

(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2004-503255

(P2004-503255A)

(43) 公表日 平成16年2月5日(2004.2.5)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	2 G O 4 5
C 1 2 Q 1/02	C 1 2 Q 1/02	4 B O 2 4
C 1 2 Q 1/68	C 1 2 Q 1/68	4 B O 6 3
G O 1 N 33/15	G O 1 N 33/15	
G O 1 N 33/50	G O 1 N 33/50	
	審査請求 未請求 予備審査請求 有	(全 103 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2002-510943 (P2002-510943)	(71) 出願人	501153186 ビスタジェン インコーポレイテッド アメリカ合衆国 カリフォルニア州 94 010-2307 パーリングゲイム ロー リンズ ロード 1450
(86) (22) 出願日	平成13年6月14日 (2001.6.14)	(74) 代理人	100078282 弁理士 山本 秀策
(85) 翻訳文提出日	平成14年12月9日 (2002.12.9)	(74) 代理人	100062409 弁理士 安村 高明
(86) 国際出願番号	PCT/US2001/019048	(74) 代理人	100113413 弁理士 森下 夏樹
(87) 国際公開番号	W02001/096865	(72) 発明者	スノッドグラス, エイチ. ラルフ アメリカ合衆国 カリフォルニア 944 03, サン マテオ, アルマダ ウェ イ 2221
(87) 国際公開日	平成13年12月20日 (2001.12.20)		最終頁に続く
(31) 優先権主張番号	60/211, 608		
(32) 優先日	平成12年6月14日 (2000.6.14)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

(54) 【発明の名称】 間葉幹細胞を使用する毒性の分類

(57) 【要約】

本発明は、化合物の毒性を同定および分類するための方法およびシステム、ならびに新規な組成物を毒性についてスクリーニングするための方法およびシステムを提供する。本発明は、遺伝子またはタンパク質発現における変化を検出する工程を包含し、従って、既知もしくは未知の毒性の種々の化合物に接触する、単離された哺乳動物多能性間葉幹細胞 (MSC) における分子プロフィールを構築し、そして化合物の毒性と分子プロフィールとを相関させる。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

化合物の分子プロフィールを作製する方法であって、該方法は以下の工程：

a) 哺乳動物の間葉幹細胞 (MSC) の単離された集団を、該化合物に接触させる工程；
および

b) 該化合物に応答した、哺乳動物 MSC 中の遺伝子発現またはタンパク質発現における変化を記録し、該化合物の分子プロフィールを作製する工程、
を包含する方法。

【請求項 2】

所定の毒性を有する化合物の分子プロフィールのライブラリーを編集する方法であって、
該方法は以下の工程：

a) 哺乳動物の間葉幹細胞 (MSC) の単離された集団を、所定の毒性を有する化合物に
接触させる工程；

b) 該化合物に応答した、哺乳動物 MSC 中の遺伝子発現またはタンパク質発現における
変化を記録し、該化合物の分子プロフィールを作製する工程

c) 所定の毒性を有する、少なくとも 2 つの化合物で、工程 a) および工程 b) を繰り返
すことによって、分子プロフィールのライブラリーを編集する工程、を包含する方法。

【請求項 3】

請求項 1 または 2 に記載の方法であって、遺伝子発現またはタンパク質発現における前記
変化が、標識によって検出される、方法。

【請求項 4】

請求項 3 に記載の方法であって、前記標識が、蛍光、比色、放射活性、酵素、酵素基質、
ヌクレオチドアナログ、磁気、ガラス、ラテックスビーズ、コロイド金、および電氣的ト
ランスポンダーからなる群から選択される、方法。

【請求項 5】

請求項 1 または 2 に記載の方法であって、前記分子プロフィールが、遺伝子発現における
変化を含む、方法。

【請求項 6】

請求項 5 に記載の方法であって、遺伝子発現における前記変化が、ヌクレオチドハイブリ
ダイゼーションアッセイによって検出される、方法。

【請求項 7】

請求項 1 または 2 に記載の方法であって、前記分子プロフィールが、タンパク質発現にお
ける変化を含む、方法。

【請求項 8】

請求項 7 に記載の方法であって、タンパク質発現における前記変化が、免疫活性アッセイ
によって検出される、方法。

【請求項 9】

請求項 7 に記載の方法であって、タンパク質発現における前記変化が、質量分析アッセイ
に検出される、方法。

【請求項 10】

請求項 2 に記載の方法であって、前記 MSC が、ヒトの MSC である、方法。

【請求項 11】

請求項 10 に記載の方法であって、さらに、所定の毒性を有する前記化合物が、治療剤、
神経毒、腎臓毒、肝臓毒、造血細胞の毒、および筋肉毒からなる群から選択される、方法
。

【請求項 12】

請求項 10 に記載の方法であって、さらに、所定の毒性を有する前記化合物が、1 つ以上
の生殖器官の細胞に対して毒性である薬剤、催奇性薬剤および発癌物質からなる群から選
択される、方法。

【請求項 13】

10

20

30

40

50

請求項 10 に記載の方法であって、さらに、所定の毒性を有する前記化合物が、農薬、化粧品、および環境汚染物質からなる群から選択される、方法。

【請求項 14】

請求項 2 に記載の方法であって、前記 MSC が、非ヒト哺乳動物のものである、方法。

【請求項 15】

請求項 14 に記載の方法であって、前記非ヒト哺乳動物が、げっ歯類である、方法。

【請求項 16】

請求項 14 に記載の方法であって、さらに、所定の毒性を有する前記化合物が、動物の治療剤、神経毒、腎臓毒、肝臓毒、造血細胞の毒、および筋肉毒からなる群から選択される、方法。

10

【請求項 17】

請求項 14 に記載の方法であって、さらに、所定の毒性を有する前記化合物が、1つ以上の生殖器官の細胞に対して毒性である薬剤、催奇性薬剤および発癌物質からなる群から選択される、方法。

【請求項 18】

請求項 14 に記載の方法であって、さらに、所定の毒性を有する前記化合物が、農薬、化粧品、および環境汚染物質からなる群から選択される、方法。

【請求項 19】

所定の毒性を有する化合物の分子プロファイルのライブラリーであって、該ライブラリーが、請求項 2、10～18 のいずれか 1 項に従う方法によって作製される、ライブラリー

20

【請求項 20】

請求項 19 に記載のライブラリーであって、前記ライブラリーが、少なくとも 20 個の化合物についての分子プロファイルを含む、ライブラリー。

【請求項 21】

試験化合物の毒性を分類する方法であって、該方法は以下の工程：

a) 請求項 1 に従って、該試験化合物の分子プロファイルを作製する工程；および

b) 工程 a) における分子プロファイルを、所定の毒性を有する化合物の分子プロファイルと比較する工程、

を包含し、

30

ここで、該試験化合物の毒性の該分類が、工程 b) の該比較によって決定される、方法。

【請求項 22】

試験化学化合物の毒性を分類する体系的な方法であって、該方法は以下の工程：

a) 請求項 1 に従って、該試験化合物の分子プロファイルを作製する工程；および

b) 工程 a) における分子プロファイルを、所定の毒性を有する化合物の分子プロファイルの複合ライブラリーと比較する工程であって、ここで、該複合ライブラリーが、少なくとも 2 つの化合物の分子プロファイルを有し、該分子プロファイルが、請求項 1 に従って作製される工程、

を包含し、

ここで、該試験化合物の毒性の該分類が、工程 b) の該比較によって決定される、方法。

40

【請求項 23】

試験化合物の毒性をランク付けする方法であって、該方法は以下：

a) 請求項 1 に従って、該試験化合物の分子プロファイルを作製する工程；および

b) 工程 a) における分子プロファイルを、所定の毒性を有する化合物の分子プロファイルの複合ライブラリーと比較する工程であって、ここで、該複合ライブラリーが、少なくとも 2 つの化合物の分子プロファイルを有し、該分子プロファイルが、請求項 1 に従って作製される工程、

を包含し、

ここで、該試験化合物の毒性の該分類が、工程 b) の該比較によって決定される、方法。

【請求項 24】

50

請求項 2 1、2 2、または 2 3 に記載の方法であって、前記試験化合物が、既知または未知である、方法。

【請求項 2 5】

請求項 2 1、2 2、または 2 3 に記載の方法であって、さらに、前記 M S C が、ヒトのものである、方法。

【請求項 2 6】

請求項 2 5 に記載の方法であって、さらに、所定の毒性を有する前記化合物が、動物の治療剤、神経毒、腎臓毒、肝臓毒、造血細胞の毒、および筋肉毒からなる群から選択される、方法。

【請求項 2 7】

請求項 2 5 に記載の方法であって、さらに、所定の毒性を有する前記化合物が、1 つ以上の生殖器官の細胞に対して毒性である薬剤、催奇性薬剤および発癌物質からなる群から選択される、方法。

【請求項 2 8】

請求項 2 5 に記載の方法であって、さらに、所定の毒性を有する前記化合物が、農薬、化粧品、および環境汚染物質からなる群から選択される、方法。

【請求項 2 9】

請求項 2 1、2 2、または 2 3 に記載の方法であって、前記 M S C が、非ヒト哺乳動物のものである、方法。

【請求項 3 0】

請求項 2 9 に記載の方法であって、前記非ヒト哺乳動物が、げっ歯類である、方法。

【請求項 3 1】

請求項 2 9 に記載の方法であって、さらに、所定の毒性を有する前記化合物が、動物の治療剤、神経毒、腎臓毒、肝臓毒、造血細胞の毒、および筋肉毒からなる群から選択される、方法。

【請求項 3 2】

請求項 2 9 に記載の方法であって、さらに、所定の毒性を有する前記化合物が、1 つ以上の生殖器官の細胞に対して毒性である薬剤、催奇性薬剤および発癌物質からなる群から選択される、方法。

【請求項 3 3】

請求項 2 9 に記載の方法であって、さらに、所定の毒性を有する前記化合物が、農薬、化粧品、および環境汚染物質からなる群から選択される、方法。

【請求項 3 4】

化合物の M S C における分子プロフィールを、所定の毒性を有する化合物の M S C における分子プロフィールのライブラリーと比較するための集積システムであって、該集積システムが、アレイ上の標識のパターンを読み取るのに適し、そして所定の毒性を有する化合物の M S C における複数の分子プロフィールを有するデータベースを含む、デジタルコンピュータに作動可能に連結される、アレイ読み取り器を備える、集積システム。

【請求項 3 5】

請求項 3 4 に記載の集積システムであって、前記データが、少なくとも 2 0 個の遺伝子またはタンパク質発現プロフィールを含む、集積システム。

【請求項 3 6】

請求項 3 4 に記載の集積システムであって、1 時間あたりアレイ上で 5 0 0 以上の標識のハイブリダイゼーションパターンを読み取ることが可能である、集積システム。

【請求項 3 7】

請求項 3 4 に記載の集積システムであって、さらに、アレイ上の標識のパターンを読み取るための最適な検出器に作動可能に連結される、集積システム。

【請求項 3 8】

M S C における分子プロフィールおよび化合物の毒性を相関させる集積システムであって、該集積システムが、所定の毒性を有する化合物の M S C における複数の分子プロフィー

10

20

30

40

50

ルを有するデータベースおよび分子プロフィールと毒性の相関のために適切なプログラムを含む、デジタルコンピューターに作動可能に連結される、アレイ上の標識のパターンの読み取りに適したアレイ読み取り器を備える、集積システム。

【請求項 39】

請求項 38 に記載の集積システムであって、前記データが、少なくとも 20 個の遺伝子またはタンパク質発現プロフィールを含む、集積システム。

【請求項 40】

請求項 38 に記載の集積システムであって、1 時間あたりアレイ上で 500 以上の標識のハイブリダイゼーションパターンを読み取ることが可能である、集積システム。

【請求項 41】

請求項 38 に記載の集積システムであって、さらに、アレイ上の標識のパターンを読み取るための最適な検出器に作動可能に連結される、集積システム。

【発明の詳細な説明】

【0001】

(関連出願の相互参照)

本出願は、2000 年 6 月 14 日出願の米国仮出願番号第 60 / 211, 608 号 (これは、その全体が参考として本明細書中に援用される) の優先権の利益を主張する。

【0002】

(技術分野)

本発明は、毒性化合物を同定および特徴付ける方法ならびに毒性効果について新化合物をスクリーニングする方法を提供する。

【0003】

(背景技術)

現代の薬物探索の重大な要素は、疾患の処置のための薬物候補を迅速に同定するための、コンビナトリアル化学ライブラリーの高処理能力スクリーニングアッセイの使用である。現在、化学者によって生成される数百万の化合物のほとんどは、それらの宿主系への毒性に起因して、治療的使用に適切ではない。類似の毒性の問題は、産業および普通の化学物質の開発も同様に妨害する。現在利用可能な毒素学的スクリーニングアッセイが、ヒトの治療に関連する全毒性を検出しないことは明らかである。潜在的な毒性のための潜在的な治療法をスクリーニングする、より良好な手段は、費用および新治療法の開発の不確定性を減少させ、そして不確定性の減少によって、民間部門を助長して薬物開発のさらなる資源を与える。

【0004】

従来「単一レセプター」細胞株および動物毒性試験の、現在利用可能な代替物は、これらの必要性を十分に満たしていない。例えば、Farr、米国特許第 5, 811, 231 号は、種々の細胞株の細胞において選択されたストレスプロモーターを選択する工程、およびこれらのプロモーターに連結した遺伝子転写物レベルを決定する工程によって、毒性化合物を同定および特徴付ける方法を提供する。それゆえ、この方法は、プロモーターおよび細胞株の両方が示す、潜在的な毒性薬剤の目的の生物に対する影響の程度に依存する。

【0005】

オリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーションアレイの使用は、化学組成物の潜在的な毒性を決定するための別の経路を提供する。化学組成物に培養細胞を曝露し、次いで、その曝露された細胞の発現パターンを、他の化学薬剤に曝露された細胞の発現パターンと比較することによって、試験化合物の発現パターンと類似した発現パターンを検出し得、このようにして、化学組成物の毒性が類似であり得ることを予測し得る。例えば、Service, R., Science 282: 396-399 (1998) を参照のこと。これらの方法は、個々の細胞株が、完全な生物の複雑な生物学を十分に表し得ないという事実で損害を受ける。さらに、複数の細胞株での反復試験でさえ、再現されないか、または生物で生じる細胞と組織の間の複雑な相互作用を説明しない。

10

20

30

40

50

【0006】

肝臓細胞に基づく毒性アッセイもまた、公知である。例えば、Maierは、単離された新鮮なラット肝細胞の培養物を用いるインビトロ毒性試験の開発を記載している。Maier, P., *Experientia* 44(10): 807-817 (1988)。この試験は、肝臓において細胞分化を妨害する化合物の指標としての、倍数体肝細胞の薬物誘導病理学的変化に基づく。SawaiおよびAwataは、試験物質の毒性を試験するために使用され得る肝細胞を細胞培養するための方法を記載している。SawaiおよびAwata、日本国特許第10179150号。TakashinaおよびNaokiは、継代培養可能な肝細胞株を、毒性試験に使用され得る肝細胞と融合させることによって得られる樹立された培養可能な肝細胞を記載している。TakashinaおよびNaoki、日本国特許第06319535号。さらに、このような細胞株を用いる毒性アッセイは、完全な生物または組織の複雑な生物学を十分に考慮し得ず、そして毒性の影響を決定する細胞および組織の相互作用の寄与に対応できない。

10

【0007】

Lockhartらは、公知の遺伝子群の発現プロファイルを用いて、細胞に対する有害な副作用に関して薬物をスクリーニングする方法を記載している。Lockhartら、米国特許第6,033,860号。この方法は、16個の公知の遺伝子発現における変化を評価し、それゆえ、同一性が公知であり、発現レベルが詳細に測定され得る非常に少数の遺伝子の発現を変化させる薬物および毒性型だけに制限される。

20

【0008】

チトクロムP450の発現に基づく薬剤の細胞毒性を同定または試験する方法もまた、公知である。Harrisら、米国特許第5,660,986号。この方法は、内因性チトクロムP450を発現するヒト気管支および肝臓の上皮細胞株に対する薬剤の細胞毒性試験に基づいている。この方法は、複雑な細胞および組織の相互作用を考慮しない細胞株に基づくアッセイなので、特定の遺伝子の発現およびその性質に関するその狭い焦点によって制限される。

【0009】

当該分野で必要とされることは、細胞が他の型の細胞と相互作用する環境において、潜在的な毒性に関して、化学組成物を体系的に試験する方法である。さらに必要とされることは、費用、時間、ならびに動物およびヒトの試験の倫理的問題を伴わずに、どれが生物全体に対する組成物の影響に関連するかを実行する手段である。本発明は、これらおよび他の必要物に取り組む。

30

【0010】

(発明の開示)

本発明は、化学組成物の毒性を評価する新規の方法を提供する。実施形態の1群において、本発明は、化学組成物の分子プロファイルを作成する方法に指向され、この方法は、以下の工程を含む：a)哺乳動物の間葉肝細胞(MSC)の単離された集団と化学組成物とを接触させる工程；およびb)その化学組成物の分子プロファイルを作成するために、化学組成物に反応する哺乳動物MSCでの遺伝子発現またはタンパク質発現の変化を記録する工程。

40

【0011】

本発明は、さらに所定の毒性を有する化学組成物の分子プロファイルのライブラリーを集計する方法を具体化し、これは以下の工程を含む：a)哺乳動物MSCの単離された集団と所定の毒性を有する化学組成物とを接触させる工程；b)その化学組成物の分子プロファイルを作成するために、化学組成物に反応する哺乳動物MSCでの遺伝子発現またはタンパク質発現の変化を記録する工程；ならびにc)所定の毒性を有する少なくとも2つの化学組成物を用いて、工程a)およびb)を反復することにより分子プロファイルのライブラリーを集計する工程。本発明の方法により集計された分子プロファイルライブラリーは、コンピューターハードドライブ、コンパクトディスク、カセット、フロッピー(登録商標)ディスクなどのような適切な記憶機器に蓄積され得る。一般的そして好ましくは、適

50

切な記憶装置は、このようなデータを機器（コンピューターのような）で読み取り可能な形態に保存する。

【0012】

本発明の別の実施形態は、MSC中のその分子プロフィールを、所定の毒性を有する同定された化学組成物の分子プロフィールと比較することによって、試験化学組成物の毒性を分類する方法を提供する。1つの局面において、この試験化学組成物は、所定の毒性を有する化学組成物と同じで有り得る。例えば、公知の化学組成物と同一の分子プロフィールを呈するようなこの試験によって、この試験化学物質は同定される。

【0013】

本発明はさらに、そのプロフィールを、所定の毒性を有する複数の化学組成物のプロフィールを含むライブラリーと比較させることによって、試験化学組成物の毒性を分類するための体系方法を含む。好ましくは、ライブラリーに含まれる化学組成物は、型および標的の組織または器官について類似の毒性を発揮する。このライブラリーは、データベースの形態をとり得る。データベースは、異なる毒性分類の化学組成物についての1つより多いライブラリーを含み得る。

10

【0014】

本発明の1つの局面において、この試験化学組成物の毒性は、MSC中のその分子プロフィールと、所定の毒性を有する化学組成物の分子プロフィールとの比較によって分類され得る。

【0015】

本発明のMSCは、ヒトまたは非ヒトの哺乳動物であり得、これらとしては、ネズミ種、ならびにイヌ種、ネコ種、ブタ種、ウシ種、ヤギ種、ウマ種およびヒツジ種が挙げられる。

20

【0016】

遺伝子またはタンパク質の発現のレベルにおける変化は、以下のいずれかから選択される標識の使用によって検出され得る：蛍光、比色定量、放射能、酵素、酵素基質、ヌクレオシドアナログ、磁性、ガラス、またはラテックスビーズ、コロイド金、および電気的応答器。変化はまた、質量分析法によって検出され得る。この化学組成物は、公知（例えば、潜在的な新規薬物）または未知（例えば、道端近くに捨てられているのが見つかった未知の化合物質のサンプル、および未知の毒性のサンプル）であり得る。

30

【0017】

さらに、この化学組成物は、治療薬剤であり得（または潜在的な治療薬剤）、あるいは神経毒、肝臓毒素、肝細胞の毒素、筋毒（myotoxin）、発癌物質、催奇形物質、または1つ以上の生殖器に対する毒素のような公知の毒性の薬剤であり得る。この化学組成物はさらに、殺虫剤、殺真菌薬、抗線虫薬、および肥料のような農薬、いわゆる「美容食品（cosmeceuticals）」を含む化粧品、工業廃水または副産物、あるいは環境汚染物質であり得る。それらはまた、動物の治療法または潜在的な治療法であり得る。

【0018】

本発明はまた、本発明の方法を実行するために都合よく使用され得るアレイ形式（例えば、液体アッセイ）で提供されるMSCを提供する。アレイ形式で提供される細胞は、目的の化学組成物に曝露され得、そしてその細胞の分子プロフィールが決定され得る。この分子プロフィールは、例えば、（そのアレイ）自体の基材上でMSCをプローブ化するか、または（そのアレイ）基材から細胞を解離し、そして本明細書中に記載の分子プロフィールの決定のためにそれらを調製することによって、決定され得る。

40

【0019】

本発明はさらに、アレイ上の標識パターンを読むために適応されたアレイリーダーを備えた、化学組成物の分子プロフィールを、化学組成物の分子プロフィールのライブラリーと比較するために統合されたシステムを含み、これは、公知または未知の化学組成物と接触された哺乳動物のMSCの遺伝子発現またはタンパク質発現プロフィールの多数を有する

50

データファイルを含むコンピューターに動作可能に連結される。

【0020】

本発明はまた、アレイ上の標識パターンを読むために適応されたアレイリーダーを備えた、化学組成物の分子プロフィールと化学組成物の毒性とを関連付ける統合されたシステムを含み、これは、所定の毒性を有する化学組成物と接触された哺乳動物のMSCの分子プロフィールの多数を有するデータベースファイル、および分子プロフィール毒性相関に適切なプログラムを含むデジタルコンピューターに動作可能に連結される。本発明のこの統合されたシステムは、1時間に500標識より多くを読み取り得、そしてさらにアレイ上の標識パターンを読むための光学的検出器に動作可能に連結され得る。

【0021】

10

(発明を実施するための形態)

(A. 定義)

本明細書中で使用される「毒性」とは、生きている生物またはそれらの一部に対する化学物質の任意の有害な影響を意味する。この毒性は、個々の細胞、組織、器官、または器官系に対するものであり得る。それゆえ、毒性の測定は、ヒトまたは動物の健康状態に関する化学物質の潜在的な影響(環境の化学的曝露の重要性を含む)を決定することに不可欠である。あらゆる化学物質およびあらゆる薬物は、多少の濃度で有害な影響を有する;従って、この問題は、一部薬物または化学物質が、規定された目的で市販されるために有意に低い危険性を示すかどうか、または環境汚染に関して、環境でのその存在によって示される危険性が、その放出を防ぐための特別な予防措置を必要とするか、または一旦放出されれば隔離またはレメディエーションを必要とするかどうかということである。例えば、Klassenら、eds.、CasarettおよびDoull's Toxicology: The Basic Science of Poisons、McGraw-Hill (New York、NY、5th Ed. 1996)を参照のこと。本明細書中に使用される、「所定の毒性」を有する化学組成物は、化学組成物の毒性型および/または特定の薬力学的特性が決定されたことを意味する。例えば、化学組成物は、肝臓に毒性を誘導することが公知であり得る。さらに、化学物質によって引き起こされる肝臓毒性の重症度は、肝臓組織と接触する化学物質の量または濃度によって定量的に測定され得る。

20

【0022】

30

本発明による「遺伝子またはタンパク質の発現における改変」は、1つ以上の遺伝子またはタンパク質の発現レベルにおける、正常な組織培養培地および正常な細胞培養条件のみに曝露されているMSCの遺伝子またはタンパク質の発現レベルとの比較した変化を意味する。状況に依存して、化学薬剤に曝露されたMSCが、コントロールMSCでは発現されないタンパク質を発現する場合、この成句は、単一のタンパク質または遺伝子の発現における変化を意味し得るか、またはMSCの遺伝子またはタンパク質の全体の発現パターンを意味し得る。この成句は、1つ以上の時点ならびに/あるいはそれらの分化、増殖および/または間葉細胞への発達の経路に沿った段階での、MSCにおける遺伝子またはタンパク質の発現を含み得る。この成句は、十分に分化した間葉細胞での遺伝子またはタンパク質の発現を含まない。

40

【0023】

本明細書中に使用される「MSC型」または「MSCの型」は、特定の供給源(例えば、供給源の種、組織、年齢によって定義されるような)から単離されるMSCおよび/または特定のMSC単離方法に従って単離されるMSCをいう。

【0024】

本明細書中に使用される「化学組成物」、「化学物質」、「組成物」、および「薬剤」は、一般的に同義語であり、そして目的の化合物をいう。例えば、この化学物質は、潜在的な治療、農薬化学、環境汚染物質、あるいは犯罪現場、廃棄物処理場で検出されたか、または道端に捨てられた未知の物質として考慮され得る。

【0025】

50

本明細書中に使用される化学組成物の「分子プロフィール」または「プロフィール」は、培養培地のみ contacts する類似MSCと比較して、その化学組成物によって接触されるMSCでの遺伝子もしくはタンパク質の発現、またはその両方の変化パターンをいう。

【0026】

本明細書中に使用される化学組成物の「有効プロフィール」とは、細胞、組織、器官、および/または生物における化学組成物の、予期された、特徴的なおよび/または所望の影響の存在および/または程度をいう。例えば、骨の発達を誘導することが公知であるか、または予想される薬物の有効プロフィールは、骨の発達に関連する遺伝子および/またはタンパク質のアプレギュレーションのような影響を含み得る。

【0027】

本明細書中に使用される「データベース」とは、培養培地のみ contacts させた同種のMSCと比較した、化学組成物と contacts させたMSCでの遺伝子またはタンパク質、あるいはその両方のパターンにおける変化に対する、化学薬剤の毒性、生物学的影響、またはその両方についての情報を関連付ける情報を記録するための、法則化されたシステムをいう。

【0028】

本明細書中に使用される「ライブラリー」とは、少なくとも2つの化学組成物の分子プロフィールの編集をいい、これは、化学組成物と contacts させたMSCでの遺伝子またはタンパク質、あるいはその両方の発現における変化と、他の化学組成物によって引き起こされるこのような発現のプロフィールとの比較を可能にする。

【0029】

「アレイ」は、法則化された位置または配置を意味する。最も一般的に、本明細書中に使用される「アレイ」は、オリゴヌクレオチド(cDNAおよびゲノムDNAを含む)、チップまたは相補的オリゴヌクレオチド(cDNAおよびゲノムDNAを含む)を捕らえるために使用される他の表面上に配置されたリガンド、あるいはリガンドのための基質の法則化された配置をいう。例えば、その配置内のオリゴヌクレオチドまたはリガンドの各配置は既知であるので、この配列(核酸)または物理的性質(タンパク質)は、核酸または基質がアレイに結合する位置によって決定され得る。

【0030】

「動作可能な連結」とは、2つ以上のエレメントが、第1のエレメント(光学的リーダーによる読み取りのような)において生じる事象が、第2のエレメントによって伝えられ、そして作用されることを可能にする方法で接続されることを意味する(例えば、光学的リーダーからのデータに関係するコンピューターによる計算)。

【0031】

(B. 一般的な説明)

本発明は、インビボでの複雑な生物学的相互作用および細胞相互作用を密にモデル化するインビトロ系において、ゲノムワイドな基礎に基づき、化合物の毒性を評価する方法を提供する。1つの局面において、本発明は、その標的を確証する能力、および潜在的な治療剤に対する応答に関連する発現した遺伝子の全てを迅速に同定し、そしてこれらを定量化する能力の両方のために、薬物開発にいて特に有用である。。

【0032】

本発明は、多能性間葉幹細胞(MSC)の特性を探索することによって、これらの目的を達成する。MSCは、脂肪結合組織、骨結合組織、軟骨結合組織、弾性結合組織、筋肉結合組織、および線維結合組織を含む、様々な種類の間葉組織/細胞または結合組織/細胞に分化することが可能な形成多能性芽細胞である。MSCは、中胚葉起源の様々な組織(例えば、骨髄、血液(末梢血を含む)、骨膜、真皮、および筋肉)から見出され、そして単離されてきた。複数の組織型へと分化するその多能性によって、MSCの単離された集団は、マウスまたはより大きい哺乳類の使用に関連しつつ、費用および困難性を回避しつつ、従来の単細胞アッセイまたは酵母アッセイを行うのに比べ、インビボ系の複雑性に対してずっと近いモデルを提供する。

【0033】

10

20

30

40

50

本発明の目的のために、MSCは、他の型の幹細胞（例えば、胚性幹細胞（ES））を超える多くの利点を有する。MSCは、多くの供給源から比較的容易に単離、および精製することができる。これらはまた、培養物中で増大し、そして改変条件（例えば、薬物処理）に供することが比較的容易である。他方では、ES細胞を得ることは大変複雑であり、そして大変な労力を要する傾向にある。ES細胞の場合、ヒト胚または動物胚の使用はまた、倫理的な監視および規制による監視を受け得る。さらに、MSCは、容易に利用可能な組織（例えば、成人の皮膚または骨格筋）から単離され得るので、本発明は、独特の薬物感受性を有する、個々の患者または患者の集団に対して毒性プロファイルの開発を可能にする手段、すなわち、ES細胞を毒性アッセイについて使用する場合達成することが困難であった領域を提供する。

10

【0034】

本発明に使用されるMSCは、細胞集団を含み、この集団の大多数は、適切な条件下で培養した場合、異なった細胞系統に発生が可能である、多能性細胞である。MSC集団は、多能性細胞を少なくとも51%含むことが好ましい。より好ましくは、このMSC集団は、多能性細胞を少なくとも75%含む。そしてさらに好ましくは、このMSC集団が、多能性細胞を少なくとも95%含む。

【0035】

最も単純な形態において、本発明に従った分子プロファイルを作製する方法は、MSCと目的の化学組成物とを接触させ、次いで、この薬剤に曝露していないMSC（「コントロールMSC」）と比較して、化学組成物に曝露されたMSC（「試験MSC」）における、遺伝子発現、タンパク質発現、またはこれらの両方の変更を決定する工程を含む。

20

【0036】

さらに、2以上の異なる化学組成物（例えば、類似の毒性を有する化学組成化合物）についての分子プロファイルを編纂することによって、ライブラリーが作製され得る。これらの組成物の分子プロファイルは、これらの遺伝子発現またはタンパク質発現のパターンにおける共通の変更を識別するために、定量的または定性的のいずれかで、お互いに比較され得る。例えば、各化学組成物についての、遺伝子発現パターン全体またはタンパク質発現パターン全体は独特であり得るが、特定の具体的な遺伝子またはタンパク質の発現レベルにおける変化は、類似の毒性を有する組成物の間では類似している。すなわち、いくつかの遺伝子/タンパク質は、同様にアップレギュレートされており、従って、コントロールに比べてより多い量で発現される；一方、他の遺伝子/タンパク質は、同様にダウンレギュレートされ、従って、コントロールに比べてより少ない量で発現される。次いで、これらの化学組成物の共通の分子的特徴は、これらの毒性と相関付けられ、そして新規の化学組成物または以前に試験されていない化学組成物（例えば、薬物スクリーニングアッセイでの薬物リード）の毒性を評価するための代理マーカーとして役割を果たし得る。

30

【0037】

多数の化合物が、前臨床研究および臨床研究を受けた。前臨床研究としては、とりわけ、少なくとも2種の哺乳動物種での毒性研究が挙げられ、この種うちの1つは、通常ネズミ科の種であり、代表的にはマウスまたはラットであり、そして臨床試験は、任意の明らかな毒性についての情報を常に含む。種々のこれらの化合物についての相当の量の情報が、利用可能である。利用可能な毒性情報に基づいて、これらの化合物は、特定の毒性のカテゴリーに分類され得る。例えば、多くの化学組成物が、これらが毒性を及ぼす組織または器官に従って表1に列挙される。

40

【0038】**【表1】**

表1

薬物	毒性						商品名
	DE V	肝臓	CV	CNS	血液	指標	
サリドマイド	+						
メトトレキサート	+					抗腫瘍	
レチン酸	+					癌痛	
バルプロ酸	+	+				痙攣	Depakene
アセトアミノフェン		+				鎮痛性	
イソニアジド		+				抗生性	
ジクロフェナク(NSAIDS)		+				抗炎症性	Voltaren
ブロモフェナク(bromofenac) (NSAIDS)		+				抗炎症性	Duract
トログリタゾン(troglitazone)		+				糖尿病	Rezulin™
ロシグリタゾン(rosiglitazone)		ntc				糖尿病	Avandia™
トロバフロザシン(trovaflozacin)		+				抗生性	Trovan™
シプロフロキサシン		ntc				抗生性	Cipro™
エリスロマイシン エストレート(estolate)		+				抗生性	
プラバスタチン		+				脂質低下	Pravachol™
アトルバスタチン(atorvastin)		+				脂質低下	Lipitor™
クロフィブレート		ntc				脂質低下	Atromid
クロザピン					+	抗精神病性	Clozaril
クロロアムフェニコール(chloroamphenicol)					+	抗生性	Chloromycetin
ドキシソルピシン			+			抗腫瘍	
ダウノルビシン			+			抗腫瘍	
シクロホスファミド(cyclophosphamide)			+			抗腫瘍	
化合物							
四塩化炭素		+					
カドミウム		+					
ファロジジン(phalloidin)		+					
エタノール		+					
ジメチルホルミド		+					
ジクロロエチレン		+					
鉛		+					
ベンゾピレン(benzo(a)pyrene)			+				
アリアルアミン			+				
メチル水銀				+			
トリメチル錫				+			
二硫化炭素				+			
アクリルアミド				+			
ヘキサクロラフェン(hexachlorophene)				+			
DMSO							
「ntc」=非毒性、制限された毒性、コントロール							
「Dev」=発生							
「CV」=心臓血管							
「CNS」=中枢神経系							

本発明の1つの実施形態において、肝臓毒性を有することが知られている組成物は、MSCにおけるこれらの分子プロファイルの組織分析のために使用される。別の実施形態において、心臓血管系に対する毒性を引き起こす組成物は、MSCにおけるこれらの分子プロファイルに対して評価される。本発明の尚さらに別の実施形態において、神経系に対して毒性を引き起こす組成物が、MSCにおけるこれらの分子プロファイルについて評価される。あるいは、選択された疾患を処置するための既知の薬物または潜在的な薬物は、それらの毒性の組織分析において一緒に使用され得る。この点に関して、例えば、抗癌剤および抗癌剤候補は、これらの組織および器官の毒性についてスクリーニングされ得る。

【0039】

本発明の1つの局面に従って、化学組成物の分子プロファイルは、これらの薬剤が非ヒト動物、ヒト、またはこれらの両方において示す毒性と相関し得る。次いで新規の薬剤または以前に試験されていない薬剤に曝露したMSCの発現パターンを、既知の毒性の薬剤によって誘導された発現のこのようなプロファイルのライブラリーと比較することによって、この新規の薬剤の毒性における類似の型について、予測が行われ得る。さらに、この新規の薬剤の毒性は、もしあれば、既知の毒性化合物の中で階級付けされ得、薬物開発における優先順位についての情報が提供される。

【0040】

10

20

30

40

50

薬物開発における有用性に加えて、本発明はまた、化学組成物の毒性に興味を持たれる他の分野における用途を有する。従って、本発明は、農薬（例えば、殺虫剤および肥料）の毒性を評価するために使用され得る。これは、さらに、化粧品において使用され得る。例えば、これは、候補化粧品を、化合物を動物実験に移す前に毒性についてスクリーニングするために使用され、これによって *Draize* 眼刺激性試験のような手順に供される必要ある動物の数を潜在的に減少する。同様に、本発明の方法は、「コスメシューティカル (cosmeceuticals)」としての使用が意図される薬物に対して適用され得、ここで、主に化粧品である薬剤がまた、いくつかの準治療的特性を有することが示される。さらに、本発明は、環境汚染の相対的な毒性（廃棄物、石油化学製品残渣、燃焼生成物、および生産加工産物を含む）を評価するために用いられ得る。このような夾雑物の例としては、ダイオキシン、PCB、および炭化水素が挙げられる。

10

【0041】

一般に、タンパク質発現または遺伝子発現のレベルを検出するために使用される方法が、タンパク質発現量または遺伝子発現量の、少なくとも相対的な指標を提供することが好ましい。より好ましくは、この方法は、タンパク質発現または遺伝子発現の定量的測定を提供し、既知の毒性の化学組成物に曝露したMSCのタンパク質発現または遺伝子発現に対する、試験化学組成物に曝露されたタンパク質発現または遺伝子発現の比較を容易にする。

【0042】

(C. MSCの調製)

ヒトまたは他の哺乳動物種のMSCの調製方法は、当該分野で公知である。例えば、Caplanら、米国特許第5,197,985号および同第5,486,359号は、骨髄からのヒトMSCの単離または精製、および組織培養物におけるMSCの拡大を記載する。骨髄は、長骨の骨髄腔、いくつかのハヴァーズ管および海綿質 (cancellous bone) または海綿質 (spongy bone) の小柱の間隙を占める軟部組織である。骨髄は、造血幹細胞、赤血球、細胞および白血球細胞ならびにこれらの前駆体、間葉幹細胞、ストローマ細胞、およびこれらの前駆体、ならびに線維芽細胞、網状赤血球、脂肪細胞、および「基質」と呼ばれる結合組織網を形成する内皮細胞を含む細胞群を含む。骨髄は、多くの異なる供給源（大腿の頭部海綿質の小片のプラグ、臀部もしくは膝の置換外科手術の間の変形性関節症患者、または将来の骨髄移植のために骨髄収集された、

20

30

【0043】

収集された骨髄が、多くの異なる機械的な単離プロセスによる細胞培養分離のために調製され得るが、単離プロセスに関連する重要な工程は、Caplanら（前出）に記載されるような、分化を伴わないMSC増殖だけでなく、培養皿のプラスチック表面またはガラス表面に対するMSCのみの直接的な付着を可能にする薬剤を含む、特別に調製された培地の使用である。大変微細な量の骨髄サンプル中に存在する所望の間葉幹細胞の選択的な付着を可能にすることによって、MSCを、骨髄の中に存在する他の細胞から分離することが可能である。

【0044】

Youngらは、出生後の鳥類脚組織由来のMSCの、単離、精製、および培養拡大を記載する (Youngら (1992) *J. Tiss. Cult. Method.* 14: 85-92; Youngら、米国特許第5,328,695号)。産後11日目の幼鳥の胚を、組織解剖のために取り出した。解剖された組織（例えば、皮膚、骨格筋、腱/筋外膜、および骨膜/軟骨膜）を、回収し、そして別々にプールした。各組織プールを、濾過して、単一細胞の懸濁物を生成した。細胞培養物を、6日間、細胞分化に最適な条件下で維持し、次いで、この単核の、分化していないMSCを、分化した組織から解離させ、そして、細胞拡大のために不完全なイーグル最小必須培地に再懸濁した。

40

【0045】

Pittengerらは、腸骨稜から採取した骨髄からのヒト間葉細胞の単離を記載する

50

(Pittengerら、(1999) Science 284:143-147)。密度勾配を使用して、骨髄吸引物中に存在する、望まない細胞型を除去し、単一の表現型集団を含む、単離した培養間葉細胞を得た(それぞれ、継代1で95%均質、および継代2で98%均質である)。

【0046】

適切な培養培地条件下で、上で特定した参考文献で例示されるように、本発明で使用されるMSCは、長期間で、未分化かつ多能性のままであり得る。MSCのこの系統特異的分化は、当該分野で周知の様々な生物活性因子によって誘導され得る。例えば、Bruderらの米国特許第5,736,396号は、MSCが間葉系統(例えば、骨形成性系統、軟骨形成性系統、腱形成性(tendonogenic)系統、靭帯形成性系統、筋性系統、骨髄支質形成性(marrowstromagenic)系統、脂肪生成性系統、または真皮形成(dermogenic)系統である)に分化することを含む生物活性因子を記載する。骨形態発生タンパク質BMP-2およびBMP-3、bFGFおよびプロスタグランジンE1は、骨形成性系統を誘導することが可能であり;TGF-タンパク質、コラーゲン、レチン酸は、軟骨形成性系統を誘導することが可能であり;IL-1aおよびIL-2は、基質形成性(stromagenic)系統を誘導することが可能であり;そしてシチジンアナログは、筋性系統を誘導することが可能であることが示された。さらに、Youngら(米国特許第5,827,735号)は、筋肉形態形成タンパク質(MMP)と接触させた場合の繊維芽細胞;またはMMPおよび癒痕阻害因子(SIF)の両方に接触させた場合の分岐した多核筋性細胞のいずれかに指向されたMSCの分化を記載する。Pittenger(米国特許第5,827,740号)は、ヒトMSCの脂質形成性分化を引き起こすことが可能な因子および条件を記載する。Pittengerら(1999) Science 284:144-147はまた、MSCの、脂質生成性分化、軟骨形成性分化、および骨形成性分化を特徴づける。

10

20

【0047】

本発明で使用されるMSCを、当該分野で公知であり、本明細書中で引用した参考文献に記載される、これらの異なった特性によって同定し得る。例えば、骨髄から単離された、均質なMSCを、規定された培養条件下で、培養ディッシュのガラス表面またはプラスチック表面に対するこれらの独特の付着によって同定し得る(Caplánらの米国特許第5,486,359号)。Youngら(米国特許第5,827,735号)に従って単離されるMSCを、形態学によって、主に多核の、星状細胞として同定し得る。

30

【0048】

あるいは、本発明で使用されるMSCを、規定された段階でのMSC集団に特異的な抗体の使用のような、特異的マーカーの検出によって同定し得る。例えば、Caplanら(前出)は、骨髄から単離されたMSCを特異的に認識する、モノクローナル抗体SH2、モノクローナル抗体SH3およびモノクローナル抗体SH4を記載する。系統特異的な分化を受けたMSCをまた、特定の細胞表面マーカーによって同定し得る。例えば、分化したMSCは、細胞表面分化マーカーである、CD10、CD13、CD56、およびMHCクラスIを提示することが見出された(Youngら(1999) Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 221:63-71)。

40

【0049】

必要ならば、本発明において使用するために入手し、そして培養したMSCを、MSCの物理的特性または化学的特性(例えば、サイズ、質量、密度、特異的な抗原、または遺伝子発現)に基づいて、当該分野で公知の方法(例えば、フローサイトメトリー、細胞分類、濾過または遠心分離)を使用して、培養物から単離し得る。

【0050】

化合物を試験するために使用されるMSCは、任意の脊椎動物種のものであり得る。MSCが由来する特定の種の選択は、代表的には、いくつかの因子の釣り合いを反映する。第1に、研究の目的に依存して、1つ以上の種が特定の目的となり得る。例えば、ヒトMSCは、潜在的なヒト治療剤として試験される組成物と共に使用するための特定の目的のも

50

のであり得、その一方で、ウマM S C、ネコM S C、ウシM S C、ブタM S C、ヤギM S C、イヌM S C、またはヒツジM S Cは、潜在的な獣医学的治療について、より関心が持たれ得る。

【0051】

第2に、さらにヒト治療剤の試験に関して、費用および取り扱いの考慮によって、いくつかまたは全ての試験は、非ヒトM S C、さらに非霊長類M S Cを用いて、実施されることが決定づけられる。いくつかの試験について、マウス、ラット、モルモット、ウサギ、および他の利用可能で、費用がかからない実験動物由来の、M S Cを使用することが所望され得る。

【0052】

第3に、多くの情報が、化学組成物の毒性に関して利用可能である種を選択することは、しばしば価値があり、その結果、観察された、遺伝子およびタンパク質の発現の変化は、毒性の種々の型に相関し得る。この理由で、マウスおよびラットは好ましい実施形態である。殆どの前臨床試験が、少なくとも1種のマウス種で実施され、それゆえ、マウスおよびラットの様々な組織における様々な組成物の毒性についての多くの情報が存在する。マウスまたはラット由来のM S Cを使用することによって、M S Cにおける遺伝子またはタンパク質の発現の変更と、これらの種におけるこれらの薬剤によって示される毒性との相関付けが可能となる。前臨床試験において共通して使用される、他の種（例えば、モルモット、ウサギ、ブタおよびイヌ）のM S Cはまた、同様の理由で好ましい。代表的には、これらの種のM S Cは、「第1の通過の(f i r s t p a s s)」スクリーニングのために、または、ヒトにおける毒性についての詳細な情報が必要でない場合、または、マウスまたはこれらの実験用の種のうちの他の1つの結果が、ヒトにおける既知の毒性または他の効果について相関した場合で、使用される。

【0053】

第4に、霊長類は前臨床試験において広範囲に使用されず、かつ他の実験動物に比べ、購入するにも、そして維持するのにもしばしば費用がかかり、これらの生化学および発生生物学は、より一般的な実験動物の生化学および発生生物学よりヒトの生化学および発生生物学にかなり近い。従って、霊長類に由来するM S Cは、毒性試験のためには好ましく、ここでこの研究は、さらなる費用および取り扱い考慮の根拠を示すために十分に重要である。最も好ましいのは、ヒトM S Cである。なぜならば、これらのM S Cにおける薬物の毒性についての結論は、ヒトに対する化合物の効果に対して最も直接的に関連すると考えられ得るからである。霊長類またはヒトのM S Cにおける研究を実施することによって、他の種のM S Cについての毒性研究の結果が確証されることが期待される。

【0054】

第5に、ヒト治療薬に関して、規制当局は、一般に、ヒトの試験を始め得る前に動物データを要求し；前臨床動物研究において使用された種のM S Cを使用することが所望される。次いで、M S Cにおける毒性試験の結果は、動物試験の間、研究者が毒性の程度および種類について予測することを導き得る。特定の動物種が、他の型と異なる型のヒト毒性のより良好なモデルであることが、当該分野で公知であり、種は、薬物を代謝する能力において異なる。例えば、Williams, Environ Health Perspect. 22: 133-138 (1978); Duncan, Adv Sci 23: 537-541 (1967)を参照のこと。従って、特定の前臨床毒性研究における使用に好ましい特定の種は、薬物候補の意図する候補に従って、変化し得る。例えば、生殖系に影響を与えることが意図される薬物について適切なモデルを提供する種は、神経系に影響を与えることを意図する薬物についてのモデルとしては適切ではないかもしれない。前臨床試験に適切な種を選択するための基準は、当該分野で公知である。

【0055】

異なった種由来のM S Cが、本発明の方法において、使用され得るが、一般に哺乳動物細胞が好ましい。以下に議論するように、コントロールと試験M S Cとの任意の所定の比較において、コントロールとして使用されるM S Cおよび化学組成物の影響を試験するため

10

20

30

40

50

に使用される化学組成物が、同じ種に由来することが想定される。

【0056】

(D. 化学組成物とMSCとの接触)

(1. 概論)

一旦、MSC培養が開始されると、これは化学組成物と接触され得る。簡便には、この化学組成物は、水溶液であり、そしてこれをこの培養培地に導入される。この導入は、任意の簡便な手段によって行い得るが、通常は、ピペット、マイクロピペット、またはシリンジの使用による。いくつかの適用(例えば、ハイスループットスクリーニング)において、この化学組成物を、自動的手段(例えば、ロボットアームに基づく自動ピペットシステム)によって導入する。化学組成物はまた、粉末形態または固体形態として、薬学的賦形剤、結合剤、および薬学的組成物で一般に使用される他の物質を伴うかまたはそれを伴わずに、あるいは意図する用途において使用され得る他のキャリアと共に導入され得る。例えば、農薬または石油化学薬剤としての用途を意図する化学組成物を、これらの化学物質または薬剤の毒性を試験するために、単独で培地に導入し得るか、または、これらの化学物質または薬剤の組み合わせが相乗効果を有するか否かを決定するために、この環境で使用され得るかもしくは見出され得る、他の物質を組み合わせで導入し得る。代表的には、この培養物は、化学組成物の導入後少なくとも単時間振盪され、この組成物が培地全体に分散したことを確認する。

10

【0057】

(2. 接触のタイミング)

化合物を培養物に添加する時間は、実施者の裁量の範囲であり、特定の研究目的に伴って変る。好都合には、MSCを培養してすぐに化合物を添加して、MSCの全ての組織の発生におけるタンパク質または遺伝子の発現においての変化の決定を可能にする。しかし、特定の組織型における組成物の影響についての研究に焦点を合わせることに興味もたれ得る。以前に記載したように、個々の分化した組織(例えば、筋肉、骨および結合組織)は、特定の誘導因子の存在下で発生することが知られ、特定の細胞マーカーによって同定され得る。このような因子およびマーカーは、当該分野において公知であり、上記および引用される参考文献において例が提供される。従って、化合物の添加を、種々の時点ならびに/またはMSCの分化段階、増殖段階および/もしくは発生段階において行い得る。1つの実施形態において、化合物を、未分化形態に維持されたMSCに接触させる。別の

20

30

【0058】

(3. 化合物の投薬)

化合物の細胞傷害性について公知の情報量、研究の目的、利用可能時間、実施者の力量に依存して、異なる量のこの組成物を用いてMSCを接触させる。特に、この化合物を用いた他の研究または過去の研究もしくは実地経験によって、特定の濃度が体内で最も一般に見出される濃度であることが示された場合、化合物をただ1つの濃度で投与し得る。さらに一般的には、化合物を異なる濃度に対して、並行して培養されるMSC培養物に添加して、遺伝子またはタンパク質の発現における濃度の相違の影響を評価し得、それゆえ異なる濃度でのこの組成物の毒性における相違を評価し得る。代表的には例えば、化合物を規定濃度または中間濃度で添加し、所望される精度の程度に依存して、2倍または5倍の濃度の増大および減少によって限界が定められる。

40

【0059】

この組成物が細胞傷害性が未知の組成物である場合、好都合にはまず予備研究を実施して、この組成物を試験する濃度範囲を決定する。投薬量濃度を決定する種々の手順は、当該分野において公知である。例えば、1つの一般的手順は、薬剤が直接的に細胞傷害性である投薬量を決定することである。次いで実施者は、用量を2分の1に減じて、典型的には

50

、目的の薬剤を5倍希釈または2倍希釈の濃度において、目的の型の細胞の並行培養物へ投与することにより投薬研究を実施する。環境汚染に関して、この組成物はまた通常、環境中に見出される濃度で試験される。農薬（例えば、食品に残留物を残すような殺虫剤）に対して、この薬剤は通常、残留物が見出される濃度において試験されるが、他の濃度でも同様に試験されるようである。

【0060】

1つの実施形態において、MSC中の化合物の毒性プロフィール（例えば、分子プロフィール）は、この化合物がMSCに接触する濃度に、相関する。このような相関は、受容可能な程度または受容可能でない程度の細胞傷害性を生じる化合物の濃度の有用な指標を提供し得る。別の実施形態においてMSC中の化合物の効力のプロフィールは、この化合物がMSCに接触する濃度に、相関する。このような相関は、受容可能な程度および/または所望される程度の化合物の効力を生じるに十分な化合物の濃度の有用な指標を提供し得る。なお別の実施形態において、毒性プロフィール-濃度相関および効力プロフィール-濃度相関は、化合物の望ましさおよび/または有用性の測定法を提供する指標に用いられる。例えば、非常に望ましい化合物は、受け入れられないレベルのMSC毒性を生じる高濃度、ならびに望ましいおよび/または有用なレベルの効力を得る低濃度の関数であるような指標を有する化合物である。

10

【0061】

（E．遺伝子発現またはタンパク質発現のレベル変化の検出）

（1．タンパク質発現の変化の検出）

タンパク質発現は、当該分野で公知の多数の方法によって検出され得る。例えば、サンプル中のタンパク質をドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動（「SDS-PAGE」）によって分離して、クマシーブルーまたは銀染色のような染料によって可視化し得る。ゲル上にX線フィルムシートを置くことによって、放射性標識を検出し得る。タンパク質をまた、等電点電気泳動によって、等電点に基づいて分離し、染色によって可視化し得る。さらに、等電点電気泳動（通常、垂直方向で実施する）と組み合わせてSDS-PAGEを実施して、サンプル中のタンパク質の2次元分離を提供し得る。例えば、高圧液体クロマトグラフィ、HPLC、薄層クロマトグラフィ、アフィニティクロマトグラフィ、ゲル濾過クロマトグラフィ、イオン交換クロマトグラフィ、表面増強レーザー脱着/イオン化（「SELDI」）、マトリックス支援レーザー脱着/イオン化（「MALDI」）のような技術によって、そして沈降速度が十分に異なる場合、密度勾配遠心分離によってタンパク質をさらに分離し得る。例えば、目的の効果をもつ化合物（「試験サンプル」）に接触したMSC由来のサンプルおよび目的の化合物が不在であることを除いて同一の条件下で培養したMSC由来のサンプル（「コントロールサンプル」）を並行して泳動して、検出されるタンパク質および検出されるタンパク質量の任意の相違を記録することによって、これらの技術を用いてタンパク質発現のレベルの変化を検出することを達成し得る。

20

30

【0062】

免疫検出は、タンパク質発現における変化を検出するための一群の有用な技術を提供する。これらの技術において、抗体は典型的に、標準的プロトコル（例えば、HarlowおよびLane, *Antibodies, A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1988)において教示されるプロトコル)に従って、マウスまたはウサギにタンパク質を注射することによって、このタンパク質に対して惹起される。次いで、このようにして惹起される抗体を用いて、当該分野で公知の種々の免疫学的アッセイ（例えば、ELISA、蛍光免疫アッセイ、ウエスタンブロット、ドットブロット、免疫沈降、および病巣（focal）免疫アッセイ）において、タンパク質の存在を検出し、そしてこのタンパク質を定量し得る。試験サンプルおよびコントロールサンプルについて、並行して試験を行い、サンプル間の結果における任意の相違を記録することによって、タンパク質発現における変化を検出し得る。例えば、ELISAの結果は、タンパク質

40

50

の存在量に直接関連し得る。

【0063】

タグ化は、タンパク質発現における変化を検出および決定する別の方法を提供する。例えば、タンパク質をコードする遺伝子进行操作して、検出可能なタグを含むハイブリッドタンパク質を産生して、その結果、そのタグの検出によってそのタンパク質を特異的に検出し得る。(例えば、そのタンパク質が分離されたゲルにおいて)放射性標識の直接の画像化および定量を可能にするシステムが利用可能である。試験サンプルおよびコントロールサンプル中に存在するタグの量の相違を観察することによって、発現の相違を決定し得る。

【0064】

標準的なタンパク質化学技術によっても、タンパク質を分析し得る。例えば、トリプシン、Staphylococcus Bプロテアーゼ、キモトリプシンまたは他のタンパク質分解性酵素によるタンパク質分解性消化を実施することによって、タンパク質を分析し得る。消化された産物の相対量を比較することによって、発現の相違を検出し得る。

【0065】

タンパク質発現における相違を決定する1つの特定の好ましい方法は、質量分析法(すなわち、MS)であり、これは、少ない労力で最も広範な数のタンパク質の最も広範なプロフィールを提供する。さらに、MSは、サンプル中に存在するタンパク質の正確な検出のみでなく、定量をも可能にする。この手順を単独または選択的な物理的特性に基づく前述の1つ以上の方法との組み合わせのいずれかによって用いて、サンプル中に存在するタンパク質を分割し得る。分割することで、サンプル中の異なる物理的特性タンパク質の数を減じ、そしてタンパク質の類似のサイズ、静電荷、金属イオンに対する同じアフィニティーなどの比較を可能にすることによってより良好なMS分析を生じる。従って、例えば、サンプル中のタンパク質をSDS-PAGEおよび等電点電気泳動に供し得、次いでゲル上の得られた目的のスポットをMSに供し得る。以下の実施例2において、サイジングカラムを用いて実施される最初の分割およびSELDIを用いて実施される第2の分割を記載する。実施例2に記載のプロトコルにおいて、分子量が30kDより小さいタンパク質の分析が例証されることに注目すべきである。もちろんあるいは、より高分子量タンパク質を本発明の方法において分析し得、そしてサンプル中の全てのタンパク質を分析する準備が実施者にできている場合、または例えば、サンプル中の異なるタンパク質の総数が、分割せずとも分析するに十分少ないことを予備分析が示す場合、タンパク質を分画する必要はない。

【0066】

質量分析計に接続されたコンピューターをまた用いて、サンプルを分析して、タンパク質発現の変化が特定の毒性を示し得るか否かを決定することを容易にし得る。例えば、MSから読み出したものは、「減算算出」に用いられ、ここでコントロールMSC中のタンパク質発現が定量されて、次いで化合物に接触したMSCの定量されたタンパク質発現から差し引かれ、コントロールMSCによって発現されるタンパク質より多いかまたは少ない量で発現されるタンパク質のみが示される。この方法は直ちに、コントロール集団と試験集団との間でのタンパク質発現の相違に注意を集中する。このような比較の例は、図1Bおよび図1Cにおいて示され、そして以下に詳細に議論される。

【0067】

(2. 遺伝子発現の変化の検出)

遺伝子発現のレベルを検出および比較する多くの方法は、当該分野で公知である。

【0068】

このような比較のための1つの標準的な方法は、ノザンプロットである。この技術において、標準的な方法(例えば、Sambrook, J.ら, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (第2版, 1989)を参照のこと)に従って、サンプルをRNAから抽出して、RNA分析に適切な種々のゲルのいずれかにローディングし、次いでこれを電気泳動して、サ

イズによってRNAを分離する。次いでゲルをプロットして(Sambrook(前出)に記載のように)、目的のRNAについてのプローブにハイブリダイズする。実施者の検出系についての好みに依存してプローブは、放射性または非放射性であり得る。例えば、「Genius System」(Boehringer Mannheim Corporation, Indianapolis, IN)を製造者の指示に従って用いて、結合プローブの化学発光を検出することによって、プローブを用いたハイブリダイゼーションを観察して、分析し得る。リボソームRNAバンドのエチジウムブロマイド染色によって、レーン中の等しいRNAローディングを判断し得る。あるいは、プローブを放射標識して、写真フィルムを用いてオートラジオグラフィによって検出し得る。

【0069】

種々の方法のいずれかによって、RNAをまた増幅し得て、次いで検出し得る。例えば、Marshall, 米国特許第5,686,272号は、リガーゼ連鎖反応(すなわち「LCR」)を用いたRNA配列の増幅を開示する。LCRは、以下によって、十分に記載される: Landegrenら, Science, 241:1077-1080(1988); Wuら, Genomics, 4:560-569(1989); Barany, in PCR Methods and Applications, 1:5-16(1991); および Barany, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:189-193(1991)。またはRNAは、DNAに逆転写され、次いでLCR、ポリメラーゼ連鎖反応(「PCR」)または他の方法によって増幅され得る。RNAの逆転写を行う典型的プロトコルは、米国特許第5,705,365号に教示される。適切なプライマーおよびPCRプロトコルの選択は、例えば、Innis, M.ら編, PCR Protocols 1990(Academic Press, San Diego CA)(以後、「Innisら」)において教示される。メッセンジャーRNAの示差的発現をまた、Belyavsky, 米国特許第5,814,445号に教示されるように、mRNAをcDNAへと逆転写し、次いでこのcDNAを制限酵素で切断し、そして電気泳動で分離して、cDNAフラグメントの比較を可能にすることによって比較し得る。

【0070】

典型的には、ビオチンまたは多くの蛍光色素のいずれかを用いて、プライマーを5'末端で標識する。通常、プローブは酵素(例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)およびアルカリホスファターゼ)を用いて標識する(Innisら(前出)中の、LevensonおよびChang, Nonisotopically Labeled Probes and Primers(前出)を参照のこと)が、また例えば、ビオチン-ソラレンを用いて標識され得る。プライマー標識および酵素標識プローブ合成についての詳細な典型的プロトコルは、LevensonおよびChang(前出)によって教示される。または、プローブをまた放射活性同位体を用いて標識し得る。放射性標識されたDNAプローブおよびRNAプローブを合成する典型的なプロトコルは、Sambrookら(前出)に示される。通常、³²Pは、DNAプローブおよびRNAプローブを標識するために用いられる。PCR産物検出のための多くの方法は、公知である。例えば、非同位体標識プローブを用いたPCR産物検出の詳細なプロトコルを示すInnis(前出)を参照のこと。一般に、プローブとPCR産物とのハイブリダイゼーションを可能にする工程があり、それに続いて、検出を可能にする1つ以上の現像工程がある。

【0071】

例えば、ビオチン化ソラレンプローブを用いる場合、ハイブリダイズしたプローブをストレプトアビジンHRP結合体と共にインキュベートし、次いで色素原(例えば、テトラメチルベンジジン(TMB))と共にインキュベートする。あるいは、実施者が放射標識プローブを用いることを選択した場合、プローブがハイブリダイズしたPCR産物をオートラジオグラフィによって検出し得る。別の例として、増幅の間にビオチン化dUTP(Bethesda Research Laboratories, MD)を使用し得る。次いで、標識されたPCR産物をアガロースゲルで泳動して、ナイロンフィルターにサザ

10

20

30

40

50

ン転写し、そして例えば、ストレプトアビジン/アルカリホスファターゼ検出システムによって、検出し得る。取りこまれたビオチン化 d U T P を検出するプロトコルは、例えば、Innisら(前出)中の、Loら, Incorporation of Biotinylated d U T P に示される。最後に、PCR産物をアガロースゲルで泳動して、そして核酸を特異的に認識する色素(例えば、エチジウムブロマイド)によって核酸を検出し得る。

【0072】

Sutcliffe, 米国特許第5,807,680号は、示差的に発現したmRNAを同時に同定する方法および相対的濃度を測定する方法を教示する。アンカープライマーを用いたcDNAを形成し、次いでPCRを行う工程を含む技術は、組織に発現されるほぼ全てのmRNAを、ゲル上の異なるバンドとして可視化を可能にし、このバンドの強度は、mRNAの濃度におよそ対応する。

10

【0073】

別の群の技術は、相対的な転写発現レベルの分析を用いる。最近、4つのこのようなアプローチが開発され、包括的なハイスループットアッセイを可能にする。第1に、(上記の参考文献に記載されるように)サンプル中のRNAからcDNAを逆転写して、そして5'末端および3'末端のシングルパス(single pass)配列決定に供して、試験サンプルおよびコントロールサンプル中に発現される遺伝子についての、発現配列タグを規定する。異なるサンプルに由来するタグの提示の相対的な列挙は、サンプルにおける遺伝子転写物のおよその相対的表示の概算を提供する。

20

【0074】

第2に、ESTにおけるバリエーションが開発され、遺伝子発現の連続分析(すなわち、「SAGE」として公知であり、これは、大量の転写物の定量的分析および同時分析を可能にする。この技術は、短い診断用配列タグの単離および配列決定を使用して、標的機能に特有の遺伝子発現パターンを明らかにし、そして例えば、正常細胞および腫瘍細胞における何千もの遺伝子の発現レベルの比較に用いられる。例えば、Velculescuら, Science 270:368-369(1995); Zhangら, Science 276:1268-1272(1997)を参照のこと。

【0075】

第3に、ディファレンシャルディスプレイに基づいてアプローチが開発された。これらのアプローチにおいて、発現された遺伝子中のフラグメント長についての情報と合わされる場合に、特定の配列デリミタによって規定されるフラグメントを遺伝子の特有の識別物として用い得る。次いで、細胞内で発現された遺伝子の相対的表示は、この遺伝子に関連するフラグメントの相対的表示によって評価され得る。このアイデアを利用するために開発されたいくつかのアプローチの一部の例は、Gene Logic, Inc.によって用いられる差示的に発現された配列の制限酵素分析(restriction enzyme analysis of differentially-expressed sequences; 「READS」)およびDigital Gene Technologies, Inc.によって用いられる、総遺伝子発現分析(total gene expression analysis; 「TOGA」)である。CLONTECH, Inc. (Palo Alto, CA)は、例えば、差示的に発現される遺伝子のPCRによる同定のためのDeltaTM Differential Display Kitを販売している。

30

40

【0076】

第4に、好ましい実施形態において、ハイブリダイゼーション分析についての多くの技術のうち1つを用いて、検出が実施される。これらのアプローチにおいて、目的のサンプル由来のRNAを通常、逆転写に供して、標識されたcDNAを得る。次いでcDNAを、典型的には、チップまたは他の表面上に既知の順序で整列させた、公知の配列のオリゴヌクレオチドまたはcDNAにハイブリダイズする。標識されたcDNAにハイブリダイズするオリゴヌクレオチドの位置は、cDNAについての配列情報を提供する一方で、ハイ

50

ブリダイズした標識されたRNAまたはcDNAの量は、目的のRNAまたはcDNAの相対的表示の見積もりを提供する。さらに、この技術は、2つ以上の異なる検出可能標識を用いた、同時ハイブリダイゼーションを可能にする。次いでハイブリダイゼーションの結果は、サンプルの相対的発現の直接の比較を提供する。

【0077】

ハイブリダイゼーション分析のための多くのキットが市販されている。これらのキットは、フィルター、顕微鏡スライド、マイクロチップおよび質量分析法による技術を含む、高密度フォーマット上の特定のRNAまたはcDNAの同定を可能にする。例えば、Affymetrix, Inc. (Santa Clara, CA)は、目的の遺伝子の高い精度の配列決定のためのアレイ内に、既知の配列、長さおよび位置を有する、何千もの異なるオリゴヌクレオチドプローブを備えたGeneChipTM Probeアレイを販売する。CLONTECH, Inc. (Palo Alto, CA)のAtlasTM cDNA Expression Arrayは、588個の選択された遺伝子の発現パターンをモニタリングを可能にする。Hyseq, Inc. (Sunnyvale, CA)のGene Discovery Moduleは、事前に配列情報がなくとも細胞あたり1コピーのmRNAの分解能でRNAのハイスループットスクリーニングを可能にする。Incyte Pharmaceuticals, Inc. (Palo Alto, CA)は、例えば、整理されたヒト癌遺伝子およびシグナル伝達遺伝子の規則正しいオリゴヌクレオチドを含むマイクロアレイを提供する。この分野において、他の会社によって使用される技術は、例えば、Service R., Science 282:396-399 (1998)において議論される。

【0078】

(3. 標識)

本発明の方法において、発現レベルの変化を検出するために、タンパク質および遺伝子の両方を標識し得る。用語「標識」は、分光学的手段、光化学的手段、生物化学的手段、免疫化学的手段または化学的手段によって検出可能な、組成物をいう。例えば、有用な核酸標識およびタンパク質標識は、以下を含む：³²P、³⁵S、蛍光色素、電子密度試薬 (electron-dence reagent)、酵素 (例えば、通常ELISAにおいて使用されるようなもの)、ビオチン、ジゴキシゲニンまたは抗血清もしくはモノクローナル抗体が利用可能なハプテンおよびタンパク質。

【0079】

広範な種々の標識および結合体化技術は、公知であり、科学的文献および特許文献の両方において十分に報告されており、一般に本発明に対して、核酸、増幅された核酸およびタンパク質の標識のために適用可能である。適切な標識は、放射ヌクレオチド、酵素、基質、補因子、インヒビター、蛍光部分、化学発光部分、磁気粒子などを含む。標識剤は必要に応じて、例えば、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、タンパク質または他のポリマー (例えば、アフィニティマトリックス、炭水化物または脂質) を含む。標識された核酸または標識されたタンパク質の検出は、多くの方法 (免疫ブロッティング、放射性マーカーまたは生物発光マーカーの追跡、サザンブロット、ノザンブロットまたはサイズ、電荷もしくはアフフィニティに基づいて分子を追跡する他の方法を含む) のいずれかによって実施され得る。使用される特定の標識または検出可能部分および特定のアッセイは、本発明の重大な局面ではない。

【0080】

検出可能部分は、検出可能な物理的または化学的特性を有する任意の材料であり得る。このような検出可能な標識は、ゲル、カラムおよび固体基材の分野においてよく開発されており、そして一般にこのような方法に有用な標識は、本発明に適用可能であり得る。従って、標識は、分光学的手段、光化学的手段、生物化学的手段、免疫化学的手段、電気的手段、光学的手段または化学的手段によって検出可能な任意の組成物である。本発明における有用な標識は、以下を含む：蛍光色素 (例えば、フルオレセインイソチオシアネート、テキサスレッド、ローダミンなど)、放射標識 (例えば、³H、¹²⁵I、³⁵S、

¹ ⁴ C または ³ ² P)、酵素 (例えば、L a c Z、C A T、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼなどの他、検出可能な酵素として、またはマーカー遺伝子産物としてもしくは E L I S A においてのいずれかで通常使用される酵素)、核酸インターカレーター (例えば、エチジウムブロマイド) および比色定量標識 (例えば、金コロイドまたは着色ガラスもしくはプラスチック (例えば、ポリスチレン、ポリプロピレン、ラテックスなど) ビーズ) ならびに電子トランスポンダー (例えば、米国特許第 5, 7 3 6, 3 3 2 号)。

【0081】

蛍光標識は、単一種有機分子に限定されず、無機分子、有機分子および/または無機分子の多分子混合物、結晶ヘテロポリマーなどを含むことが理解される。従って、例えば、シリカシェルに閉じ込められる C d S e - C d S コアシェルナノクリスタルは、生物学的分子に結合するために容易に誘導され得る。B r u c h e z ら (1 9 9 8) S c i e n c e 2 8 1 : 2 0 1 3 - 2 0 1 6。同様に、高蛍光量子ドット (硫化亜鉛キャップカドニウムセレン化合物) は、超高感度生物学的検出における使用のための生物分子に共有結合的に結合する。W a r r e m および N i e (1 9 9 8) S c i e n c e 2 8 1 : 2 0 1 6 - 2 0 1 8。

10

【0082】

標識は、当該分野で周知の方法に従って所望の核酸またはタンパク質に直接的にまたは間接的に結合する。上に示されるように、広範の種々の標識は、必要とされる感度、化合物の結合の容易さ、安定性必要条件、利用可能な装置および処分可能な設備に依存して標識を選択し、使用され得る。非放射活性標識は、しばしば間接的な手段によって結合される。一般的にリガンド分子 (例えば、ビオチン) は、ポリマーに共有結合的に結合される。次いで、リガンドは、本来検出可能であるか、またはシグナル系 (例えば、検出可能な酵素、蛍光化合物または化学発光化合物) に共有結合的に結合されるかのいずれかである抗リガンド (例えば、ストレプトアビジン) 分子に結合する。多くのリガンドおよび抗リガンドは、使用され得る。リガンドは、天然の抗リガンド (例えば、ビオチン、チロキシンおよびコルチゾール) を有する場合、標識された抗リガンドと組み合わせて使用され得る。あるいは、任意のハプテン化合物または抗原化合物は、抗体と組み合わせて使用され得る。

20

【0083】

標識は、また、例えば、酵素またはフルオロフォア (F l o u r o p h o r e) との結合によって単一生成化合物に直接的に結合され得る。標識として目的の酵素は、主に、ヒドロラーゼ (特に、ホスファターゼ、エステラーゼおよびグリコシダーゼ) またはオキシドレダクダーゼ (特にペルオキシダーゼ) である。蛍光化合物としては、フルオレセインおよびその誘導體、ローダミンおよびその誘導體、ダンシル、アンペリフェロン、蛍光緑色タンパク質などが挙げられる。化学発光化合物としては、ルシフェリンおよび 2, 3 - ジヒドロフタルジンジオン (2, 3 - d i h y d r o p h t h a l a z i n e d i o n e s) (例えば、ルミノール) が挙げられる。

30

【0084】

標識を検出する手段は、当業者に周知である。従って、例えば、標識が、放射活性標識である場合、検出のための手段としては、シンチレーション、近接カウンタ (シンチレーションを備えるマイクロプレート) またはオートラジオグラフィにおけるような写真用フィルムが挙げられる。標識が、蛍光標識である場合、適切な波長の光を用いて蛍光色素を励起することそして例えば、顕微鏡によって、目視検査によって、写真用フィルムを介して、電荷結合デバイス (C C D S) または光電子増倍管のような電子検出器などの使用によって、得られた蛍光を検出することによって検出され得る。同様に、酵素学的標識は、酵素のための適切な基質を提供することおよび得られた反応産物を検出することによって検出され得る。最後に、単純な比色定量の標識は、しばしば、標識と結合する色を観察することによって簡単に検出され得る。従って、種々のディップスティックアッセイにおいて、結合した金色は、しばしばピンク色に見えるが、種々の結合してビーズは、ビー

40

50

ズの色に見える。

【0085】

(F. 毒性との相関分子プロフィール)

本発明は、既定の毒性を有する化合物の絶え間なく拡大する (e v e r - w i d e r i n g) 群と試験MSCとを接触することによる分子プロフィールのライブラリーの編集の複数の反復を考える。多くの化合物の毒性および生物学的効果は、すでに、以前の動物試験または臨床試験を介して公知である。任意のこのような情報は、MSCにおける遺伝子またはタンパク質発現の変更と共に注意深く留意される。多数の化合物または薬剤に関する試験からのデータが、集められるように、データは、ライブラリーから集められる。別個のライブラリーは、毒性の各型について維持され得る；好ましくは、実施された全ての試験の結果およびMSCが暴露された薬剤に関する任意の利用可能な毒性情報を記録する単一のデータベースが維持され得る。好ましくは、生物学的効果もまた、留意される。過去の経験によると毒性の生物学が、より理解される場合、生物学的効果は、しばしば、特定の毒性に関連するか、または特定の毒性に対するマーカーになることが示される。

10

【0086】

実施形態の一群において、(これは、表1に列挙される1つ以上のMSCを含み得る)既定の毒性を有する1つ以上の化合物と接触する、1つ以上の型のMSCの分子プロフィール(これは、表2に列挙される1つ以上のMSCを含み得る)を含むライブラリーが、編集される。

20

【0087】

【表2】

表. 2- MSCの型の例

種	供給源	単価法
ヒト	海綿状骨髄のアラゲ	Caplan, 米国特許第 5,486,359号と第5,197,985号
ヒト	腸骨吸引骨髄	Caplan, 米国特許第 5,486,359号と第5,197,985号
チキン	胚性、11日目の卵の筋由来の骨髄細胞	Young, S., 米国特許第 5,827,735号
ヒト	腸骨髄質	Pittenger J ³ , Science (1999), 284:143-147

30

本発明は、化合物と試験MSCとの接触の各反復は、化合物および/またはMSC型に特徴的な、遺伝子の発現パターンまたはタンパク質の発現パターンあるいは両方を生成することが考えられる。類似の毒性の合理的な多数の化学的化合物の遺伝子またはタンパク質の発現における改変の決定は、毒性に関連する、遺伝子の発現パターンまたはタンパク質発現のパターンあるいは両方が決定され得るように所望である。類似の毒性を有する薬物のクラスに共通するMSC細胞における遺伝子またはタンパク質発現パターンの変化は、関連する生物学および毒性を有するような化合物を認識するために有用である代理の分子プロフィールとして役立つ。これは、以前に試験されていない化合物に関して予測的な力を本発明に与える遺伝子またはタンパク質の発現および毒性におけるこれらの改変の相関である。

40

【0088】

毒性と遺伝子発現パターンまたはタンパク質の発現パターンとの相関は、任意の簡便な手段によって実施され得る。例えば、パターンの視覚的な比較は、異なる型の毒性に関連するパターンを決定するために実行され得る。さらに簡便には、相関は、以下の節に考察される統計学的なプログラムの1つを使用する、コンピューターによって行なわれ得る。好ましくは、神経ネットワークプログラムは、パターン認識のために詳細に設計されているので、相関は、非パラメーターの統計学的方法または神経ネットワークプログラムを使用するコンピューターによって実施される。一旦、特定の毒性に対するバイオマーカーであ

50

る発現マーカーの相関が、作製されれば、再び、コンピューターによって簡便に、新しいまたは未知の化合物によって誘導される遺伝子の発現パターンまたはタンパク質の発現パターンと既知のパターンの比較が行なわれ得、発現の最近接した一致を提供し得る。次いで、パターンを再調査して、新しいまたは未知の化学物質のありそうな毒性を推定する。

【0089】

(G. 試験化合物の毒性の分類および順位付け)

試験化合物の分子プロフィールは、前節に記載されるような試験化学組成物によって接触されるMSCにおける遺伝子またはタンパク質の発現における変更を検出することによって確立され得る。一旦、試験組成物の分子プロフィールが、決定されれば、既定の毒性を有する化合物の分子プロフィールと比較され得るか、または好ましくは、既定の毒性を有する化合物の分子プロフィールのライブラリーと比較される。このような比較の結果は、試験組成物が、毒性であるか否か、どの型の毒性か、および他の既知の毒性組成物と比較してどのような毒性かの可能性を推定するために、情報を提供する。

10

【0090】

本発明を実施する目的のために、MSC細胞におけるその分子プロフィールに基づく試験組成物の毒性の推定は、100%正確である必要はない。薬物開発の有効性および費用に対する主要な肯定的な影響を有するために、1つのみが、より少ない毒性の可能性を適度に増大し、従って、より首尾よい薬剤候補は、例えば、新しい薬物リードの優先順位をついたリストの上半分にある。

【0091】

前の節に留意されるように、化合物に曝露されるMSCにおける遺伝子またはタンパク質の発現における変更は、当該分野で公知の多数の手段のいずれかによって検出され得る。MSによって決定されるタンパク質発現は、出力データが、典型的に質量分析計に連結されるコンピューターに直接入力され、そして即座に種々の計算に利用可能であるので、このような比較に特に都合がよい。変更が、グラフ表示に影響されやすい場合、MSが、検出の手段として使用され、直接比較は、コントロールMSCと比較されるタンパク質の発現に対する化合物の効果から構成される。変更が、例えば、多数の読み出しを生じるELISAによって検出される場合、次いで、多数の読み出しは、タンパク質の発現を定量するために使用され得る。遺伝子発現に関して、ノザンプロットは、プローブ化された各RNAについて存在するRNAの量に相関し得る。遺伝子発現が、ハイブリダイゼーションアッセイによって検出される場合、試験MSCおよびコントロールMSC由来の核酸についてのハイブリダイゼーションのパターンは、比較のために基礎を提供する。

20

30

【0092】

分子のプロフィールの比較は、当該分野で公知の多数の手段によって行なわれ得る。通常、計算から得られたグラフは、例えば、ファイルフォルダーなどに保存され得、そしてコントロールと比較される発現の通常のパターンおよび差異を識別するために視覚的に調査され得る。簡便には、しかし、このデータは、コンピューターによって保存され得、そして比較され得る。プログラムは、例えば、質量分析データと比較するために利用可能である。比較の1つの形態は、「サブトラクティブな計算」およびグラフ表示の使用に基づき、試験化合物(「試験サンプル」)と接触するMSCのタンパク質発現に対するコントロールMSC(「コントロールサンプル」)におけるタンパク質発現を比較する。比較のこの型において、コントロールサンプルによって発現される各タンパク質の量は、試験サンプルによって発現される量から減算される。コントロールサンプル値は、横線によって示され、そして異なる量において発現される任意のタンパク質は、試験サンプルの発現が、コントロールの発現と異なる量を示す線の高さを有し、線の上または線の下(それぞれ、コントロールの発現と比較して正の量および負の量を示す)として示される。この方法は、タンパク質発現における差異に注目する。同様の様式において、プログラムはまた、発現パターンにおける任意の差異が、容易に識別され得るように2つ以上の試験サンプルの発現と比較するために使用され得る。発現のパターンがより類似すると、2つの薬剤の効果および毒性の型がより類似することが予想される。

40

50

【0093】

比較のこの形態は、さらに図1に例示される。これは、考察の明確さのために単独で提供される。図1は、MSCによって発現される核タンパク質おける差異を例示する。上部パネル、(パネル1A)は、質量分析計からの読み取りのハーフトーン再生(half-tone reproduction)である。長軸にそってシートを見ると、上のバンドは、コントロール(試験化学組成物の非存在下において増殖したMSC)に対するマスペクトルであり、中間のバンドは、添加された試験化学的化合物(試験化合物I)の存在下で増殖したMSCに対するスペクトルであり、そして図1Aの下のバンドは、第2の試験化学的化合物(試験組成物II)に曝露されたMSCによって発現される核タンパク質のマスペクトルである。

10

【0094】

図1Bおよび図1Cは、試験化合物(「試験MSC」)の1つと接触したMSCと、化合物を添加されていない標準組織増殖培地において増殖するコントロールMSCとの間のタンパク質発現レベルにおける差異を図によって例示する。これらのパネルは、それぞれの試験MSCとコントロールとの間の同一のタンパク質のコンピューターの減算を例示して、試験MSCとコントロールMSCとの間の発現における有意な差異であるこれらのタンパク質のみを示す。各バーは、単一のタンパク質を示し、そしてバーの長さは、コントロールMSCによって発現された量と比較される試験組成物に曝露されたMSCによって発現されるタンパク質の量を示す。中央の線より上のバーは、試験MSCが、コントロールMSCが発現するよりも多いタンパク質を発現することを示す；線より下のバーは、試験MSCが、コントロールのタンパク質より少ないタンパク質を発現することを示す。

20

【0095】

図1Bは、コントロールMSCと比較される試験組成物Iの存在下で増殖したMSCによって発現される核タンパク質における差異を例示する。図1Cは、試験組成物IIの存在下で増殖するMSCによって発現される核タンパク質およびコントロールにおける差異を例示する。(試験MSCとコントロールMSCの両方は、分化/発生/増殖の同じ時点にある。)これらの例示の図において、左から図1Bおよび図1Cを読むと、最初に出くわすバーは、両方の図に関して同じ位置におけるラインより上であるが、バーの高さは、図1Cのほうがより高い。これは、試験MSCの両方の群が、コントロールを発現するよりもこのタンパク質をより発現するが、試験組成物IIと接触する細胞は、試験組成物Iと接触する細胞が発現するよりもかなり多く発現することを示す。

30

【0096】

図1Cの軸のXまたは分子量にそって続けると、出くわす次の4つのバーは、図1Bにおける対応物を有することを示す。さらに図のそれぞれにおいて、同じ3つのタンパク質を示すバーは、線の下にあるが、同じ4番目のタンパク質についてのバーは、線より上にある。再び、線の高さは、図1Cと図1Bの間では異なる。従って、この例示において、検出された最初の5つの核タンパク質に関して、試験化合物Iおよび試験化合物IIと接触したMSCは、異なるレベルの発現であるが、同じパターンのタンパク質発現を表示することを示す。それぞれのこれらのタンパク質のそれぞれおよび全体の発現パターンは、未知の化学組成物(例えば、新しい潜在的治療法)が、試験組成物の組織毒性を有することを示すプロフィールに含まれる候補である。逆に、図1Cの4000ダルトン分子量ラインの右に例示されるような検出される第1のタンパク質は、図1Bにおける対応物(またはコントロール細胞のレベルとは異なるレベルで発現される点での少なくとも1つの対応物)を有しないことを示す。このタンパク質は、試験化合物の組織/器官毒性の正常の経路を示したタンパク質とみなされない。同じ組織/器官に対する他の毒素の発現経路とこのタンパク質は相関するが、このタンパク質は、試験化学的化合物によって示される同じ組織/器官の対する毒性に関し得る。同様の分析が、2つのグラフにおいて例示される他のタンパク質においてなされ得る。

40

【0097】

比較の別の形態は、考察の明確さのためだけに提供される、図2、3および4において例

50

示される。これらの図は、2つの化合物のうちの1つに曝露されたコントロールサンプルによって、およびコントロールサンプルによって発現された小核タンパク質、小細胞質タンパク質および大細胞質タンパク質ならびにサンプルによって発現されるタンパク質の量を図で示す。これらのグラフは、視覚的に比較され得、そして発現したタンパク質および量は、手動で記録した。図2は、上記のような3つのMSC群における小核タンパク質の発現を比較する。これらのグラフにおいて、パネルにおける各バーは、単一のタンパク質を示すが、バーの長さは、コントロールMSCと比較される発現した量の比較ではなく発現したタンパク質の相対的な量を示す。図2において、上のパネル2Aは、標準的な組織培養培地中のMSCに加えて、化合物に曝露されないMSCにおいて、質量分析によって決定されるような、タンパク質発現レベルのグラフである。真ん中のパネル2Bは、試験化合物Iに曝露されるMSCのタンパク質の発現のレベルを例示する。そして、下のパネル2Cは、試験組成物IIと接触するMSCの発現のレベルを例示する。これらのパネルにおいて、相対的な値として、タンパク質の発現レベル（Y軸におけるプロットが示される）は、分子量（X軸にプロットして示される）に対してプロットされる。例示されるようなパネルの視覚的な比較は、発現のレベルは異なるが、試験された2つの化合物に曝露されるMSCによって発現されるタンパク質のいくつかは、同じであり、そして他のものは異なり、そして共にいずれの組成物にも曝露されないコントロールMSCが示すものと異なる発現パターンを示すことを明らかにする。

10

【0098】

図3は、前述の段落において考察されるのと同じMSCの3つの群における小細胞質タンパク質の発現のレベルを例示する。これらのパネルは、図2のように同じ順序に整列される。もう1度、各群に対する発現レベル（Y軸にプロットして示される）は、タンパク質の分子量（X軸にプロットして示される）に対してプロットされる。もう1度、例示されるようなパネルの視覚的な比較は、発現のレベルにおいて異なるが、試験された2つの化合物に曝露されたMSCによって発現されるタンパク質のいくつかは、同じであり、そして他のものは、異なることを明らかにする。

20

【0099】

同様に、図4は、上に考察されるMSCの同じ群によって発現される大きい細胞質タンパク質のグラフ分析を例示する。もう1度、質量分析計によって決定される発現のレベルは、Y軸にプロットされ、一方で分子量は、X軸にプロットされる。もう1度、明確な類似性および明確な差異が、試験化合物に曝露されたMSCのタンパク質発現パターン間、およびこれらのタンパク質発現パターンと試験化合物のいずれかへの曝露なしに増殖されたMSCのタンパク質発現パターンとの間に観察され得る。

30

【0100】

薬物が、複雑かつ固有のタンパク質発現パターンを誘導し得ることは上のような図から明らかである。いくつかのタンパク質は、コントロールMSCにおけるタンパク質発現と比較してより少量で発現されるか（または「下方制御」）され、そして他は、コントロールと比較してより多量に発現されるか（または（「上方制御される」）。さらに、化合物は、同じタンパク質のいくつかに影響を与え得、従って、共通のサブパターンを共有し得る。

40

【0101】

例えば、図2Cに例示されるように、2500ダルトンの分子量を示す線の右に、強く発現したタンパク質を表す、Y軸における15単位を超える、高い線が存在する。パネル2Bおよび2Aまでの線に続いて同じタンパク質が、試験組成物Iと接触するMSCおよびいずれの組成物とも接触しないコントロールMSCの両方における高レベルで発現されることが示される。従って、このタンパク質は、サンプルが採取される発生の時点でMSCにおいて高く発現するようであるが、発現のレベルにおけるいくつかのバリエーションが存在する。しかし、パネル2Cの右につづき、そして同じ比較をすると、次の存在するタンパク質はまた、試験組成物Iに曝露されるMSCにおいておよそ同じ量で存在することが示されるが、コントロールMSCによって全て発現されない。従って、このタンパク質

50

は、他の組成物および他の種類の毒性から試験化合物の組織/器官毒性を有する化合物を区別するための候補である。

【0102】

好ましくは、結果は、検索可能なデータ分野に記録される化合物の公知の毒性についての情報を有する、コンピューターデータベースに配置される。タンパク質発現または遺伝子発現における変更の検出の他の形態からのデータの輸入はまた、手動またはコンピューターデータベースにおいて概説され、そして記録される。例えば、E I L S Aからの値またはウエスタンプロットにおいて同定されるタンパク質は、コントロールサンプルおよび試験サンプルにおいて発現されるタンパク質の型および量を同定するために記録され得る。同様に、ノザンプロットにおけるパターンまたはオリゴヌクレオチドアレイ上のハイブリダイゼーションパターンは、コントロールサンプルおよび試験サンプルの遺伝子発現を同定するために記録され得る。情報は、手動で維持され得るが、好ましくは、コンピューター検索可能なデータベースで維持される。

10

【0103】

標準データベースプロフィール(例えば、Enterprise Data Management (Sybase, Inc., Emeryville, CA)またはOracle 8 (Oracle Corp., Redwood Shores, CA))は、情報を保存そして比較するために使用され得る。あるいは、このデータは、例えば、Partek Inc. (St. Charles, MO)から入手可能な詳細に設計されたプログラムにおいて記録または分析あるいは両方をし得る。

20

【0104】

さらに、質量分析計のような、統合統計システムを販売する会社は、結果を記録するためのソフトウェアを内蔵した機械を提供する。このような会社としては、Finnigan Corp. (San Jose, CA), Perkin-Elmer Corp. (Norwalk CT), Ciphergen Biosystems, Inc. (Palo Alto CA), およびHewlett Packard Corp. (Palo Alto, CA)が挙げられる。同様にAffymetrix, Inc. (Santa Clara, CA)およびIncyte Pharmaceuticals, Inc. (Palo Alto CA)のような会社は、ハイブリダイゼーションアッセイの取りこんだ画像を記録および分析するために独自の画像認識アルゴリズムを維持するオリゴヌクレオチドハイブリダイゼーションサービスを提供する。

30

【0105】

好ましい実施形態において、このデータは、神経ネットワーク技術によって記録および分析され得る。神経ネットワークは、データセットにおけるパターン認識のために詳細に設計される複雑な非直線系式である。1つのこのようなプログラムは、Ward Systems Group, Inc. (Frederick, MD)製のNeuroShell Classifier classification algorithmである。他の神経ネットワークプログラムは、Partek, Inc., BioComp Systems, Inc. (Redmond WA)およびZ Solutions, LLC (Atlanta, GA)から入手可能である。

40

【0106】

(H. アレイリーダーを適合させる)

1つの実施形態において、本発明は、遺伝子またはタンパク質発現における変化をそれぞれ検出するための、ハイブリダイズしたオリゴヌクレオチドのアレイまたは結合したタンパク質のアレイの形成に関する。このようなアレイは、アレイリーダーによって走査または読み取りされ得る。

【0107】

代表的には、このアレイリーダーは、アレイ上の標識(例えば、結合したタンパク質またはハイブリダイズしたオリゴヌクレオチド)のパターンを読み取るために適合され、1以上のデータファイル(これは、既知または未知の毒性化学組成物と接触させた哺乳動物M

50

MSCの、複数の遺伝子発現プロファイルまたはタンパク質発現プロファイルを有する)を記憶し、または(例えば、外部ドライブで、またはインターネットを介して)アクセス可能なコンピューターに作動可能に連結された最適なスキャナーを有する。しかし、アレイリーダーは、光学的に検出できない標識を「読み取る」ために適切な検出デバイス(たとえば、電子中継器)に適合され得る。

【0108】

(I. 高スループットスクリーニングにおける使用)

本発明の方法は、高スループットスクリーニングに容易に適合され得る。高スループット(「HTP」)スクリーニングは、大きな製薬会社においてすでに開発された多数の特徴づけられていない化合物ならびにコンビナトリアルケミストリーによって現在合成されている新規化合物の氾濫に起因して、非常に望ましい。本発明を使用して、数百の化学組成物がMSCで試験され得、そして遺伝子またはタンパク質の発現またはこれら両方において得られた変更を、既知の化学組成物の毒性と比較して、新規化合物が保有する毒性の型およびおそらく毒性の程度を予測し得る。次いで、受容可能な毒性プロファイルを有するこれらの組成物は、さらなるレベル試験について考慮され得る。

10

【0109】

HTPスクリーニングは、自動化されかつ統合された培養システム、サンプル調製(タンパク質またはRNA/cDNA)、および分析を使用することによって容易にされ得る。これらの工程は、標準的なロボットアームを使用する通常の実験器具、またはより最近開発されたマイクロチップおよび微小流動デバイス(例えば、Caliper Technologies Corp. (Palo Alto, CA)によって開発されたもの、米国特許第5,800,690号においてOrchid Biocomputer, Inc. (Princeton, NJ)によって記載されるもの、1997年10月25日のNew Scientistに記載されるもの、および他の会社によるもの(これらは、非常に少量の試薬を使用する自動化分析の方法を提供する)において実行され得る。例えば、McCormick, R.ら、Anal. Chem. 69:2626-2630(1997); Turgeon, M., Med. Lab. Management Rept, Dec. 1997、1頁を参照のこと。

20

【0110】

(実施例)

30

(実施例1. 毒性スクリーニングのために化学的化合物を選択する)

特定の分類の毒性に分類される組成物を使用して、分子プロファイルを確立し、そして特定の毒性についてのライブラリーを編成する。表1は、特定の組織もしくは器官に対して、または発生段階の間に毒性であることが公知の、多くの組成物を列挙する。特に、肝臓毒性を引き起こすこれらの組成物を、各組成物を接触させたMSCにおける遺伝子またはタンパク質の発現パターンの変更を決定することによって、その分子プロファイルについて、評価する。それによって、肝臓毒性を有する組成物の分子プロファイルを含むライブラリーを、編成する。心臓血管毒性を引き起こすこれらの組成物を、同様に、その分子プロファイルについて評価し、そしてライブラリーを編成する。さらに、中枢神経系に対する毒性を有する組成物についての分子プロファイルおよびライブラリー、ならびに発生の毒性を有する組成物についての分子プロファイルおよびライブラリーを、MSCシステムを使用して同様に確立する。上記のような実験手順を、一般的に、そして以下の実施例においてより詳細に、特定の型の毒性を有する組成物についての分子プロファイルおよびライブラリーを編成するために続ける。

40

【0111】

特定の疾患に対する活性を有することが既知であるかまたは疑われる薬物を使用して、毒性評価のための分子プロファイルおよびライブラリーを確立し得る。例えば、表1に列挙される、類似の毒性を有する抗新生物薬物を使用して、これらの薬物に曝露されたMSCにおける遺伝子またはタンパク質の発現パターンにおける変更を決定することによって分子プロファイルを編成し得る。同様に、類似の毒性を有する抗生物質をまた、MSCにお

50

ける遺伝子またはタンパク質の発現パターンにおける変更について評価し得る。糖尿病を制御する薬物、脂質レベルを低下させるための薬物、または抗炎症性薬物もまた使用される。一旦、類似の毒性を有する特定の型の薬物の分子プロフィールを含む混成ライブラリーが確立されると、これを使用して、潜在的な毒性についての類似の型を導く新規の薬物についてスクリーニングし得る。また、上記のような実験手順を、一般的に、そして以下の実施例においてより詳細に記載されるように、分子プロフィールおよびライブラリーのために、ならびに新規薬物が導く毒性の分類分け/ランキングのために続ける。

【0112】

(実施例2. 組織/器官毒性に関して、化学的薬剤についてのタンパク質プロフィールを確立する)

この実施例は、間葉幹細胞の培養、所定の組織毒性または器官毒性を有する異なる化学的薬剤に対する間葉幹細胞の曝露、および間葉幹細胞におけるタンパク質発現の変化の決定を実証する。

【0113】

(細胞の単離)

MSCを、以下に記載の方法に従って単離、精製および培養増殖させる：

(方法1)

ヒト間葉幹細胞を、Caplanら(米国特許第5,197,985号および同第5,486,359号)に記載される方法に従って、単離、精製および培養増殖させる。簡潔には、骨髄を、海綿骨髄の栓子または吸引骨髄のいずれかから獲得する。海綿骨髄の栓子を、滅菌チューブに移し、これに10%の胎仔ウシ血清(JR Scientific, Woodland, Calif.)を含む約25mlのBGJ₁培地(GIBCO, Grand Island, N.Y.)(完全培地)を添加する。このチューブを、骨髄を分散させるためにボルテックスし、次いで、細胞および骨断片をペレット化するために約1000×RPMで約5分間遠心する。上清および脂肪層を除去し、そして骨髄および骨を約5mlの完全培地中で再構築し、そして骨髄細胞を懸濁するためにボルテックスする。懸濁された細胞を16ゲージの針を装着したシリンジで回収し、そして別々のチューブに移す。骨断片を約5mlの完全培地中で再構築し、そして骨髄細胞を前のように回収する。骨髄細胞を、18ゲージの針および20ゲージの針を装着したシリンジを通すことによって、単一の細胞懸濁物に分離する。細胞を、1000×RPMで約5分間遠心し、その後、脂肪層および上清を除去する。細胞を、完全培地中で再構築し、血球計算器で計数し(赤血球を、計数の前に、4%酢酸で溶解させる)、そして、50~100×10⁶有核細胞/皿で、100mmの皿にプレートする。

【0114】

吸引骨髄の場合、約5~10mlの吸引骨髄を、滅菌チューブに移し、これに、20mlの完全培地を添加する。このチューブを、1000×RPMで約5分遠心して、細胞をペレット化する。上清および脂肪層を除去し、そして細胞ペレット(約2.5~5.0ml)を、70% Percoll(Sigma, St. Louis, MO)勾配上にロードし、そして460×gで15分間遠心する。これらの勾配を、ピペットを用いて以下の3つの画分に分離する：勾配の上端25%(低密度細胞-血小板画分)、プールされた濃度=1.03g/ml；勾配の中央50%(高密度細胞-単核細胞)、プールされた濃度=1.10g/ml；勾配の底25%(赤血球)、プールされた濃度=1.14g/ml。低密度の細胞を、プレートする。

【0115】

大腿骨頭海綿骨または腸骨吸引物のいずれかに由来する骨髄細胞を、完全培地中で、95%の空気および5%のCO₂を含む加湿雰囲気中で37℃で培養する。細胞を、非接着細胞を新鮮な完全培地で元の培地を置換することによって培養物から除去する前に、少なくとも1日間接触させる。その後の培地交換を、約4日ごとに行う。コンフルエンスに達した際に、細胞を、0.1mM EDTA(GIBCO)を含む0.25%トリプシンを用いて、37℃で約10~15分分離させる。トリプシンの作用を、1/2容量の胎仔

10

20

30

40

50

ウシ血清を用いて停止させる。細胞を計数し、約 1 : 3 に分割し、そして培養培地中で置換する。

【0116】

(方法2)

MSCを、Youngら(J. Tiss. Cult. Method (1992)、14 : 85 - 92 ; 米国特許第5,328,695号)によって記載される方法に従って、単離する。簡潔には、11日齢の胚を、ニワトリ受精卵から取り出し、断頭し、そしてその脚(膝から足首の関節を含む)を取り出し、滅菌したTryode's T.M. 緩衝液(Youngら、Connect. Tiss. Res.、17 : 99 - 118 (1988))中に配置する。皮膚を、各々の脚および筋肉から取り出し、そして付随する軟組織を微細に刻み、細胞を分散させるために粉碎し、滅菌チーズクロスを通じて濾過し、次いで20 μ mのNitetexTM フィルターを通じて濾過して、単一細胞懸濁液を獲得する(Youngら、J. Tiss. Cult. Meth. (1991)、13 : 275 - 284)。生存細胞数を、色素排除試験によって推定する：100 μ lの細胞懸濁液アリコートをし、pH 7.4の滅菌Tyrode'sTM 溶液中の0.4%トリパンブルー(100 μ l)と混合し、そして生存(色素排除)細胞を、血球計算器で計数する。細胞を、100mmの組織培養プレート当たり 2.5×10^6 細胞でプレートし、そして、Earle's Salts (GIBCO、Gaithersburg、Md.)、10%の予め選択されたウマ血清、および5%の段階特異的な胚抽出物を含むEagle'sTM Minimal Essential Medium (MEM)を毎日供給する(Youngら、J. Tiss. Cult. Method. (1992)、14 : 85 - 92 (1992))。培養物を、加湿された95%空気/5%CO₂のインキュベーター中で、37°Cでインキュベートする。

10

20

【0117】

培養物を、全ての筋原性系統決定済み細胞が、単核の星状形状細胞の複数のコンフルエントな層に包埋された、多核の自然に収縮する筋管を形成するまで、維持する(Youngら、J. Tiss. Cult. Meth. (1991)、13 : 275 - 284)。混合された培養物を、Moscona's : Moscona's - EDTA緩衝液中の0.05%トリプシンを用いて環境温度で5~10分間緩やかにトリプシン処理して、プレートから細胞を開放する(Youngら、J. Tiss. Cult. Meth. (1991)、13 : 275 - 284)。細胞/トリプシン懸濁液を、二分の一容積のウマ血清消化物(digestate)に添加してさらなるトリプシン活性を阻害し、そして遠心分離する(Youngら、J. Tiss. Cult. Meth. (1991)、13 : 275 - 284)。上清を廃棄し、細胞を、Earle's塩を含む不完全Eagle's T.M. MEM中に懸濁し、滅菌チーズクロスおよび20 μ mのNitetex T.M. を通じてふるいにかき、そして100 μ lのアリコートを、生存率試験および細胞計数のために取り出す。間葉幹細胞(Youngら、J. Tiss. Cult. Method. (1992)、14 : 85 - 92)を、Earle's塩、5%胚抽出物(Youngら、J. Tiss. Cult. Meth. (1991)、13 : 275 - 284を参照のこと)、および10%胎仔ウシ血清を有するEagle's MEMからなる培地中で維持する。

30

40

【0118】

(試験化合物への細胞の曝露およびタンパク質発現の分析方法)

上記の方法に従って単離されたMSCを、細胞の分化を誘導するために、デキサメタゾンを含む培地中で培養する。所定の毒性を有する薬物(例えば、トログリタゾン(trogliptazone))(これは、糖尿病の制御のために所望される薬物であり、まれにはあるが重篤な肝臓毒性を示し、最近市場から回収された)を、MSCを含む1群のプレート(群「A」)に、約20 μ Mの最終濃度で添加する。同じ日に、所定の毒性を有する別の薬物(例えば、エリスロマイシンエステル(estolate)(Sigma、カタログ番号E8630))(これは、公知の肝臓毒性を有するエリスロマイシンの形態である)を、最終濃度約50 μ Mで第二の群のプレート(群「B」)に添加する。培養細胞

50

を含む第三の群のプレート(群「C1」)を、コントロールとして働くように、いずれの薬物も添加しないで培養する。さらに、組織培養培地のみを含むプレート(群「C2」)を、培養培地中のタンパク質分解についてのコントロールとして、培養細胞を含むプレートと平行して培養する。薬物に対する細胞の曝露期間後(例えば、約10、20、30および40日後)に、培養物を回収し、細胞をPBSのような緩衝液で洗浄し、次いで緩衝液(例えば、PBS、0.5% Triton-X100を含む)中で、氷上で約10分溶解させる。核をペレット化し、そして上清を除去し、そして分析まで-80で貯蔵する。核を、0.2% SDSを有するPBSのような緩衝液中で溶解させ、そしてDNAを剪断するために、ダウンスホモジェナイズする。不溶性物質を、ペレット化し、そして核溶解物を分析まで-80で貯蔵する。細胞質および核溶解物をまた、さらなるコントロールとして働くように、任意の試験化合物に対する曝露前0日目に、採取する。

10

【0119】

溶解物および培地のサンプルを、例えば、50mMのTris-HCl(pH8)および0.4M NaClを含む緩衝液中で3倍に希釈する。希釈された溶解物または培地のアリコートサンプルを、サイジングスピンカラムに配置する。このカラムは、例えば30kDのサイズカットオフでサンプルを画分化し、50mM Tris-HCl(pH8)および50mM NaCl中で平衡化する。このカラムを、各画分について適切な力で適切な時間(例えば、700gで3分)遠心する。約25 μ Lの複数の画分を、カラム平衡化緩衝液を使用して、各カラムについて回収する。

【0120】

サンプルを、表面増強レーザー脱着/イオン化(「SELDI」)によって分割し、そしてタンパク質を、質量分析法によって検出する。SELDIは、タンパク質が選択された表面上で捕捉され、次いで、選択されたストリンジェンシーで洗浄され得ることを可能にし、所望の特性(例えば、捕捉のために使用される表面の金属イオンに対する親和性)に従う画分化を可能にする。

20

【0121】

Ciphergen正常相チップ(Ciphergen Biosystems、Palo Alto、CA)を使用して、スピンカラムによって生成された画分中のタンパク質を分割する。各画分の約1 μ Lのアリコートを、チップ上のスポットに沈着させ、そしてこのサンプルを室温で約5分間風乾する。0.5%のトリフルオロ酢酸(「TFA」)を有する50%アセトニトリル中の飽和シナピン酸(「SPA」)約0.5 μ Lの混合物を、各スポットに適用する。このチップを再び室温で約5分間風乾し、そしてSPA混合物の第二のアリコートを適用する。

30

【0122】

チップを、Ciphergen Protein Biology System1リーダーによって読み取る。例示的なリーダーの設定は、以下の通りである。自動モードを、SELDI定量設定でデータ収集に使用する。2セットのタンパク質プロファイルを、1つは低レーザー強度で(透過と共に15で)、そして1つは高レーザー強度で(透過と共に50で)、検出器設定10で収集する。同じサンプルスポット上の1つの位置当たり、平均15ショットを行う。異なる溶解物由来のタンパク質プロファイルを、SELDIソフトウェア(Ciphergen Biosystems、Palo Alto、CA)を使用して比較する。このプログラムは、互いに約1%以内の分子量を有する2つのタンパク質は、同一物であると仮定する。次いで、これは、コントロールサンプルに対して試験サンプルを比較して結果を定量し、そしてコントロール中の各タンパク質の量を水平線で示し、コントロールサンプル中のこのタンパク質の量と比較した試験サンプル中の各タンパク質の量の任意の減少または過剰を、コントロールを示す線の下または上の線として示すグラフを印刷する。

40

【0123】

(実施例3. 組織毒性および器官毒性についての抗癌薬物のスクリーニング)

この実施例は、その組織毒性または器官毒性について、抗癌剤をスクリーニングするため

50

のMSC系の使用を例示する。

【0124】

ヒトおよび/または動物における既知の毒性および生物学的終点を有する化合物および薬物(抗癌薬物および治療的薬物の両方)を、MSCにおける遺伝子またはタンパク質の発現プロフィールを編成するために選択する。さらに、化合物を、活性の既知の機構に関して、そしてヒトを用いたインビトロ細胞培養物効果における臨床結果に相関させるために以前の研究において使用された化合物に関して選択する。表3。

【0125】

【表3】

表3

10

薬物	毒性						機構	
	Dev	肝臓	CV	GI	CNS	腎		血液
クロロキノキサリン			+			+		?
スルホンアミド								
ジデムニンB (didemnin B)				+				?
シクロホスファミド (cyclophosphamide)			+					アルキル化剤
ビゼレシン (bizelesin)							+	アルキル化剤
カルボプラチン				+			+	アルキル化剤
シスプラチン				+		+	+	アルキル化剤
オキサリプラチン					+			アルキル化剤
エクテイナシジン (ecteinascidin) 743							+	アルキル化剤
ペンクロメジン (penclomedine)					+			アルキル化剤
メトトレキサート	+	+						代謝拮抗
フザラビン (fuzarabine)							+	代謝拮抗
フルダラビン							+	代謝拮抗
フラボピリドール (flavopiridol)				+				CdK インヒビター
ドキソルビシン			+					DNA 介在因子
アモナフィド							+	DNA 介在因子
ダウノルビシン			+				+	DNA 合成インヒビター
ゲムシタビン		+					+	DNA 合成インヒビター
エトポシド							+	DNA 合成インヒビター
デオキシスパーグアリン (deoxyspergualin)			+					免疫抑制
カンプトセシン							+	トポ-I インヒビター
9 アミノカンプトセシン							+	トポ-I インヒビター
トポテカン (topotecan)							+	トポ-I インヒビター
メルバロン (merbarone)						+		トポ-II インヒビター
ドラスタチン (dolastatin) 10							+	チューブリンインヒビター
タキソール							+	チューブリンインヒビター
ビンブラスチン	+						+	チューブリンインヒビター
ビンクリスチン	+						+	チューブリンインヒビター
ビンデシン	+			+			+	チューブリンインヒビター
ビノレルビン	+						+	チューブリンインヒビター

20

30

“Dev” = 発生 “GI” = 胃腸 “CV” = 心臓血管 “CNS” = 中枢神経系

(a . 遺伝子発現プロフィールを確立する)

選択された化合物の遺伝子発現パターンを、cDNAマイクロアレイを使用して測定および定量し、そして細胞分化について正規化する。化合物の遺伝子発現パターンを、化合物に曝露されていないコントロールMSC培養物、あるいは類似の機能または用量限定的毒性を有する関連の薬物で処置した適切なMSC培養物と比較する。類似もしくは関連の毒性を有する多数の抗癌剤についての遺伝子発現プロフィールを編成することによって、遺伝子発現における共通の変更を、識別して毒性と相関させ、そして試験抗癌薬物候補物の毒性を評価するための代理プロフィールとして使用する。

40

【0126】

cDNAマイクロアレイは、例えば、Shalonら(1996)、Genome Res 6:639-645に記載されるような、当該分野で公知かつ利用可能な多種のうちの任意の1つであり得る。cDNAマイクロアレイは、コントロールと化学的に処置された細胞との直接の比較によって、数千の遺伝子の発現の同時モニタリングを可能にする。3'発現配列タグ(EST)を、整列し、そして高速ロボットを使用して、1スライド当

50

たり数百～数千の濃度で、ガラス顕微鏡スライド上にスポットする。蛍光 cDNA プローブを、2つの異なる波長で励起する蛍光（すなわち、Cy3 および Cy5）を使用して標識された dUTP を用いる逆転写反応を使用して、コントロール RNA および試験 RNA から生成する。これは、各サンプル中の相対的な遺伝子発現の直接の比較のために、同じチップに対するコントロール RNA および試験 RNA の両方のハイブリダイゼーションを可能にする。この蛍光シグナルを、特別に操作された走査型共焦点顕微鏡を使用して検出する。15,000個の配列が確認されたヒトクローンおよび8700個のマウスクローンの回収を使用して、cDNA マイクロアレイを作製し得る。これらのマイクロアレイは、種々の薬剤で処置された MSC 培養物中の遺伝子発現パターンの分析のために理想的である。

10

【0127】

マイクロアレイ分析の別の例が、Lockhartら、米国特許第6,040,138号に記載される。この方法において、標的細胞由来の標識されたRNAまたはcDNAは、オリゴヌクレオチドプローブの高密度アレイにハイブリダイズされ、ここで、この高密度アレイは、RNAサンプルまたはcDNAサンプル中の標的核酸の部分配列に相補的であるオリゴヌクレオチドプローブを含む。Lockhartら（前述）において記載されるように調製した、20マーのオリゴヌクレオチドプローブは、平坦なガラススライド上に整列される。標識RNAを、当該分野で公知の方法（例えば、標識ヌクレオチドの存在下で細胞をインキュベートする）を使用して、コントロールMSCおよび試験MSCから生成する。あるいは、標識cDNAは、標識ヌクレオチド（例えば、異なる波長で励起する蛍光を使用するdUTP）での逆転写反応を使用して、試験細胞およびコントロール細胞のRNAから調製される。標識RNAまたはcDNAからのシグナルは、レーザー照射スキニング共焦点蛍光顕微鏡によって読み取られ得る。本方法におけるマイクロアレイは、10,000個よりも多い異なる遺伝子を同時にモニタリングし得る。

20

【0128】

簡単に言うと、RNAは、コントロールMSCおよび処理されたMSCから単離される。総RNAを、Qiagenから入手したRNAeasyキットを使用して調製する。続いて、RNAを、Cy3またはCy5 dUTPのいずれかで、逆転写の1回のラウンドで標識する。得られた標識cDNAを、濃縮された量中で混合し、そしてアレイにハイブリダイズする。ハイブリダイゼーションを、65℃で一晩、エバポレーションを防ぐようにカスタム設計されたチャンバー中でインキュベートする。ハイブリダイゼーションの後、チップをカスタム共焦点レーザーキャナでスキャンし、これが、Cy3およびCy5チャンネルの両方について、アレイ上のそれぞれのスポットの強度の結果を提供する。次いで、このデータを、さらなる拡張を備えるソフトウェアパッケージで分析する。これらの拡張は、それぞれのスポットにまたがるシグナルの統合、設計されたハウスキーピング遺伝子のパネルに対するデータの標準化、そして統計学的に計算して、その比が異常値であるか、または処理によって有意に異なる遺伝子の列挙を作製することを可能にする。画像分析ソフトウェアに加えて、情報科学パッケージ（例えば、Spot-FireおよびGeneSpring（その両方共が市販されている））を使用して、用量および/または時間にまたがる複数の実験における、遺伝子のクラスター化および分析が可能になる。一般に、cDNAマイクロアレイ技術は、定量的データを提供するための、実行可能な技術として、いぜんとして確証されている。赤/緑の比によって、1つの集団他の集団における遺伝子の発現の相対的なレベルに対する良好な定量的データが提供されるが、その値はその遺伝子の誘導調節/下方調節のレベルの絶対値ではない。アレイに対する、サンプルのそれぞれの対を、3回ハイブリダイズする。3つのうち2つのハイブリダイゼーション実験において、一貫して誘導されるかまたは抑制される異常値は、さらに伝統的なRNA定量的方法（例えば、ノーザンプロットまたはRT-PCR）によって確証される。

30

40

【0129】

それぞれの薬物を、増殖、分化およびRNA発現に対するその効果について、少なくとも3回、別々のMSCクラスターに対して試験する。細胞数（増殖）、発現した/発現して

50

いない、および/もしくは特定の分化マーカー/特徴(分化)を提示する細胞の量、ならびにRNAレベル/cDNAマイクロアレイデータ(RNA発現)を、3回以上の実験について平均を取り、そしてその平均値およびSEMを決定する。全ての結果を、約15個の「ハウスキーピング」遺伝子を使用して標準化する。これにより、ヒトまたは動物において毒性ではないコントロール化合物に対する試験薬物の効果の、定量的な比較が可能になる。統計的な比較により、所定の薬物が、コントロール薬物または未処理細胞と比較して、MSC遺伝子発現に影響するか否かを決定するための情報、および、細胞中のRNAにおける変化が関連するか否かを決定するための情報が提供される。

【0130】

(b. タンパク質発現プロファイルの構築)

選択された抗癌剤のタンパク質発現プロファイルを、実施例2に記載されるように、CIPHERGENのSELDI質量分析(MS)-TOFシステムを使用して構築する。収集したMSC培養物由来の総細胞溶解物を、0.1%SDSまたはTriton-X100(0.5%)のいずれかにおいて調製し、そして等量のタンパク質を、製造業者のプロトコルを使用して、直接タンパク質アレイチップに適用する。いくつかの状況について、チップとサンプルとの間のより定量的な比較を可能にするために、1つ以上の既知のコントロールペプチドの規定された量を内部較正および定量的な標準として、添加することが望ましくあり得る。それぞれのチップは、3連で2つの薬物を分析し得る。ストリンジエンシーな条件および実験的な複製を行った後、試験化合物あたり平均して6つのProteinChipsTMを使用する。

【0131】

CIPHERGEN技術は、サンプル中のタンパク質について捕獲、保持、およびチップ上で直接精製することを可能にする。次いで、マイクロチップ上のタンパク質を、SELDIによって分析する。この分析によって、サンプル中のタンパク質の分子量を決定する。次いで、サンプル中の精製されたタンパク質の分子量の自動的な読出しを評価し得る。代表的に、このシステムは、20%未満のCVを有する。CIPHERGENデータ分析システムは、このデータを、内部参照標準に対して標準化し、そして薬物処理された細胞におけるタンパク質の読出しから、コントロールサンプル中に見出されるデータの読出しを減算する。このデータ分析によって、薬物によって刺激されるタンパク質発現、およびその発現が薬物によって阻害されるコントロール細胞中のみ見出されるタンパク質が明らかになる。この分析は、コントロール群と処理群との間のタンパク質発現の定量的な読出しを提供する。複数のサンプルの分析によって、タンパク質発現および可変性の相対的な測定における、平均的な変化倍数が提供される。これは、タンパク質変化の統計的な評価を提供し得る、平均値±SEMとして表され得る。この分析を使用して、ヒトにおいて毒性の同様の形態を誘導する薬物が、MSC中のタンパク質発現において同様の変化を引き起こすか否かを決定する。それぞれの薬物を、MSCの少なくとも3つの別々の群で分析する。

【0132】

本明細書中で言及されるすべての刊行物および特許出願は、個々の刊行物または特許出願が詳細に、そして個々に参考として援用されて示されるのかのように、参考として本明細書中に援用される。

【0133】

前述の本発明を、理解を明確にする目的で図解および実施例によっていくらか詳細に記載してきたが、特定の変更および改変が、特許請求の範囲の趣旨および範囲から逸脱することなくなされ得ることが、本発明の教示から照らして、当業者に容易に明らかである。

【図面の簡単な説明】

【図1】

図1は、2つの化学組成物のうちの1つに曝露されたMSCとコントロールMSCとの間の核タンパク質の発現における相違を例示的に示す。

図1Aは、質量分析計から読み出しのハーフトーンでの再現を示す。最上位のバンドは、

10

20

30

40

50

試験化学組成物のいずれかの非存在下で増殖されるコントロールM S Cの質量スペクトルである。中間のバンドは、試験化学組成物(試験組成物I)の存在下で増殖したM S Cの質量スペクトルであり、そして図1 Aの下バンドは、第二の試験化学組成物(試験組成物I I)に曝露されたM S Cによって発現された核タンパク質の質量スペクトルを示す。図1 Bおよび図1 Cは、試験M S CとコントロールM S Cとの間の発現において有意に差のあるこれらのタンパク質のみを示すために、試験M S CおよびコントロールM S Cのそれぞれの間での同一タンパク質の減算計算を示す棒グラフである。それぞれの棒は、単一のタンパク質を示し、そしてその棒の最も高さは、化学組成物に曝露されないM S Cによる発現量と比較された、試験組成物に曝露されたM S Cによるタンパク質発現量を示す。図1 B: コントロールのタンパク質発現と比較した、試験組成物Iと接触させた試験M S Cのタンパク質発現。図1 C: コントロールのタンパク質発現と比較した、試験組成物I Iと接触させた試験M S Cのタンパク質発現。

10

【図2】

図2は、質量分析計によって検出された小さな核タンパク質の発現を示す棒グラフである。X軸: 検出されたタンパク質の質量。Y軸: 相対単位での検出されたタンパク質量。図2 A: 化学組成物に曝露されていないコントロールM S Cのタンパク質発現。図2 B: 試験組成物Iに曝露されたM S Cのタンパク質発現。図2 C: 試験化合物I Iに曝露されたM S Cのタンパク質発現。太線は、2つの試験化学組成物のそれぞれに曝露されたM S C間の異なる量で発現されたタンパク質を示す。

【図3】

図3は、質量分析計によって検出された小さな細胞質タンパク質の発現を示す棒グラフである。X軸: 検出されたタンパク質の質量。Y軸: 相対単位での検出されたタンパク質量。図3 A: 化学組成物に曝露されていないコントロールM S Cのタンパク質発現。図3 B: 試験組成物Iに曝露されたM S Cのタンパク質発現。図3 C: 試験化合物I Iに曝露されたM S Cのタンパク質発現。太線は、2つの試験化学組成物のそれぞれに曝露されたM S C間の異なる量で発現されたタンパク質を示す。

20

【図4】

図4は、質量分析計によって検出された大きな核タンパク質の発現を示す棒グラフである。X軸: 検出されたタンパク質の質量。Y軸: 相対単位での検出されたタンパク質量。図4 A: 化学組成物に曝露されていないコントロールM S Cのタンパク質発現。図4 B: 試験組成物Iに曝露されたM S Cのタンパク質発現。図4 C: 試験化合物I Iに曝露されたM S Cのタンパク質発現。太線は、2つの試験化学組成物のそれぞれに曝露されたM S C間の異なる量で発現されたのタンパク質を示す。

30

【 図 1 】

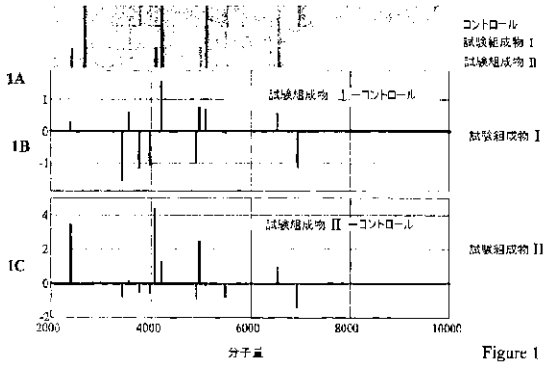


Figure 1

【 図 3 】

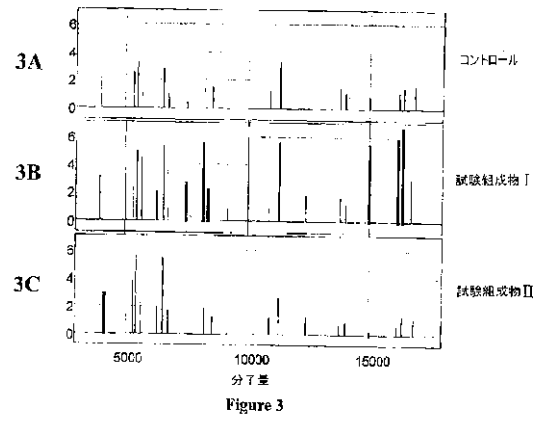


Figure 3

【 図 2 】

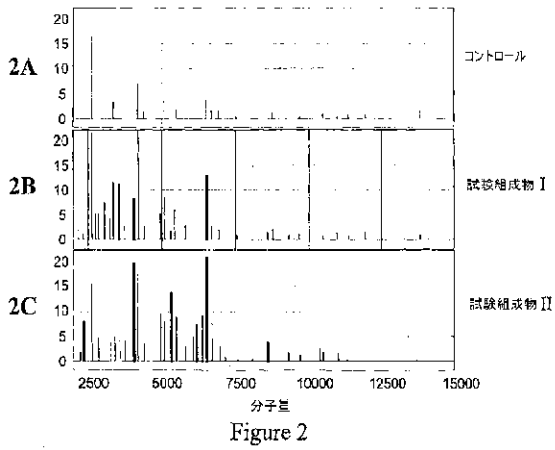


Figure 2

【 図 4 】

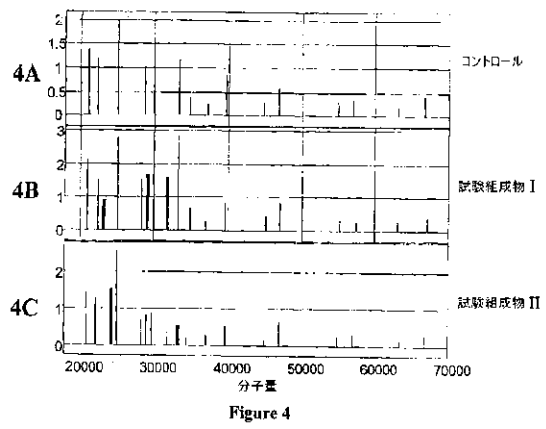


Figure 4

【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
20 December 2001 (20.12.2001)

PCT

(10) International Publication Number
WO 01/96865 A1

- (51) International Patent Classification: G01N 33/50, C12Q 1/68
 - (21) International Application Number: PCT/US01/19048
 - (22) International Filing Date: 14 June 2001 (14.06.2001)
 - (25) Filing Language: English
 - (26) Publication Language: English
 - (30) Priority Data: 60/211,608 14 June 2000 (14.06.2000) US
 - (71) Applicant (for all designated States except US): VISTA-GEN, INC. [US/US]; 1450 Rollins Road, Burlingame, CA 94010 (US).
 - (72) Inventor; and
(75) Inventor/Applicant (for US only): SNODGRASS, H., Ralph [US/US]; 2221 Armada Way, San Mateo, CA 94403 (US).
 - (74) Agents: MONROY, Gladys, H. et al.; Morrison & Foerster L.L.P., 755 Page Mill Road, Palo Alto, CA 94304 1018 (US).
- (81) Designated States (national): AP, AG, AI, AM, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GU, GT, HK, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KR, KG, KP, KZ, LC, LI, LR, LS, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TH, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BI, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published: with international search report — before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments.
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 01/96865 A1

(54) Title: TOXICITY TYPING USING MESENCHYMAL STEM CELLS

(57) Abstract: This invention provides methods and systems for identifying and typing toxicity of chemical compositions, as well as for screening new compositions for toxicity. The invention involves detecting alterations in gene or protein expression and hence establishing molecular profiles in isolated mammalian MSCs contacted with various chemical compositions of known and unknown toxicities, and correlating the molecular profiles with toxicities of the chemical compositions.

WO 01/96865

PCT/US01/19048

TOXICITY TYPING USING MESENCHYMAL STEM CELLSCROSS REFERENCE TO RELATED APPLICATIONS

5 This application claims the priority benefit of the provisional patent application U.S. Serial No. 60/211,603, filed June 14, 2000, which is hereby incorporated by reference in its entirety.

TECHNICAL FIELD

10 This invention provides methods for identifying and characterizing toxic compounds as well as for screening new compounds for toxic effects.

BACKGROUND ART

15 A critical element of modern drug discovery is the use of high throughput screening assays of combinatorial chemical libraries to rapidly identify drug candidates for treatment of diseases. Currently, few of the millions of compounds generated by chemists are suitable for therapeutic use because of their toxicity to the host system. Similar toxicity problems hinder the development of industrial and household chemicals as well. It is clear that currently available toxicological screening assays do not detect all toxicities associated with human therapy. Better means of screening potential therapeutics for potential toxicity would reduce the cost and uncertainty of developing new therapeutics and, by reducing uncertainty, would encourage the private sector to commit additional resources to drug development.

25 Currently available alternatives to traditional "single-reporter" cell lines and animal toxicity testing do not fully meet these needs. For example, Farr, U.S. Patent 5,811,231, provides methods of identifying and characterizing toxic compounds by choosing selected stress promoters and determining the level of the transcription of genes linked to these promoters in cells of various cell lines. This method therefore depends on the degree to which both the promoter and the cell

30

WO 01/96865

PCT/US01/19048

lines are representative of the effect of the potentially toxic agent on the organism of interest.

The use of hybridization arrays of oligonucleotides provides another route for determining the potential toxicity of chemical compositions. Exposing cells of a culture to a chemical composition and then comparing the expression pattern of the exposed cells to that of cells exposed to other chemical agents permits one to detect patterns of expression similar to that of the test compound, and thus to predict that the toxicities of the chemical compositions will be similar. See, e.g., Service, R., *Science* 282:396-399 (1998). These methods suffer from the fact that individual cell lines may not be fully representative of the complex biology of an intact organism. Moreover, even repeating the tests in multiple cell lines does not reproduce or account for the complex interactions among cells and tissues that occur in an organism.

Liver cell-based toxicity assays are also known. For example, Maier describes development of an in vitro toxicity test with cultures of freshly isolated rat hepatocytes. Maier, P., *Experientia* 44(10):807-817 (1988). This test is based on drug-induced pathological alterations in ploidy in hepatocytes as indicators of compounds which interfere with cell differentiation in liver. Sawai and Awata describe a method for culturing liver cells that can be used for testing the toxicity of test substances. Sawai and Awata, Japanese Patent 10179150. Takashina and Naoki describe established subculturable hepatic cells obtained by fusing a subculturable hepatic cell strain to a hepatocyte that can be used for toxicity tests. Takashina and Naoki, Japanese Patent 06319535. Again, toxicity assays using cell lines such as these may not fully take into account the complex biology of an intact organism or tissue, and cannot address the contributions of cell and tissue interactions in determining toxicity effects.

Lockhart et al. describe a method of screening a drug for deleterious side effects on a cell using expression profiles of a group of known genes. Lockhart et al., U.S Patent 6,033,860. This method assesses alterations in expression of 16 known genes, and therefore is limited to only drug and toxicity

WO 01/96865

PCT/US01/19048

types that alter the expression of a very small number of genes whose identity is known and expression level can be specifically measured.

5 A method for identifying or testing cytotoxicity of an agent based on expression of cytochrome P450 is also known. Harris et al., U.S. Patent 5,660,986. This method is based on testing cytotoxicity of agents on human bronchial and liver epithelial cell lines expressing exogenous cytochrome P450. This method is limited by its narrow focus on the expression of a particular gene and its nature as an assay that is based on cell lines that do not take account of complex cell and tissue interactions.

10 What is needed in the art is a method of systematically testing chemical compositions for potential toxicity in a milieu in which cells interact with cells of other types. What is further needed is a means of doing so which is relevant to the effect of the composition on whole organisms, without the cost, time, and ethical ramification of animal and human testing. The present invention
15 addresses these and other needs.

DISCLOSURE OF THE INVENTION

This invention provides novel methods for assessing the toxicity of chemical compositions. In one group of embodiments, the invention is directed to
20 methods of creating a molecular profile of a chemical composition, comprising the steps of a) contacting an isolated population of mammalian mesenchymal stem cells (MSCs) with the chemical composition; and b) recording alterations in gene expression or protein expression in the mammalian MSCs in response to the chemical composition to create a molecular profile of the chemical composition.

25 The invention further embodies methods of compiling a library of molecular profiles of chemical compositions having predetermined toxicities, comprising the steps of a) contacting an isolated population of mammalian MSCs with a chemical composition having predetermined toxicities; b) recording alterations in gene expression or protein expression in the mammalian MSCs in
30 response to the chemical composition to create a molecular profile of the chemical composition; and c) compiling a library of molecular profiles by repeating steps a)

WO 01/96865

PCT/US01/19048

and b) with at least two chemical compositions having predetermined toxicities. Libraries of molecular profiles compiled by methods of the invention can be stored in suitable storage devices, such as computer hard drives, compact disks, cassettes, floppy disks and the like. Generally and preferably, suitable storage
5 devices store such data in machine (such as computer) readable form.

Another embodiment of the present invention provides methods for typing toxicity of a test chemical composition by comparing its molecular profile in MSCs with that of an identified chemical composition with predetermined toxicity. In one aspect, the test chemical composition can be the same as the
10 chemical composition having predetermined toxicities. For example, the test chemical is identified through this testing as exhibiting the identical molecular profile as the known chemical composition.

The invention further encompasses systemic methods for typing the toxicity of a test chemical composition by making the profile comparison with a library comprising profiles of multiple chemical compositions with
15 predetermined toxicities. Preferably, the chemical compositions comprised in a library exert similar toxicities in terms of types and target tissues or organs. The library can be in the form of a database. A database may comprise more than one library for chemical compositions of different toxicity categories.

In one aspect of the present invention, the toxicity of a test
20 chemical composition can be ranked according to a comparison of its molecular profile in MSCs to those of chemical compositions with predetermined toxicities.

MSCs in the present invention can be of human or non-human
25 mammals, including those of murine species, as well as canine, feline, porcine, bovine, caprine, equine, and sheep species.

The alterations in levels of gene or protein expression can be detected by use of a label selected from any of the following: fluorescent, colorimetric, radioactive, enzyme, enzyme substrate, nucleoside analog, magnetic,
glass, or latex bead, colloidal gold, and electronic transponder. The alterations
30 can also be detected by mass spectrometry. The chemical composition can be

WO 01/96865

PCT/US01/19048

known (for example, a potential new drug) or unknown (for example, a sample of an unknown chemical found dumped near a roadside and of unknown toxicity).

Further, the chemical compositions can be therapeutic agents (or potential therapeutic agents), or agents of known toxicities, such as neurotoxins, hepatic toxins, toxins of hematopoietic cells, myotoxins, carcinogens, teratogens, or toxins to one or more reproductive organs. The chemical compositions can further be agricultural chemicals, such as pesticides, fungicides, nematocides, and fertilizers, cosmetics, including so-called "cosmeceuticals," industrial wastes or by-products, or environmental contaminants. They can also be animal therapeutics or potential animal therapeutics.

The invention also provides MSCs provided in array format (for example, liquid arrays) that can be conveniently used for conducting methods of the invention. Cells provided in array format can be exposed to chemical compositions of interest, and the molecular profiles of the cells determined. The molecular profiles can be determined by, for example, probing the MSCs on the substrate (of the array) itself, or by detaching cells from the substrate (of the array) and preparing them for determination of molecular profiles as described herein.

The invention further includes integrated systems for comparing the molecular profile of a chemical composition to a library of molecular profiles of chemical compositions, comprising an array reader adapted to read the pattern of labels on an array, operably linked to a computer comprising a data file having a plurality of gene expression or protein expression profiles of mammalian MSCs contacted with known or unknown chemical compositions.

The invention also includes integrated systems for correlating the molecular profile and toxicity of a chemical composition comprising an array reader adapted to read the pattern of labels on an array, operably linked to a digital computer comprising a database file having a plurality of molecular profiles of mammalian MSCs contacted with chemical compositions with predetermined toxicities and a program suitable for molecular profile-toxicity correlation. The integrated systems of the invention can be capable of reading more than 500

WO 01/96865

PCT/US01/19048

labels in an hour, and further can be operably linked to an optical detector for reading the pattern of labels on an array.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

5 Figure 1 illustratively depicts differences in expression of nuclear proteins between MSCs exposed to one of two chemical compositions, and control MSCs.

10 Figure 1A illustrates a half-tone reproduction of a readout from a mass spectrometer. The top band is the mass spectrum for control MSCs, which are grown in the absence of either of the test chemical compositions. The middle band is the mass spectrum for the MSCs grown in the presence of a test chemical composition (test composition I), and the bottom band of Figure 1A shows the mass spectrum of nuclear proteins expressed by MSCs exposed to a second test chemical composition (test composition II).

15 Figure 1B and 1C are bar graphs that illustrate computational subtractions of identical proteins between the respective test MSCs and the control MSCs to indicate only those proteins which are significantly different in expression between the test and the control MSCs. Each bar represents a single protein and the height of the bar represents the amount of protein expressed by the MSCs exposed to the test composition compared to the amount expressed by MSCs not exposed to the chemical composition. Figure 1B: protein expression of test MSCs contacted with test composition I, compared to protein expression of controls. Figure 1C: protein expression of test MSCs contacted with test composition II, compared to protein expression of controls.

25 Figure 2 is a bar graph illustrating expression of small nuclear proteins detected by mass spectrometry. X-axis: mass of protein detected. Y-axis: amount of protein detected, in relative units. Figure 2A: Protein expression of control MSCs not exposed to the chemical composition. Figure 2B: Protein expression of MSCs exposed to test composition I. Figure 2C: Protein expression of MSCs exposed to test composition II. Bold lines indicate proteins expressed in

30

WO 01/96865

PCT/US01/19048

different amounts between MSCs exposed to each of the two test chemical compositions.

Figure 3 is a bar graph illustrating expression of small cytoplasmic proteins detected by mass spectrometry. X-axis: mass of protein detected. Y-axis: amount of protein detected, in relative units. Figure 3A: Protein expression of control MSCs not exposed to the chemical composition. Figure 3B: Protein expression of MSCs exposed to test composition I. Figure 3C: Protein expression of MSCs exposed to test composition II. Bold lines indicate proteins expressed in different amounts between MSCs exposed to each of the two test chemical compositions.

Figure 4 is a bar graph illustrating expression of large nuclear proteins detected by mass spectrometry. X-axis: mass of protein detected. Y-axis: amount of protein detected, in relative units. Figure 4A: Protein expression of control MSCs not exposed to the chemical composition. Figure 4B: Protein expression of MSCs exposed to test composition I. Figure 4C: Protein expression of MSCs exposed to test composition II. Bold lines indicate proteins expressed in different amounts between MSCs exposed to each of the two test chemical compositions.

20 MODE(S) FOR CARRYING OUT THE INVENTION

A. DEFINITIONS

"Toxicity," as used herein, means any adverse effect of a chemical on a living organism or portion thereof. The toxicity can be to individual cells, to a tissue, to an organ, or to an organ system. A measurement of toxicity is therefore integral to determining the potential effects of the chemical on human or animal health, including the significance of chemical exposures in the environment. Every chemical, and every drug, has an adverse effect at some concentration; accordingly, the question is in part whether a drug or chemical poses a sufficiently low risk to be marketed for a stated purpose, or, with respect to an environmental contaminant, whether the risk posed by its presence in the

WO 01/96865

PCT/US01/19048

environment requires special precautions to prevent its release, or quarantining or remediation once it is released. *See, e.g., Klaassen, et al., eds., Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons*, McGraw-Hill (New York, NY, 5th Ed. 1996). As used herein, a chemical composition with "predetermined toxicities" means that the type of toxicities and/or certain pharmacodynamic properties of the chemical composition have been determined. For example, a chemical composition may be known to induce liver toxicity. Furthermore, the severity of liver toxicity caused by the chemical may be quantitatively measured by the amount or concentration of the chemical in contact with the liver tissues.

"Alteration in gene or protein expression" according to the present invention means a change in the expression level of one or more genes or proteins compared to the gene or protein expression level of MSC which has been exposed only to normal tissue culture medium and normal culturing conditions. Depending on the context, the phrase can mean an alteration in the expression of a single protein or gene, as when MSCs exposed to a chemical agent expresses a protein not expressed by control MSCs, or it can mean the overall pattern of gene or protein expression of MSCs. The phrase can include gene or protein expression in MSCs at one or more time points and/or stages along the pathway of their differentiation, growth, and/or development into mesenchymal cells. The phrase does not include gene or protein expression in fully differentiated mesenchymal cells.

"MSC type" or "type of MSC" as used herein refer to MSCs isolated from a particular source (as defined by, for example, species, tissue, age of source) and/or according to a particular MSC isolation method.

"Chemical composition," "chemical," "composition," and "agent," as used herein, are generally synonymous and refer to a compound of interest. The chemical can be, for example, one being considered as a potential therapeutic, an agricultural chemical, an environmental contaminant, or an unknown substance found at a crime scene, at a waste disposal site, or dumped at the side of a road.

As used herein, "molecular profile" or "profile" of a chemical composition refers to a pattern of alterations in gene or protein expression, or

WO 01/96865

PCT/US01/19048

both, in MSCs contacted by the chemical composition compared to similar MSCs in contact only with culture medium.

As used herein, "efficacy profile" of a chemical composition refers to the existence and/or extent of an expected, characteristic and/or desired effect(s) of the chemical composition in a cell, tissue, organ, and/or organism. For example, the efficacy profile of a drug known or expected to induce bone development might include an effect such as up-regulation of a gene(s) and/or protein(s) associated with bone development.

As used herein, "database" refers to an ordered system for recording information correlating information about the toxicity, the biological effects, or both, of a chemical agent to the alterations in the pattern of gene or protein expression, or both, in MSCs contacted by a chemical composition compared to like MSCs in contact only with culture medium.

A "library," as used herein, refers to a compilation of molecular profiles of at least two chemical compositions, permitting a comparison of the alterations in gene or protein expression, or both, in MSCs contacted by a chemical composition to the profiles of such expression(s) caused by other chemical compositions.

"Array" means an ordered placement or arrangement. Most commonly, it is used herein to refer to an ordered placement of oligonucleotides (including cDNAs and genomic DNA) or of ligands placed on a chip or other surface used to capture complementary oligonucleotides (including cDNAs and genomic DNA) or substrates for the ligand. For example, since the oligonucleotide or ligand at each position in the arrangement is known, the sequence (of a nucleic acid) or a physical property (of a protein) can be determined by the position at which the nucleic acid or substrate binds to the array.

"Operably linked" means that two or more elements are connected in a way that permits an event occurring in one element (such as a reading by an optical reader) to be transmitted to and acted upon by a second element (such as a calculation by a computer concerning data from an optical reader).

B. GENERAL DESCRIPTION

The invention provides methods of assessing toxicity of chemical compositions on a genome-wide basis, in an in vitro system that closely models
5 the complex biological and cellular interactions in vivo. In one aspect, the invention is especially useful in drug development, both because of its ability to validate targets and because of its ability to rapidly identify and to quantify all the expressed genes associated with responses to a potential therapeutic agent.

The invention achieves these goals by exploiting the properties of
10 pluripotent mesenchymal stem cells (MSCs). MSCs are the formative pluripotential blast cells that are capable of differentiating into various specific types of mesenchymal or connective tissues/cells, including adipose, osseous, cartilaginous, elastic, muscular, and fibrous connective tissues. MSCs have been found and isolated from various tissues of mesodermal origin such as bone
15 marrow, blood (including peripheral blood), periosteum, dermis and muscle. Because of its pluripotency in differentiating into multiple tissue types, an isolated population of MSCs provides a much closer model to the complexity of in vivo systems than do traditional single cell or yeast assays, while still avoiding the cost and difficulties associated with the use of mice or larger mammals.

For the purpose of the present invention, MSCs possess many
20 advantages over other types of stem cells such as embryonic stem cells (ES). MSCs are relatively easy to isolate and purify from many sources. They are also relatively easy to expand in culture and to be subject to modified conditions such as drug treatments. Obtaining ES cells, on the other hand, can be very
25 complicated and tend to be labor intensive. In the case of ES cells, use of human or animal embryos may also be subject to ethical and regulatory scrutiny. Furthermore, since MSCs can be isolated from easily accessible tissues such as skin or skeletal muscle of adults, the present invention provides means to enable the development of toxicity profiles for individual patients or patient populations
30 that have unique drug sensitivities, an area that would be almost impossible to achieve if using ES cells for toxicity assay.

WO 01/96865

PCT/US01/19048

5 The MSCs used in the invention comprise a cell population, the majority of which being pluripotent cells capable of developing into different cellular lineages when cultured under appropriate conditions. It is preferred that the MSC population comprises at least 51% pluripotent cells. More preferably, the MSC population comprises at least 75% pluripotent cells. And still more preferably, the MSC population comprises at least 95% pluripotent cells.

10 In its simplest form, the method of creating a molecular profile according to the present invention involves contacting MSCs with a chemical composition of interest, and then determining the alterations in gene expression, protein expression, or both, in MSCs exposed to the chemical composition (the "test MSCs") compared to MSCs which are not exposed to the agent (the "control MSCs").

15 Furthermore, a library can be generated by compiling molecular profiles for two or more different chemical compositions, such as those having similar toxicities. The molecular profiles of these compositions can be compared with each other, either qualitatively or quantitatively, in order to discern common alterations in their gene or protein expression patterns. For example, while the overall gene or protein expression pattern for each chemical composition may be unique, the changes in expression level of certain specific genes or proteins may be similar among compositions having similar toxicities--some genes/proteins may be similarly up-regulated and therefore expressed in higher amount compared to controls; while other genes/proteins may be similarly down-regulated and therefore expressed in smaller amount compared to controls. These common molecular features of the chemical compositions can then be correlated to their toxicities and serve as surrogate markers for assessing the toxicities of a new or previously untested chemical composition, such as a drug lead in drug screening assays.

25 Thousands of compounds have undergone preclinical and clinical studies. Preclinical studies include, among other things, toxicity studies in at least two mammalian species, one of which is usually a murine species, typically mice or rats, and clinical trials always include information on any apparent toxicity. A

WO 01/96865

PCT/US01/19048

considerable amount of information is available about the toxicity of various of these compounds. Based on the toxicity information available, these compounds can be classified into particular categories of toxicities. For example, a number of chemical compositions are listed in Table 1 according to tissues or organs in

5 which they exert toxicities.

TABLE 1

DRUGS	TOXICITIES					INDICATION	TRADE NAMES
	DE v	LIVER	CV	CNS	BLOOD		
thalidomide	+					antineoplastics	
mefloquine	+					seizures	Depakene
retinoic acid	+					analgesic	
valproic acid	+	+				antibiotic	
acetaminophen		+				anti-inflammatory	Voltaire
isoniazid		+				anti-inflammatory	Duract
diclofenac (NSAIDS)		+				diabetes	Rezulin™
bromfenac (NSAIDS)		+				diabetes	Ayuda™
roglitazone		ntc				antibiotic	Trovan™
trovafloxacin		+				antibiotic	Cipro™
ciprofloxacin		ntc				antibiotic	
erythromycin estolate		+				lipid lowering	Pravachol™
pravastatin		+				lipid lowering	Lipitor™
atorvastatin		ntc				lipid lowering	Atromid
clozapine				+		antipsychotic	Clozaril
chloramphenicol				+		antibiotic	Chloramycetin
flaxacubicin			+			antineoplastics	
daunorubicin			+			antineoplastics	
cytosophosphamide			+			antineoplastics	
COMPOUNDS							
carbon tetrachloride		+					
cadmium		+					
phalloidin		+					
ethanol		+					
di-methyl formide		+					
dichloroethylene		+					
lead		+					
benzo(a)pyrene			+				
allylamine			+				
methylmercury				+			
trimethyltin				+			
carbon disulfide				+			
acrylamide				+			
hexachlorophane				+			
DMSO					not well studied		

*ntc¹ = non-toxic, limited toxicity, control

*Dev² = developmental

*CV³ = cardiovascular

*CNS⁴ = central nervous system

WO 01/96865

PCT/US01/19048

In one embodiment of the invention, compositions known for having liver toxicities are used for a systematic analysis of their molecular profiles in MSCs. In another embodiment, compositions causing toxicities to the cardiovascular system are evaluated for their molecular profiles in MSCs. In yet another embodiment of the invention, compositions causing toxicities to the neuronal system are evaluated for their molecular profiles in MSCs. Alternatively, known or potential drugs for treating a disease of choice can be used together in a systematic analysis of their toxicities. In this regard, for example, anti-cancer drugs and drug candidates can be screened for their tissue and organ toxicities.

According to one aspect of the invention, molecular profiles of chemical compositions can be correlated to toxicities these agents demonstrated in non-human animals, in humans, or in both. By then comparing the expression pattern of MSCs exposed to a new or previously untested agent to a library of such profiles of expression induced by agents of known toxicity, predictions can be made as to the likely type of toxicity of the new agent. Furthermore, the toxicity of the new agent, if any, can be ranked among the known toxic compositions, providing information for prioritization in drug development.

In addition to its utility in drug development, the invention also has uses in other arenas in which the toxicity of chemical compositions is of concern. Thus, the invention can be utilized to assess the toxicity of agricultural chemicals, such as pesticides and fertilizers. It can further be used with cosmetics. For example, it can be used to screen candidate cosmetics for toxicity prior to moving the compounds into animal studies, thereby potentially reducing the number of animals which need to be subjected to procedures such as the Draize eye irritancy test. Similarly, the methods of the invention can be applied to agents intended for use as "cosmeceuticals," wherein agents which are primarily cosmetic are also asserted to have some quasi-therapeutic property. Further, the invention can be used to assess the relative toxicity of environmental contaminants, including waste products, petrochemical residues, combustion products, and products of

industrial processes. Examples of such contaminants include dioxins, PCBs, and hydrocarbons.

In general, it is preferred that the method used to detect the levels of protein or gene expression provides at least a relative measure of the amount of protein or gene expression. More preferably, the method provides a quantitative measure of protein or gene expression to facilitate the comparison of the protein or gene expression of the MSCs exposed to the test chemical composition to that of MSCs exposed to chemical compositions of known toxicity.

10 C. PREPARING MSCs

Methods for preparing MSCs of human or other mammalian species are known in the art. For example, Caplan et al. U.S. Pat. Nos. 5,197,985 and 5,486,359 describe isolation and purification of human MSCs from bone marrow, and expansion of MSCs in tissue culture. Bone marrow is the soft tissue occupying the medullary cavities of long bones, some haversian canals, and spaces between trabeculae of cancellous or spongy bone. Bone marrow comprises hematopoietic stem cells, red and white blood cells and their precursors, mesenchymal stem cells, stromal cells and their precursors, and a group of cells including fibroblasts, reticulocytes, adipocytes, and endothelial cells which form a connective tissue network called "stroma". Bone marrow can be obtained from a number of different sources, including plugs of femoral head cancellous bone pieces, patients with degenerative joint disease during hip or knee replacement surgery, or aspirated marrow obtained from normal donors and oncology patients who have marrow harvested for future bone marrow transplantation.

While the harvested marrow can be prepared for cell culture separation by a number of different mechanical isolation processes, the critical step involved in the isolation processes is the use of a specially prepared medium described by Caplan et al. *supra*, that contains agents which allow for not only MSC growth without differentiation, but also for the direct adherence of only the MSCs to the plastic or glass surface area of the culture dish. By allowing for the selective attachment of the desired mesenchymal stem cells which are present in

the marrow samples in very minute amounts, it is possible to separate the MSCs from the other cells present in the bone marrow.

Young et al. describe isolation, purification and culture-expansion of MSCs from postnatal avian leg tissues. Young et al. (1992) J. Tiss. Cult. Method. 14:85-92; Young et al. U.S. Patent No. 5,328,695. The legs of 11-day postnatal chick embryos were removed for tissue dissection. Dissected tissues such as skin, skeletal muscle, tendons/epimysium, and periosteum/perichondrium were collected and separately pooled. Each tissue pool was filtered to generate single cell suspension. Cell cultures were maintained under optimum conditions for cellular differentiation for six days, then the single mononucleated, undifferentiated MSCs were dissociated from differentiated structures and resuspended in incomplete Eagle's Minimal Essential Media for culture expansion.

Pittenger et al. describe isolation of human mesenchymal cells from bone marrow taken from the iliac crest. Pittenger et al., (1999) Science 284:143-147. A density gradient was used to eliminate unwanted cell types present in the marrow aspirates, yielding isolated cultured mesenchymal cells comprising a single phenotypic population (95% and 98% homogeneous at passage 1 and 2, respectively).

Under proper culture medium conditions, as exemplified in the above-identified references, MSCs used in the invention can remain undifferentiated and pluripotent for an extended period of time. The lineage-specific differentiation of MSCs can be induced by various bioactive factors that are well known in the art. For example, Bruder et al. U.S. Patent No. 5,736,396 describes bioactive factors inducing differentiation of MSCs into a mesenchymal lineage such as osteogenic, chondrogenic, tendonogenic, ligamentogenic, myogenic, marrow stromagenic, adipogenic, or dermogenic lineage. It was shown that bone morphogenic proteins BMP-2 and BMP-3, bFGF and prostaglandin E1 are capable of inducing the osteogenic lineage; TGF- β proteins, collagens, retinoic acid are capable of inducing the chondrogenic lineage; IL-1 α and IL-2 are

WO 01/96865

PCT/US01/19048

capable of inducing the stromagenic lineage; and cytidine analogs are capable of inducing the myogenic lineage. Furthermore, Young et al., U.S. Patent No. 5,827,735, describes directed differentiation of MSCs into either fibroblast cells when contacted with muscle morphogenic protein (MMP); or branched multinucleated myogenic cells when contacted with both MMP and scar inhibitory factor (SIF). Pittenger, U.S. Patent No. 5,827,740, describes factors and conditions capable of causing adipogenic differentiation of human MSCs. Pittenger et al. (1999) *Science* 284:144-147, also characterizes adipogenic, chondrogenic and osteogenic differentiation of MSCs.

MSCs used in the present invention can be identified by their distinct properties as known in the art and described in references cited herein. For example, homogenous MSCs isolated from bone marrow can be identified by their unique adherence to glass or plastic surface of culture dish under defined culturing conditions. Caplan et al. U.S. Patent No. 5,486,359. The MSCs isolated according to Young et al., U.S. Patent No. 5,827,735, can be identified by morphology as predominantly mononucleated, stellate-shaped cells.

Alternatively, the MSCs used in the present invention can be identified by the detection of specific markers such as through the use of antibodies specific to a population of MSCs at a defined stage. For example, Caplan et al., *supra*, describes monoclonal antibodies SH2, SH3 and SH4 that specifically recognize the MSCs isolated from bone marrow. MSCs that have undergone lineage-specific differentiation can also be identified by specific cell-surface markers. For example, differentiated MSCs were found to display cell surface differentiation markers CD10, CD13, CD56 and MHC class-I. Young et al. (1999) *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 221:63-71.

If necessary, MSCs obtained and cultured for use in the present invention may be isolated from the culture based on their physical or chemical properties (such as size, mass, density, specific antigen or gene expression), using methods known in the art (such as flow cytometry, cell sorting, filtration or centrifugation).

WO 01/96865

PCT/US01/19048

5 The MSCs used to test the chemical composition can be of any vertebrate species. The choice of the particular species from which the MSCs are derived will typically reflect a balance of several factors. First, depending on the purpose of the study, one or more species may be of particular interest. For example, human MSCs will be of particular interest for use with compositions being tested as potential human therapeutics, while equine, feline, bovine, porcine, caprine, canine, or sheep MSCs may be of more interest for a potential veterinary therapeutic.

10 Second, even with respect to testing of human therapeutics, cost and handling considerations may dictate that some or all testing be performed with non-human, and even non-primate MSCs. For some testing, it may be desirable to use MSCs from mice, rats, guinea pigs, rabbits, and other readily available, and less expensive, laboratory animals.

15 Third, it will often be of value to select a species as to which considerable information is available on the toxicity of chemical compositions, so that observed changes in gene and protein expression can be correlated to various types of toxicity. For this reason, mice and rats are preferred embodiments. Most pre-clinical testing is performed on at least one murine species, and there therefore exists a large body of information on the toxicity of various compounds on various tissues of mice and on rats. Using MSCs derived from mice or rats permits the correlation of the alterations in gene or protein expression in the MSCs with the toxicities exhibited by these agents in those species. MSCs of other species commonly used in preclinical testing, such as guinea pigs, rabbits, pigs, and dogs, are also preferred for the same reason. Typically, MSCs of these species will be used for "first pass" screening, or where detailed information on toxicity in humans is not needed, or where a result in a murine or other one of these laboratory species has been correlated to a known toxicity or other effect in humans.

20
25
30 Fourth, although primates are not as widely used in preclinical testing and are often more expensive to purchase and to maintain than other laboratory animals, their biochemistry and developmental biology is considerably

WO 01/96865

PCT/US01/19048

5
closer to that of humans than those of the more common laboratory animals. MSCs derived from primates is therefore preferred for toxicity testing where the study is sufficiently important to justify the additional cost and handling considerations. Most preferred are human MSCs, since conclusions about the toxicity of agents in these MSCs can be considered the most directly relevant to the effect of a chemical composition on humans. It is anticipated that studies in primate or human MSCs will be performed to confirm results of toxicity studies in MSCs of other species.

10
Fifth, with respect to human therapeutics, regulatory agencies generally require animal data before human trials can begin; it will generally be desirable to use MSCs of species which will be used in the preclinical animal studies. The results of toxicity testing in the MSCs can then guide the researcher on the degree and type of toxicity to anticipate during the animal trials. Certain animal species are known in the art to be better models of human toxicity of different types than are others, and species also differ in their ability to metabolize drugs. See, e.g., Williams, *Environ Health Perspect.* 22:133-138 (1978); Duncan, *Adv Sci* 23:537-541 (1967). Thus, the particular species preferred for use in a particular preclinical toxicity study may vary according to the intended use of the drug candidate. For example, a species which provides a suitable model for a drug intended to affect the reproductive system may not be as suitable a model for a drug intended to affect the nervous system. Criteria for selecting appropriate species for preclinical testing are well known in the art.

15
20
25
While MSCs from different species can be used in the methods of the invention, in general, mammalian cells are preferred. In the discussions below, it is assumed that in any given comparison of control and test MSCs, the MSCs used as controls and those used to test the effects of the chemical compositions are derived from the same species.

D. CONTACTING MSCs WITH CHEMICAL COMPOSITIONS**1. General**

Once a MSC culture has been initiated, it can be contacted with a chemical composition. Conveniently, the chemical composition is in an aqueous solution and is introduced to the culture medium. The introduction can be by any convenient means, but will usually be by means of a pipette, a micropipettor, or a syringe. In some applications, such as high throughput screening, the chemical compositions will be introduced by automated means, such as automated pipetting systems, which may be on robotic arms. Chemical compositions can also be introduced into the medium as in powder or solid forms, with or without pharmaceutical excipients, binders, and other materials commonly used in pharmaceutical compositions, or with other carriers which might be employed in the intended use. For example, chemical compositions intended for use as agricultural chemicals or as petrochemical agents can be introduced into the medium by themselves to test the toxicity of those chemicals or agents, or introduced in combination with other materials with which they might be used or which might be found in the environment, to determine if the combination of the chemicals or agents has a synergistic effect. Typically, the cultures will be shaken at least briefly after introduction of a chemical composition to ensure the composition is dispersed throughout the medium.

2. Timing of contacting

The time at which a chemical composition is added to the culture is within the discretion of the practitioner and will vary with the particular study objective. Conveniently, the chemical composition will be added as soon as the MSCs are cultured, permitting the determination of the alteration in protein or gene expression on the development of all the tissues of the MSCs. It may be of interest, however, to focus the study on the effect of the composition on a particular tissue type. As previously noted, individual differentiated tissues, such as muscle, bone, and connective tissues, are known to develop in the presence of specific inducing factors, and can be identified by specific cell markers. Such

WO 01/96865

PCT/US01/19048

factors and markers are known in the art, and examples are provided above and in the references cited. Addition of the chemical composition can therefore be staged to occur at various time points and/or stages in the differentiation, growth and/or development of the MSCs. In one embodiment, the chemical composition is contacted with MSCs maintained in undifferentiated form. In another embodiment, addition of the chemical composition is staged to occur at the time the tissue of interest commences developing. In yet another embodiment, the addition of the chemical composition is staged to occur at a chosen time point after commencement of that development, in order to observe the effect on altering gene or protein expression in the tissue of interest.

3. Dosing of the chemical composition

Different amounts of a chemical composition will be used to contact MSCs depending on the amount of information known about the cytotoxicity of that composition, the purposes of the study, the time available, and the resources of the practitioner. A chemical composition can be administered at just one concentration, particularly where other studies or past work or field experience with the compound have indicated that a particular concentration is the one which is most commonly found in the body. More commonly, the chemical composition will be added in different concentrations to cultures of MSCs run in parallel, so that the effects of the concentration differences on gene or protein expression and, hence, the differences in toxicity of the composition at different concentrations, can be assessed. Typically, for example, the chemical composition will be added at a normal or medium concentration, and bracketed by twofold or fivefold increases and decreases in concentration, depending on the degree of precision desired.

Where the composition is one of unknown cytotoxicity, a preliminary study is conveniently first performed to determine the concentration ranges at which the composition will be tested. A variety of procedures for determining concentration dosages are known in the art. One common procedure, for example, is to determine the dosage at which the agent is directly cytotoxic. The practitioner then reduces the dose by one half and performs a dosing study,

typically by administering the agent of interest at fivefold or twofold dilutions of concentration to parallel cultures of cells of the type of interest. For environmental contaminants, the composition will usually also be tested at the concentration at which it is found in the environment. For agricultural chemicals, such as pesticides which leave residues on foodstuffs, the agent will usually be tested at the concentration at which the residue is found, although it will likely be tested at other concentrations as well.

In one embodiment, the toxicity profile(s) (e.g., molecular profile) of a chemical composition in MSCs is correlated with the concentration(s) at which the chemical composition is contacted with the MSCs. Such a correlation can provide useful indication of the concentration(s) of the chemical composition that causes acceptable or unacceptable extents of cytotoxicity. In another embodiment, the efficacy profile(s) of a chemical composition in MSCs is correlated with the concentration(s) at which the chemical composition is contacted with the MSCs. Such a correlation can provide useful indication of the concentration(s) of the chemical composition sufficient to cause an acceptable and/or desirable degree of efficacy of the composition. In yet another embodiment, the toxicity profile-concentration correlation and the efficacy profile-concentration correlation are used in an index that provides a measurement of the desirability and/or usefulness of the chemical composition. For example, a highly desirable chemical composition would be one that has an index that is a function of high concentration for causing an unacceptable level of MSC toxicity and low concentration for obtaining a desirable and/or useful level of efficacy.

E. DETECTING ALTERATIONS IN LEVELS OF GENE OR PROTEIN EXPRESSION

1. Detecting Protein Expression Alterations

Protein expression can be detected by a number of methods known in the art. For example, the proteins in a sample can be separated by sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis ("SDS-PAGE") and visualized with a stain such as Coomassie blue or a silver stain. Radioactive

WO 01/96865

PCT/US01/19048

labels can be detected by placing a sheet of X-ray film over the gel. Proteins can also be separated on the basis of their isoelectric point via isoelectric focusing, and visualized by staining. Further, SDS-PAGE can be performed in combination with isoelectric focusing (usually performed in perpendicular directions) to provide two-dimensional separation of the proteins in a sample. Proteins can further be separated by such techniques as high pressure liquid chromatography, HPLC, thin layer chromatography, affinity chromatography, gel-filtration chromatography, ion exchange chromatography, surface enhanced laser desorption/ionization ("SELDI"), matrix-assisted laser desorption/ionization ("MALDI"), and, if the sedimentation rates are sufficiently different, density gradient centrifugation. Detecting alterations in levels of protein expression using these techniques can be accomplished, for example, by running in parallel samples from MSCs contacted with a chemical composition whose effect is of interest ("test samples") and samples from MSCs cultured under identical conditions except for the presence of the chemical composition of interest ("control samples"), and noting any differences in the proteins detected and the amount of the proteins detected.

Immunodetection provides a group of useful techniques for detecting alterations in protein expression. In these techniques, antibodies are typically raised against the protein by injecting the protein into mice or rabbits following standard protocols, such as those taught in Harlow and Lane, *Antibodies, A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1988). The antibodies so raised can then be used to detect the presence of and quantitate the protein in a variety of immunological assays known in the art, such as ELISAs, fluorescent immunoassays, Western and dot blots, immunoprecipitations, and focal immunoassays. Alterations in protein expression can be determined by running parallel tests on test and control samples and noting any differences in results between the samples. Results of ELISAs, for example, can be directly related to the amount of protein present.

Tagging provides another way to detect and determine changes in protein expression. For example, the gene encoding the protein can be engineered

WO 01/96865

PCT/US01/19048

to produce a hybrid protein containing a detectable tag, so that the protein can be specifically detected by detection of the tag. Systems are available which permit the direct imaging and quantitation of radioactive labels in, for example, gels on which the proteins have been separated. Differences in expression can be
5 determined by observing differences in the amount of the tag present in test and control samples.

Proteins can also be analyzed by standard protein chemistry techniques. For example, proteins can be analyzed by performing proteolytic digests with trypsin, Staphylococcus B protease, chymotrypsin, or other
10 proteolytic enzymes. Differences in expression can be determined by comparing relative amounts of the digested products.

One particularly preferred method for determining differences in protein expression is mass spectroscopy, or "MS," which provides the broadest profile of the broadest number of proteins for the least effort. Moreover, MS
15 permits not only accurate detection of proteins present in a sample, but also quantitation. The procedure can be used either by itself, or in combination with one or more of the preceding methods based on selective physical properties to partition the proteins present in a sample. Partitioning reduces the number of
20 proteins of different physical properties in the sample and results in a better MS analysis by permitting a comparison of proteins of similar size, electrostatic charge, affinity for metal ions, or the like. Thus, for example, the proteins in a sample can be subjected to SDS-PAGE and isoelectric focusing, and a resulting spot of interest on the gel can then be subjected to MS. In Example 2, below, an
25 initial partitioning performed using a sizing column and a second partitioning performed using SELDI are illustrated. It should be noted that, in the protocol described in Example 2, analysis of proteins with molecular weights smaller than 30 kD is exemplified. Alternatively, of course, the higher weight proteins could
30 be analyzed in the methods of the invention, and the proteins do not need to be fractionated if the practitioner is prepared to analyze all the proteins in a sample or, for example, if a preliminary analysis shows that the total number of different proteins in a sample is small enough to be analyzed without partitioning.

Computers attached to the mass spectrometer can also be used to analyze the samples to facilitate determination of whether a change in protein expression may be indicative of a particular toxicity. For example, the readout from the MS can be used in a "subtractive calculation" in which the protein expression in control MSCs is quantitated and then subtracted from the quantitated protein expression of MSCs contacted with a chemical composition, with only the proteins expressed in greater or lesser quantities than those expressed by the control MSCs being shown. This method immediately focuses attention on differences in protein expression between a control and a test population. Examples of such comparisons are shown in Figures 1B and 1C and discussed in detail below.

2. Detecting Gene Expression Alterations

A number of methods are known in the art for detecting and comparing levels of gene expression.

One standard method for such comparisons is the Northern blot. In this technique, RNA is extracted from the sample and loaded onto any of a variety of gels suitable for RNA analysis, which are then run to separate the RNA by size, according to standard methods (*see, e.g.,* Sambrook, J., *et al.*, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (2nd ed. 1989)). The gels are then blotted (as described in Sambrook, *supra*), and hybridized to probes for RNAs of interest. The probes can be radioactive or non-radioactive, depending on the practitioner's preference for detection systems. For example, hybridization with the probe can be observed and analyzed by chemiluminescent detection of the bound probes using the "Genius System," (Boehringer Mannheim Corporation, Indianapolis, IN), following the manufacturer's directions. Equal loading of the RNA in the lanes can be judged, for example, by ethidium bromide staining of the ribosomal RNA bands. Alternatively, the probes can be radiolabeled and detected autoradiographically using photographic film.

The RNA can also be amplified by any of a variety of methods and then detected. For example, Marshall, U.S. Patent No. 5,686,272, discloses the

amplification of RNA sequences using ligase chain reaction, or "LCR." LCR has been extensively described by Landegren *et al.*, *Science*, 241:1077-1080 (1988); Wu *et al.*, *Genomics*, 4:560-569 (1989); Barany, in *PCR Methods and Applications*, 1:5-16 (1991); and Barany, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:189-193 (1991). Or, the RNA can be reverse transcribed into DNA and then amplified by LCR, polymerase chain reaction ("PCR"), or other methods. An exemplar protocol for conducting reverse transcription of RNA is taught in U.S. Patent No. 5,705,365. Selection of appropriate primers and PCR protocols are taught, for example, in Innis, M., *et al.*, eds., *PCR Protocols 1990* (Academic Press, San Diego CA) (hereafter "Innis *et al.*"). Differential expression of messenger RNA can also be compared by reverse transcribing mRNA into cDNA, which is then cleaved by restriction enzymes and electrophoretically separated to permit comparison of the cDNA fragments, as taught in Belyavsky, U.S. Patent No. 5,814,445.

Typically, primers are labeled at the 5' terminus with biotin or with any of a number of fluorescent dyes. Probes are usually labeled with an enzyme, such as horseradish peroxidase (HRP) and alkaline phosphatase (*see*, Lovenson and Chang, *Nonisotopically Labeled Probes and Primers in Innis, et al. supra*), but can also be labeled with, for example, biotin-psoralen. Detailed exemplar protocols for labeling primers and for synthesizing enzyme-labeled probes are taught by Lovenson and Chang, *supra*. Or, the probes can also be labeled with radioactive isotopes. An exemplar protocol for synthesizing radioactively labeled DNA and RNA probes is set forth in Sambrook *et al.*, *supra*. Usually, ³²P is used for labeling DNA and RNA probes. A number of methods for detection of PCR products are known. *See, e.g.*, Innis, *supra*, which sets forth a detailed protocol for detecting PCR products using non-isotopically labeled probes. Generally, there is a step permitting hybridization of the probe and the PCR product, following which there are one or more development steps to permit detection.

For example, if a biotinylated psoralen probe is used, the hybridized probe is incubated with streptavidin HRP conjugate and then incubated with a chromogen, such as tetramethylbenzidine (TMB). Alternatively, if the

WO 01/96865

PCT/US01/19048

practitioner has chosen to employ a radioactively labeled probe, PCR products to which the probe has hybridized can be detected by autoradiography. As another example, biotinylated dUTP (Bethesda Research Laboratories, MD) can be used during amplification. The labeled PCR products can then be run on an agarose gel, Southern transferred to a nylon filter, and detected by, for example, a streptavidin/alkaline phosphatase detection system. A protocol for detecting incorporated biotinylated dUTP is set forth, *e.g.*, in Lo *et al.*, Incorporation of Biotinylated dUTP, in Innis *et al.*, *supra*. Finally, the PCR products can be run on agarose gels and nucleic acids detected by a dye, such as ethidium bromide, which specifically recognizes nucleic acids.

Sutcliffe, U.S. Patent 5,807,680, teaches a method for the simultaneous identification of differentially expressed mRNAs and measurement of relative concentrations. The technique, which comprises the formation of cDNA using anchor primers followed by PCR, allows the visualization of nearly every mRNA expressed by a tissue as a distinct band on a gel whose intensity corresponds roughly to the concentration of the mRNA.

Another group of techniques employs analysis of relative transcript expression levels. Four such approaches have recently been developed to permit comprehensive, high throughput analysis. First, cDNA can be reverse transcribed from the RNAs in the samples (as described in the references above), and subjected to single pass sequencing of the 5' and 3' ends to define expressed sequence tags for the genes expressed in the test and control samples. Enumerating the relative representation of the tags from the different samples provides an approximation of the relative representation of the gene transcript within the samples.

Second, a variation on ESTs has been developed, known as serial analysis of gene expression, or "SAGE," which allows the quantitative and simultaneous analysis of a large number of transcripts. The technique employs the isolation of short diagnostic sequence tags and sequencing to reveal patterns of gene expression characteristic of a target function, and has been used to compare expression levels, for example, of thousands of genes in normal and in tumor

WO 01/96865

PCT/US01/19048

cells. See, e.g., Velculescu, *et al.*, *Science* 270:368-369 (1995); Zhang, *et al.*, *Science* 276:1268-1272 (1997).

5 Third, approaches have been developed based on differential display. In these approaches, fragments defined by specific sequence delimiters can be used as unique identifiers of genes, when coupled with information about
10 fragment length within the expressed gene. The relative representation of an expressed gene within a cell can then be estimated by the relative representation of the fragment associated with that gene. Examples of some of the several approaches developed to exploit this idea are the restriction enzyme analysis of differentially-expressed sequences ("READS") employed by Gene Logic, Inc., and total gene expression analysis ("TOGA") used by Digital Gene Technologies, Inc. CLONTECH, Inc. (Palo Alto, CA), for example, sells the Delta™
Differential Display Kit for identification of differentially expressed genes by PCR.

15 Fourth, in preferred embodiments, the detection is performed by one of a number of techniques for hybridization analysis. In these approaches, RNA from the sample of interest is usually subjected to reverse transcription to obtain labeled cDNA. The cDNA is then hybridized, typically to oligonucleotides or cDNAs of known sequence arrayed on a chip or other surface in a known order.
20 The location of the oligonucleotide to which the labeled cDNA hybridizes provides sequence information on the cDNA, while the amount of labeled hybridized RNA or cDNA provides an estimate of the relative representation of the RNA or cDNA of interest. Further, the technique permits simultaneous hybridization with two or more different detectable labels. The hybridization
25 results then provide a direct comparison of the relative expression of the samples.

A number of kits are commercially available for hybridization analysis. These kits allow identification of specific RNA or cDNAs on high density formats, including filters, microscope slides, microchips, and technologies relying on mass spectrometry. For example, Affymetrix, Inc. (Santa Clara, CA),
30 markets GeneChip™ Probe arrays containing thousands of different

WO 01/96865

PCT/US01/19048

oligonucleotide probes with known sequences, lengths, and locations within the array for high accuracy sequencing of genes of interest. CLONTECH, Inc.'s (Palo Alto, CA) Atlas™ cDNA Expression Array permits monitoring of the expression patterns of 588 selected genes. Hyseq, Inc.'s (Sunnyvale, CA) Gene Discovery Module permits high throughput screening of RNA without previous sequence information at a resolution of 1 mRNA copy per cell. Incyte Pharmaceuticals, Inc. (Palo Alto, CA) offers microarrays containing, for example, ordered oligonucleotides of human cancer and signal transduction genes. Techniques used by other companies in the field are discussed in, e.g., Service, R., Science 282:396-399 (1998).

3. Labels

Both proteins and genes can be labeled to detect the alteration in levels of expression in the methods of the invention. The term "label" refers to a composition detectable by spectroscopic, photochemical, biochemical, immunochemical, or chemical means. For example, useful nucleic acid and protein labels include ³²P, ³⁵S, fluorescent dyes, electron-dense reagents, enzymes (e.g., as commonly used in an ELISA), biotin, digoxigenin, or haptens and proteins for which antisera or monoclonal antibodies are available.

A wide variety of labels and conjugation techniques are known and are reported extensively in both the scientific and patent literature, and are generally applicable to the present invention for the labeling of nucleic acids, amplified nucleic acids, and proteins. Suitable labels include radionucleotides, enzymes, substrates, cofactors, inhibitors, fluorescent moieties, chemiluminescent moieties, magnetic particles, and the like. Labeling agents optionally include, e.g., monoclonal antibodies, polyclonal antibodies, proteins, or other polymers such as affinity matrices, carbohydrates or lipids. Detection of labeled nucleic acids or proteins may proceed by any of a number of methods, including immunoblotting, tracking of radioactive or bioluminescent markers, Southern blotting, Northern blotting, or other methods which track a molecule based upon

WO 01/96865

PCT/US01/19048

size, charge or affinity. The particular label or detectable moiety used and the particular assay are not critical aspects of the invention.

The detectable moiety can be any material having a detectable physical or chemical property. Such detectable labels have been well developed in the field of gels, columns, and solid substrates, and in general, labels useful in such methods can be applied to the present invention. Thus, a label is any composition detectable by spectroscopic, photochemical, biochemical, immunochemical, electrical, optical or chemical means. Useful labels in the present invention include fluorescent dyes (e.g., fluorescein isothiocyanate, Texas red, rhodamine, and the like), radiolabels (e.g., ^3H , ^{125}I , ^{32}S , ^{14}C , or ^{32}P), enzymes (e.g., LacZ, CAT, horse radish peroxidase, alkaline phosphatase and others, commonly used as detectable enzymes, either as marker gene products or in an ELISA), nucleic acid intercalators (e.g., ethidium bromide) and colorimetric labels such as colloidal gold or colored glass or plastic (e.g. polystyrens, polypropylene, latex, etc.) beads, as well as electronic transponders (e.g., U.S. Patent 5,736,332).

It will be recognized that fluorescent labels are not to be limited to single species organic molecules, but include inorganic molecules, multi-molecular mixtures of organic and/or inorganic molecules, crystals, heteropolymers, and the like. Thus, for example, CdSe-CdS core-shell nanocrystals enclosed in a silica shell can be easily derivatized for coupling to a biological molecule. Bruchez *et al.* (1998) *Science* 281: 2013-2016. Similarly, highly fluorescent quantum dots (zinc sulfide-capped cadmium selenide) have been covalently coupled to biomolecules for use in ultrasensitive biological detection. Warren and Nie (1998) *Science* 281: 2016-2018.

The label is coupled directly or indirectly to the desired nucleic acid or protein according to methods well known in the art. As indicated above, a wide variety of labels may be used, with the choice of label depending on the sensitivity required, ease of conjugation of the compound, stability requirements, available instrumentation, and disposal provisions. Non-radioactive labels are often attached by indirect means. Generally a ligand molecule (e.g., biotin) is

WO 01/96865

PCT/US01/19048

covalently bound to a polymer. The ligand then binds to an anti-ligand (*e.g.*, streptavidin) molecule which is either inherently detectable or covalently bound to a signal system, such as a detectable enzyme, a fluorescent compound, or a chemiluminescent compound. A number of ligands and anti-ligands can be used.

5 Where a ligand has a natural anti-ligand, for example, biotin, thyroxine, and cortisol, it can be used in conjunction with labeled anti-ligands. Alternatively, any haptenic or antigenic compound can be used in combination with an antibody.

Labels can also be conjugated directly to signal generating compounds, *e.g.*, by conjugation with an enzyme or fluorophore. Enzymes of interest as labels will primarily be hydrolases, particularly phosphatases, esterases
10 and glycosidases, or oxidoreductases, particularly peroxidases. Fluorescent compounds include fluorescein and its derivatives, rhodamine and its derivatives, dansyl, umbelliferone, fluorescent green protein, and the like. Chemiluminescent compounds include luciferin, and 2,3-dihydrophthalazinediones, *e.g.*, luminol.

15 Means of detecting labels are well known to those of skill in the art. Thus, for example, where the label is a radioactive label, means for detection include a scintillation counter, proximity counter (microtiter plates with scintillation fluid built in), or photographic film as in autoradiography. Where the label is a fluorescent label, it may be detected by exciting the fluorochrome
20 with the appropriate wavelength of light and detecting the resulting fluorescence, *e.g.*, by microscopy, visual inspection, via photographic film, by the use of electronic detectors such as charge coupled devices (CCDS) or photomultipliers and the like. Similarly, enzymatic labels may be detected by providing appropriate substrates for the enzyme and detecting the resulting reaction product.
25 Finally, simple colorimetric labels are often detected simply by observing the color associated with the label. Thus, in various dipstick assays, conjugated gold often appears pink, while various conjugated beads appear the color of the bead.

F. CORRELATING MOLECULAR PROFILES WITH TOXICITIES

30 The invention contemplates multiple iterations of compiling a library of molecular profiles by contacting test MSCs with an ever-widening

WO 01/96865

PCT/US01/19048

group of chemical compositions having predetermined toxicities. The toxicities and biological effects of many chemical compositions are already known through previous animal or clinical testing. Any such information is carefully noted along with the alterations of gene or protein expression in MSCs. As the data from tests on a number of chemical compositions, or agents, is gathered, it is assembled to form a library. Separate libraries can be maintained for each type of toxicity; preferably, a single database can be maintained recording the results of all the tests conducted and any available toxicity information on the agents to which the MSCs were exposed. Preferably, biological effects are also noted. Past experience has indicated that biological effects often become associated with, or markers for, particular toxicities as the biology of the toxicity becomes better understood.

In one group of embodiments, libraries are compiled comprising molecular profiles of one or more types of MSCs, which may include one or more of those listed in Table 2, contacted with one or more chemical compositions with predetermined toxicities, which may include one or more of those listed in Table 1.

TABLE 2 -- Examples of types of MSCs

Species	Source	Isolation method
Human	Plugs of cancellous bone marrow	Caplan, U.S. Patents 5,486,359 & 5,197,985
Human	Iliac aspirate bone marrow	Caplan, U.S. Patents 5,486,359 & 5,197,985
Chicken	Embryonic day 11 leg muscle and associated soft tissues	Young et al., U.S. Patent 5,827,735
Human	Iliac crest bone marrow	Pittenger et al., Science (1999), 284:143-147

20

WO 01/96865

PCT/US01/19048

The invention contemplates that each iteration of contacting test MSCs with a chemical composition will generate a pattern of gene or protein expression, or both, characteristic for that chemical composition and/or MSC type. The determination of the alteration in gene or protein expression of a reasonably large number of chemical compounds of similar toxicity is desirable so that patterns of gene or protein expression, or both, associated with that toxicity can be determined. Changes in gene or protein expression patterns in MSC cells that are common to classes of drugs that have similar toxicities will serve as surrogate molecular profiles useful for recognizing compounds that are likely to have related biology and toxicities. It is the correlation of these alterations in gene or protein expression and toxicities that gives the invention its predictive power with respect to previously untested compounds.

The correlation of patterns of gene or protein expression with toxicities can be performed by any convenient means. For example, visual comparisons of patterns can be performed to determine patterns associated with different types of toxicities. More conveniently, the correlation can be done by computer, using one of the statistical programs discussed in the following section. Preferably, the correlation is performed by a computer using non-parametric statistical methods or neural network programs, since neural network programs are specifically designed for pattern recognition. Once a correlation of expression markers which are biomarkers for a particular toxicity has been made, a comparison can be made, again conveniently by computer, of known patterns to the pattern of gene or protein expression induced by a new or unknown chemical composition to provide the closest matches of expression. The patterns can then be reviewed to predict the likely toxicity of the new or unknown chemical.

G. TYPING AND RANKING TOXICITIES OF TEST CHEMICAL COMPOSITIONS

A molecular profile of a test chemical composition can be established by detecting the alterations in gene or protein expression in MSCs contacted by the test chemical composition as described in the previous sections.

WO 01/96865

PCT/US01/19048

Once the molecular profile of the test composition is determined, it can be compared to that of a chemical composition with predetermined toxicities or, preferably, to a library of molecular profiles of chemical compositions with predetermined toxicities. The outcome of such comparison provides information for one to predict the likelihood of whether the test composition is toxic, what type of toxicities, and how toxic it would be as compared to the other known toxic compositions.

For the purpose of practicing the invention, the predictions of toxicity of the test composition based on its molecular profiles in MSC cells does not have to be 100% accurate. To have a major positive impact on the efficiency and costs of drug development, one only has to modestly increase the probability that the less toxic and thus more successful drug candidates are, for example, on the top half of a prioritized list of new drug leads.

As noted in previous sections, alterations in gene or protein expression in MSCs exposed to a chemical composition can be detected by any of a number of means known in the art. Protein expression determined by MS is particularly convenient for such comparisons since the output data is typically fed directly into a computer connected to the mass spectrometer and is immediately available for a variety of calculations. If the alterations are susceptible to graphical representation, as when MS is used as the means of detection, a direct comparison can be made of the effect of the chemical composition on the expression of proteins compared to the control MSCs. If the alterations are detected by, for example, an ELISA, which produces a numerical readout, then the numerical readouts can be used to quantitate the expression of the protein. For gene expression, Northern blots can be correlated to the amount of RNA present for each RNA probed. Where gene expression is detected by hybridization arrays, the pattern of hybridization for nucleic acids from the test and control MSCs provides a basis for comparison.

The comparison of molecular profiles can be done by a number of means known in the art. Usually, the graphs resulting from the calculations can be stored, for example, in file folders or the like, and examined visually to discern

WO 01/96865

PCT/US01/19048

common patterns of expression compared to the control, as well as differences. Conveniently, however, the data can be stored on and compared by a computer. Programs are available, for example, to compare mass spectrometry data. One form of comparison is based on the use of "subtractive calculation" and graphical representation to compare protein expression in the control MSCs ("control samples") against that of the MSCs contacted with test chemical composition(s) ("test samples"). In this type of comparison, the amount of each protein expressed by the control samples is subtracted from the amount expressed by the test samples. The control sample value is represented by a horizontal line, and any protein expressed in a different amount is represented as a line above or below the line (representing positive and negative amounts compared to the control, respectively), with the height of the line designating the amount by which the expression of the test sample is different from that of the control. This method focuses attention on the differences in protein expression. In a like manner, the program can also be used to compare the expression of two or more test samples so that any differences in expression patterns can be readily discerned. It is expected that the more similar the pattern of expression, the more similar will be the effect, and the type of toxicity, of the two agents.

This form of comparison is further illustrated in Figure 1, which is provided solely for clarity of discussion. Figure 1 illustrates differences in nuclear proteins expressed by the MSCs. The top panel, panel 1A, is a half-tone reproduction of the readout from a mass spectrometer. Viewing the sheet from along the long axis, the top band would be the mass spectrum for the control, the MSCs grown in the absence of test chemical compositions, the middle band would be the spectrum for the MSCs grown in the presence of an added test chemical compound (test composition I), and the bottom band of Figure 1A would be the mass spectrum of nuclear proteins expressed by MSCs exposed to a second test chemical compound (test composition II).

Figures 1B and 1C graphically illustrate differences in protein expression level between MSCs contacted with one of the test chemical compositions ("test MSCs") and control MSCs grown in standard tissue growth

WO 01/96865

PCT/US01/19048

medium without added chemical compositions. These panels illustrate computational subtractions of identical proteins between the respective test MSCs and the control MSCs to indicate only those proteins which are significantly different in expression between the test and the control MSCs. Each bar represents a single protein and the length of the bar represents the amount of protein expressed by the MSCs exposed to the test composition compared to the amount expressed by the control MSCs. A bar above the center line indicates that the test MSCs express more of that protein than do the control MSCs; a bar below the line indicates that the test MSCs express less of that protein.

Figure 1B illustrates differences in the nuclear proteins expressed by MSCs grown in the presence of test composition I compared to control MSCs. Figure 1C illustrates the differences in the nuclear proteins expressed by the MSCs grown in the presence of test composition II, and the control. (Both the test and the control MSCs would be at the same time point of differentiation/development/growth.) In these illustrative figures, reading Figures 1B and 1C from the left, the first bar encountered is above the line at the same position for both Figures, but the height of the bar is much greater in Figure 1C. This indicates that both groups of test MSCs express more of this protein than do the control, but that the cells contacted with test composition II express considerably more than do cells contacted with test composition I.

Continuing along the X, or molecular weight, axis of Figure 1C, the next four bars encountered are shown to have a counterpart in Figure 1B. Moreover, in each of the figures, the bars representing the same three proteins are below the line, whereas the bar for the same fourth protein is above the line. Once again, the height of the lines differs between Figures 1C and 1B. Thus, in this illustration, for the first 5 nuclear proteins detected, the MSCs contacted with test chemical compositions I and II are shown to display the same pattern of protein expression, but at different levels of expression. Each of these proteins, and the overall expression pattern, would be a candidate for inclusion in a profile indicating that an unknown chemical composition, such as a new potential therapeutic, had the tissue toxicity of the test composition(s). Conversely, the first

WO 01/96865

PCT/US01/19048

protein detected as illustrated in Figure 1C to the right of the 4000 Daltons molecular weight line is shown as not having a counterpart (or at least a counterpart in terms of being expressed at a level different from that of the control cells) in Figure 1B. This protein would not be considered a protein that demonstrated a common pathway of tissue/organ toxicity of the test chemical composition(s). Depending on its correlation with expression pathways of other toxins against the same tissue/organ, it might, however, be associated with toxicity towards the same tissue/organ exhibited by the test chemical compositions. Similar analyses can be made for the other proteins illustrated on the two graphs.

Another form of comparison is illustrated in Figures 2, 3, and 4, which are provided solely for clarity of discussion. These figures graphically depict the small nuclear, small cytoplasmic, and large cytoplasmic proteins expressed by control samples and by test samples exposed to one of two chemical compositions, as well as the amount of the protein expressed by the samples. These graphs can be compared visually, and the proteins and the amounts expressed recorded manually. Figure 2 compares the expression of small nuclear proteins in the three MSC groups described above. In these graphs, each bar in a panel represents a single protein, but the length of the bar represents the relative amount of protein expressed, rather than a comparison of the amount expressed compared to the control MSCs. In Figure 2, the top panel, 2A, graphs the level of protein expression, as determined by mass spectroscopy, in the MSCs not exposed to chemical compositions in addition to those in a standard tissue culture medium. The middle panel, 2B, illustrates the level of expression of proteins of MSCs exposed to test composition I. And the bottom panel, 2C, illustrates the level of expression of MSCs contacted with test composition II. In these panels, the expression level of the protein, shown plotted on the Y axis as a relative value, is plotted against the molecular weight, shown plotted on the X axis. A visual comparison of the panels as illustrated reveals that some of the proteins expressed by the MSCs exposed to the two chemical compositions tested are the same, although perhaps at different levels of expression, and that others are different,

WO 01/96865

PCT/US01/19048

and that both reveal a different pattern of expression than do the control MSCs not exposed to either composition.

Figure 3 illustrates the level of expression of small cytoplasmic proteins in the same three groups of MSCs as those discussed in the preceding paragraph. The panels are arranged in the same order as in Figure 2. Once again, the expression level of the protein for each group, shown plotted on the Y axis, is plotted against the molecular weight of the proteins, shown plotted on the X axis. Once again, a visual comparison of the panels as illustrated reveals that some of the proteins expressed by the MSCs exposed to the two chemical compositions tested are the same, although perhaps at different levels of expression, and that others are different.

Similarly, Figure 4 illustrates a graphical analysis of the large cytoplasmic proteins expressed by the same groups of MSCs discussed above. Once again, the level of expression determined by the mass spectrometry is plotted on the Y axis, while the molecular weight is plotted on the X axis. Once again, clear similarities, and clear differences, can be observed between the protein expression patterns of the MSCs exposed to the test chemical compositions, and between those protein expression patterns and that of the MSCs grown without exposure to either of the test chemical compositions.

It would be clear from figures such as the above that the drugs can induce complex and unique protein expression patterns. Some proteins would be expressed in smaller amounts (or "down regulated") compared to the protein expression in the control MSCs, and others would be expressed in higher amounts (or "up regulated") compared to the controls. Additionally, the chemical compositions may affect some of the same proteins and thus share common sub-patterns.

For example, as illustrated in Figure 2C, to the right of the line denoting a molecular weight of 2500 Daltons, there is shown a tall line, over 15 units on the Y axis, which would designate a strongly expressed protein. Following the line up to panels 2B and 2A, it is shown that that same protein is expressed at high levels in both the MSCs contacted with a test composition I and

WO 01/96865

PCT/US01/19048

in the control MSCs not contacted with either composition. This protein, therefore, would be deemed as highly expressed in MSCs at the point in development at which the samples are taken, although there would be some variation in level of expression. Continuing to the right in panel 2C and making the same comparisons, however, the next protein present is also shown as present, in approximately the same amount, in the MSCs exposed to test composition I, but is not expressed at all by the control MSCs. Thus, this protein would be a candidate for differentiating chemical compositions with the tissue/organ toxicity of the test chemical composition(s) from other compositions and other kinds of toxicity.

Preferably, the results are placed into a computer database, with information about the known toxicities of the chemical compositions recorded in searchable data fields. Entries of data from other forms of detecting alterations in protein or gene expression can also be reviewed and recorded manually or in a computer database. For example, the values from an ELISA, or the proteins identified on a Western blot can be recorded to identify the types and amounts of proteins expressed in control and test samples. Similarly, the patterns on a Northern blot, or the hybridization pattern on an oligonucleotide array, can be recorded to identify the gene expression of control and test samples. The information can be kept manually, but preferably is maintained in a computer searchable form.

Standard database programs, such as Enterprise Data Management (Sybase, Inc., Emeryville, CA) or Oracle8 (Oracle Corp., Redwood Shores, CA) can be used to store and compare information. Alternatively, the data can be recorded, or analyzed, or both, in specifically designed programs available, for example, from Partek Inc. (St. Charles, MO).

Additionally, companies selling integrated analytical systems, such as mass spectrometers, provide with the machines integrated software for recording results. Such companies include Finnigan Corp. (San Jose, CA), Perkin-Elmer Corp. (Norwalk CT), Ciphergen Biosystems, Inc. (Palo Alto CA), and Hewlett Packard Corp. (Palo Alto, CA). Similarly, companies such as

Affymetrix, Inc. (Santa Clara, CA) and Incyte Pharmaceuticals, Inc. (Palo Alto CA) providing oligonucleotide hybridization services maintain proprietary image recognition algorithms to record and analyze the scanned images of hybridization arrays.

5 In a preferred embodiment, the data can be recorded and analyzed by neural network technology. Neural networks are complex non-linear modeling equations which are specifically designed for pattern recognition in data sets. One such program is the NeuroShell Classifier™ classification algorithm from Ward Systems Group, Inc. (Frederick, MD). Other neural network programs are available from, e.g., Partek, Inc., BioComp Systems, Inc. (Redmond WA) and Z
10 Solutions, LLC (Atlanta, GA).

H. ADAPTING ARRAY READERS

15 In one embodiment, the invention relates to the formation of arrays of hybridized oligonucleotides or of bound proteins to detect changes in gene or protein expression, respectively. Such arrays can be scanned or read by array readers.

Typically, the array reader will have an optical scanner adapted to read the pattern of labels on an array, such as of bound proteins or hybridized
20 oligonucleotides, operably linked to a computer which has stored on it, or accessible to it (for example, on an external drive or through the internet) one or more data files having a plurality of gene expression or protein expression profiles of mammalian MSCs contacted with known or unknown toxic chemical compositions. The array reader can, however, be adapted with a detection device
25 suitable to "read" labels that can not be read optically, such as electronic transponders.

I. USE IN HIGH THROUGHPUT SCREENING

30 The methods of the invention can be readily adapted to high throughput screening. High throughput ("HTP") screening is highly desirable

WO 01/96865

PCT/US01/19048

because of the large number of uncharacterized compounds already developed in the larger pharmaceutical companies, as well as the flood of new compounds now being synthesized by combinatorial chemistry. Using the invention, hundreds of chemical compositions can be tested on MSCs and the resulting alterations in gene or protein expression, or both, compared to toxicities of known chemical compositions to predict the type and possibly the degree of toxicity the new compounds possess. Those compositions with acceptable toxicity profiles can then be considered for further levels of testing.

HTP screening can be facilitated by using automated and integrated culture systems, sample preparation (protein or RNA/cDNA), and analysis. These steps can be performed in regular labware using standard robotic arms, or in more recently developed microchip and microfluidic devices, such as those developed by Caliper Technologies Corp. (Palo Alto, CA), described in U.S. Patent 5,800,690, by Orchid Biocomputer, Inc. (Princeton, NJ), described in the October 25, 1997 New Scientist, and by other companies, which provide methods of automated analysis using very low volumes of reagents. See, e.g., McCormick, R., *et al.*, Anal. Chem. 69:2626-2630 (1997); Turgeon, M., Med Lab. Management Rept, Dec. 1997, page 1.

EXAMPLES**Example 1. Selecting chemical compounds for toxicity screening**

5 Compositions that fall into particular categories of toxicity are used
to establish molecular profiles and compile libraries for particular toxicities.
Table 1 lists a number of compositions that are known to be toxic to certain
tissues or organs or during developmental stages. In particular, those
compositions that cause liver toxicities are assessed for their molecular profiles by
determining alterations of gene or protein expression patterns in MSCs contacted
10 by each composition. A library comprising molecular profiles of compositions
having liver toxicities is therefore compiled. Those compositions causing
cardiovascular toxicities are similarly assessed for their molecular profiles and a
library compiled. In addition, molecular profiles and library thereof for
compositions having toxicities on the central nervous system and for compositions
15 having developmental toxicities are similarly established using the MSC system.
The experimental procedures as described above in general, and in more detail in
the following examples, are followed to compile the molecular profiles and
libraries for compositions with particular type of toxicities.

WO 01/96865

PCT/US01/19048

Drugs with known or suspected of having activities against particular diseases can be used to establish molecular profiles and libraries for toxicity assessment. Antineoplastic drugs with similar toxicities, for example those listed in Table 1, can be used to compile molecular profiles by determining the alterations in gene or protein expression patterns in MSCs exposed to these drugs. Similarly, antibiotics with similar toxicities can also be assessed for their alterations in gene or protein expression patterns in MSCs. Also used are drugs controlling diabetes, drugs for lowering lipid levels, or anti-inflammatory drugs. Once a composite library comprising molecular profiles of specific type of drugs having similar toxicities is established, it can be used to screen for new drug leads of the similar type for their potential toxicities. Again, the experimental procedures as described above in general, and in more detail in the following examples, are followed for compiling molecular profiles and libraries, and for typing/ranking toxicities of new drug leads.

Example 2. Establishing protein profiles for chemical agents relating to tissue/organ toxicities

This Example demonstrates the culturing of mesenchymal stem cells, the exposure of the mesenchymal stem cells to different chemical agents having pre-determined tissue or organ toxicities, and the determination of changes in protein expression in the mesenchymal stem cells.

Isolation of cells

MSCs are isolated, purified and culture-expanded according to methods described below:

Method 1:

Human mesenchymal stem cells are isolated, purified and culture-expanded according to methods described in Caplan et al. (U.S. Patent Nos. 5,197,985 and 5,486,359). Briefly, marrow is obtained from either plugs of cancellous bone marrow or aspirate bone marrow. Plugs of cancellous bone

WO 01/96865

PCT/US01/19048

marrow are transferred to sterile tubes to which about 25 ml BGI₃ medium (GIBCO, Grand Island, N.Y.) with 10% fetal bovine serum (JR Scientific, Woodland, Calif.) (complete medium) is added. The tubes are vortexed to disperse the marrow, and then spun at about 1000XRPM for about 5 minutes to pellet cells and bone pieces. The supernatant and fat layer are removed and the marrow and bone reconstituted in about 5 ml complete medium and vortexed to suspend the marrow cells. The suspended cells are collected with a syringe fitted with a 16 gauge needle and transferred to separate tubes. Bone pieces are reconstituted in about 5 ml complete medium and the marrow cells collected as before. Marrow cells are separated into a single cell suspension by passing them through syringes fitted with 18 and 20 gauge needles. Cells are spun at 1000XRPM for about 5 minutes after which the fat layer and supernatant are removed. Cells are reconstituted in complete medium, counted with a hemocytometer (red blood cells are lysed prior to counting with 4% acetic acid), and plated in 100 mm dishes at 50-100X10⁶ nucleated cells/dish.

In the case of aspirate bone marrow, about 5 to 10 ml of aspirate marrow is transferred to sterile tubes to which 20 ml of complete medium is added. The tubes are spun at 1000XRPM for about 5 minutes to pellet the cells. The supernatant and fat layer are removed and the cell pellets (about 2.5 to 5.0 ml) are loaded onto 70% Percoll (Sigma, St. Louis, Mo.) gradients and spun at 460X g for 15 minutes. The gradients are separated into three fractions with a pipet: top 25% of the gradient (low density cells-platelet fraction), pooled density=1.03 g/ml; middle 50% of the gradient (high density cells-mononucleated cells), pooled density=1.10 g/ml; and, bottom 25% of the gradient (red blood cells), pooled density=1.14 g/ml. The low density cells are plated.

Marrow cells from either the femoral head cancellous bone or the iliac aspirate are cultured in complete medium at 37°C, in humidified atmosphere containing 95% air and 5% CO₂. Cells are allowed to attach for at least 1 day before nonadherent cells are removed from the cultures by replacing the original medium with fresh complete medium. Subsequent medium changes are performed about every 4 days. Upon reaching confluence, cells are detached with

WO 01/96865

PCT/US01/19048

0.25% trypsin with 0.1 mM EDTA (GIBCO) for about 10-15 minutes at 37°C.
The action of trypsin is stopped with 1/2 volume of fetal bovine serum. Cells are counted, split about 1:3, and replated in culture medium.

5 **Method 2:**

MSCs are isolated according to the methods described by Young et al. (*J. Tiss. Cult. Method* (1992), 14:85-92; U.S. Patent No. 5,328,695). Briefly, day 11 embryos are removed from fertilized chick eggs, decapitated, and their legs (encompassing knee to ankle joint) are removed and placed into sterile
10 Tyrode's.TM. buffer (Young et al, *Connect. Tiss. Res.*, 17: 99-118 (1988)). The skin is removed from each leg and the muscle and associated soft tissues are finely minced, triturated to disperse the cells, filtered through sterile cheese cloth and then through a 20 µm Nitex™ filter to obtain a single cell suspension (Young et al, *J. Tiss. Cult. Meth.* (1991), 13: 275-284). Viable cell numbers are estimated
15 by the dye exclusion test: a 100 µl aliquot of cell suspension is mixed with 100 µl of 0.4% trypan blue in sterile Tyrode's™ solution at pH 7.4, and the viable (dye-excluding) cells counted on a hemocytometer. The cells are plated at 2.5×10^6 cells per 100 mm tissue culture plate and fed daily with Eagle's™ Minimal Essential Medium (MEM) with Earle's Salts (GIBCO, Gaithersburg, Md.), 10%
20 pre-selected horse serum, and 5% stage-specific embryo extract (Young et al, *J. Tiss. Cult. Method.* (1992), 14: 85-92 (1992)). The cultures are incubated at 37°C in a humidified, 95% air/5% CO₂, incubator.

The cultures are maintained until all myogenic lineage-committed cells had formed multinucleated spontaneously contracting myotubes embedded within
25 multiple confluent layers of mononucleated stellate-shaped cells (Young et al, *J. Tiss. Cult. Meth.* (1991), 13: 275-284). The mixed cultures are gently trypsinized with 0.05% trypsin in Moscona's: Moscona's-EDTA buffer for 5-10 minutes at ambient temperature to release the cells from the plate (Young et al, *J. Tiss. Cult. Meth.* (1991), 13: 275-284). The cell/trypsin suspension is added to one-half
30 digestate volume of horse serum to inhibit further trypsin activity and centrifuged

WO 01/96865

PCT/US01/19048

(Young et al, *J. Tiss. Cult. Meth.* (1991), 13: 275-284). The supernatant is discarded, the cells are suspended in incomplete Eagle's TM MEM with Earle's salts, sieved through sterile cheese cloth and 20 µm Nitex TM, and 100 µl aliquot removed for viability testing and cell counting. The mesenchymal stem cells (Young et al, *J. Tiss. Cult. Method.* (1992), 14: 85-92) are maintained in medium consisting of Eagle's MEM with Earle's salts, 5% embryo extract (see Young et al., *J. Tiss. Cult. Meth.* (1991), 13:275-284), and 10% fetal calf serum.

10 Exposure of cells to test chemical composition and methods of analysis of protein expression

MSCs isolated according to the methods described above are cultured in medium containing dexamethasone to induce differentiation of the cells. A drug with pre-determined toxicity, such as troglitazone, which is a drug designed for the control of diabetes which has shown rare but severe liver toxicity and recently removed from the market, is added at a final concentration of about 20 µM to one group of plates (group "A") containing the MSCs. On the same day, another drug with pre-determined toxicity, such as erythromycin estolate (Sigma, catalog number F8630), which is a form of erythromycin with known liver toxicity, is added to a second group of plates (group "B") at a final concentration of about 50 µM. A third group of plates containing the cultured cells (group "C1") is cultured without any added drugs to serve as a control. Additionally, plates containing only tissue culture medium (group "C2") are cultured alongside those containing cultured cells as a control for degradation of proteins in the culture medium. Following a period of exposure of the cells to the drugs, for example after about ten, twenty, thirty and forty days, the cultures are harvested, the cells washed with a buffer such as PBS, and then lysed in a buffer that contains, for example, PBS, 0.5% Triton X-100 for about 10 minutes on ice. The nuclei are pelleted, and the supernatant removed and stored at -80°C until analysis. The nuclei are lysed in a buffer such as PBS with 0.2% SDS and dounce homogenized to shear the DNA. The insoluble material is pelleted and the nuclear lysates stored at -80°C until

WO 01/96865

PCT/US01/19048

analyzed. Cytoplasmic and nuclear lysates are also taken on day zero prior to exposure to any test chemical compositions to serve as additional controls.

5 The lysates and medium samples are diluted by, for example, 3 fold in buffer containing 50 mM Tris-HCl at pH 8, and 0.4 M NaCl. Aliquoted samples of diluted lysate or medium are placed in a sizing spin column that fractionates the sample with a size cut-off of, for example, 30 kD and equilibrated in 50 mM Tris-HCl, pH 8 and 50 mM NaCl. The column is spun at an appropriate force and for an appropriate period, such as 700 g for 3 minutes, for each fraction. Multiple fractions of about 25 μ L are collected for each column using the column equilibrated buffer.

10 The samples are partitioned by surface enhanced laser desorption/ionization ("SELDI"), and proteins are detected by mass spectroscopy. SELDI permits proteins to be captured on a surface of choice, which can then be washed at selected stringency, to permit fractionation according to desired characteristics such as affinity for metal ions of the surface used for capture.

15 CIPHERGEN normal phase chips (Ciphergen Biosystems, Palo Alto, CA) are used to partition the proteins in the fractions generated by the spin columns. Aliquots of about 1 μ L of each fraction are deposited on a spot on the chip, and the sample is air dried at room temperature for about 5 minutes. A mixture of about 0.5 μ L of saturated sinapinic acid ("SPA") in 50% acetonitrile with 0.5% trifluoroacetic acid ("TFA") is applied to each spot. The chip is again permitted to air dry for about 5 minutes at room temperature, and a second aliquot of the SPA mixture is applied.

20 Chips are read by the Ciphergen Protein Biology System 1 reader. Exemplary reader settings are as follows. Auto mode is used for data collection, at the SELDI quantitation setting. Two sets of protein profiles are collected, one at low laser intensity (at 15 with filter out) and one at high laser intensity (at 50 with filter out), detector set at 10. An average of 15 shots per location on the same sample spot are made. Protein profiles from different lysates are compared using SELDI software (Ciphergen Biosystems, Palo Alto, CA). This program

WO 01/96865

PCT/US01/19048

assumes two proteins with a molecular weight within about 1% of each other are the same. It then quantitates the results, compares the test samples against the control samples, and prints a graph showing the amount of each protein in the control as a horizontal line, with any reduction or excess in the amount of each protein in the test sample compared to the amount of that protein in the control sample as a line below or above the line representing the control.

Example 3. Screening of anti-cancer drugs for tissue and organ toxicities

This example illustrates using the MSC system for screening anti-cancer agents for their tissue or organ toxicities.

Compounds and drugs (both anti-cancer and therapeutic) that have known toxicities and biology endpoints in humans and/or animals are selected for compiling their gene or protein expression profiles in MSCs. In addition, compounds are selected with related known mechanisms of activities and with regard to compounds that have been used in previous studies to correlate clinical outcomes with human in vitro cell culture effects. Table 3.

TABLE 3

DRUGS	TOXICITIES							MECHANISM
	DEF	LIVER	CV	GI	CNS	RENAL	BLOOD	
chloroquinoloxaline sulfonamide			+					?
didemnin B				+				?
cyclophosphamide			+					alkylator
bizelesin							+	alkylator
carboplatin				+			+	alkylator
cisplatin				±		+	+	alkylator
oxaliplatin					+			alkylator
octenascidin 743							+	alkylator
penicillamine					+			alkylator
methotrexate	+	+						anti-metabolite
fuzarabine							+	anti-metabolite
fludarabine							+	anti-metabolite
flavopiridol				+				Cdk inhibitor
doxorubicin			+					DNA intercalator
amonaftide							+	DNA intercalator
daunorubicin			+				+	DNA syn inhib
gemcitabine		+					+	DNA syn inhib
etoposide							+	DNA syn inhib
deoxyspergualin			+					immunosuppression

WO 01/96865

PCT/US01/19048

camptothecin			+	topo-I inhibitor
9-aminocamptothecin			+	topo-I inhibitor
topotecan			+	topo-I inhibitor
nerbarone		+		topo-II inhibitor
delestatin 10			+	tubulin inhibitor
taxol			+	tubulin inhibitor
vinblastine	-		+	tubulin inhibitor
vincristine	+		+	tubulin inhibitor
vindesine	+	+	+	tubulin inhibitor
vinorelbine	+		+	tubulin inhibitor

"Dev" = developmental "GI" = gastro-intestinal "CV" = cardiovascular "CNS" = central nervous

5 a. Establishing gene expression profiles

The gene expression pattern of a selected compound is measured and quantified using cDNA microarrays and is normalized with cellular differentiation. The gene expression pattern of the compound is compared with a control MSC culture not exposed to the compound or, where appropriate, MSC cultures treated with related drugs with similar function or dose limiting toxicity. By compiling the gene expression profiles for a number of anti-cancer agents having similar or related toxicities, common alterations in gene expression are discerned and correlated with the toxicities, and are used as surrogate profiles for assessing the toxicities of test anti-cancer drug candidates.

The cDNA microarray can be any one of many kinds that are known and available in the art, for example, as described in Shalon et al (1996), *Genome Res* 6:639-645. cDNA microarrays allow for the simultaneous monitoring of the expression of thousands of genes, by direct comparison of control and chemically-treated cells. 3' expressed sequence tags (ESTs) are arrayed and spotted onto glass microscope slides at a density of hundreds to thousands per slide using high speed robotics. Fluorescent cDNA probes are generated from control and test RNAs using a reverse transcriptase reaction with labeled dUTP using fluors that excite at two different wavelengths, i.e. Cy3 and Cy5, which allows for the hybridization of both the control and test RNA to the same chip for direct comparison of relative gene expression in each sample. The fluorescent signal is detected using a specially engineered scanning confocal

microscope. A collection of 15,000 sequence verified human clones and 8700 mouse clones can be used in making cDNA microarrays. These microarrays are ideal for the analysis of gene expression patterns in MSC cultures treated with a variety of agents.

5 Another example of microarray analysis is described in Lockhart et al., U.S. Patent No. 6,040,138. In this method, labeled RNA or cDNA from target cells are hybridized to a high density array of oligonucleotide probes where the high density array contains oligonucleotide probes complementary to
10 subsequences of target nucleic acids in the RNA or cDNA sample. 20 mer oligonucleotide probes prepared as described in Lockhart et al., *supra*, are arrayed on a planar glass slide. Labeled RNAs are generated from control and test MSCs using methods known in the art, such as incubating cells in the presence of labeled nucleotides. Alternatively, labeled cDNAs are prepared from RNAs of the test
15 and control cells using a reverse transcription reaction with labeled nucleotides, such as dUTP using fluors that excite at different wavelengths. Signal from the labeled RNA or cDNA can be read by a laser-illuminated scanning confocal fluorescence microscope. The microarray in this method is capable of
20 simultaneous monitoring of more than 10,000 different genes.

 Briefly, RNAs are isolated from control and treated MSCs. Total
20 RNA are prepared using the RNeasy kit from Qiagen. Subsequently, RNA are labeled either with Cy3 or Cy5 dUTP in a single round of reverse transcription. The resultant labeled cDNAs are mixed in a concentrated volume and hybridized to the arrays. Hybridizations are incubated overnight at 65°C in a custom
25 designed chamber that prevents evaporation. Following hybridization, the chip is scanned with a custom confocal laser scanner that will provide an output of the intensity of each spot in the array for both the Cy3 and Cy5 channels. The data
30 are then analyzed with a software package that contains additional extensions. These extensions allow for the integration of a signal across each spot, normalization of the data to a panel of designated housekeeping genes, and statistical calculations to generate a list of genes whose ratios are outliers, or

WO 01/96865

PCT/US01/19048

5 significantly changed by the treatment. In addition to the image analysis software, informatics packages such as Spot-Fire and GeneSpring, both of which are commercially available, are used to allow clustering and analysis of genes in multiple experiments across dose and/or time. cDNA microarray technology, in
10 general, is still being validated as a viable technique for providing quantitative data. While the ratio of red/green provides good qualitative data on the relative level of expression of a gene in one population versus the other, it is not an absolute value of the level of induction/down regulation of that gene. Each pair of samples on the arrays are hybridized in triplicate. Outliers that are consistently
15 induced or suppressed in two of the three hybridization experiments are further validated by a traditional RNA quantitation method, such as Northern blot or RT-PCR.

Each drug is tested at least three times on separate MSC cultures for its effects on growth, differentiation and RNA expression. Cell counts
15 (growth), amount of cells expressing/not expressing and/or exhibiting a particular differentiation marker/characteristic (differentiation) and RNA levels/cDNA microarray data (RNA expression) are averaged for the three or more experiments and the mean and SEM determined. All results are normalized using
20 approximately 15 "house keeping" genes. This allows a quantitative comparison of the effects of the test drugs to control compounds that are not toxic in humans or animals. Statistical comparisons provide information for determining whether a given drug affects MSC gene expression compared to control drugs or non-treated cells and for determining whether a change in RNA in the cells is relevant.

25 **b. Establishing protein expression profiles**

The protein expression profiles of the selected anti-cancer drugs are established using Ciphergen's SELDI mass spectroscopy (MS)-TOF system, as described in Example 2. Total cell lysates from harvested MSC cultures are prepared in either 0.1% SDS or Triton-X100 (0.5%) and an equal protein mass is
30 directly applied to protein array chips using manufacturer's protocols. For some situations it may be desirable to add a defined mass of one or more known control

WO 01/96865

PCT/US01/19048

peptides as internal calibration and quantification standards to allow more quantitative comparisons between chips and samples. Each chip can analyze two drugs in triplicate. After working out the stringency conditions and experimental replications, on average 6 ProteinChips™ per test compound are used.

5 The Ciphergen technology allows for the proteins in the sample to be captured, retained and purified directly on the chip. The proteins on the microchip are then analyzed by SELDI. This analysis determines the molecular weight of proteins in the sample. An automatic readout of the molecular weights of the purified proteins in the sample can then be assessed. Typically this system
10 has a CV of less than 20%. The Ciphergen data analysis system normalizes the data to internal reference standards and subtracts the readout of proteins found in control cells from those in drug treated cells. This data analysis reveals protein expression stimulated by the drugs as well as proteins only found in the control cells whose expression is inhibited by the drug. The analysis provides a
15 qualitative readout of protein expression between a control and treated group. Analysis of multiple samples provides an average fold change in protein expression and a relative measure of variability. This can be represented as a mean \pm SEM which can provide a statistical measure of the protein changes. This analysis is used to determine whether drugs that induce similar forms of toxicity
20 in humans cause similar changes in protein expression in MSCs. Each drug is analyzed on at least 3 separate groups of MSCs.

All publications and patent applications cited in this specification are
25 herein incorporated by reference as if each individual publication or patent application were specifically and individually indicated to be incorporated by reference.

Although the foregoing invention has been described in some detail by way of illustration and example for purposes of clarity of understanding, it will be
30 readily apparent to those of ordinary skill in the art in light of the teachings of this

WO 01/96865

PCT/US01/19048

invention that certain changes and modifications may be made thereto without departing from the spirit or scope of the appended claims.

WO 01/96865

PCT/US01/19048

CLAIMS

WHAT IS CLAIMED IS:

- 5 1. A method of creating a molecular profile of a chemical
composition, comprising the steps of:
 a) contacting an isolated population of mammalian mesenchymal
stem cells (MSCs) with the chemical composition; and
 b) recording alterations in gene expression or protein expression in
10 the mammalian MSCs in response to the chemical composition to create a
molecular profile of the chemical composition.
2. A method of compiling a library of molecular profiles of chemical
compositions having predetermined toxicities, comprising the steps of:
15 a) contacting an isolated population of mammalian mesenchymal
stem cells (MSCs) with a chemical composition having predetermined toxicities;
 b) recording alterations in gene expression or protein expression in
the mammalian MSCs in response to the chemical composition to create a
molecular profile of the chemical composition; and
20 c) compiling a library of molecular profiles by repeating steps a)
and b) with at least two chemical compositions having predetermined toxicities.
3. The method of claim 1 or 2, wherein the alterations in gene
expression or protein expression are detected by a label.
25
4. The method of claim 3, wherein the label is selected from the
group consisting of fluorescent, colorimetric, radioactive, enzyme, enzyme
substrate, nucleoside analog, magnetic, glass, latex bead, colloidal gold, and
electronic transponder.
30

WO 01/96865

PCT/US01/19048

5. The method of claim 1 or 2, wherein the molecular profile comprises alterations in gene expression.
6. The method of claim 5, wherein the alterations in gene expression are detected by a nucleotide hybridization assay.
7. The method of claim 1 or 2, wherein the molecular profile comprises alterations in protein expression.
8. The method of claim 7, wherein the alterations in protein expression are detected by an immunoactivity assay.
9. The method of claim 7, wherein the alterations in protein expression are detected by a mass spectrometry assay.
10. The method of claim 2, wherein the MSCs are of human.
11. The method of claim 10, further wherein the chemical compositions having predetermined toxicities are selected from the group consisting of therapeutic agents, neurotoxins, renal toxins, hepatic toxins, toxins of hematopoietic cells, and myotoxins.
12. The method of claim 10, further wherein the chemical compositions having predetermined toxicities are selected from the group consisting of agents that are toxic to cells of one or more reproductive organs, teratogenic agents and carcinogens.
13. The method of claim 10, further wherein the chemical compositions having predetermined toxicities are selected from the group consisting of agricultural chemicals, cosmetics, and environmental contaminants.

WO 01/96865

PCT/US01/19048

14. The method of claim 2, wherein the MSCs are of non-human mammals.
15. The method of claim 14, wherein the non-human mammals are rodents.
16. The method of claim 14, further wherein the chemical compositions having predetermined toxicities are selected from the group consisting of animal therapeutics, neurotoxins, renal toxins, hepatic toxins, toxins of hematopoietic cells, and mycotoxins.
17. The method of claim 14, further wherein the chemical compositions having predetermined toxicities are selected from the group consisting of agents that are toxic to cells of one or more reproductive organs, teratogenic agents and carcinogens.
18. The method of claim 14, further wherein the chemical compositions having predetermined toxicities are selected from the group consisting of agricultural chemicals, cosmetics, and environmental contaminants.
19. A library of molecular profiles of chemical compositions having predetermined toxicities, produced by a method according to any one of the claims 2, 10-18.
20. The library of claim 19, wherein the library comprises molecular profiles for at least 20 chemical compositions.
21. A method of typing toxicity of a test chemical composition, comprising the steps of:
- a) creating a molecular profile of the test chemical composition according to claim 1; and

WO 01/96865

PCT/US01/19048

b) comparing the molecular profile in step a) with the molecular profile of a chemical composition having predetermined toxicities;

wherein the type of toxicity of the test chemical composition is determined by the comparison in step b).

5

22. A systematic method of typing toxicity of a test chemical composition, comprising the steps of:

a) creating a molecular profile of the test chemical composition according to claim 1; and

10

b) comparing the molecular profile in step a) with a composite library of molecular profiles of chemical compositions having predetermined toxicities, wherein the composite library comprises the molecular profiles of at least two chemical compositions, said molecular profiles are created according to claim 1;

15

wherein the type of toxicity of the test chemical composition is determined by the comparison in step b).

23. A method of ranking toxicity of a test chemical composition, the method comprising:

20

a) creating a molecular profile of the test chemical composition according to claim 1; and

25

b) comparing the molecular profile in step a) with a composite library of molecular profiles of chemical compositions having predetermined toxicities, wherein the composite library comprises the molecular profiles of at least two chemical compositions, said molecular profiles are created according to claim 1;

wherein the toxicity of the test chemical composition is ranked by the comparison in step b).

30

24. The method of claim 21, 22 or 23, wherein the test chemical composition is known or unknown.

WO 01/96865

PCT/US01/19048

25. The method of claim 21, 22 or 23, further wherein the MSCs are of human.
- 5 26. The method of claim 25, further wherein the chemical compositions having predetermined toxicities are therapeutic agents, neurotoxins, renal toxins, hepatic toxins, toxins of hematopoietic cells, or myotoxins.
- 10 27. The method of claim 25, further wherein the chemical compositions having predetermined toxicities are selected from the group consisting of agents that are toxic to cells of one or more reproductive organs, teratogenic agents and carcinogens.
- 15 28. The method of claim 25, further wherein the chemical compositions having predetermined toxicities are selected from the group consisting of agricultural chemicals, cosmetics, and environmental contaminants.
- 20 29. The method of claim 21, 22 or 23, further wherein the MSCs are of non-human mammals.
30. The method of claim 29, wherein the non-human mammals are rodents.
- 25 31. The method of claim 29, further wherein the chemical compositions having predetermined toxicities are selected from the group consisting of animal therapeutics, neurotoxins, renal toxins, hepatic toxins, toxins of hematopoietic cells, and myotoxins.
- 30 32. The method of claim 29, further wherein the chemical compositions having predetermined toxicities are selected from the group

WO 01/96865

PCT/US01/19048

consisting of agents that are toxic to cells of one or more reproductive organs, teratogenic agents and carcinogens.

5 33. The method of claim 29, further wherein the chemical compositions having predetermined toxicities are selected from the group consisting of agricultural chemicals, cosmetics, and environmental contaminants.

10 34. An integrated system for comparing the molecular profile in MSCs of a chemical composition to a library of molecular profiles in MSCs of chemical compositions having predetermined toxicities, comprising: an array reader adapted to read the pattern of labels on an array, operably linked to a digital computer comprising a database file having a plurality of molecular profiles in MSCs of chemical compositions having predetermined toxicities.

15 35. The integrated system of claim 34, wherein the data file comprises at least 20 gene or protein expression profiles.

20 36. The integrated system of claim 34, capable of reading the hybridization pattern of 500 or more labels on an array per hour.

37. The integrated system of claim 34, further operably linked to an optical detector for reading the pattern of labels on an array.

25 38. An integrated system for correlating the molecular profile in MSCs and toxicity for a chemical composition comprising: an array reader adapted to read the pattern of labels on an array, operably linked to a digital computer comprising a database file having a plurality of molecular profiles in MSCs of chemical compositions with predetermined toxicities and a program suitable for molecular profile-toxicity correlation.

30

WO 01/96865

PCT/US01/19048

39. The integrated system of claim 38, wherein the data file comprises at least 20 gene or protein expression profiles.
40. The integrated system of claim 38, capable of reading the
5 hybridization pattern of 500 or more labels on an array per hour.
41. The integrated system of claim 38, further operably linked to an optical detector for reading the pattern of labels on an array.

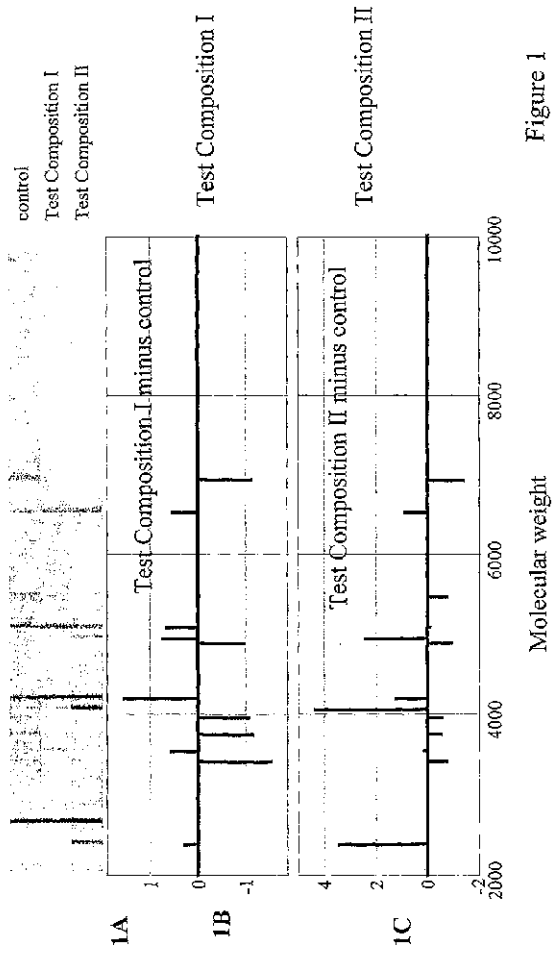


Figure 1

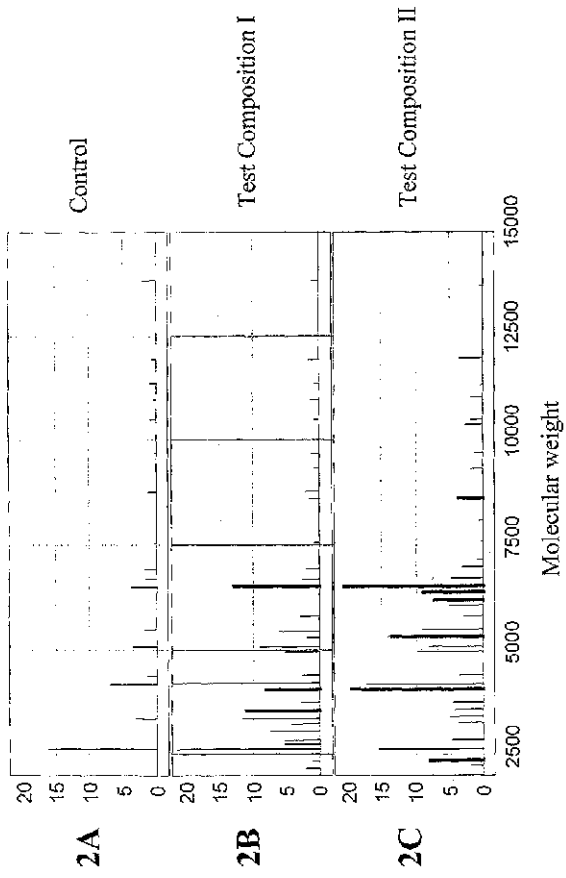


Figure 2

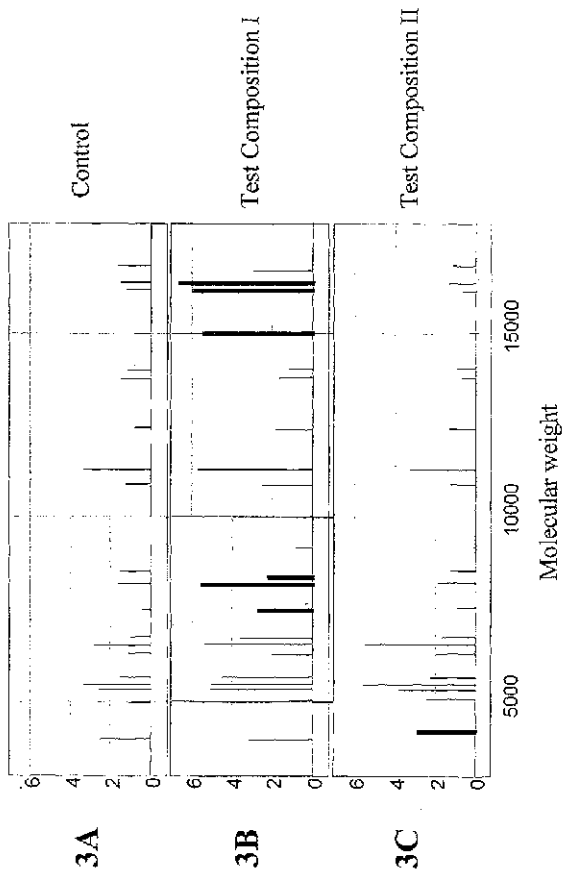


Figure 3

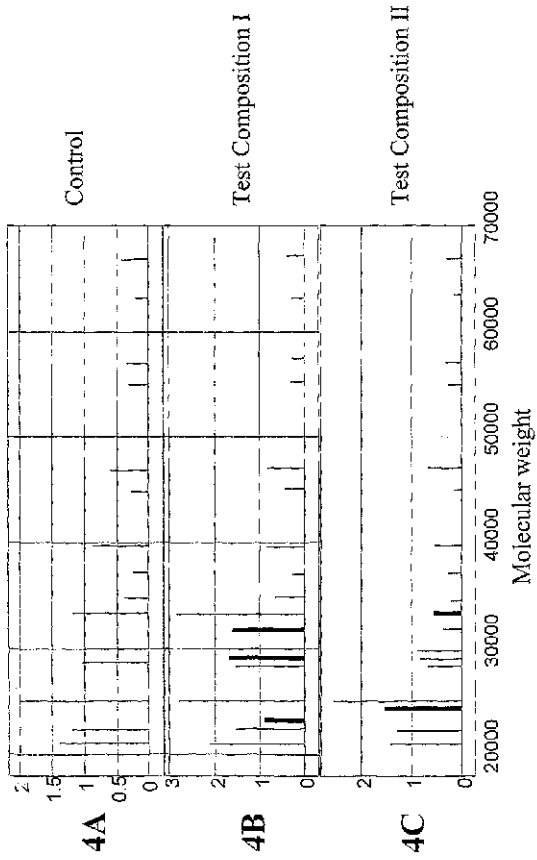


Figure 4

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Intern. of Application No. PC1/US 01/19048
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 G01N3/50 C12Q1/68		
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) IPC 7 G01N C12Q		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic databases consulted during the international search (name of database not, where practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 99 44062 A (SAUTER GUIDO ;US HEALTH (US); KONONEN JUHA (US); KALLIONIEMI OLLI) 2 September 1999 (1999-09-02) claims 1,9,11,20-56; example 17	1-41
A	WO 99 27090 A (MORGAN GWYN ;BERTRAM TIMOTHY (GB); BUGELSKI PETER (GB); ENGLAND PA) 3 June 1999 (1999-06-03) the whole document	1-41
	-/-	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in 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) *O* 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. *Z* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 13 November 2001		Date of mailing of the international search report 21/11/2001
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P. B. 5918 Patentlaan 2 NL - 3720 HV Hjevoek Tel: (+31-70) 340-2000, Tx: 31 651 epo nt Fax: (+31-70) 340-2016		Authorized officer Osborne, H

Form PCT/ISA/210 (secret/04) (July 1993)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Info Application No PC, 01/19048
C/(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant pages	Relevant to claim No.
A	GRAY N S: "Exploiting chemical libraries, structure, and genomics in the search for kinase inhibitors" SCIENCE, AMERICAN ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF SCIENCE, US. vol. 281, 24 July 1998 (1998-07-24), pages 533-538, XP002101911 ISSN: 0036-8075 see abstract	1-35
A	WO 99 10535 A (UNIV YALE; LIU MENG (US); BASKARAN NAMADEY (US); WEISSMAN SHERMAN) 4 March 1999 (1999-03-04) the whole document	1-35
A	US 5 811 297 A (GOPAL T VENKAT) 22 September 1998 (1998-09-22) example 17	1
A	WO 00 29002 A (OSIRIS THERAPEUTICS INC; THIEDE MARK (US); FLAKE ALAN (US)) 25 May 2000 (2000-05-25)	
A	WO 97 13877 A (LYNX THERAPEUTICS INC; MARTIN DAVID W (US)) 17 April 1997 (1997-04-17) claims 1-30	1-35

1

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1993)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT Information on patent family members				Inter-Application No. PC1/US 01/19048
Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date	
WO 9944062	A	02-09-1999	AU 2875799 A	15-09-1999
			AU 2973599 A	15-09-1999
			EP 1068528 A2	17-01-2001
			EP 1066517 A1	10-01-2001
			WO 9944062 A1	02-09-1999
			WO 9944063 A2	02-09-1999
			EP 1131470 A1	12-09-2001
			WO 0024940 A1	04-05-2000
WO 9927090	A	03-06-1999	AU 1166199 A	15-06-1999
			EP 1032663 A1	06-09-2000
			WO 9927090 A1	03-06-1999
WO 9910535	A	04-03-1999	AU 9200298 A	16-03-1999
			WO 9910535 A1	04-03-1999
US 5811297	A	22-09-1998	CA 2248655 A1	12-09-1997
			EP 0954594 A2	10-11-1999
			JP 2000508885 T	18-07-2000
			WO 9732992 A1	12-09-1997
WO 0029002	A	25-05-2000	AU 1478000 A	05-06-2000
			EP 1128836 A2	05-09-2001
			WO 0029002 A2	25-05-2000
WO 9713877	A	17-04-1997	AU 712929 B2	18-11-1999
			AU 4277896 A	06-05-1996
			AU 6102096 A	30-12-1996
			AU 7717596 A	30-04-1997
			CN 1193357 A	16-09-1998
			CZ 9700866 A3	17-09-1997
			CZ 9703926 A3	17-06-1998
			EP 0793718 A1	10-09-1997
			EP 0832287 A1	01-04-1998
			EP 0931165 A1	28-07-1999
			FI 971473 A	04-06-1997
			HU 9900910 A2	28-07-1999
			JP 11507528 T	06-07-1999
			JP 10507357 T	21-07-1998
			NO 971644 A	02-06-1997
			NO 975744 A	05-02-1998
			PL 324000 A1	27-04-1998
			US 6280935 B1	28-08-2001
			WO 9641011 A1	19-12-1996
			WO 9713877 A1	17-04-1997
US 6235475 B1	22-05-2001			
AU 718357 B2	13-04-2000			

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 37/00	G 0 1 N 33/53	M
	G 0 1 N 37/00	1 0 2

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

Fターム(参考) 2G045 AA40 BB20 CB01 DA12 DA13 DA14 DA36 FB02 FB07
 4B024 AA11 CA04 CA05 CA06 CA09 CA11 GA18 HA08 HA12 HA14
 4B063 QA01 QA18 QQ20 QQ36 QQ42 QQ52 QR07 QR08 QR14 QR32
 QR38 QR41 QR42 QR48 QR55 QR62 QR66 QR69 QR72 QR82
 QS12 QS25 QS34 QS39 QX02

专利名称(译)	使用间充质干细胞分类毒性		
公开(公告)号	JP2004503255A	公开(公告)日	2004-02-05
申请号	JP2002510943	申请日	2001-06-14
[标]申请(专利权)人(译)	Vista中仁公司		
申请(专利权)人(译)	Vista中仁公司		
[标]发明人	スノッドグラスエイチラルフ		
发明人	スノッドグラス, エイチ. ラルフ		
IPC分类号	C12N15/09 C12Q1/02 C12Q1/68 C12Q1/6809 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53 G01N37/00		
CPC分类号	C12Q1/6809 G01N33/5014		
FI分类号	C12N15/00.A C12Q1/02 C12Q1/68.A G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/53.M G01N37/00.102		
F-TERM分类号	2G045/AA40 2G045/BB20 2G045/CB01 2G045/DA12 2G045/DA13 2G045/DA14 2G045/DA36 2G045/FB02 2G045/FB07 4B024/AA11 4B024/CA04 4B024/CA05 4B024/CA06 4B024/CA09 4B024/CA11 4B024/GA18 4B024/HA08 4B024/HA12 4B024/HA14 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QQ20 4B063/QQ36 4B063/QQ42 4B063/QQ52 4B063/QR07 4B063/QR08 4B063/QR14 4B063/QR32 4B063/QR38 4B063/QR41 4B063/QR42 4B063/QR48 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QR66 4B063/QR69 4B063/QR72 4B063/QR82 4B063/QS12 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QS39 4B063/QX02		
代理人(译)	夏木森下		
优先权	60/211608 2000-06-14 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及用于识别和该化合物的毒性，以及新的组合物进行分类的方法和系统用于筛选毒性的方法和系统。本发明包括检测基因或蛋白质表达变化的步骤，因此是鉴定分离的哺乳动物多能间充质干细胞（MSC）中的分子的方法，其接触已知或未知毒性的各种化合物。建立你的个人资料并将化合物的毒性与分子谱相关联。

表. 2- MSCの型の例

種	供給源	単離方法
ヒト	海綿状骨髄のマラゲ	Caplan 米国特許第 5,486,559号及び同第5,177,825号
ヒト	腸骨吸引管	Caplan 米国特許第 5,486,559号及び同第5,177,825号
マウス	胚性11日目の胎中の前歯骨に隣接する軟骨組織	Young 5 米国特許第 5,827,735号
ヒト	腸骨骨髄	Pittenger 5, Science (1999), 284:143-147