なくとも10倍大きい抗ヒスタミン抗体を含む反応混合物と前記サンプルを接触させ、
- b) 前記反応混合物をインキュベートし、
- c) コントロールサンプルにおけるHDC活性のレベルと比較して、患者サンプルにおいてHDC活性の増加が起こるか否かを決定することを含み、コントロールサンプルに対する蛍光偏光シグナルの減少は、患者サンプルが疾病の危険があることを示す。

40

本発明の別の実施態様では、リンカー領域で担体に結合されたヒスタミンでマウスを免疫することによって、使用される抗ヒスタミン抗体が生成され、前記リンカーは、ヒスタミン-フルオレセインプローブと構造的に類似している。

本発明の別の実施態様では、疾病は、癌、喘息及び肥満細胞腫、免疫学的疾患、及び胃腸疾患から選ばれる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0010】

(図面の簡単な説明)

図1Aはヒスタミンの構造を示す。

50

図 1 B は N-[3',6'-ジヒドロキシ-3-オキソスピロ[イソベンゾフラン-1(3H),9'-[9H]キサンテン-5(又は6)-イル]-N'-[2-(1H-イミダゾール-4-イル)エチル]-2,4-ジメチルチオ尿素, 2 ナトリウム塩 (FITC-ヒスタミン) プローブ分子の構造を示す。

図 2 は FITC-ヒスタミンの抗ヒスタミン抗体への結合を示す。アッセイは、方法の項に記載されるように、96-ウエルプレートで、6 nM で FITC-ヒスタミンにより繰り返して行われた。データは SAS でフィットされ、3.9 nM の Kd が測定された。

図 3 は抗ヒスタミン抗体に結合する FITC-ヒスタミンのヒスタミン () 又はヒスチジン () による置換を示す。方法の項に記載されるように、96-ウエルプレートで 3 通りの測定 (6 nM の FITC-ヒスタミン、50 nM の抗ヒスタミン抗体及び表示濃度のコンペティターリガンド) を行った。

図 4 A は種々の酵素濃度での HDC の時間的経過を示す。384-ウエルプレートでの 3 通りの反応を表示濃度の HDC の添加により開始し、蛍光偏光をインキュベーションから 0 ~ 180 分の時点で測定した。プローブ、基質及び抗体濃度は標準アッセイに記載される通りである。

図 4 B。90 分の HDC 滴定。表示濃度の HDC を用いて 90 分間 37 ° で Allegro (商標) システムで 4 通りに、アッセイ (384-ウエル) を行った。ブランク (酵素なし) 及び反応ウエルの間の mP の差としてアッセイウインドウを定義する。

図 5 は、メチルエステルヒスチジン (A)、 α -フルオロメチルヒスチジン (B) 及びジベプチドヒスチジン-フェニルアラニン (C) による HDC の阻害を示す。反応は、方法の項に記載される標準条件及び表示濃度の阻害剤を用いて行った。XLFit4 (IDBS ソフトウェア) を用いてデータをフィッティングすることによって IC50 値を得た。エラーバーは 3 回の測定の平均 \pm S > D を示す。

図 6 は 96 プレート (384 ウエル) の単一日スクリーニング実施のブランク () 及び正の対照 () の散布図を示す。

【 0 0 1 1 】

(発明の詳細な説明)

蛍光標識されたヒスタミンプローブ。本発明は蛍光プローブを規定する。好ましいプローブは、Molecular Probes (ユージーン、OR) から得られる FITC-ヒスタミン (チオ尿素, N-[3',6'-ジヒドロキシ-3-オキソスピロ[イソベンゾフラン-1(3H),9'-[9H]キサンテン-5(又は6-イル)-N'-[2-(1H-イミダゾール-4-イル)エチル]-2,4-ジメチル-, 2 ナトリウム塩) である。他の適したプローブとしては、ローダミン、TAMRA 又は Cy5 で標識されたヒスタミンなどが挙げられる。

【 0 0 1 2 】

抗ヒスタミン抗体。本発明は抗ヒスタミン抗体を使用するアッセイを提供する。使用できる 1 つの適したモノクローナル抗体は、Argene (Varilhes、フランス) から得られるヒスタミン抗体 D22.12 である。D22.12 抗体は、アルブミンに結合された 2-ヒスタミル-1,4-ベンゾキノンでマウスを免疫化することによって生成され (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)、試験した他の抗体のすべては、アルブミンに結合されたヒスタミン又はアセチル化ヒスタミンでの免疫化によって生成された。ヒスタミン-フルオレセインに対する D22.12 の高い結合親和性は、D22.12 を得るために使用される免疫原 (ヒスタミルベンゾキノン) とヒスタミン-フルオレセインプローブとの間の構造的ホモロジーの結果として生じることができた。本発明で使用するのに適した他の抗ヒスタミン抗体は、ヒスタミンプローブとの構造的類似性を有する同様のリンカーをもつ免疫原を用いて生成できる。異なる抗-ヒスタミン抗体は、プローブとして使用されるフルオロフォア

に依りて使用してもよい。

ヒスチジンは Sigma Chemical Co. (セントルイス、MO) から得られる。

【 0 0 1 3 】

HDC 酵素源

10

20

30

40

50

a) 組換え体 - 本発明の好ましい実施態様では、ヒトHDC酵素を使用する。全長タンパク質を使用するか、又はヒスチジンデカルボキシラーゼ活性を保持する限り53KD型のような切断型を用いることができると考えられる。好ましくは、ヒトHDCタンパク質(配列番号1)又はその断片を用いる。また、HDCタンパク質は、タンパク質タグ(例えば、グルタチオンS-トランスフェラーゼ(GST))に縮合されて精製を容易にすることができる。

b) 精製 - 本発明の方法は精製HDC酵素を用いて行うことができる。本明細書で使用されるように、「部分的に精製され」という用語は、HDC酵素がヒト細胞で見出されるよりも高い程度に部分的に精製されているHDC酵素を含むように意図されている。HDCの精製手順は技術的に公知であり、Watabe A, Fukui T, Ohmori E, Ichikawa A: Purification and properties of L-histidine decarboxylase from mouse stomach. *Biochem. Pharmacol.* 1992;43:587-593によって教示されている(その内容は本明細書に組み込まれるものとする)。

【0014】

阻害剤を検出するための標準アッセイ

標準アッセイでは、HDC(DTTのような還元剤及び酵素補助因子PLPを含むHDCバッファーで希釈された)をサンプルプレートに添加する。HDCバッファープラス適量のDMSO又はバッファー単独中の試験化合物をプレートに添加する。蛍光標識されたヒスタミン及びヒスチジンをFPバッファー中で混合し、プレートに10 μ Lで移す。最後に、90nMの抗ヒスタミン抗体を20 μ LのFPバッファーに添加する。こうして、アッセイの最終濃度は、HDCが25~50nM、FITC-ヒスチジンが3~6nM、ヒスチジンが300~600 μ M、抗ヒスタミン抗体が25~50nM及びDMSOが1~5%である。次いで、プレートを37 $^{\circ}$ Cで少なくとも15分間インキュベートする。485nmの励起、530nmの発光、505nmのフルオレセイン二色性ミラー及び1のG因子をもつLJL Analyst(Molecular Devices、サニーヴェール、CA)のような蛍光偏光を読み出すのに適した装置で、蛍光偏光シグナルを読み出す。蛍光シグナルの増加は、試験化合物がHDCの活性を阻害することを示す。

【0015】

候補阻害剤を検出するための標準手順の変更 パラメータの最適化

本発明は、候補化合物のHDC調節活性を測定するためのHDCアッセイ及び患者のサンプル中のHDCレベルを測定するための診断方法を提供する。多くのパラメータを変えて前記アッセイをそれら自身の使用に適合させることができる方法で、当業者が本発明を実施できると考えられる。変えてもよいパラメータとしては、抗ヒスタミン抗体濃度、基質ヒスチジンの濃度、プローブ濃度、HDC酵素源及び濃度、試験化合物濃度、成分の添加の順番、個々の成分の容量、反応の合計容量、HDCを反応前に予め試験化合物と共にインキュベートする工程の追加、反応時間、反応温度、アッセイプレートの種類、冷却又は加熱工程、酵素反応をとめる工程の追加(例えば、酸、塩基、塩、公知のHDC阻害剤など)、装置の種類並びに蛍光偏光シグナルを読み出すために使用される関連パラメータなどが挙げられる。

【0016】

その受容体標的分子についての蛍光プローブの選択性

本発明の1つの実施態様では、ヒスチジンと比較して、ヒスタミンに対する抗ヒスタミン抗体の選択性は100倍よりも大きい。適した候補阻害剤は10 μ Mよりも小さいIC50をもつと予想される。

【0017】

疾病を診断するための標準アッセイ

正常又は患部サンプル由来の組織又は血清を抽出及び調製してHDC活性を測定する方法は、技術的に公知である。例えば、(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. Vannacci, L. Messerini, F. Perna, C. Co

10

20

30

40

50

rtesini and F. Cianchi Histamine and histidine decarboxylase up-regulation in colorectal cancer: correlation with tumor stage *Inflamm. res.* 54, Supplement 1 (2005) S80S81、(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.

これらの方法は、本明細書に記載される蛍光HDCアッセイにおける試験のためのサンプルを調製するために適用できる。我々の方法は、目的とする正常又は患部組織若しくは血漿若しくは血液サンプルにおけるHDC活性の試験を高速処理することを可能にする。

【実施例】

【0018】

(実施例)

試薬

FITC-ヒスタミン(チオ尿素, N-[3',6'ジヒドロキシ-3-オキソスピロ[イソベンゾフラン-1(3H),9'-[9H]キサンテン-5(又は6-イル)-N'-[2-(1H-イミダゾール-4-イル)エチル]-2,4-ジメチル-, 二ナトリウム塩)をMolecular Probes(ユージーン, OR)から得た。ヒスタミンモノクローナル抗体22.12をArgene(Varilhes, フランス)から得た。L-ヒスチジン、ヒスタミン、リン酸カリウム(1Mのモノ及びジ塩基性溶液)、ポリエチレングリコール400分子量、エチレングリコール四酢酸(EGTA)、ジチオトレイトール、ピリドキサル-5-ホスファート及び塩化ナトリウムをSigma Chemical Co.(セントルイス, MO)から得た。3-[(3-コールアミドプロピル)ジメチルアンモニオ]-1-プロパンスルホナート(CHAPS)をPierce Chemical Co.(ロックフォード, IL)から得た。ジメチルスルホキシドをBaker Chemical Corpから得た。黒色不透明(Black opaque)ポリスチレン384-ウェルプレートをCorning-Costarから得た。公知のHDC阻害剤、ヒスチジン-メチルエステル及びHis-PheをSigma Chemical Coから得、 α -フルオロメチルヒスチジンをBoehringer Ingelheim Pharmaceuticals compound libraryから得た。

【0019】

バッファー

HDCバッファーは、200mMのリン酸カリウム(pH 6.8)、2%のPEG-400、0.2mMのEGTA及び0.03%のCHAPSを含む。FPバッファーは16.6mMのTris-HCl(pH 7.5)及び50mMのNaClである。

【0020】

ヒスタミン含有量のHPLC測定

ダイオードアレー検出器を備えたAgilent 1090MでHPLC分離を行った。Delta-Pak HPLC 4 300, 2.0x150mmカラム(Waters)を用いた。移動相は、1000mlの10mMトリエチルアミンホスファート中に20mlのPIC(商標)B-8 Low UV Reagent(Waters)からなるものであった(pH 3.0)。すべての分離は室温(22°C)で0.2ml/分の流速により行い、215nmの波長でモニターした。

濃度対面積応答の標準曲線を用いてヒスタミン濃度を計算した。対照バッファー中0~200又は600 μ Mの濃度でヒスタミンの2重注入を用いて標準曲線を作成した。6つの等間隔の濃度を用いた。 μ Mの濃度対面積応答について直線回帰を用いてTI-68計算機で標準曲線を計算した。相関係数は0.999よりも大きかった。

【0021】

ヒトHDCのクローニング

全RNAを用いてヒト肥満細胞株HMC-1からPCRによって全長ヒトHDC(受入番号:NM_002112)の切断型53Kdに相当するcDNAを増幅した(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)。使用したプライマーは5'-atgatggagcctgaggagtacagag及び3'-acactactgactcaggatgagagtである。HDC cDNA(1.5Kb)をpcDNA4.1ベクターにクローン化した。HDCの

10

20

30

40

50

最初の1431塩基（アミノ酸残基1～477）を含み、トロンピン切断部位5'を組み込み、最初の塩基に隣接するPCR産物を得るための鋳型としてクローンpcDNA 4.1-HDCを用いた。製造業者の手順書に従ってGateway Cloning Technology（Invitrogen Life Technologies）を用いてこのPCR産物をpDEST 20にクローン化した。最終発現クローンから精製したDNAを配列決定し、確認し、次いでバクミドへの転位のためにDH10Bac E. coliに形質転換した。単一クローンから組み換えバクミドDNAを精製し、PCR分析により転位を確認した。

【0022】

GST-HDCのパキキュロウイルス発現及び精製

20 L容量のSF90011-SFM（Invitrogen cat# 10902-088）を30 LのMBR攪拌タンクバイオリアクターに無菌ろ過した。MBRバイオリアクターには、pH、溶存酸素及び温度プローブが備え付けられており、コントロールセットポイントはpH 6.2、DO 50%、温度27、RPM 110であった。Sf9細胞の4つの1 L振盪フラスコを $2.5 \times 10^6 \sim 3 \times 10^6$ cells/mLの細胞密度に増殖し、バイオリアクターをインキュベートするためにこれを使用し、 $4 \times 10^5 \sim 5 \times 10^5$ cells/mLのおよその細胞密度をもつ24 Lの培養液を得た。Cedex細胞計数器（Innovative）を用いて細胞密度、生存率及び細胞直径のためにインキュベートしたバイオリアクターを毎日試料採取した。また、Bioprofile 100分析器（Nova Biomedical）を用いて栄養分（グルコース、グルタミン）及び廃棄物（アンモニア）分析を毎日行った。細胞インキュベーションの開始後24時間で、バイオリアクターをGST-HDCパキキュロウイルスで感染させて0.1のMOIを達成した。ラン（run）がSDS-PAGE及びWESTERN分析のために回収されるまで、感染前及び24時間ごとに、1.5mLの細胞上澄みサンプル（遠心分離、デカント及び凍結）を採取した。感染後24時間で、25mgのロイペプチンをSF90011-SFM培養液に溶解し、ろ過滅菌し、バイオリアクターに注入した。感染後48時間で、ランを回収した。感染した細胞を12 Lの遠心機（Sorvall BP12）でスピン当たり3000rpmで、4 10分間ペレット化した。ペレットを1つの遠心分離ボトルに入れ、3500rpmで10分間4 で最終スピンを与えた。ペレットの重さを量り、使用するまで-80 で凍結した。標準ペレット収量は300グラムであった。

10

20

30

40

50

【0023】

タンパク質精製のために、すべてのバッファーを精製脱イオン水から調製し、すべての処理を4で行った。細胞ペレットを溶解バッファー（20mMのHepes、pH 7.5、150mMのKCl、10%のグリセロール、2 mMのDTT、1 mMのEGTA、Rocheプロテアーゼ阻害剤混合錠剤及び0.01mMのPLP）と5 ml/gの細胞ペレットの比で混合した。PolyTron PT 2100（Kinematica AG, Switzerland）を用いて細胞を氷上でホモジナイズし、次いで3回5分間Branson Sonifier 450（Converter, USA）を用いて50%負荷サイクルで超音波処理した。細胞可溶化物を18,600 gで30分間、続いて225,071 gで60分間遠心分離した。清澄された可溶化物を直接50mLのGlutathione Sepharose 4Bカラム（Amersham, Sweden）にAKTA Primeクロマトグラフィシステム（Amersham, Sweden）を用いて充填した。充填後、カラムを4カラム容量（CV）の洗浄バッファー（20mMのHepes、pH 7.5、150mMのKCl、10%のグリセロール、2 mMのDTT、0.5mMのEDTA、0.5mMのPMSF及び0.01mMのPLP）で洗浄し、次いで10CVの溶出バッファー（20mMのGTH還元型、2 mMのDTT及び洗浄バッファー、pH 8.0）で溶出した。カラムから溶出するHDC生成物をSDS-PAGEゲルの目視検査に従って貯蔵した。標準収量は1.8 mg/mLで33mLのHDCであった。貯蔵した生成物を5 Lのバッファー1（20mMのHepes、pH 7.5、0.1mMのEGTA、0.2mMのPMSF、0.25mMのDTT、10%のグリセロール及び0.01mMのPLP）に4時間透析し、次いで5 Lのバッファー2（0.1Mのリン酸カリウム、pH 7.5、2%のPEG-400、0.1mMのEGTA、2 mMのPMSF、10%のグリセロール及び0.02mMのPLP）に17時間透析した。最終生成物を分注し、液体窒素でスナップ凍結（snap frozen）し、-80 で貯蔵した。

.

【0024】

ヒスチジンデカルボキシラーゼアッセイ

標準アッセイでは、HDC（HDCバッファープラス0.9mMのDTT及び99 μ MのPLPにおいて90nMに希釈された）を20 μ Lの黒色不透明384-ウエルプレートに添加した。HDCバッファープラ

ス6%のDMSO又はバッファー単独中の試験化合物を10 μ Lのプレートに添加した。36nMのFITC-ヒスチジン及び3.6mMのヒスチジンをFPバッファー中で混合し、10 μ Lのプレートに移した。最後に、90nMの抗ヒスチジン抗体20 μ LのFPバッファーに加えた。こうして、アッセイにおける最終濃度は、HDC 30nM、FITC-ヒスチジン 6nM、ヒスチジン 600 μ M、抗ヒスタミン抗体 30nM、DMSO 1%となった。プレートを37 $^{\circ}$ Cで90分間インキュベートした。485nmの励起、530nmの発光、505nmのフルオレセイン二色性ミラー及び1のG因子をもつLJL Analyst (Molecular Devices、サニーヴェール、CA)で蛍光偏光シグナルを読み出した。384-ウエルプレートについて示される容量の2倍で、アッセイの96-ウエルプレートバージョン(アッセイ開発で使用された)を上述のとおりに行った。

【0025】

高速処理スクリーニング

アッセイをZymark Allegro(商標)ロボットシステム(Caliper-Zymark、Hopkinton、MA)で自動化し、Multidropを用いて酵素を添加し、Scicloneを用いて基質/プローブ及び試験化合物を添加し、Multidropを用いて抗体を添加した。プレートを37 $^{\circ}$ Cで加湿環境でインキュベートし、蛍光偏光を、上述の設定を用いてAllegroシステムが組み込まれたLJL Analystで読み出した。化合物を5 μ g/mLの濃度で選別した。完全な反応マイナスHDCを含むアッセイブランク及び化合物の代わりに1%のDMSOを有するHDCバッファーを含む100%コントロールに関連して、POC値を計算した。

【0026】

結果

HDC酵素産物(ヒスタミン)及びヒスタミンプローブ(FITC-ヒスタミン)の構造を図1に示す。最初に、いくつかの市販の抗ヒスタミン抗体のFITC-ヒスタミンプローブとの相互作用を評価した(データは示されない)。これらの抗体の1つ(D22.12)は、蛍光偏光によって測定されるように強いプローブ結合を示し、別の特性を保持していた。

最初に、抗体に対するプローブの親和力及び相互作用の特異性を調べた(ともに競合的形態でロバストアッセイを構成することにとって重要である)。図2は、異方性の測定によって決定されるプローブと抗体との結合曲線を示す。プローブ濃度は6nMで保持され、抗体濃度は約10³にわたって変化する。データをフィッティングすることにより3.9nMの解離定数を決定した。ヒスチジンと比較したヒスタミンに対する前記抗体の特異性は、図3に示されるように立証された。プローブ及び抗体濃度をそれぞれ6及び50nMで一定に保持したが、ヒスタミン及びヒスチジン濃度は示されるように変化した。ヒスチジンは、試験される10⁵にわたる抗体への結合についてFITC-ヒスタミンと競合することはできなかった。しかしながら、ヒスタミンは、抗体結合のためのプローブと自由に競合し、135 μ MのIC50を得た。このように、FITC-ヒスタミンのヒスタミンモノクローナル抗体への強く特異的な結合及び酵素反応の産物との結合のために競合する能力は、HDCのための競合的ロバストアッセイを開発することができることを示唆する。

【0027】

図4Aは、種々の濃度のHDCでの酵素反応の時間的経過を示す。ヒスタミン(600 μ M)は200~400 μ Mの報告されているKm(Watabe et al 1992)の約2倍であった。100nMよりも高いHDC濃度では、反応は約30分間だけ線形であった。アッセイウインドウのサイズと大スケール選別及び反応の線形性のための酵素要求とのバランスを取るために、標準アッセイにおいて25~50nMのHDC及び90分のインキュベーション時間を用いることを選んだ。これは、さらに図4Bにおいて精緻化され、Allegroロボットシステムで行われる90分のインキュベーションでHDCの滴定を示す。この実験から、30nMの酵素濃度に行き着いた。このように、最終アッセイ条件を60 μ Lの合計容量中30nMのHDC、30nMの抗体及び6nMのFITC-ヒスタミンで90分間37 $^{\circ}$ Cに設定した。PLP濃度を33 μ Mに設定して酵素の飽和を維持した。

図5は、3つの公知のHDC阻害剤:メチルエステルヒスチジン、 α -フルオロメチルヒスチジン及びジペプチドヒスチジンフェニルアラニンの標準アッセイにおける振る舞いを示す。3つの化合物について、それぞれ7.7 μ M、1.4 μ M及び228.1 μ MのIC50を決定した。これらの値は、HPLCを用いて得られるものとよく一致している。

10

20

30

40

50

次いで、記載されたアッセイを用いてライブラリーから 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の最終濃度で化合物を選別した。384-ウエルプレートはプレート当たり352の化合物ウエル、16のコントロールウエル（化合物なし）及び16のブランクウエル（酵素なし）を含むように設定した。そのままのDMSOにおいて、化合物をアッセイ中1%の最終DMSO濃度を与えるためにバッファーで希釈した。この濃度のDMSOは、酵素活性又は安定性に影響を及ぼさないことが示された（データは示さない）。Allegroロボットシステムでアッセイを完全に自動化し、1日当たり約100プレートの処理が可能になった。図6は、90プレートの単一の選別実施についてブランク及びコントロールウエルの散布図を示し、Z'の平均は0.6であり、アッセイウインドウは80~100mPであった。ヒット基準として60%のコントロールを用いて0.05%の確認されたヒット率をもつこのアッセイで600,000を超える化合物を選別した。確認されたヒットは、効力を評価するために10点容量反応で引き続いてアッセイされた。

10

20

30

40

【0028】

考察

FPアッセイの性能に寄与する重要なパラメータは、蛍光プローブのその受容体又は標的分子に対する親和力である。一般に、プローブがその受容体へ結合する K_d は、結合されたフラクションに反比例する。このように、高親和力結合は、最適な蛍光-リガンド/受容体化学量論及びロバストFPシグナルを可能にする。複数の抗-ヒスタミン抗体を選別してヒスタミン-フルオレセインプローブに対して適した親和力を有するものを見つけた。これらの抗体の中でD22.12だけがFPアッセイの開発にとって十分に高い親和力を有する。マウスをアルブミンに結合した2-ヒスタミン-1,4-ベンゾキノンで免疫することによってD22.12抗体を生成し（Guesdon et al; 1986）、アルブミンに結合したヒスタミン又はアセチル化ヒスタミンで免疫することによって試験した他の抗体のすべてを生成した。D22.12のヒスタミン-フルオレセインに対する堅い結合親和力は、D22.12（ヒスタミンベンゾキノン）を得るために使用した免疫原とヒスタミン-フルオレセインプローブとの間の構造的類似性に起因する。

HDC（54Kd型）のその基質ヒスチジンに対する K_m は275 μM である（データは示さない）。このように、HDCアッセイの開発に対して重要な要件はヒスチジンと比較したヒスタミンに対する選択性である。我々のFPアッセイは、ヒスチジンと比較してヒスタミンに対して100倍を超える選択性を示す。しかしながら、図3に示すように、ヒスチジン濃度は、FPシグナルにおける非特異的増加により2mM未満のままである。この制限は、酵素の K_m がアッセイによって許容されるヒスチジンの最大量よりもはるかに低いことを考えれば、HDC活性を測定するほとんどの適用で問題ではない。

デカルボキシラーゼは、重要な生理学的役割を演じる酵素の大きなファミリーを形成する（Christen et al; 2001）。例えば、DOPAデカルボキシラーゼは、L-3,4-ジヒドロキシフェニルアラニン（L-DOPA）及びL-5-ヒドロキシトリプトファンの脱カルボキシ反応を介してそれぞれ重要な神経伝達物質であるドーパミン及びセロトニンの合成を引き起こす。セロトニン及びドーパミンのような伝達物質を測定するために使用される現在の方法はヒスタミン検出方法と類似している。このように、HDCについて本明細書に記載したアッセイは、ドーパデカルボキシラーゼのような関連する酵素に適用でき、よりよい薬理学的特性を持つ新しい阻害剤の開発を可能にする。

【配列表】

[2008520977000001.app](#)

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

ational application No

PCT/US2005/041766

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
INV.	G01N33/58	G01N33/533 G01N33/53 G01N33/574
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	KINOSHITA E ET AL: "Novel histamine measurement by HPLC analysis used to assay histidine decarboxylase inhibitory activity of shoyuflavones from soy sauce." BIOSCIENCE, BIOTECHNOLOGY, AND BIOCHEMISTRY. AUG 1998, vol. 62, no. 8, August 1998 (1998-08), pages 1488-1491, XP002382521 ISSN: 0916-8451 page 1489, column 1, paragraph 4 - column 2, paragraph 2 abstract ----- -/--	1-15
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents:		
A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *C* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *&* document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
24 May 2006		22/06/2006
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Schlegel, B

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

ational application No
PCT/US2005/041766

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	OWICKI J C: "FLUORESCENCE POLARIZATION AND ANISOTROPY IN HIGH THROUGHPUT SCREENING: PERSPECTIVES AND PRIMER" JOURNAL OF BIOMOLECULAR SCREENING, LARCHMONT, NY, US, vol. 5, no. 5, October 2000 (2000-10), pages 297-306, XP009007612 ISSN: 1087-0571 page 297, column 2, paragraph 2 - page 299, column 1, paragraph 1 abstract	1-19
Y	BURKE T J ET AL: "DEVELOPMENT AND APPLICATION OF FLUORESCENCE POLARIZATION ASSAYS IN DRUG DISCOVERY" CURRENT TOPICS IN MEDICINAL CHEMISTRY, BENTHAM SCIENCE PUBLISHERS, HILVERSUM, NL, vol. 6, no. 3, May 2003 (2003-05), pages 183-194, XP008050421 ISSN: 1568-0266 page 190, column 2, paragraph 2 - page 191, column 1, paragraph 2	1-19
A	GUESDON J L ET AL: "Monoclonal anti-histamine antibody. Preparation, characterization and application to enzyme immunoassay of histamine." JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS. 27 FEB 1986, vol. 87, no. 1, 27 February 1986 (1986-02-27), pages 69-78, XP002382522 ISSN: 0022-1759 cited in the application the whole document	1-19
Y	US 6 297 361 B1 (HAAK-FRENDSCHO MARY ET AL) 2 October 2001 (2001-10-02) columns 1,13 column 4, lines 10-34	16-19

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2005/041766

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 6297361	B1	02-10-2001	
		AU 7102798 A	03-08-1998
		CA 2275886 A1	16-07-1998
		EP 0970125 A2	12-01-2000
		JP 2001513755 T	04-09-2001
		WO 9830593 A2	16-07-1998

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード(参考)	
C 1 2 Q	1/527	(2006.01)	C 1 2 Q	1/527	
G 0 1 N	33/573	(2006.01)	G 0 1 N	33/573	A
G 0 1 N	21/64	(2006.01)	G 0 1 N	21/64	A
C 1 2 N	9/88	(2006.01)	C 1 2 N	9/88	

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(74)代理人 100114007

弁理士 平山 孝二

(72)発明者 オーガスト イー マイケル

アメリカ合衆国 コネチカット州 0 6 8 7 7 - 0 3 6 8 リッジフィールド リッジバリー ロード 9 0 0 ピーオーボックス 3 6 8 ベーリンガー インゲルハイム ファーマシューティカルズ インコーポレイテッド内

(72)発明者 ラジョット ダニエル

アメリカ合衆国 コネチカット州 0 6 8 7 7 リッジフィールド リッジバリー ロード 9 0 0 ピーオーボックス 3 6 8 ベーリンガー インゲルハイム ファーマシューティカルズ インコーポレイテッド内

Fターム(参考) 2G043 AA03 CA04 DA08 EA01 GA07 GB16
 2G045 AA40 BB51 DA20 DA71 FA11 FB03 FB12 GC15
 2G054 AB03 AB04 BB13 CB02 CB03 CE02 EA03 GA04 GB02
 4B050 CC03 DD11 GG01 LL01 LL03
 4B063 QA01 QA18 QA19 QQ38 QQ61 QQ95 QR48 QR49 QR55 QS32
 QS33 QS36 QX02

专利名称(译)	用于测量组氨酸脱羧酶活性的荧光偏振测定法		
公开(公告)号	JP2008520977A	公开(公告)日	2008-06-19
申请号	JP2007541490	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)	勃林格殷格翰制药公司		
[标]发明人	オーガストイーマイケル ラジヨットダニエル		
发明人	オーガスト イー マイケル ラジヨット ダニエル		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/542 G01N33/50 G01N33/15 G01N21/78 C12Q1/527 G01N33/573 G01N21/64 C12N9/88		
CPC分类号	G01N33/542 C12Q1/34 G01N33/573 G01N2333/988 G01N2500/02		
FI分类号	G01N33/53.ZNA.Q G01N33/542.A G01N33/50.Z G01N33/15.Z G01N21/78.C C12Q1/527 G01N33/573.A G01N21/64.A C12N9/88		
F-TERM分类号	2G043/AA03 2G043/CA04 2G043/DA08 2G043/EA01 2G043/GA07 2G043/GB16 2G045/AA40 2G045/BB51 2G045/DA20 2G045/DA71 2G045/FA11 2G045/FB03 2G045/FB12 2G045/GC15 2G054/AB03 2G054/AB04 2G054/BB13 2G054/CB02 2G054/CB03 2G054/CE02 2G054/EA03 2G054/GA04 2G054/GB02 4B050/CC03 4B050/DD11 4B050/GG01 4B050/LL01 4B050/LL03 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ38 4B063/QQ61 4B063/QQ95 4B063/QR48 4B063/QR49 4B063/QR55 4B063/QS32 4B063/QS33 4B063/QS36 4B063/QX02		
代理人(译)	小川伸男		
优先权	60/628242 2004-11-16 US		
其他公开文献	JP2008520977A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

下面荧光测量候选化合物包括以下步骤偏振法的HDC调节活性：大于候选化合物和选择性组胺大的) HDC，组氨酸，荧光标记的组胺探针，至少10倍更高的组氨酸的抗组氨酸抗体该; B) 温育反应混合物; c) 确定在测试化合物存在下是否发生HDC抑制，其中在测试化合物存在下检测到荧光信号的增加表示它禁止HDC的活动。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US2005/041766
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int. Cl. 7: G01N33/53 G01N33/533 G01N33/53 G01N33/574		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELD SEARCHED Classification searched (classification system followed by classification system) G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT Category: Citation of documents with indication, where appropriate, of the relevant passages. Referenced to claim No.		
Y	KIMOSHITA ET AL.: "Novel histamine measurement by HPLC analysis used to assay histidine decarboxylase inhibitory activity of shoyuflavone from soy sauce." BIOCHEMISTRY, BIOTECHNOLOGY, AND BIOCHEMISTRY, AUG 1998, VOL. 62, NO. 8, AUGUST 1998 (1998-08), pages 1488-1491, XP002382521 ISSN: 0916-3441 Page 1489, column 1, paragraph 4 - column 2, paragraph 2 abstract	1-15
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the combination of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family status.		
A Document pertinent to the present state of the art which is not considered to be relevant. *B* Document pertinent to the present state of the art which is not considered to be relevant because it does not disclose the invention. *C* Document pertinent to the present state of the art which is not considered to be relevant because it does not disclose the invention. *D* Document pertinent to the present state of the art which is not considered to be relevant because it does not disclose the invention. *E* Document pertinent to the present state of the art which is not considered to be relevant because it does not disclose the invention. *F* Document pertinent to the present state of the art which is not considered to be relevant because it does not disclose the invention. *G* Document pertinent to the present state of the art which is not considered to be relevant because it does not disclose the invention. *H* Document pertinent to the present state of the art which is not considered to be relevant because it does not disclose the invention. *I* Document pertinent to the present state of the art which is not considered to be relevant because it does not disclose the invention. *J* Document pertinent to the present state of the art which is not considered to be relevant because it does not disclose the invention. *K* Document pertinent to the present state of the art which is not considered to be relevant because it does not disclose the invention. *L* Document pertinent to the present state of the art which is not considered to be relevant because it does not disclose the invention. *M* Document pertinent to the present state of the art which is not considered to be relevant because it does not disclose the invention. *N* Document pertinent to the present state of the art which is not considered to be relevant because it does not disclose the invention. *O* Document pertinent to the present state of the art which is not considered to be relevant because it does not disclose the invention. *P* Document pertinent to the present state of the art which is not considered to be relevant because it does not disclose the invention. *Q* Document pertinent to the present state of the art which is not considered to be relevant because it does not disclose the invention. *R* Document pertinent to the present state of the art which is not considered to be relevant because it does not disclose the invention. *S* Document pertinent to the present state of the art which is not considered to be relevant because it does not disclose the invention. *T* Document pertinent to the present state of the art which is not considered to be relevant because it does not disclose the invention. *U* Document pertinent to the present state of the art which is not considered to be relevant because it does not disclose the invention. *V* Document pertinent to the present state of the art which is not considered to be relevant because it does not disclose the invention. *W* Document pertinent to the present state of the art which is not considered to be relevant because it does not disclose the invention. *X* Document pertinent to the present state of the art which is not considered to be relevant because it does not disclose the invention. *Y* Document pertinent to the present state of the art which is not considered to be relevant because it does not disclose the invention. *Z* Document pertinent to the present state of the art which is not considered to be relevant because it does not disclose the invention.		
Date of the actual completion of the international search: 24 May 2006		Date of mailing of the international search report: 22/06/2006
Name and mailing address of the ISA/EPO: European Patent Office, P.O. Box 1, Patentstrasse 2, CH-8001 Zurich, Switzerland, Fax: (+41-76) 310-3010		Authorized officer: Schlegel, B