(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2004-503256
(P2004-503256A)
(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）
C12N 15/09	C12N 15/00	F	2G043
A01K 67/027	A01K 67/027		2G045
C12N 5/06	C12Q 1/68	A	4B024
C12Q 1/68	G01N 21/64	F	4B029
G01N 21/64	G01N 27/62	V	4B063

審査請求 未請求　予備審査請求 有　（全 113 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2002-510944(P2002-510944)
(86)(22)出願日　平成13年6月14日(2001.6.14)
(85)翻訳文提出日　平成14年12月12日(2002.12.12)
(86)国際出願番号　PCT/US2001/019187
(87)国際公開番号　WO2001/096866
(87)国際公開日　平成13年12月20日(2001.12.20)
(31)優先権主張番号　60/211,606
(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)

(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　９４０１０－２３０７　バーリンゲイム　ローリンズ　ロード　１４５０
(74)代理人　100078282
弁理士　山本　秀策
(74)代理人　100062409
弁理士　安村　高明
(74)代理人　100113413
弁理士　森下　夏樹
(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　９４４０３，　サン　マテオ，　アルマダ　ウェイ　２２２１

最終頁に続く

(54)【発明の名称】肝臓幹細胞を使用する毒性分類

(57)【要約】
本発明は、化学組成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、遺伝子発現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、それによって、毒性が既知もしくは未知の種々の化学組成物と接触させた、単離された哺乳動物ＬＳＣにおける分子プロフィールを確立し、そして化学組成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】
化学組成物の分子プロフィールを作成する方法であって、該方法は以下の工程：
ａ）哺乳動物肝臓幹細胞（ＬＳＣ）の単離された集団を、該化学組成物と接触させる工程；および
ｂ）該化学組成物に応答した該哺乳動物ＬＳＣにおける遺伝子発現またはタンパク質発現の変化を記録し、該化学組成物の分子プロフィールを作成する工程、を包含する方法。
【請求項２】
所定の毒性を有する化学組成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）哺乳動物肝臓幹細胞（ＬＳＣ）の単離された集団を、所定の毒性を有する化学組成物と接触させる工程；
ｂ）該化学組成物に応答した該哺乳動物ＬＳＣにおける遺伝子発現またはタンパク質発現の変化を記録し、該化学組成物の分子プロフィールを作成する工程；および
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】
遺伝子発現またはタンパク質発現の前記変化が、標識によって検出される、請求項１または２に記載の方法。
【請求項４】
前記標識が、蛍光、比色、放射性、酵素、酵素基質、ヌクレオシドアナログ、磁気、ガラス、ラテックスビーズ、金コロイド、および電気的トランスポンダーからなる群から選択される、請求項３に記載の方法。
【請求項５】
前記分子プロフィールが、遺伝子発現の変化を含む、請求項１または２に記載の方法。
【請求項６】
遺伝子発現の前記変化が、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、請求項５に記載の方法。
【請求項７】
前記分子プロフィールが、タンパク質発現の変化を含む、請求項１または２に記載の方法。
【請求項８】
タンパク質発現の前記変化が、免疫活性アッセイによって検出される、請求項７に記載の方法。
【請求項９】
タンパク質発現の前記変化が、質量分析アッセイに検出される、請求項７に記載の方法。
【請求項１０】
前記ＬＳＣが、ヒトのＬＳＣである、請求項２に記載の方法。
【請求項１１】
さらに、所定の毒性を有する前記化学組成物が、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、請求項１０に記載の方法。
【請求項１２】
さらに、所定の毒性を有する前記化学組成物が、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、請求項１０に記載の方法。
【請求項１３】
さらに、所定の毒性を有する前記化学組成物が、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、請求項１０に記載の方法。
【請求項１４】

前記ＬＳＣが、非ヒト哺乳動物のＬＳＣである、請求項２に記載の方法。
【請求項１５】
前記非ヒト哺乳動物が、げっ歯類である、請求項１４に記載の方法。
【請求項１６】
さらに、所定の毒性を有する前記化学組成物が、動物治療剤、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、請求項１４に記載の方法。
【請求項１７】
さらに、所定の毒性を有する前記化学組成物が、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、請求項１４に記載の方法。
【請求項１８】
さらに、所定の毒性を有する前記化学組成物が、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、請求項１４に記載の方法。
【請求項１９】
請求項２、１０～１８のいずれか１項に記載の方法によって作製される、所定の毒性を有する化学組成物の分子プロフィールのライブラリー。
【請求項２０】
前記ライブラリーが、少なくとも２０個の化学組成物についての分子プロフィールを含む、請求項１９に記載のライブラリー。
【請求項２１】
試験化学組成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、該試験化学組成物の分子プロフィールを作成する工程；および
ｂ）工程ａ）における分子プロフィールを、所定の毒性を有する化学組成物の分子プロフィールと比較する工程、
を包含し、
ここで、該試験化学組成物の毒性の分類が、工程ｂ）における比較によって決定される、方法。
【請求項２２】
試験化学化学組成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、該試験化学組成物の分子プロフィールを作成する工程；および
ｂ）工程ａ）における分子プロフィールを、所定の毒性を有する化学組成物の分子プロフィー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つの化学組成物の分子プロフィールを含み、該分子プロフィールが、請求項１に従って作成される、工程、
を包含し、
ここで、該試験化学組成物の毒性の分類が、工程ｂ）における比較によって決定される、方法。
【請求項２３】
試験化学組成物の毒性を順位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、該試験化学組成物の分子プロフィールを作成する工程；および
ｂ）工程ａ）における分子プロフィールを、所定の毒性を有する化学組成物の分子プロフィー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つの化学組成物の分子プロフィールを含み、該分子プロフィールが、請求項１に従って作成される工程、
を包含し、
ここで、該試験化学組成物の毒性が、工程ｂ）における比較によって順位付けされる、方法。
【請求項２４】
前記試験化学組成物が、既知または未知である、請求項２１～２３に記載の方法。
【請求項２５】

さらに、前記ＬＳＣが、ヒトのＬＳＣである、請求項２１～２３に記載の方法。
【請求項２６】
さらに、所定の毒性を有する前記化学組成物が、治療剤、神経毒、腎臓毒、肝臓毒、造血細胞の毒、または筋肉毒である、請求項２５に記載の方法。
【請求項２７】
さらに、所定の毒性を有する前記化学組成物が、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、請求項２５に記載の方法。
【請求項２８】
さらに、所定の毒性を有する前記化学組成物が、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、請求項２５に記載の方法。
【請求項２９】
前記ＬＳＣが、非ヒト哺乳動物のＬＳＣである、請求項２１～２３に記載の方法。
【請求項３０】
前記非ヒト哺乳動物が、げっ歯類である、請求項２９に記載の方法。
【請求項３１】
さらに、所定の毒性を有する前記化学組成物が、動物治療剤、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、請求項２９に記載の方法。
【請求項３２】
さらに、所定の毒性を有する前記化学組成物が、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、請求項２９に記載の方法。
【請求項３３】
さらに、所定の毒性を有する前記化学組成物が、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、請求項２９に記載の方法。
【請求項３４】
化学組成物のＬＳＣにおける分子プロフィールを、所定の毒性を有する化学組成物のＬＳＣ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、以下：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学組成物のＬＳＣ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ファイルを含む、デジタルコンピューターに作動可能に連結される、アレイリーダー、を備える、集積システム。
【請求項３５】
前記データファイルが、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、請求項３４に記載の集積システム。
【請求項３６】
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、請求項３４に記載の集積システム。
【請求項３７】
さらに、アレイ上の標識のパターンを読み取るための光学検出器に作動可能に連結される、請求項３４に記載の集積システム。
【請求項３８】
ＬＳＣにおける分子プロフィールと化学組成物の毒性とを相関させる集積システムであって、該集積システムが、以下：所定の毒性を有する化学組成物のＬＳＣ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ファイル、および分子プロフィール－毒性の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作動可能に連結される、アレイ上の標識のパターンを読み取るのに適したアレイリーダー、を備える、集積システム。
【請求項３９】
前記データファイルが、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、請求項３８に記載の集積システム。

【請求項４０】
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、請求項３８に記載の集積システム。
【請求項４１】
さらに、アレイ上の標識のパターンを読み取るための光学検出器に作動可能に連結される、請求項３８に記載の集積システム。
【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日出願の米国仮特許出願番号第６０／２１１，６０６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）
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を利用するような、現代の薬物探索の方法における進歩は、我々に疾患の処置のための前例のない多数の薬物候補を提供し続けている。しかし、宿主系に対する薬物毒性の問題は、健康管理の設定のために、ライブラリーからの薬物候補の解釈において、重大な評価制限段階（ｒａｔｅ－ｌｉｍｉｔｉｎｇ　ｓｔｅｐ）にあり続けている。類似の毒性問題は、産業および普通の化学物質の開発も同様に妨害する。高価で、かつ時間を浪費するのに加えて、現在利用可能な毒素学的スクリーニングアッセイは、ヒトの治療に関連する全毒性を検出できない。例えば、全ての期待されるヒトの治療法の３分の１ほどは、予想外の毒性に起因して、ヒトの臨床治験の第１相で不合格になる。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】
従来の「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の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、試験化学組成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（１９９８）２８２：３９６－３９９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および組織の間の複雑な相互作用を説明しない。
【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（１９８８）、４４（１０）：８０７－８１７。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。

【０００７】

Ｌｏｃｋｈａｒｔらは、公知の遺伝子群の発現プロフィールを用いて、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。

【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】

主に体内で有毒な物質を解毒する生体の役割を実行するという理由で、肝臓は、物質の毒性の影響が最も頻繁に、そして厳しく表される部位である。例えば、表１を参照のこと。それゆえ、肝臓に関連するか、または肝臓で発見された細胞で、潜在的に毒性の化合物の影響に主な焦点を置く毒性アッセイは、特に有益なことが予期される。

【００１０】

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し、かつ毒性の影響の共通標的に最も関連する環境において、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、どれが生物全体または組織に対する組成物の影響に関連するかに取り組む手段である。本発明は、これらおよび他の必要物に取り組む。

【００１１】

（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ィー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）哺乳動物の肝臓幹細胞（ＬＳＣ）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ィールを作成するために、化学組成物に応答する哺乳動物ＬＳＣ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。

【００１２】

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ィールのライブラリーを集計する方法を具体化し、この方法は以下の工程を含む：ａ）哺乳動物ＬＳＣ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ィールを作成するために、化学組成物に応答する哺乳動物ＬＳＣ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ィールのライブラーを集計する工程。本発明の方法により集計された分子プロフィールライブラリーは、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。

【００１３】

本発明の別の実施形態は、ＬＳＣ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試験化学物質が、この試験によって同定される。

【００１４】

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。

【００１５】

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、ＬＳＣ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。

【００１６】

本発明のＬＳＣ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。

【００１７】

遺伝子またはタンパク質の発現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、放射性、酵素、酵素基質、ヌクレオシドアナログ、磁気、ガラス、またはラテックスビーズ、金コロイド、および電気的トランスポンダー。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学物質のサンプル、および未知の毒性のサンプル）であり得る。

【００１８】

さらに、この化学組成物は、治療薬剤（または潜在的な治療薬剤）であり得るか、あるいは神経毒、肝臓毒、造血細胞の毒、筋肉毒（ｍｙｏｔｏｘｉｎ）、発癌物質、催奇性薬剤、または１つ以上の生殖器官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（ｃｏｓｍｅｃｅｕｔｉｃａｌ）」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。

【００１９】

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ＬＳＣ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ＬＳＣ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。

【００２０】

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の、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ＬＳＣ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。

【００２１】

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ＬＳＣ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検出器に動作可能に連結され得る。

【００２２】

（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対する化学物質の潜在的な影響（環境で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十分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、Ｋｌａａｓｓｅｎら、編、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。

【００２３】

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ＬＳＣ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ＬＳＣが、コントロールＬＳＣ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ＬＳＣ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ＬＳＣの分化、増殖および／または十分に分化した肝細胞への発達の経路に沿った段階での、ＬＳＣ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、十分に分化した肝細胞での遺伝子またはタンパク質の発現を含まない。

【００２４】

本明細書中に使用される「ＬＳＣ型」または「ＬＳＣ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ＬＳＣおよび／または特定のＬＳＣ単離方法に従って単離されるＬＳＣをいう。

【００２５】

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。

【００２６】

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、培養培地のみに接触する類似ＬＳＣと比較して、その化学組成物によって接触されるＬＳＣ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。

【００２７】

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ップレギュレーションのような影響を含み得る。

【００２８】

本明細書中に使用される「データベース」とは、培養培地のみと接触させた同種のＬＳＣと比較した、化学組成物と接触させたＬＳＣ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。

【００２９】

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、化学組成物と接触させたＬＳＣ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。

【００３０】

「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。

【００３１】

「作動可能な連結」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、そして第２のエレメントによって作用されること（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）を可能にする方法で接続されることを意味する。

（Ｂ．一般な説明）

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、化学的組成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、薬物開発において特に有用である。。

【００３２】

本発明は、多能性肝臓幹細胞（ＬＳＣ）の特性を利用することによって、これらの目的を達成する。ＬＳＣは、肝臓および／または他の組織／器官（例えば、膵臓、腸）の複数の上皮細胞に分化することが可能な形成多能性前駆細胞である。一般に、これらは、肝細胞または胆管細胞のいずれかに発生し得る前駆細胞である。しかし、これらはまた、他の細胞型に分化し得ると考えられている。ＬＳＣは、前腸の肝憩室内で、一般に胚発生段階における胚前駆細胞（本発明の目的のためのＬＳＣの好ましい形態）として、見出されるかまたは単離された。それらはまた、成人の肝臓から、幹細胞特性または幹細胞様特徴を有する細胞として単離された。本発明の目的のために、成人肝臓中に見出される卵円形細胞（ｏｖａｌ　ｃｅｌｌ）もまたＬＳＣである。多数の組織型に分化におけるその多能性に起因して、ＬＳＣの単離された集団は、マウスまたはより大きい哺乳動物の使用に関連する、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】

本発明の目的のために、ＬＳＣ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。ＬＳＣは、多くの供給源から比較的容易に単離、および精製される。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があり得る。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。ＬＳＣはまた、これらが、肝細胞および胆管細胞（これらは、薬物および他の物質に起因する毒性に対して最も感受性のある器官である肝臓において優勢な細胞である）のための前駆細胞であるという点で、他の幹細胞を超える有意な利点を与える（例えば、表１を参照のこと）。従って、肝臓の細胞成分および発生に焦点をあてた毒性アッセイは、多くの試験化合物の潜在的な毒性のより直接的な評価を与えると期待される。さらに、ＬＳＣは、生きた個体から、（例えば、針または成人の肝臓の小さいくさび状生検によって）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のために使用する場合には達成することがほとんど不可能であった領域を提供する。最近の技術開発によって、いくつかの場合において、死後２４時間までの死体からこれらの細胞を単離することが可能である。

【００３４】

本発明に使用されるＬＳＣ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し得る多能性細胞である。ＬＳＣ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ＬＳＣ集団は、多能性細胞を少なくとも７５％含む。そしてさらにより好ましくは、このＬＳＣ集団は、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、ＬＳＣ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ＬＳＣ（「コントロールＬＳＣ」）と比較して、この化学組成物に曝露されたＬＳＣ（「試験ＬＳＣ」）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化を決定する工程を包含する。

【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、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、ある特定の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類似し得る。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得る；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得る。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。

【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の毒性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。

【００３８】

【表１】

表1

薬物	毒性 DEV	肝臓	CV	CNS	血液	指標	商品名
サリドマイド	+						
メトトレキサート	+					抗腫瘍	
レチン酸	+					挫瘡	
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	Voltarern
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
ドキソルビシン			+			抗腫瘍	
ダウノルビシン			+			抗腫瘍	
シクロホスファミド(cyclosophosphamide)			+			抗腫瘍	
化合物							
四塩化炭素		+					
カドミウム		+					
ファロジジン(phallodidin)		+					
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(hexachloraphene)				+			
DMSO		調査不充分					

「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、ＬＳＣ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、ＬＳＣ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。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、ＬＳＣ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ＬＳＣ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】

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が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、「美容食品（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、ある程度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。

【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指標を提供し、既知の毒性の化学組成物に曝露したＬＳＣ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ＬＳＣタンパク質発現または遺伝子発現の比較を容易にする。

（Ｃ．ＬＳＣの調製）

ヒトまたは他の哺乳動物種のＬＳＣの調製方法は、当該分野で公知である。例えば、Ｒｅｉｄらの米国特許第５，５７６，２０７号および同第５，７８９，２４６号は、その子孫が様々な肝細胞に分化し得る未成熟細胞の単離または拡大の方法を記載する。これらの細胞は、肝臓、膵臓、胃、肺、および骨髄を含む様々な組織から単離され得る。この未成熟（前駆）細胞は、標準的な手順（例えば、酵素学的な分離、および機械的な分離）によって、組織供給源から分離され得る。分離された細胞集団は、標準的な方法（例えば、前駆細胞のエピトープ（このようなエピトープは当該分野で公知であり、以下に例が提供される）を認識する抗体の使用）により前駆細胞についてさらに濃縮される。この前駆細胞の拡大は、細胞外マトリクス、肝臓支質細胞および増殖因子の存在下で、この細胞を培養することによって、達成され得る。これらの細胞の単離および拡大に適切な他の条件はまた、開示される。これらの前駆細胞は、肝細胞、胆管細胞、肝内皮細胞、および伊東細胞に分化し得る。

【００４２】

肝前駆細胞を単離する方法は公知である。例えば、、Ｒｅｉｄら、米国特許第６，０６９，００５号は、パニング技術を使用する単離方法および蛍光発色細胞分類を記載する。これらの肝前駆細胞は、肝細胞を分離し、その後に抗体を使用して（蛍光発色細胞分類によって）パニングおよび分類を行い、夾雑細胞型の量を減じることによって単離される。

【００４３】

肝前駆細胞を、単離し、特徴付け、そして培養するための別の方法は、Ｎａｕｇｈｔｏｎら、米国特許第５，５５９，０２２号に記載される。肝前駆細胞は、密度勾配遠心分離によって単離され、そしてこれらの形態学、染色特徴、高増殖活性、およびインビトロでの分化能によって、他の肝臓実質細胞から識別される。

【００４４】

肝臓幹細胞を得る別の方法は、ＦａｒｉｓのＰＣＴ公開ＷＯ００／０３００１に記載される。Ｆａｒｉｓは、胎児、小児、または成人の肝臓組織から一次肝臓幹細胞を単離する方法を記載し、この方法は、肝細胞との細胞クラスターに加わる肝臓幹細胞の傾向に基づき、さらなる濃縮は、イムノサブトラクション、選択的酵素消化、および免疫親和性選択に

よって達成される。

【００４５】

種々の分化した細胞（肝臓直系の細胞を含む）を生じることが可能な胆管前駆細胞の単離が、Ｐａｎｇらの米国特許第５，８６１，３１３号に記載されている。哺乳動物胆管の微小構造を有する細胞の集団（例えば、胆管外植片）は、培養され、この培養集団中の前駆細胞の増殖を生じる薬剤と接触される。引き続き、この前駆細胞は、例えば、直接的な機械的分離によって、この外植片の残りから分離されるか、または外植片の全てもしくは一部分の分離によって単離される。前駆細胞の単離および培養に適切な種々の条件は、参考文献において提供される。

【００４６】

肝前駆細胞に対する表現型類似性を有する、条件的に形質転換された肝前駆細胞の単離がまた、記載される。Ｆｉｏｒｉｎｏら（Ｉｎ Ｖｉｔｒｏ Ｃｅｌｌ．Ｄｅｖ．Ｂｉｏｌ．－－Ａｎｉｍａｌ（１９９８），３４：２４７－２５８）は、肝臓の種々の分化マーカーを発現されるように誘導され得る細胞の単離を記載する。

【００４７】

ＬＳＣの系特異的分化は、当該分野で周知の種々の生物学的活性因子および／または条件によって、誘導され得る。これらは、例えば、Ｂｒｉｌｌら、Ｅｘｔｒａｃｅｌｌｕｌａｒ ｍａｔｒｉｘ ｒｅｇｕｌａｔｉｏｎ ｏｆ ｇｒｏｗｔｈ ａｎｄ ｇｅｎｅ ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ ｉｎ ｌｉｖｅｒ ｃｅｌｌ ｌｉｎｅａｇｅｓ ａｎｄ ｈｅｐａｔｏｍａｓ Ｉｎ Ｌｉｖｅｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ ａｎｄ Ｐａｔｈｏｂｉｏｌｏｇｙ（１９９４），ｐｐ．８６９－８９７（Ｒａｖｅｎ Ｐｒｅｓｓ，ＮＹ）；ＲｅｉｄおよびＬｕｎｔｚ，Ｅｘ ｖｉｖｏ ｍａｉｎｔｅｎａｎｃｅ ｏｆ ｄｉｆｆｅｒｅｎｔｉａｔｅｄ ｍａｍｍａｌｉａｎ ｃｅｌｌｓ Ｉｎ Ｂａｓｉｃ Ｃｅｌｌ Ｃｕｌｔｕｒｅ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ（１９９７），７５：３１－５７（Ｈｕｍａｎａ Ｐｒｅｓｓ，Ｔｏｔｏｗａ，ＮＪ）；ＲｅｉｄおよびＬｕｎｔｚ（１９９７），Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ（１９９７），７５：３１－５７に記載され、一般的には、Ｒｅｉｄ，Ｓｔｅｍ ｃｅｌｌ／ｌｉｎｅａｇｅ ｂｉｏｌｏｇｙ ａｎｄ ｌｉｎｅａｇｅ－ｄｅｐｅｎｄｅｎｔ ｅｘｔｒａｃｅｌｌｕｌａｒ ｍａｔｒｉｘ ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ：ｋｅｙｓ ｔｏ ｔｉｓｓｕｅ ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ ｏｆ ｑｕｉｅｓｃｅｎｔ ｔｉｓｓｕｅｓ ｓｕｃｈ ａｓ ｌｉｖｅｒ Ｉｎ Ｔｅｘｔｂｏｏｋ ｏｆ Ｔｉｓｓｕｅ Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ（１９９７），（Ｒ．Ｇ．Ｌａｎｄｅｓ／Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，Ａｕｓｔｒｉｎ，ＴＸ）；Ｂｒｉｌｌら，Ｄｉｆｆｅｒｅｎｔｉａｔｉｏｎ（１９９５），５９：９５－１０２；Ｂｒｉｌｌら．，Ｄｉｇｅｓｔｉｖｅ Ｄｉｓｅａｓｅｓ＆Ｓｃｉｅｎｃｅｓ（１９９９），４４：３６４－３７１；ならびにＦａｒｉｓ，ＰＣＴ公開ＷＯ００／０３００１を参照のこと。例えば、肝前駆細胞の分化は、細胞を未分化形態で維持することが知られている状態を取り除くことによってか、またいくつかの公知の増殖因子（例えば、ＨＧＦ、ＦＧＦ、およびＩＧＦ－ＩＩ）の１つを投与することよって達成され得る。肝幹細胞の分化はまた、肝組織（すなわち、他の肝細胞、または当該分野で公知の細胞マトリクス成分）との接触によって、誘導され得る。培養培地中のデキサメタゾンの存在が、肝細胞系および胆管細胞系の両方に沿う、胚性マウス肝細胞の分化を誘導することが示された。培養培地に、血清、インシュリン、デキサメタゾン、およびジメチルスルホキシドを補充することによって、細胞がＥ１２ラット肝臓から単離された細胞が、肝細胞マーカーを発現するように誘導し、一方、これらの細胞を酪酸ナトリウムに曝露することは、胆管細胞マーカーの発現を生じる。一般的には、ＧｒｉｓｈａｍおよびＴｈｏｒｇｅｉｒｓｓｏｎ，Ｌｉｖｅｒ ｓｔｅｍ ｃｅｌｌｓ Ｉｎ Ｓｔｅｍ Ｃｅｌｌｓ ｐｐ．２３３－２８２（Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，Ｌｏｎｄｏｎ）（１９９７）；ＳｈｉｏｊｉｒｉおよびＭｉｚｕｎｏ，Ａｎａｔ．Ｅｍｂｒｙｏｌ．（１９９３），１８７：２２１－２２９；ＧａｌｌおよびＢｈａｔｈａｌ，Ｊ Ｅｘｐ．Ｐａｔｈｏｌ．（１９９０），７１：４１－５０；ならびにＧｅｒｍａｉｎら，Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．（１９８８），４８：４９０９：４９１８を参照の

こと。

【００４８】

本発明で使用するために得たＬＳＣは、当該分野で周知であるかまたは本明細書中で引用した参考文献に記載されるように、これらの別個の特性によって同定され得る。例えば、肝臓幹細胞は、これらのさらに分化した子孫より小さくなり、より高い細胞質対核の比、未分化であり薄い核およびわずかな細胞間接着を有する傾向がある。Ｒｅｉｄら、米国特許第６，０６９，００５号。Ｎａｕｇｈｔｏｎらは、低い細胞質対核の比、酸性染色液および塩基性染色液の組合わせを接触した場合の特異的な特徴を有する染色、ならびに培地内で成熟肝細胞より高い増殖速度を有する彼らの方法で単離した肝前駆細胞を記載する。Ｎａｕｇｈｔｏｎら、米国特許第５，５５９，０２２号。

【００４９】

あるいは、本発明で使用されるＬＳＣは、例えば、所定の段階のＬＳＣの集団に特異的な抗体の使用によるような、特異的なマーカーの検出によって同定され得る。例えば、ＧｒｉｓｈａｍおよびＴｈｏｒｇｅｉｒｓｓｏｎ（前出）は、分化を評価するために、そして肝臓上皮細胞（ＯＣ．２およびＯＣ．３を含む）の系を追跡するために、肝前駆細胞で発現されるが肝細胞で発現されないマーカーである一般に使用される抗体マーカーの実質的な表を記載する。また、サイトケラチンに対する抗体は、肝臓上皮細胞系および分化を評価する際に有用であり得る。例えば、Ｍｏｌｌら、Ｃｅｌｌ（１９８２），３１：１１－２４；ＯｓｂｏｒｎおよびＷｅｂｅｒ，Ｃｅｌｌ（１９８２），３１：３０３－３０６；Ｍａｒｃｅａｕ，Ｌａｂ．Ｉｎｖｅｓｔ．（１９９０），６３：４－２０；Ｓｈｉｏｊｉｒａら．，Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．（１９９１），５１：２６１１－２６２０；ならびに、Ｂｌｏｕｉｎら，Ｄｉｆｆｅｒｅｎｔｉａｔｉｏｎ（１９９２），５２：４５－５４は、全ての型の上皮細胞は、２～１０個のサイトケラチン（ＣＫ）の組み合わせを発現すること、およびこの細胞により発現されるＣＫの特定の組み合わせ（例えば、ヒトの、ＣＫ８、ＣＫ１８、ＣＫ７およびＣＫ１９（ならびに少ないが、ＣＫ１４）に等価なＣＫの組み合わせ）が、肝上皮細胞の分化した形態を示すことを報告した。

【００５０】

必要ならば、本発明において使用するために得、そして培養したＬＳＣを、ＬＳＣ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。

【００５１】

化学的組成物を試験するために使用されるＬＳＣは、任意の脊椎動物種のものであり得る。ＬＳＣ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、研究の目的に基づいて、１つ以上の種が特定の目的となり得る。例えば、ヒトＬＳＣ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のであり得、その一方で、ウマＬＳＣ、ネコＬＳＣ、ウシＬＳＣ、ブタＬＳＣ、ヤギＬＳＣ、イヌＬＳＣ、またはヒツジＬＳＣ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。

【００５２】

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ＬＳＣ、さらに非霊長類ＬＳＣ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、ＬＳＣを使用することが所望され得る。

【００５３】

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対す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ＬＳＣを使用することによって、ＬＳＣにおける遺伝子またはタンパク質の発現の変化と、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一般に使用される、他の種（例えば、モルモット、ウサギ、ブタおよびイヌ）のＬＳＣはまた、同様の理由で好ましい。代表的には、これらの種のＬＳＣは、「ファーストパス（ｆｉｒｓｔ　ｐａｓｓ）」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と相関した場合で、使用される。

【００５４】

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ＬＳＣ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ＬＳＣである。なぜならば、これらのＬＳＣにおける薬物の毒性についての結論は、ヒトに対する化学的組成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ＬＳＣにおける研究を実施することによって、他の種のＬＳＣ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。

【００５５】

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ＬＳＣを使用することが所望される。次いで、ＬＳＣ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、種はまた、薬物を代謝する能力において異なる。例えば、Ｗｉｌｌｉａｍｓ，Ｅｎｖｉｒｏｎ　Ｈｅａｌｔｈ　Ｐｅｒｓｐｅｃｔ．（１９７８）２２：１３３－１３８；Ｄｕｎｃａｎ，Ａｄｖ　Ｓｃｉ（１９６７）２３：５３７－５４１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使用に従って、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。

【００５６】

異なった種由来のＬＳＣ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。以下の議論にいおいて、コントロールと試験ＬＳＣ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ＬＳＣおよび化学組成物の影響を試験するために使用されるＬＳＣが、同じ種に由来することが想定される。

【００５７】

（Ｄ．化学組成物とＬＳＣとの接触）

（１．概論）

一旦、ＬＳＣ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、そしてこれは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、マイクロピペッター、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、ロボットアームに基づき得る自動的手段（例えば、自動化ピペッティングシステム）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培地に導入され得る。例えば、農薬または石油化学薬剤としての用途が意図される化学組成物を、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、この環境で共に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て導入し得る。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。

【００５８】

（２．接触のタイミング）

化学的組成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わる。好都合には、ＬＳＣを培養してすぐに化学的組成物を添加して、ＬＳＣ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、特定の肝細胞型におけるこの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がもたれ得る。以前に記載したように、個々の分化した組織（例えば、肝細胞および胆管細胞）は、特定の誘導因子および／または条件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、条件およびマーカーは、当該分野において公知であり、本明細書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、化学的組成物の添加を、ＬＳＣの分化段階、増殖段階および／または発生の種々の時点および／または段階において行い得る。１つの実施形態において、この化学的組成物を、未分化形態に維持されたＬＳＣに接触させる。別の実施形態において、化学的組成物の添加を、目的の細胞型／組織が発生を開始する時点において行う。なお別の実施形態において、目的の細胞型／組織においての遺伝子またはタンパク質の発現の変化への影響を観察するために、化学的組成物の添加を、この発生開始後の選択された時点において行う。

【００５９】

（３．化学的組成物の投薬）

化学的組成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ＬＳＣを接触させる。特に、この化学的組成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、化学的組成物をただ１つの濃度で投与し得る。さらに一般的には、化学的組成物を異なる濃度で、並行して培養されるＬＳＣ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、化学的組成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。

【００６０】

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、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。環境汚染物質に関して、この組成物はまた通常、環境中で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。

【００６１】

１つの実施形態において、ＬＳＣ中の化学的組成物の毒性プロフィール（例えば、分子プロフィール）は、この化学的組成物がＬＳＣ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学的組成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ＬＳＣ中の化学的組成物の効力のプロフィールは、この化学的組成物がＬＳＣ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学的組成物の効力を生じるに十分な化学的組成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、化学的組成物の望ましさおよび／または有用性の尺度を提供する指標に用いられる。例えば、非常に望ましい化学的組成物は、受け入れられないレベルのＬＳＣ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学的組成物である。

【００６２】

（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料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学的組成物（「試験サンプル」）に接触したＬＳＣ由来のサンプルおよび目的の化学的組成物の存在を除いて同一の条件下で培養したＬＳＣ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何らか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。

【００６３】

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何らか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決定し得る。例えば、ＥＬＩＳＡの結果は、タンパク質の存在量に直接関連し得る。

【００６４】

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を操作して、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。

【００６５】

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、発現の相違を決定し得る。
【００６６】
タンパク質発現における相違を決定するために１つの特に好ましい方法は、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類似したタンパク質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。
【００６７】
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」に用いられ得、ここでコントロールＬＳＣ中のタンパク質発現が定量されて、次いで化学的組成物に接触したＬＳＣ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ＬＳＣ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。
【００６８】
（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。
【００６９】
このような比較のための１つの標準的な方法は、ノザンブロットである。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、ＲＮＡをサンプルから抽出して、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、次いでこれを泳動して、サイズによってＲＮＡを分離する。次いでゲルをブロットして（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。
【００７０】
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（１９８８），２４１：１０７７－１０８０；Ｗｕら，Ｇｅｎｏｍｉｃｓ（１９８９），４：５６０－５６９；Ｂａｒａｎｙ，ＰＣＲ Ｍｅｔｈｏｄｓ ａｎｄ Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ，１：５－１６（１９９１）；およびＢａｒａｎｙ，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ（１９９１），８８：１８９－１９３。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。

【００７１】

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、^{32}Ｐ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。

【００７２】

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ｄＵＴＰ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 ｄＵＴＰ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。

【００７３】

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て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。

【００７４】

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し得る。異なるサンプルに由来するタグの相対的な表示の列挙は、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。

【００７５】

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かつ同時の分析を可能にする。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（１９９５）　２７０：３６８－３６９；Ｚｈａｎｇら，Ｓｃｉｅｎｃｅ（１９９７）　２７６：１２６８－１２７２を参照のこと。

【００７６】

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　ａｎａｌｙｓ　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Ｄｅｌｔａ™　Ｄｉｆｆｅｒｅｎｔｉａｌ　Ｄｉｓｐｌａｙ　Ｋｉｔを販売している。

【００７７】

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が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。

【００７８】

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での特定の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ＧｅｎｅＣｈｉｐ™　Ｐｒｏｂｅアレイを販売する。ＣＬＯＮＴＥＣＨ，Ｉｎｃ．（Ｐａｌｏ　Ａｌｔｏ，ＣＡ）のＡｔｌａｓ™　ｃＤＮＡ　Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ　Ａｒｒａｙは、５８８個の選択された遺伝子の発現パタ

ーンの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。

【００７９】

（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：^{32}Ｐ、^{35}Ｓ、蛍光色素、電子密度試薬（ｅｌｅｃｔｒｏｎ－ｄｅｎｓｅ 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。

【００８０】

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広範に報告されており、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。適切な標識としては、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、磁気粒子などが挙げられる。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、アフィニティーマトリックス、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ー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。

【００８１】

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おいて有用な標識は、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としては、以下が挙げられる：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、^{3}Ｈ、^{125}Ｉ、^{35}Ｓ、^{14}Ｃまたは^{32}Ｐ）、酵素（例えば、ＬａｃＺ、ＣＡＴ、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼおよび、マーカー遺伝子産物としてもしくはＥＬＩＳＡにおいてのいずれかで検出可能な酵素として、通常使用される他の酵素）、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５，７３６，３３２号）。

【００８２】

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ＣｄＳｅ－ＣｄＳ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。Ｂｒｕｃｈｅｚら、Ｓｃｅｉｎｃｅ（１９９８）２８１：２０１３－２０１６。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。ＷａｒｒｅｍおよびＮｉｅ（１９９８）Ｓｃｉｅｎｃｅ ２８１：２０１６－２０１８。

【００８３】

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。

【００８４】

標識は、また、例えば、酵素またはフルオロフォア（ｆｌｏｕｒｏｐｈｏｒｅ）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、ハイドロラーゼ（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体、ローダミンおよびその誘導体、ダンシル、アンベリフェロン、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－ｄｉｈｙｄｒｏｐｈｔｈａｌａｚｉｎｅｄｉｏｎｅｓ）（例えば、ルミノール）が挙げられる。

【００８５】

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、シンチレーションカウンター、近接カンウンター（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ー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（ＣＣＤＳ）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、ビーズの色に見える。

【００８６】

（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学的組成物の絶え間なく拡大する（ｅｖｅｒ－ｗｉｄｅｒｉｎｇ）群と試験ＬＳＣとを接触することによる分子プロフィールのライブリーの編集の複数の反復を考える。多くの化学的組成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、ＬＳＣ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。多数の化学的組成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、各型の毒性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ＬＳＣ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。

【００８７】

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ＬＳＣを含み得る）既定の毒性を有する１つ以上の化学的組成物と接触する、１つ以上の型のＬＳＣ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ＬＳＣを含み得る）を含むライブラリーが、編集される。

【００８８】

（表２　ＬＳＣの型の例）

【００８９】

【表２】

種	供給源	単離方法
種々（ヒト、げっ歯類、ウサギ、ウシを含む）	種々（肝臓、すい臓、腸、肝、骨髄を含む）	Reid ら 米国特許第5,576,207号および第5,789,246号
ラット	14日目の胎児肝臓	Reid ら 米国特許第6,069,005号
ラット	15日目の胎児肝臓	Reid ら 米国特許第6,069,005号
ラット	6～9週の成体肝臓	Naughton ら 米国特許第5,559,022号
ラット	成体肝臓	Faris PCT公開 WO00/03001
ラットまたはマウス	成体または新生児の総胆管	Pang ら 米国特許第5,861,313号

本発明は、化学的組成物と試験ＬＳＣとの接触の各反復は、化学的組成物および／またはＬＳＣ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産生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ＬＳＣ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。

【００９０】

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。より簡便には、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学的組成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、発現の最も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。
【００９１】
（Ｇ．試験化学的組成物の毒性の分類および順位付け）
試験化学的組成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ＬＳＣ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学的組成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学的組成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。
【００９２】
本発明を実施する目的のために、ＬＳＣ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のついたリストの上半分にある。
【００９３】
前の節に留意されるように、化学的組成物に曝露されるＬＳＣ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ＬＳＣと比較されるタンパク質の発現に対する化学的組成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、ノザンブロットは、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ＬＳＣおよびコントロールＬＳＣ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、比較のための基礎を提供する。
【００９４】
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、試験化学的組成物（「試験サンプル」）と接触するＬＳＣのタンパク質発現に対するコントロールＬＳＣ（「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。この型の比較において、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。
【００９５】
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、ＬＳＣ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ＬＳＣ）に対するマススペクトルであり、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ＬＳＣ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ＬＳＣによって発現される核タンパク質のマススペクトルである。

【００９６】

図１Ｂおよび図１Ｃは、試験化学的組成物（「試験ＬＳＣ」）の１つと接触したＬＳＣと、化学的組成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ＬＳＣ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ＬＳＣ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ＬＳＣとコントロールＬＳＣ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ＬＳＣ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ＬＳＣ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ＬＳＣが、コントロールＬＳＣ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ＬＳＣ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。

【００９７】

図１Ｂは、コントロールＬＳＣと比較される試験組成物Ｉの存在下で増殖したＬＳＣ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ＬＳＣ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ＬＳＣとコントロールＬＳＣ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ＬＳＣ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。

【００９８】

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ＬＳＣ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）を有さないことを示す。このタンパク質は、試験化学的組成物の組織／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。

【００９９】

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において例示される。これらの図は、２つの化学的組成物のうちの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ＬＳＣ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ＬＳＣ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ＬＳＣに加えて、化学的組成物に曝露されないＬＳＣ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ＬＳＣ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ＬＳＣ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つの化学的組成物に曝露されるＬＳＣによって発現されるタンパク質のいくつかが、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ＬＳＣ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。

【０１００】

図３は、前述の段落において考察されるのと同じＬＳＣ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つの化学的組成物に曝露されたＬＳＣによって発現されるタンパク質のいくつかが、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。

【０１０１】

同様に、図４は、上に考察されるＬＳＣ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、試験化学的組成物に曝露されたＬＳＣ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学的組成物のいずれかへの曝露なしに増殖されたＬＳＣのタンパク質発現パターンとの間に観察され得る。

【０１０２】

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ＬＳＣにおけるタンパク質発現と比較してより小量で発現されるか（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、化学的組成物は、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。

【０１０３】

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ＬＳＣおよびいずれの組成物とも接触しないコントロールＬＳＣ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ＬＳＣ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ＬＳＣ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ＬＳＣによって全て発現されない。従って、このタンパク質は、他の組成物および他の種類の毒性から試験化学的組成物の組織／器官毒性を有する化学的組成物を区別するための候補である。

【０１０４】
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を検出する他の形態からのデータの入力はまた、手動またはコンピューターデータベースにおいて再検討され、そして記録される。例えば、ＥＩＬＳＡからの値またはウエスタンブ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、ノザンブ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形態で維持される。

【０１０５】
標準データベースプログラム（例えば、Ｅｎｔｅｒｐｒｉｓｅ Ｄａｔａ Ｍａｎａｇｅｍｅｎｔ（Ｓｙｂａｓｅ，Ｉｎｃ．，Ｅｍｅｒｙｖｉｌｌｅ，ＣＡ）またはＯｒａｃｌｅ８（Ｏｒａｃｌｅ Ｃｏｒｐ．，Ｒｅｄｗｏｏｄ Ｓｈｏｒｅｓ，ＣＡ））は、情報を保存および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）から入手可能な特別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）され得る。

【０１０６】
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走査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。

【０１０７】
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特別に設計された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^{TM}分類アルゴリズムである。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。

【０１０８】
（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。

【０１０９】
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ＬＳＣの、複数の遺伝子発現プロフィールまたはタンパク質発現プロフィールを有する）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。

【０１１０】

（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さ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ＬＳＣ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ィー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。

【０１１１】

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．（Ｐｒｉｎｓｔｏｎ、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、非常に低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。

【０１１２】

（実施例）

（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、分子プロフィールを確立し、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ＬＳＣ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、その分子プロフィー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ィー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、その分子プロフィールについて評価し、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ィー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ィールおよびライブラリーを、ＬＳＣ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ィールおよびライブラリーを編成するために続ける。

【０１１３】

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ィー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ＬＳＣ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ィールを編成し得る。同様に、類似の毒性を有する抗生物質をまた、ＬＳＣ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／順位付けのために続ける。

【０１１４】

（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、肝臓幹細胞の培養、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肝臓幹細胞の曝露、および肝臓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。

【０１１５】

（細胞の単離）

ヒト肝臓前駆細胞を、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）

肝臓前駆細胞を、Ｒｅｉｄら、米国特許第５，５７６，２０７号および同第５，７８９，２４６号に従って、単離する。簡潔には、肝臓切片を、５００～５０００ｍｇ／Ｌのグルコースおよび２～１０％の抗生物質（例えば、ペニシリンおよびストレプトマイシン）を含む氷冷ＰＢＳ溶液に配置する。この肝臓切片を、切り刻み、そして１ｍＭ $CaCl_2$ を含む生理食塩溶液中に調製されたコラゲナーゼ、プロナーゼおよびデオキシリボヌクレアーゼを含む溶液で連続消化する。消化を、攪拌水浴中で３７℃で約２０分間行う。次いで、部分的に消化した組織を、重力によって組織篩を通して裏ごしし、未消化の残留物を２回再消化する。次いで、収集した細胞を、生理食塩水溶液で洗浄する。細胞を、Ｍｉｌｌｉｃｅｌｌ支持体のような基底表面を介して極性化および補給させるように、ＩＶ型コラーゲンのマトリックス上またはマトリックス中に配置する。マトリックス結合細胞に、胚性肝臓誘導ストロマ細胞補給層を供給し、そして０．４ｍＭ未満のカルシウムおよび１０μｇ／ｍｌのインスリン、１０μＵ／ｍｌの成長ホルモン、２０ｍＵ／ｍｌのプロラクチン、１０μｇ／ｍｌのグルカゴン、５０ｎｇ／ｍｌのＥＧＦ、10^{-8} Ｍのデキサメタゾン、10^{-9} ＭのＴ３、3×10^{-10} Ｍの銅、および 10^{-10} Ｍの亜鉛を含有する基本培地（例えば、ＲＰＭＩ　１６４０、Ｈａｍ’ｓ　Ｆ１０、Ｈａｍ’ｓ　Ｆ１２）（これらを含む培地を、本明細書中以降、「培地Ａ」とよぶ」）中で培養する。あるいは、この培地は、０．４％のウシ血清アルブミン、１リットル当たり７６ｍＥｑの遊離脂肪酸混合物（３１％のパルミチン酸、２．８％のパルミトレイン酸、１１．６％のステアリン酸、１３．４％のオレイン酸、３５．６％のリノール酸および５．６％のリノレン酸）をさらに含む（これらを含む培地を、本明細書中以降、「培地Ｂ」と呼ぶ）。10^{-6} Ｍのデキサメタゾン、０．１～１００μｇ／ｍｌのインスリン、５０ｎｇ／ｍｌの多刺激活性（Ｓｉｇｍａ　Ｃｈｅｍｉｃａｌ　Ｃｏ．Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ、ＭＯ）、２５～１００ｎｇ／ｍｌのＥＧＦ、10^{-4} Ｍのノルエピネフリン、２５μｌ／ｍｌの造血素および１０ｎｇ／ｍｌのＦＧＦを含む培地Ａまたは培地Ｂをまた、使用し得る。この方法によって獲得された肝臓前駆細胞を、以下に記載のように本発明に従って分析する。

【０１１６】

（方法２）

肝芽（ｈｅｐａｔｏｂｌａｓｔ）を、Ｒｅｉｄら、米国特許第６，０６９，００５号に記載の方法に従って単離する。簡潔には、肝臓を、妊娠１４日目のラット胎仔から切り出し、そして新鮮な氷冷Ｈａｎｋ’ｓ　Ｓａｌｔ　Ｓｏｌｕｔｉｏｎ（ＨＢＳＳ）中に配置する。全ての組織を収集し、そして非肝組織を除去した後、ＨＢＳＳ－５ｍＭ　ＥＧＴＡを、１ｍＭの最終ＥＧＴＡ濃度まで添加する。次いで、肝臓を、穏やかに６～８回粉砕し、組織を部分的に分解し、次いで、４００ｇで５分間、４℃で遠心分離する。引き続く全ての遠心分離工程を、同じ設定で実施する。上清を除去し、そして細胞および組織のペレットを、１ｍＭ $CaCl_2$ を含むＨＢＳＳ中の０．６％のコラゲナーゼＤ（Ｂｏｅｈｒｉ

ｎｇｅｒ Ｍａｎｎｈｅｉｍ、Ｉｎｄｉａｎａｐｏｌｉｓ、Ｉｎｄ．）中に再懸濁し、穏やかに粉砕し、次いで、３７℃で１５分間攪拌する。分散した細胞をプールし、１ｍＭのＥＧＴＡを含むＨＢＳＳ中に懸濁し、そして４６μｍの組織収集器（Ｂｅｌｌｃｏ Ｇｌａｓｓ，Ｉｎｃ．、Ｖｉｎｅｌａｎｄ、Ｎ．Ｙ．）を通して濾過する。細胞懸濁物を、遠心分離し、そして細胞を、ＭＥＭアミノ酸、ＭＥＭビタミン、ＭＥＭ非必須アミノ酸、インスリン（１０μｇ／ｍｌ）、鉄飽和トランスフェリン（１０μｇ／ｍｌ）、遊離脂肪酸（７．６ｍＥｑ／Ｌ）、微量元素、アルブミン（０．１％、フラクションＶ、脂肪酸フリー、Ｍｉｌｅｓ Ｉｎｃ．、Ｋａｎｋａｋｅｅ，Ｉｌｌ．）、ｍｙｏ－イノシトール（０．５ｍＭ）およびゲンタマイシン（１０μｇ／ｍｌ、Ｇｉｂｃｏ ＢＲＬ、Ｇｒａｎｄ Ｉｓｌａｎｄ、Ｎ．Ｙ．）を補充されたＨＢＳＳ（ＨＢＳＳ－ＭＥＭ）中に再懸濁する。細胞数および生存率を、血球計算器およびトリパンブルー排除によって決定する。

【０１１７】

赤血球系細胞を除去するために、標準的な手順に従って、ウサギ抗ラットＲＢＣ ＩｇＧ（Ｒｏｃｋｌａｎｄ Ｉｎｃ．、Ｇｉｌｂｅｒｔｓｖｉｌｌｅ、Ｐａ．）を用いて調製したパニング皿を使用する。０．０５Ｍ Ｔｒｉｓ（ｐＨ９．５）で希釈した抗体（０．５ｍｇ／皿）を、１００ｍｍ^{2}の細菌学的ポリスチレンペトリ皿（Ｆａｌｃｏｎ、Ｌｉｎｃｏｌｎ Ｐａｒｋ、Ｎ．Ｊ．）に注ぐ。この皿を、表面を均一に被覆するために旋回させ、室温で約４０分間インキュベートする。被覆された皿をＰＢＳで４回洗浄し、そして使用の前に０．１％のＢＳＡを含むＨＢＳＳで１回洗浄する。

【０１１８】

３×１０^{7}細胞までの細胞を含む細胞懸濁物を、被覆された皿中で、ウサギ抗ラットＲＢＣ ＩｇＧと共に４℃で約１０分間インキュベートする。非接着細胞を、吸引によって除去し、そしてプレートをＨＢＳＳ－０．１％ ＢＳＡ－０．２ｍＭ ＥＧＴＡで３回洗浄し、そして遠心分離する。この細胞ペレットを、ＨＢＳＳ－ＭＥＭに再懸濁し、そしてＲＢＣパニングを繰り返す。第二のＲＢＣパニングの後、細胞数および生存率を、再び決定する。

【０１１９】

次いで、ＲＢＣパニング後に回収された細胞を、マウスモノクローナル抗体ＯＸ－４３（１／２００＝１５μｇ／ｍｌ、ＭＣＡ ２７６、Ｂｉｏｐｒｏｄｕｃｔｓ ｆｏｒ Ｓｃｉｅｎｃｅ、Ｉｎｄｉａｎａｐｏｌｉｓ、Ｉｎｄ．）およびモノクローナル抗体３７４．３（１／５００～１／７５０、Ｒ．ＦａｒｉｓおよびＤ．Ｈｉｘｏｎ、Ｂｒｏｗｎ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ、Ｐｒｏｖｉｄｅｎｃｅ、Ｒ．Ｉ．から入手可能）と共に同時に４℃で４０分間インキュベートすることによって、懸濁物中で標識する。二次抗体は、ＰＥ結合体化抗マウスＩｇＧ、重鎖特異的（Ｓｏｕｔｈｅｒｎ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ Ｉｎｃ．、Ａｌａ．）およびＦＩＴＣ結合体化抗マウスＩｇＭ、重鎖特異的（Ｓｉｇｍａ Ｃｈｅｍｉｃａｌ Ｃｏ．、Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ、Ｍｏ．）である。

【０１２０】

分類前の細胞および分類後の細胞を、４℃でＨＢＳＳ－ＭＥＭ中で維持する。抗体標識後、１０μｇ／ｍｌのヨウ化プロピジウムを各サンプルに添加する。蛍光活性化細胞分類を、６０ｍＷの出力で４Ｗのアルゴンレーザーを使用し、そして１００μｍのノズルを使用して、Ｂｅｃｔｏｎ Ｃｉｃｋｉｎｓｏｎ ＦＡＣＳＴＡＲ$^+$（Ｓａｎ Ｊｏｓｅ、ＣＡ）を用いて実行する。４８８ｎｍの蛍光発光を、ＦＩＴＣについては５３０／３０ｎｍ帯通過フィルター、ＰＥについては５８５／４２ｎｍ帯通過フィルターの通過後に、収集する。蛍光測定を、ＦＬ１（ＦＩＴＣ）対ＦＬ２（ＰＥ）の二パラメータープロット上の対数増幅を使用して実施する。蛍光が、陰性コントロール細胞の９５％より高い場合に、細胞は陽性であるとみなされる。

【０１２１】

細胞の物理学的特徴の測定のために、ＦＡＣＳＴＡＲ＋パラメーターは、ＦＳＣゲイン８およびＳＳＣゲイン８である。ＨＢＳＳを、閾値液体として利用する。表形式のデータを獲得し、そしてＬｙｓｉｓＩＩソフトウェアを使用して分析する。

【０１２２】
単一抗体に対する陽性度を決定するために、蛍光対側方散乱のドットブロットを使用する。密度プロットＦＬ１対ＦＬ２を使用して、両方の抗原の発現に関して集団を選択する。分類増強モジュールを、非直角ゲーティングのために使用し、そして目的の集団を選択するために多パラメーターゲーティングを使用する。
【０１２３】
全ての集団から分類された細胞を、基本培地としてのα－ＭＥＭを含む無血清のホルモン的に規定された培地に配置し、これに以下の成分を添加する：インスリン（１０μｇ／ｍｌ）；ＥＧＦ（０．０１μｇ／ｍｌ、Ｕｐｓｔａｔｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ、Ｌａｋｅ Ｐｌａｃｉｄ、Ｎ．Ｙ．）；成長ホルモン（１０μＵ／ｍｌ）；プロラクチン（２０ｍＵ／ｍｌ）；トリヨードサイロニン（10^{-7}Ｍ）；デキサメタゾン（10^{-7}Ｍ）；鉄飽和トランスフェリン（１０μｇ／ｍｌ）；フォリン酸（10^{-8}Ｍ、Ｇｉｂｃｏ ＢＲＬ、Ｇｒａｎｄ Ｉｓｌａｎｄ、Ｎ．Ｙ．）、遊離脂肪酸混合物（７．６ｍＥｑ／Ｌ；Ｎｕ－Ｃｈｅｋ－Ｐｒｅｐ、Ｅｌｙｓｉａｎ、Ｍｉｎｎ．）；プトレシン（０．０２μｇ／ｍｌ）；ヒポキサンチン（０．２４μｇ／ｍｌ）；チミジン（０．０７μｇ／ｍｌ）；ウシアルブミン（０．１％、フラクションＶ、脂肪酸フリー、Ｍｉｌｅｓ Ｉｎｃ．Ｋａｎｋａｋｅｅ、Ｉｌｌ．）；微量元素；$CuSO_4 \cdot 5H_2O$（０．０００００２５ｍｇ／ｌ）、$FeSO_4 \cdot 7H_2O$（０．８ｍｇ／ｌ）、$MnSO_4 \cdot 7H_2O$（０．０００００２４ｍｇ／ｌ）、$(NH_4)_6Mo_7O_2 \cdot 4H_2O$（０．００１２ｍｇ／ｌ）、$NiCl_2 \cdot 6H_2O$（０．０００００１２ｍｇ／ｌ）、$NH_4VO_3$（０．０００００５８ｍｇ／ｌ）、$H_2SeO_3$（０．０００３９ｍｇ／ｌ）；Ｈｅｐｅｓ（３１ｍＭ）およびゲンタマイシン（１０μｇ／ｍｌ、Ｇｉｂｃｏ ＢＲＬ、Ｇｒａｎｄ Ｉｓｌａｎｄ、Ｎ．Ｙ．）［ＨＤＭ］。試薬は、他を特定しない限り、Ｓｉｇｍａ Ｃｈｅｍｉｃａｌ Ｃｏｍｐａｎｙ、Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ、Ｍｏ．によって供給される。微量元素混合物は、Ｉ．Ｌｅｍｉｓｈｋａ博士、Ｐｒｉｎｓｔｏｎ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ、ＮＪから入手可能である。
【０１２４】
各培養集団のアリコートおよび種々の細胞懸濁物のサイトスピンを、氷冷エタノールまたはアセトンと混合する。１％のＢＳＡを含むＰＢＳでの、室温で３０分間のブロッキング後、混合した細胞を、以下の一次抗体を使用して、間接的免疫蛍光によって研究する：ポリクローナルウサギ抗ラットアルブミン（Ｕｎｉｔｅｄ Ｓｔａｔｅｓ Ｂｉｏｃｈｅｍｉｃａｌ Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ、Ｃｌｅｖｅｌａｎｄ、Ｏｈｉｏ）、ウサギ抗マウスＡＦＰ抗血清（ＩＣＮ Ｂｉｏｍｅｄｉｃａｌ，Ｉｎ．、Ｃｏｓｔａ Ｍｅｓａ、Ｃａｌｉｆ．）、モノクローナルマウス抗ヒトサイトケラチン１９（Ａｍｅｒｓｈａｍ Ｌｉｆｅ Ｓｃｉｅｎｃｅ、Ａｒｌｉｎｇｔｏｎ Ｈｅｉｇｈｔｓ，ＩＩＩ．）、ポリクローナルウサギ抗ヒトＩＧＦ ＩＩレセプター（Ｍｉｃｈａｅｌ Ｃｚｅｃｈ博士、Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ ｏｆ Ｗｏｒｃｈｅｒｓｔｅｒ、Ｍａｓｓ）、マウスモノクローナル抗ラット－Ｔｈｙ－１（ＯＸ－７、Ｂｉｏｐｒｏｄｕｃｔｓ ｆｏｒ Ｓｃｉｅｎｃｅ、Ｉｎｄｉａｎａｐｏｌｉｓ、Ｉｎｄ．）、モノクローナルマウス抗デスミン（Ｂｏｅｈｒｉｎｇｅｒ Ｍａｎｎｈｅｉｍ、Ｉｎｄｉａｎａｐｏｌｉｓ、Ｉｎｄ．）、および２５８．２６（出生後肝細胞およびいくつかの胎仔肝臓実質細胞を同定するモノクローナルマウス抗ラット抗体）（Ｒ．Ｆａｒｉｓ博士およびＤ．Ｈｉｘｏｎ博士、Ｂｒｏｗｎ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ、ＲＩ）。二次抗体としては、一次抗体に対応する種特異的なローダミン結合体化抗体が挙げられる。陰性コントロールは、マウスＩｇＧもしくはウサギＩｇＧまたはマウスアイソタイプコントロールで染色された細胞からなる。新たに単離された成体肝細胞を、アルブミン染色についての陽性コントロールとして使用する。γ－グルタミルトランスペプチダーゼ（ＧＧＴ）を、Ｒｕｔｅｎｂｅｒｇら、Ｊ．Ｈｉｓｔ．Ｃｙｔ．（１９６９）、第１７巻、５１７－５２６頁によって記載される方法を使用して、エタノール固定された細胞の免疫化学によってアッセイする。
【０１２５】

主に未成熟の前駆肝細胞を含む細胞集団を、アルブミン、α－フェトプロテインおよびＧＧＴを発現する集団として同定する。いくつかの例において、これらの細胞の同定を、これらの細胞のマーカーについてノーザンブロット分析および／またはウェスタンブロット分析によって確認し、これらの分析は、本明細書中に記載され、当該分野で公知である。

【０１２６】

得られる肝臓前駆細胞を、ＨＤＭ中で維持し、そして以下に記載のように本発明に従って分析する。

【０１２７】

（方法３）

肝臓を、妊娠１５日目のラット胎仔から切り出し、そして０．８ｍＭ $MgCl_2$、２０ｍＭ ＨＥＰＥＳ（ｐＨ７．３）を含む、氷冷したCa^{2+}フリーのＨＢＳＳ中に配置し、そして室温で約１分間穏やかに攪拌する。非肝組織の除去後、肝臓を、穏やかに粉砕し、次いで、１ｍＭ $CaCl_2$および０．０６％のＤＮＡｓｅＩ（Ｂｏｅｈｒｉｎｇｅｒ Ｍａｎｎｈｅｉｍ、Ｉｎｄｉａｎａｐｏｌｉｓ、Ｉｎｄ．）を含むＨＢＳＳ中の０．６％のＩＶ型コラゲナーゼ（Ｓｉｇｍａ Ｃｈｅｍｉｃａｌ Ｃｏ．、Ｌｏｔ １１Ｈ６８３０、Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ、Ｍｏ．）と共に３７℃で約１０～１５分間攪拌する。５分間隔で、組織断片を、１ｇで堆積させる。上清を回収し、そして新鮮なコラゲナーゼ溶液を添加する。分散した細胞をプールし、５ｍＭ ＥＧＴＡを含むＨＢＳＳ中に懸濁し、そして１ｇの下で４６μｍの組織収集器（Ｂｅｌｌｃｏ Ｇｌａｓｓ，Ｉｎｃ．、Ｖｉｎｅｌａｎｄ、Ｎ．Ｙ．）を通して濾過する。得られた細胞懸濁物を、４５０ｇの下で４℃で約５分間遠心分離する。細胞ペレットを、０．２ｍＭ ＥＧＴＡおよび０．５％のＢＳＡを含むＨＢＳＳ（ＨＢＳＳ－ＥＧＴＡ－０．５％ ＢＳＡ）中に再懸濁し、そして細胞数を、推定する。細胞生存率を、０．０４％のトリパンブルーの除外によって評価し、そして懸濁物のアリコートを、４５０ｇで約５分間遠心分離する。

【０１２８】

造血細胞および内皮細胞を、抗体被覆したポリスチレン皿上に免疫接着させる（ｉｍｍｕｎｏａｄｈｅｒｅ）ために、パニング皿を、標準的な手順に従って、ウサギ抗ラットＲＢＣ ＩｇＧ（Ｉｎｔｅｒ－ｃｅｌｌ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ，Ｉｎｃ．、Ｈｏｐｅｗｅｌｌ、Ｎ．Ｊ．）およびマウスの全ＩｇＧ分子に対するヤギＩｇＧ（Ｍ－３０１４、Ｓｉｇｍａ、Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ、Ｍｏ．）を用いて調製する。０．０５Ｍ Ｔｒｉｓ（ｐＨ９．５）で希釈した抗体（０．５ｍｇ／皿）を、表面を均一に被覆するように１００mm^2の細菌学的ポリスチレンペトリ皿（Ｆａｌｃｏｎ、Ｌｉｎｃｏｌｎ Ｐａｒｋ、Ｎ．Ｊ．）に注ぐ。この皿ぎ、そして室温で約４０分間インキュベートする。被覆された皿をＰＢＳで洗浄し、次いで使用の前に０．１％のＢＳＡを含むＨＢＳＳで洗浄する。

【０１２９】

3×10^7細胞までの細胞を含む細胞懸濁物を、被覆された皿中で４℃で約１０分間インキュベートする。非接着細胞を含む上清を、傾けて旋回させながら穏やかな吸引によって除去し、ＨＢＳＳ－ＥＧＴＡ－０．１％ ＢＳＡでの洗浄と組み合わせ、そして４５０ｇの下で４℃で約５分間遠心分離する。細胞をプールし、そしてウサギ抗ラットＲＢＳ ＩｇＧで被覆した新たな皿を用いて再パニングする。次いで、非接着細胞を上記のように除去し、そして1×10^7／ｍｌの濃度でＨＢＳＳ－ＥＧＴＡ－０．５％ ＢＳＡで再懸濁する。次いで、富化された肝細胞を、マウスモノクローナル抗体ＯＸ－４３（１５μｇ／ｍｌ、ＭＣＡ ２７６、Ｓｅｒｏｔｅｃ、Ｉｎｄｉａｎａｐｏｌｉｓ、Ｉｎｄ．）と共に４℃で４０分間同時にインキュベートする。洗浄後、肝細胞の富化を、ヤギ抗マウス全ＩｇＧ抗体で被覆した皿中で４℃で１０分間細胞をパニングすることによって達成する。非接着細胞を、上記のように除去する。

【０１３０】

得られる肝臓前駆細胞を、ＨＤＭ中で維持し（上記の方法３を参照のこと）、そして以下に記載のように本発明に従って分析する。

【０１３１】

（方法４）
肝臓前駆細胞を、Ｎａｕｇｈｔｏｎら、米国特許第５，５５９，０２２号に記載される方法に従って単離する。簡単にいうと、肝臓を、標準的な手順に従って成体ラットから取り出す。この肝臓を、改良したブフナー漏斗に置き、そしてＣａ$^{2+}$および０．０５ｇ／ｄｌ　ＩＶ型コラゲナーゼ（Ｓｉｇｍａ　Ｃｈｅｍｉｃａｌ　Ｃｏ．，ＭＯ）を含む緩衝液を用いて、再循環系内で約１５～２０分間、灌流する。次いでこの肝臓を、１．５％のＢＳＡを補充したコラゲナーゼ緩衝液を含むペトリ皿に移し、そして肝細胞を、グリソン鞘の穿孔の後に懸濁液中に遊離させ、１８５μｍナイロンシーブを通して濾過し、遠心分離によってペレットにし、そして完全培地（培地５００ｍｌあたり、６％ウシ胎仔血清および１０％ウマ血清を用いて馴化し、そして３５μｌのグルカゴン（Ｓｉｇｍａ＃Ｇ９２６１）、１０μｇのインスリン（Ｓｉｇｍａ＃１４０１１）、０．２５ｇのグルコース、および２５０μｌのヘミコハク酸ヒドロコルチゾンを補充したＤＭＥＭ）中に再懸濁する。肝臓細胞を、Ｐｅｒｃｏｌｌ勾配遠心分離を使用して、亜集団に分離する。

【０１３２】
肝臓前駆細胞を得るために、大きな集団（直径約３０μｍ）の好酸性細胞（これは増殖し、そして培養において成熟肝細胞に類似の細胞に分化する）を、以下のように分離する：新鮮な単離された肝臓細胞の単一細胞の懸濁液を遠心分離し（５００×ｇ／５分）、そしてこのペレットを培地に再懸濁する。この細胞懸濁液を、「ニート（ｎｅａｔ）」Ｐｅｒｃｏｌｌおよび１×ＰＢＳの７０％ｖ／ｖ溶液の２５ｍｌにわたり重層し、そして８００×ｇで１０分間遠心分離する。（４つのうち）下方２つの帯域をプールし、洗浄し、そして２５％／５０％（ｖ／ｖ、ニートＰｅｒｃｏｌｌ／１×ＰＢＳ）不連続勾配に対して遠心分離し、明確な界面帯域およびペレットを得る。この界面（密度＝１．０３８１ｇ／ｍｌ）は、約９０％の大きな、軽い好酸性の、複数の隆起した（ｐｒｏｍｉｎｅｎｔ）仁を有する単核細胞または二核細胞からなる。次いで、この方法によって得られる肝臓前駆細胞を、以下に記載するように、本発明に従って分析する。

【０１３３】
（方法５）
肝臓前駆細胞を、Ｆａｒｉｓ，ＰＣＴ公開ＷＯ００／０３００１に記載される方法に従って単離する。簡単にいうと、肝臓を切除し、細かく刻み、そして０．１Ｍ　Ｈｅｐｅｓを有するＨＢＳＳを含む懸濁緩衝液に入れる。この細かく刻んだ組織を、３７℃にて滅菌プレート上で約４０～５０分間インキュベートする。この合わせた懸濁液を、２３０ミクロンのスチールメッシュフィルター、そして６０ミクロンのナイロンメッシュフィルターを通して連続して濾過する。フィルター上に残っている残留物を洗浄して流し、そして消化緩衝液中に入れる。この消化緩衝液は、０．０２ｇのウシ血清アルブミン、０．１Ｍ　Ｈｅｐｅｓ、$CaCl_2$（５００ｍＭ）、ＳＴＩ（０．０２５ｇ／１００ｍｌ；Ｇｉｂｃｏ）、およびコラゲナーゼＩＶ型（６０単位／ｍｌ）、ｐＨ７．４～７．５を含む、ＣＭＦ培地（Ｇｉｂｃｏ）溶液である。細胞を、振盪水浴中で３７℃でインキュベートする。２０分後、この細胞懸濁液をチューブに移し、そして重力下で沈降させる。

【０１３４】
次いで、この上清および残留物（沈降した物質）を分離する。この上清をデカントし、そして８０×ｇで５分間遠心分離する。新鮮な消化緩衝液を、細胞に添加し、そしてこの細胞を、振盪水浴中に戻す。遠心分離の後に残るペレットを、洗浄緩衝液（ＤＭＥＭ－Ｆ１２およびＢＳＡ（１ｇ／１００ｍｌ）ｐＨ７．２～７．３）で再懸濁する。

【０１３５】
この細胞懸濁液を、６０ミクロンのナイロンメッシュフィルターを通して濾過し、次いで当容積の９０％Ｐｅｒｃｏｌｌおよび１０％　１０×ＤＭＥＭ－Ｆ１２と混合する。これを、３００×ｇで約５分間遠心分離する。このペレットを、（上記のように）洗浄緩衝液中に再懸濁し、そして１２０×ｇで約５分間、遠心分離する。次いでこのペレットを、洗浄緩衝液中に再懸濁する。

【０１３６】

ラット胆管および中皮細胞に特異的なマウスモノクローナル抗体（ＩｇＧ$_{2b}$）に結合体化させたＤｙｎａｂｅａｄを細胞懸濁液に添加し、そしてローテーターで４℃にて、約１０分間インキュベートする。次いでこの懸濁液を、磁石に置き、抗体陽性細胞を取り出し、これを捨てる。この工程を、少なくとも３回以上繰り返す。抗体陰性細胞を、ＣＣＡＭ（例えば、抗ラット細胞－ＣＡＭ　１０５；Ｅｎｄｏｇｅｎ）に特異的な抗体に結合体化させたＤｙｎａｂｅａｄと共にさらなるインキュベートに供し、そして付着した幹細胞を有する抗体陽性細胞（例えば、ダブレットおよびトリプレットのような細胞クラスター）を、培養し、そしてサイトスピンする。

【０１３７】

単離された細胞の培養物を、トリプシン処理して細胞クラスターを解離させ、次いで、細胞マーカー（例えば、ＣＫ１９（Ａｍｅｒｓｈａｍ）、ＣＣＡＭ（Ｅｎｄｏｇｅｎ）、ジペプチジルペプチダーゼ－４（Ｅｎｄｏｇｅｎ））に特異的な抗体を磁気ビーズと組み合わせて曝露し、ＦＡＣＳ分類して幹細胞を富化する。

【０１３８】

この方法によって得られた肝臓前駆細胞を、以下に記載されるように、本発明に従って分析する。

【０１３９】

（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）

上記のように単離された細胞を、ラットの尾の腱から抽出されたＩ型コラーゲンでコーティングされたウェル中に、高密度（例えば、１ウェルあたり５０，０００～１００，０００細胞／ｃｍ^2）でプレートして細胞を分化させる。所定の毒性を有する薬物（例えば、トログリタゾン（ｔｒｏｇｌｉｔａｚｏｎｅ））（これは、糖尿病の制御のために所望される薬物であり、まれにではあるが重篤な肝臓毒性を示し、最近市場から排除された）を、ＬＳＣを含むプレートの１つの群（「Ａ」群）に、約２０μＭ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トレート（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５０μＭでプレートの第２の群（「Ｂ」群）に添加する。培養細胞を含むプレートの第３の群（「Ｃ１」群）を、コントロールとして働くように、薬物を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（「Ｃ２」群）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、培養物を収集し、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、ダンスホモジナイズする。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の０日目に採取する。

【０１４０】

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（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分画する）に入れ、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）スピンする。約２５μＬ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。

【０１４１】

サンプルを、表面増強レーザー脱着／イオン化（ｓｕｒｆａｃｅ　ｅｎｈａｎｃｅｄ　ｌａｓｅｒ　ｄｅｓｏｒｐｔｉｏｎ／ｉｏｎｉｚａｔｉｏｎ）（「ＳＥＬＤＩ」）によって

分配し、そしてタンパク質を、質量分析法によって検出する。ＳＥＬＤＩは、タンパク質を最適な表面上で捕捉することを可能にし、これは、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）に従って分画を可能にする。

【０１４２】

Ｃｉｐｈｅｒｇｅｎ順相チップ（ｎｏｒｍａｌ　ｐｈａｓｅ　ｃｈｉｐ）（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離する。各画分の約１μｌ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」）の約０．５μＬ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アプライする。

【０１４３】

チップを、Ｃｉｐｈｅｒｇｅｎ　Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｂｉｏｌｏｇｙ　Ｓｙｓｔｅｍ　１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ィールを、１つを低レーザー強度（フィルターアウト（ｆｉｌｔｅｒ　ｏｕｔ）１５）、そしてもう１つを高レーザー強度（フィルターアウト５０）、検出器設定を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ィールを、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超過を、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。

【０１４４】

（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、抗癌剤をその組織毒性または器官毒性についてスクリーニングするためのＬＳＣ系の使用を例示する。

【０１４５】

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剤の両方）を、ＬＳＣ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集めるために選択する。さらに、化合物を、活性の関連した既知の機構に関して、および以前の研究において使用された化合物に関してヒトを用いたインビトロ細胞培養物効果の臨床結果に相関するように選択する。表３。

【０１４６】

【表３】

表 3

薬物	毒性 Dev	肝臓	CV	GI	CNS	腎臓	血液	機構
クロロキノキサリン スルホンアミド			+			+		?
ジデムニンB(didemnin B)				+				?
ｼｸﾛﾘﾝｽﾎｽﾌｧﾐﾄﾞ(cyclosophosphamide)			+					アルキル化剤
ビゼレシン(bizelesin)							+	アルキル化剤
カルボプラスチン				+			+	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
ｴｸﾃｲﾅｼｼﾞﾝ(ecteinascidin)743							+	アルキル化剤
ﾍﾟﾝｸﾛﾒｼﾞﾝ(penclomedine)					+			アルキル化剤
メトトレキサート	+	+						代謝拮抗剤
フザラビン(fuzarabine)							+	代謝拮抗剤
フルダラビン							+	代謝拮抗剤
フラボピリドール(flavopiridol)				+				CdKインヒビター
ドキソルビシン			+					DNAインターカレーター
アモナフィド							+	DNAインターカレーター
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
ﾃﾞｵｷｼｽﾍﾟﾙｸﾞｱﾘﾝ(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

"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ＬＳＣ培養物、あるいは適切な場合には類似の機能または用量限定的毒性を有する関連した薬物で処置したＬＳＣ培養物と比較する。類似もしくは関連した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集めることによって、遺伝子発現における共通の変化を、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。

【０１４７】
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を使用する逆転写反応を用いて、コントロールＲＮＡおよび試験ＲＮＡから生成させる。これらのプローブは、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。検証されたヒトクローンの１５，０００個の配列および８７００個のマウスクローンの収集物を使用して、ｃＤＮＡマイクロアレイを作製するのに用い得る。これらのマイクロアレイは、種々の薬剤で処置されたＬＳＣ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。

【０１４８】

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、このオリゴヌクレオチドプローブの高密度アレイは、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場合、この高密度アレイにハイブリダイズされる。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ＬＳＣおよび試験ＬＳＣ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、レーザー照射スキャ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。

【０１４９】

簡単に言うと、ＲＮＡは、コントロールＬＳＣおよび処理されたＬＳＣから単離される。総ＲＮＡを、Ｑｉａｇｅｎ製のＲＮＡｅａｓｙキットを使用して調製する。続いて、ＲＮＡを、Ｃｙ３またはＣｙ５　ｄＵＴＰのいずれかを用いて、１回の逆転写で標識する。得られた標識ｃＤＮＡを、濃縮された容積中で混合し、そしてアレイにハイブリダイズさせる。ハイブリダイゼーションを、蒸発を防ぐように特注で設計したチャンバー中で６５℃で一晩、インキュベートする。ハイブリダイゼーションの後、チップを特注の共焦点レーザースキャナでスキャンし、これにより、Ｃｙ３チャネルおよびｃｙ５チャ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を用いて分析する。これらの拡張は、それぞれのスポットにわたるシグナルの統合、指定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正規化、および統計学的計算により、割合が異常値であるか、または処理によって有意に変化した遺伝子のリストを作成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／または時間にわた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、今だに有効である。赤／緑の割合によって、１つの集団　対　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、このデータはその遺伝子の誘導／下方調節のレベルの絶対値ではない。アレイに対する、サンプルの各々の対を、３連で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、ノーザンブロットまたはＲＴ－ＰＣＲ）によって検証される。

【０１５０】

各々の薬物を、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ＬＳＣクラスターで試験する。細胞数（増殖）、発現した／発現していない、および／もしくは特定の分化マーカー／特徴（分化）を示す細胞の量、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」遺伝子を使用して正規化する。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、ＬＳＣ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を提供する。

【０１５１】

（ｂ．タンパク質発現プロフィールの構築）

選択された抗癌剤のタンパク質発現プロフィールを、実施例２に記載されるように、Ｃｉ

ｐｈｅｒｇｅｎ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ＬＳＣ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、そして等しいタンパク質質量を、製造業者のプロトコールを使用して、タンパク質アレイチップに直接適用する。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質量を内部較正および定量的な標準として、添加することが好適であり得る。それぞれのチップは、２つの薬物を３連で分析し得る。ストリンジェントな条件および実験的な複製を行った後、１つの試験化合物あたり平均して６つのＰｒｏｔｅｉｎＣｈｉｐｓ^{TM}を使用する。

【０１５２】

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を自動的に読出した値を評価し得る。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正規化し、そして薬物処理された細胞中に見出されるタンパク質の読出し値から、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。このデータ分析は、薬物によって刺激されるタンパク質発現、および発現が薬物によって阻害されるコントロール細胞中にのみ見出されるタンパク質を明らかにする。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値を提供する。複数のサンプルの分析は、タンパク質発現における平均の倍数変化値および可変性の相対的な測定値を提供する。これは、タンパク質変化の統計的な尺度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、ヒトにおける毒性の類似の形態を誘導する薬物が、ＬＳＣ中のタンパク質発現において類様の変化を引き起こすか否かを決定する。各々の薬物を、ＬＳＣの少なくとも３つの別々の群で分析する。

【０１５３】

本明細書中で引用されるすべての刊行物および特許出願は、刊行物または特許出願の各々が詳細にかつ個々に参考として援用されることを示すように、本明細書中で参考として援用される。

【０１５４】

前述の本発明は、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、ある種の変更および改変が、添付の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本発明に対してなされ得ることが、本発明の教示を鑑みて、当業者に容易に理解される。

【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ＬＳＣとコントロールＬＳＣ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、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ＬＳＣ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ＬＳＣの質量スペクトルであり、そして図１Ａの下のバンドは、第二の試験化学組成物（試験組成物ＩＩ）に曝露されたＬＳＣ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１Ｂおよび図１Ｃは、試験ＬＳＣとコントロールＬＳＣ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、それぞれの試験ＬＳＣおよびコントロールＬＳＣ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、そしてその棒の高さは、化学組成物に曝露されないＬＳＣによる発現量と比較された、試験組成物に曝露されたＬＳＣによるタンパク質発現量を示す。図１Ｂ：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ＬＳＣのタンパク質発現。図１Ｃ：コントロールのタンパク質発現と比較した、試験組成物ＩＩと

接触させた試験ＬＳＣのタンパク質発現。

【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２Ａ：化学組成物に曝露されていないコントロールＬＳＣのタンパク質発現。図２Ｂ：試験組成物Ｉに曝露されたＬＳＣのタンパク質発現。図２Ｃ：試験化合物ＩＩに曝露されたＬＳＣ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ＬＳＣ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３Ａ：化学組成物に曝露されていないコントロールＬＳＣのタンパク質発現。図３Ｂ：試験組成物Ｉに曝露されたＬＳＣのタンパク質発現。図３Ｃ：試験化合物ＩＩに曝露されたＬＳＣ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ＬＳＣ間の異なる量で発現されたタンパク質を示す。

【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４Ａ：化学組成物に曝露されていないコントロールＬＳＣのタンパク質発現。図４Ｂ：試験組成物Ｉに曝露されたＬＳＣのタンパク質発現。図４Ｃ：試験化合物ＩＩに曝露されたＬＳＣ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ＬＳＣ間の異なる量で発現されたタンパク質を示す。

【図１】

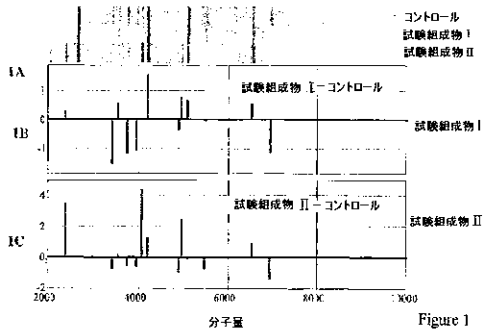

Figure 1

【図２】

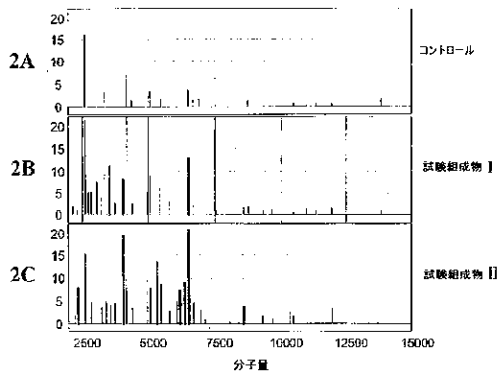

Figure 2

【図３】

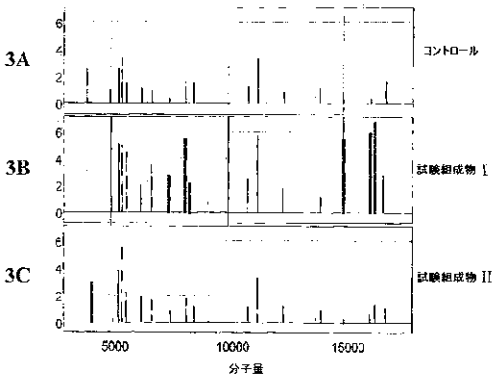

Figure 3

【図４】

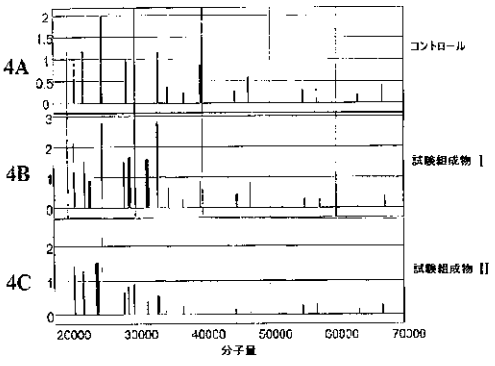

Figure 4

【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 01/96866 A1

(51) International Patent Classification⁷: G01N 33/50, C12Q 1/68

(21) International Application Number: PCT/US01/19187

(22) International Filing Date: 14 June 2001 (14.06.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/211,606 14 June 2000 (14.06.2000) US

(71) Applicant (*for all designated States except US*): VISTAGEN, 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 LLP, 755 Page Mill Road, Palo Alto, CA 94304-1018 (US).

(81) Designated States (*nationals*): 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.

(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, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, 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 01/96866 A1

(54) Title: TOXICITY TYPING USING LIVER 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 LSCs contacted with various chemical compositions of known and unknown toxicities, and correlating the molecular profiles with toxicities of the chemical compositions.

TOXICITY TYPING USING LIVER STEM CELLS

CROSS_REFERENCE TO RELATED APPLICATIONS

This application claims the priority benefit of the provisional patent application U.S. Serial No. 60/211,606, filed June 14, 2000, which is hereby incorporated by reference in its entirety.

TECHNICAL FIELD

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

BACKGROUND ART

Advances in methods of modern drug discovery such as those utilizing high throughput screening assays of combinatorial chemical libraries continue to provide us with unprecedented numbers of drug candidates for treatment of diseases. However, the problem of drug toxicity to the host system continues to be a significant rate-limiting step in the translation of drug candidates from the laboratory to the healthcare setting. Similar toxicity problems hinder the development of industrial and household chemicals as well. Besides being expensive and time-consuming, currently available toxicological screening assays fail to detect all toxicities associated with human therapy. For instance, as much as one third of all prospective human therapeutics fail in the first phase of human clinical trials because of unexpected toxicity. 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.

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 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* (1998), 282:396-399. 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* (1988), 44(10):807-817. 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 types that alter the expression of a very small number of genes whose identity is known and expression level can be specifically measured.

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.

Largely because it performs a vital role in detoxifying poisonous substances in the body, the liver is the site wherein the toxicity effects of substances are most frequently and severely manifested. *See, e.g.*, Table 1. Therefore, toxicity assays that focus primarily on the effects of potentially toxic compounds on cells related to or found in the liver would be expected to be particularly informative.

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 and that is most relevant to the common target(s) of toxic effects. What is further needed is a means of doing so which is relevant to the effect of the composition on whole organisms or tissues, without the cost, time, and ethical ramification of animal and human testing. The present invention 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 methods of creating a molecular profile of a chemical composition, comprising the steps of a) contacting an isolated population of mammalian liver stem cells (LSCs) with the chemical composition; and b) recording alterations in gene

expression or protein expression in the mammalian LSCs in response to the chemical composition to create a molecular profile of the chemical composition.

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 LSCs with a chemical composition having predetermined toxicities; b) recording alterations in gene expression or protein expression in the mammalian LSCs in 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) 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 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 LSCs with that of an identified chemical composition with predetermined toxicity. In one aspect, the test chemical composition can be the same as the 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 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 chemical composition can be ranked according to a comparison of its molecular profile in LSCs to those of chemical compositions with predetermined toxicities.

LSCs in the present invention can be of human or non-human 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 can also be detected by mass spectrometry. The chemical composition can be 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, nematicides, 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 LSCs 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 LSCs 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 LSCs 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 LSCs 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 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

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

Figure 1A illustrates a half-tone reproduction of a readout from a mass spectrometer. The top band is the mass spectrum for control LSCs, which are grown in the absence of either of the test chemical compositions. The middle band is the mass spectrum for the LSCs 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 LSCs exposed to a second test chemical composition (test composition II).

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

controls. Figure 1C: protein expression of test LSCs contacted with test composition II, compared to protein expression of controls.

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 LSCs not exposed to the chemical composition. Figure 2B: Protein expression of LSCs exposed to test composition I. Figure 2C: Protein expression of LSCs exposed to test composition II. Bold lines indicate proteins expressed in different amounts between LSCs 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 LSCs not exposed to the chemical composition. Figure 3B: Protein expression of LSCs exposed to test composition I. Figure 3C: Protein expression of LSCs exposed to test composition II. Bold lines indicate proteins expressed in different amounts between LSCs 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 LSCs not exposed to the chemical composition. Figure 4B: Protein expression of LSCs exposed to test composition I. Figure 4C: Protein expression of LSCs exposed to test composition II. Bold lines indicate proteins expressed in different amounts between LSCs exposed to each of the two test chemical compositions.

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 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 LSC 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 LSCs exposed to a chemical agent expresses a protein not expressed by control LSCs, or it can mean the overall pattern of gene or protein expression of LSCs. The phrase can include gene or protein expression in LSCs at one or more time points and/or stages along the pathway of their differentiation, growth, and/or development into fully-differentiated liver cells.

The phrase does not include gene or protein expression in fully-differentiated liver cells.

"LSC type" or "type of LSC" as used herein refer to LSCs isolated from a particular source (as defined by, for example, species, tissue, age of source) and/or according to a particular LSC 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 both, in LSCs contacted by the chemical composition compared to similar LSCs 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 LSCs contacted by a chemical composition compared to like LSCs 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 LSCs 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 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 pluripotent liver stem cells (LSCs). LSCs are the formative pluripotential progenitor cells that are capable of differentiating into multiple epithelial cell types of the liver and/or other tissues/organs, such as the pancreas and intestine. Generally, these are progenitor cells that are capable of developing into either hepatocytes or bile duct cells. However, it is thought that that they are also capable of differentiating into other cell types. LSCs have been found and isolated as hepatoblasts (a preferred form of LSC for the purpose of this invention), generally at the embryonic development stage, in the hepatic diverticulum of the foregut. They have also been isolated from adult liver as cells

that have stem cell or stem cell-like characteristics. For the purpose of this invention, oval cells found in adult liver are also LSCs. Because of its pluripotency in differentiating into multiple tissue types, an isolated population of LSCs 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, LSCs possess many advantages over other types of stem cells such as embryonic stem cells (ES). LSCs are relatively easy to isolate and purify from a number of sources. They are also relatively amenable to expansion in culture and to be subject to modified conditions such as drug treatments. Obtaining ES cells, on the other hand, can be very 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. LSCs also offer a significant advantage over other stem cells in that they are the progenitor cells for the hepatocytes and bile duct cells, which are the predominant cells in liver, which is the organ most susceptible to toxicity due to drugs and other substances (*see, for e.g.*, Table 1). Therefore, toxicity assays that focus on the cellular components and development of the liver would be expected to offer a more direct assessment of the potential toxicity of a significant number of test compounds. Furthermore, since LSCs can be isolated from live individuals, such as through a needle or small wedge biopsy of adult liver, the present invention provides means to enable the development of toxicity profiles for individual patients or patient populations that have unique drug sensitivities, an area that would be almost impossible to achieve if using ES cells for toxicity assay. Recent technology developments allow the isolation of these cells from cadavers in some cases up to 24 hours after death.

The LSCs 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 LSC population comprises at least 51% pluripotent cells. More preferably, the

LSC population comprises at least 75% pluripotent cells. And still more preferably, the LSC population comprises at least 95% pluripotent cells.

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

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.

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 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 which they exert toxicities.

TABLE 1

	TOXICITIES						
DRUGS	DEV	LIVER	CV	CNS	BLOOD	INDICATION	TRADE NAMES
thalidomide	+						
methotrexate	+					antineoplastics	
retinoic acid	+					acne	
valproic acid	+	+				seizures	Depakene
acetominophen		+				analgesic	
isoniazid		+				antibiotic	
diclofenac (NSAIDS)		+				anti-inflammatory	Voltarem
bromofenac (NSAIDS)		+				anti-inflammatory	Duract
troglitazone		+				diabetes	Rezulin™
rosiglitazone		ntc				diabetes	Avandia™
trovaflozacin		+				antibiotic	Trovan™
ciprofloxacin		ntc				antibiotic	Cipro™
erythromycin estolate		+				antibiotic	
pravastatin		+				lipid lowering	Pravachol™
atorvastin		+				lipid lowering	Lipitor™
clofibrate		ntc				lipid lowering	Atromid
clozapine					+	antipsychotic	Clozaril
chloroamphenicol					+	antibiotic	Chloromycetin
doxorubicin			+			antineoplastics	
daunorubicin			+			antineoplastics	
cyclosopbosphamide			+			antineoplastics	
COMPOUNDS							
carbon tetrachloride		+					
cadmium		+					
phallodidin		+					
ethanol		+					
di-methyl formide		+					
dichlorethylene		+					
lead		+					
benzo(a)pyrene			+				
allylamine			+				
methylmercury				+			
trimethyltin				+			
carbon disulfide				+			
acrylamide				+			
hexachloraphene				+			
DMSO	not well studied						

"ntc" = non-toxic, limited toxicity, control
"Dev" = developmental "CV" = cardiovascular "CNS" = central nervous system

In one embodiment of the invention, compositions known for having liver toxicities are used for a systematic analysis of their molecular profiles in LSCs. In another embodiment, compositions causing toxicities to the cardiovascular system are evaluated for their molecular profiles in LSCs. In yet another embodiment of the invention, compositions causing toxicities to the neuronal system are evaluated for their molecular profiles in LSCs. 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 LSCs 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 LSCs exposed to the test chemical composition to that of LSCs exposed to chemical compositions of known toxicity.

C. PREPARING LSCs

Methods for preparing LSCs of human or other mammalian species are known in the art. For example, Reid et al., U.S. Patent Nos. 5,576,207 and 5,789,246, describe methods for isolation and expansion of immature cells whose progeny may differentiate into various liver cells. These cells can be isolated from various tissues, including liver, pancreas, gut, lung and bone marrow. The immature (precursor) cells can be dissociated from the tissue source by standard procedures such as enzymatic and mechanical dissociation. The dissociated cell population can further be enriched for precursor cells by standard methods, such as using antibodies that recognize an epitope of the precursor cells (such epitopes are known in the art, and examples are provided below). Expansion of the precursor cells is achieved by culturing the cells in the presence of an extracellular matrix, liver stromal cells and growth factors. Other conditions suitable for isolation and expansion of these cells are also disclosed. These precursor cells may differentiate into hepatocytes, bile duct cells, liver endothelial cells, and Ito cells.

Methods of isolating hepatoblasts are also known. For example, Reid et al., U.S. Patent No. 6,069,005, describe an isolation method using panning techniques and fluorescence activated cell sorting. These hepatic progenitor cells are isolated by dissociating liver cells, followed by panning and sorting (by fluorescence activated cell sorting) utilizing antibodies to reduce the amount of contaminating cell types.

Another method for isolating, characterizing and culturing liver progenitor cells is described in Naughton et al., U.S. Patent No. 5,559,022. Liver

progenitor cells are isolated by density gradient centrifugation, and distinguished from other liver parenchymal cells by their morphology, staining characteristics, high proliferative activity and ability to differentiate in vitro.

Another method for obtaining liver stem cells is described in Faris, PCT Publication WO00/03001. Faris describes methods of isolating primary liver stem cells from fetal, pediatric or adult liver tissue that is based on the propensity of liver stem cells to participate in cell clusters with hepatocytes, with further enrichment achieved by immunosubtraction, selective enzymatic digestion and antibody affinity selection.

Isolation of bile duct progenitor cells which are capable of giving rise to various differentiated cells, including cells of the hepatic lineage, is described in Pang et al., U.S. Patent No. 5,861,313. A population of cells having a microarchitecture of a mammalian bile duct, such as a bile duct explant, is cultured, and contacted with agents that cause proliferation of progenitor cells in the cultured population. Subsequently, the progenitor cells are isolated, such as by direct mechanical separation from the rest of the explant or by dissolution of all or a portion of the explant. Various conditions suitable for isolation and culturing of the progenitor cells are provided in the reference.

Isolation of conditionally transformed liver progenitor cells with phenotypic similarities to hepatoblasts has also been described. Fiorino et al., *In Vitro Cell. Dev. Biol.--Animal*(1998), 34:247-258 , describe the isolation of cells capable of being induced to express various differentiation markers of liver cells.

The lineage-specific differentiation of LSCs can be induced by various bioactive factors and/or conditions that are well known in the art. These are described in, for example, Brill et al., Extracellular matrix regulation of growth and gene expression in liver cell lineages and hepatomas *In* Liver Biology and Pathobiology (1994), pp. 869-897 (Raven Press, NY); Reid and Luntz, Ex vivo maintenance of differentiated mammalian cells *In* Basic Cell Culture Protocols (1997), 75:31-57 (Humana Press, Totowa, NJ); Reid and Luntz (1997), *Methods in Molecular Biology* (1997), 75:31-57; *see, generally*, Reid, Stem cell/lineage biology and lineage-dependent extracellular matrix chemistry: keys to

tissue engineering of quiescent tissues such as liver *In* Textbook of Tissue Engineering (1997), (R.G. Landes/Academic Press, Austrin, TX); Brill et al., *Differentiation* (1995), 59:95-102; Brill et al., *Digestive Diseases & Sciences* (1999), 44:364-371; and Faris, PCT Publication WO00/03001. For example, differentiation of liver progenitor cells can be achieved by removal of conditions known to maintain the cells in undifferentiated form or by administering one of several known growth factors, such as HGF, FGF and IGF-II. Differentiation of liver stem cells can also be induced by contact with liver tissue, i.e., other hepatocytes or cell matrix components known in the art. Presence of dexamethasone in culture medium has been shown to induce differentiation of embryonic mouse liver cells along both the hepatocyte and bile duct lineages. Supplementation of culture medium with serum, insulin, dexamethasone and dimethyl sulfoxide induces cells isolated from E12 rat liver to express hepatocyte markers, whereas exposure of these cells to sodium butyrate causes expression of bile duct cell markers. *See, generally*, Grisham and Thorgeirsson, Liver stem cells *In* Stem Cells pp. 233-282 (Academic Press, London) (1997); Shiojiri and Mizuno, *Anat. Embryol.* (1993), 187:221-229; Gall and Bhathal, *J. Exp. Pathol.* (1990), 71:41-50; and Germain et al., *Cancer Res.* (1988), 48:4909:4918.

LSCs obtained for use in the present invention can be identified by their distinct properties as known in the art and described in references cited herein. For example, liver stem cells tend to be smaller than their more differentiated descendants, have a high nuclear to cytoplasmic ratio, undifferentiated and pale nuclei, and a few intercellular adhesions. Reid et al., U.S. Patent No. 6,069,005. Naughton et al. describe the hepatic progenitor cells isolated by their method as having a low nuclear to cytoplasmic ratio, staining with specific characteristics when contacted with a combination of acidic and basic stains, and having higher proliferation rates in culture than do mature liver cells. Naughton et al., U.S. Patent 5,559,022.

Alternatively, the LSCs 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 LSCs at a defined stage. For example,

Grisham and Thorgeirsson, *supra*, describe a substantial list of antibody markers commonly used to assess differentiation and to trace lineage of liver epithelial cells, including OC.2 and OC.3, which are markers expressed in hepatoblasts but not hepatocytes. Also, antibodies to cytokeratins could be useful in evaluating liver epithelial cell lineage and differentiation. For example, Moll et al., *Cell* (1982), 31:11-24; Osborn and Weber, *Cell* (1982), 31:303-306; Marceau, *Lab. Invest.* (1990), 63:4-20; Shiojiri et al., *Cancer Res.* (1991), 51:2611-2620; and Blouin et al., *Differentiation* (1992), 52:45-54, have reported that all types of epithelial cells express combinations of between two and ten cytokeratins (CK), and that the particular combination of CKs expressed by the cells, such as the combination of CKs that are the equivalent to human CKs 8, 18, 7, and 19 (and rarely CK 14), indicate differentiated forms of liver epithelial cells.

If necessary, LSCs 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).

The LSCs used to test the chemical composition can be of any vertebrate species. The choice of the particular species from which the LSCs 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 LSCs will be of particular interest for use with compositions being tested as potential human therapeutics, while equine, feline, bovine, porcine, caprine, canine, or sheep LSCs may be of more interest for a potential veterinary therapeutic.

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 LSCs. For some testing, it may be desirable to use LSCs from mice, rats, guinea pigs, rabbits, and other readily available, and less expensive, laboratory animals.

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 LSCs derived from mice or rats permits the correlation of the alterations in gene or protein expression in the LSCs with the toxicities exhibited by these agents in those species. LSCs of other species commonly used in preclinical testing, such as guinea pigs, rabbits, pigs, and dogs, are also preferred for the same reason. Typically, LSCs 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.

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 closer to that of humans than those of the more common laboratory animals. LSCs 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 LSCs, since conclusions about the toxicity of agents in these LSCs 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 LSCs will be performed to confirm results of toxicity studies in LSCs of other species.

Fifth, with respect to human therapeutics, regulatory agencies generally require animal data before human trials can begin; it will generally be desirable to use LSCs of species which will be used in the preclinical animal studies. The results of toxicity testing in the LSCs 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.* (1978), 22:133-138; Duncan, *Adv. Sci.* (1967), 23:537-541. 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.

While LSCs 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 LSCs, the LSCs used as controls and those used to test the effects of the chemical compositions are derived from the same species.

D. CONTACTING LSCs WITH CHEMICAL COMPOSITIONS

1. General

Once a LSC 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 LSCs are cultured, permitting the determination of the alteration in protein or gene expression on the development of all the tissues of the LSCs. It may be of interest, however, to focus the study on the effect of the composition on a particular liver cell type. As previously noted, individual differentiated cells, such as hepatocytes and bile duct cells, are known to develop in the presence of specific inducing factors and/or conditions, and can be identified by specific cell markers. Such factors, conditions and markers are known in the art, and examples are provided herein 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 LSCs. In one embodiment, the chemical composition is contacted with LSCs maintained in undifferentiated form. In another embodiment, addition of the chemical composition is staged to occur at the time the cell type/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 cell type/tissue of interest.

3. Dosing of the chemical composition

Different amounts of a chemical composition will be used to contact LSCs 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 LSCs 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 LSCs is correlated with the concentration(s) at which the chemical composition is contacted with the LSCs. 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 LSCs is correlated with the concentration(s) at which the chemical composition is contacted with the LSCs. 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 LSC 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 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 LSCs contacted with a chemical composition whose effect is of interest ("test samples") and samples from LSCs 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 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 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 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 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 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 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 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 LSCs is quantitated and then subtracted from the quantitated protein expression of LSCs contacted with a chemical composition, with only the proteins expressed in greater or lesser quantities than those expressed by the control LSCs 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* (1988), 241:1077-1080; Wu *et al.*, *Genomics* (1989), 4:560-569; Barany, *in* PCR Methods and Applications, 1:5-16 (1991); and Barany, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1991), 88:189-193. 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*, Levenson 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 Levenson 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, ^{32}P 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 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 cells. *See, e.g.*, Velculescu, *et al.*, *Science* (1995), 270:368-369; Zhang, *et al.*, Science (1997), 276:1268-1272.

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 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.

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. 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 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), markets GeneChip™ Probe arrays containing thousands of different 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 ^{32}P, ^{35}S, 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 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.*, ^{3}H, ^{125}I, ^{35}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.* polystyrene, 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.*, *Science* (1998), 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, *Science* (1998), 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 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. 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 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.

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 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. 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

The invention contemplates multiple iterations of compiling a library of molecular profiles by contacting test LSCs with an ever-widening 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 LSCs. 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 LSCs 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 LSCs, 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 LSCs

Species	Source	Isolation method
Various, including human, rodent, rabbit, bovine	Various, including liver, pancreas, gut, lung, bone marrow	Reid et al., U.S. Patent 5,576,207 and 5,789,246
Rat	Day 14 fetal liver	Reid et al., U.S. Patent No. 6,069,005
Rat	Day 15 fetal liver	Reid et al., U.S. Patent No. 6,069,005
Rat	6-9 week adult liver	Naughton et al., U.S. Patent No. 5,559,022
Rat	Adult liver	Faris, PCT Publication WO00/03001
Rat or mouse	Adult or neonatal common bile duct	Pang et al., U.S. Patent 5,861,313

The invention contemplates that each iteration of contacting test LSCs with a chemical composition will generate a pattern of gene or protein expression, or both, characteristic for that chemical composition and/or LSC 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 LSCs 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 LSCs contacted by the test chemical composition as described in the previous sections. 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 LSCs 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 LSCs 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 LSCs. 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 LSCs 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 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 LSCs ("control samples") against that of the LSCs 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 LSCs. 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 LSCs grown in the absence of test chemical compositions, the middle band would be the spectrum for the LSCs 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 LSCs exposed to a second test chemical compound (test composition II).

Figures 1B and 1C graphically illustrate differences in protein expression level between LSCs contacted with one of the test chemical compositions ("test LSCs") and control LSCs grown in standard tissue growth medium without added chemical compositions. These panels illustrate computational subtractions of identical proteins between the respective test LSCs and the control LSCs to indicate only those proteins which are significantly different in expression between the test and the control LSCs. Each bar represents a single protein and the length of the bar represents the amount of protein expressed by the LSCs exposed to the test composition compared to the amount expressed by the control LSCs. A bar above the center line indicates that the test LSCs express more of that protein than do the control LSCs; a bar below the line indicates that the test LSCs express less of that protein.

Figure 1B illustrates differences in the nuclear proteins expressed by LSCs grown in the presence of test composition I compared to control LSCs.

Figure 1C illustrates the differences in the nuclear proteins expressed by the LSCs grown in the presence of test composition II, and the control. (Both the test and the control LSCs 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 LSCs 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 LSCs 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 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 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 LSC 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 LSCs. In Figure 2, the top panel, 2A, graphs the level of protein expression, as determined by mass spectroscopy, in the LSCs 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 LSCs exposed to test composition I. And the bottom panel, 2C, illustrates the level of expression of LSCs 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 LSCs exposed to the two chemical compositions tested are the same, although perhaps at different levels of expression, and that others are different, and that both reveal a different pattern of expression than do the control LSCs not exposed to either composition.

Figure 3 illustrates the level of expression of small cytoplasmic proteins in the same three groups of LSCs 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 LSCs 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 LSCs 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 LSCs exposed to the test chemical compositions, and between those protein expression patterns and that of the LSCs 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 LSCs, 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 LSCs contacted with a test composition I and in the control LSCs not contacted with either composition. This protein, therefore, would be deemed as highly expressed in LSCs 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 LSCs exposed to test composition I, but is not expressed at all by the control LSCs. 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.

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 Solutions, LLC (Atlanta, GA).

H. ADAPTING ARRAY READERS

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 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 LSCs contacted with known or unknown toxic chemical compositions. The array reader can, however, be adapted with a detection device suitable to "read" labels that can not be read optically, such as electronic transponders.

I. USE IN HIGH THROUGHPUT SCREENING

The methods of the invention can be readily adapted to high throughput screening. High throughput ("HTP") screening is highly desirable 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 LSCs 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. (1997), 69:2626-2630; Turgeon, M., *Med Lab. Management Rept*, Dec. 1997, page 1.

EXAMPLES

Example 1. Selecting chemical compounds for toxicity screening

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 LSCs contacted 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 having developmental toxicities are similarly established using the LSC 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.

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 LSCs exposed to these drugs. Similarly, antibiotics with similar toxicities can also be assessed for their alterations in gene or protein expression patterns in LSCs. 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 liver stem cells, the exposure of the liver stem cells to different chemical agents having pre-determined tissue or organ toxicities, and the determination of changes in protein expression in the liver stem cells.

Isolation of cells

Human liver progenitor cells are isolated, purified and culture-expanded according to methods described below:

Method 1:

Liver precursor cells are isolated according to Reid et al., U.S. Patent Nos. 5,576,207 and 5,789,246. Briefly, a liver section is placed in an ice-cold PBS solution that contain 500-5000 mg/L glucose, and 2-10% antibiotics (e.g., penicillin and streptomycin). The liver section is minced and sequentially

digested with a solution containing collagenase, pronase and deoxyribonuclease, prepared in a saline solution containing 1 mM $CaCl_2$. Digestion is done at 37°C in a shaking water bath for about 20 minutes. The partially digested tissue is then strained through a tissue sieve by gravity and the undigested remnants are re-digested two times. Collected cells are then washed with saline solution. Cells are plated on or in a matrix of collagen Type IV so as to allow them to polarize and feed through a basal surface such as a Millicell support. Matrix -bound cells are provided with an embryonic liver-derived stromal cell feeder layer, and cultured in a basal medium (e.g., RPMI 1640, Ham's F10, Ham's F12) containing less than 0.4 mM calcium and 10 µg/ml insulin, 10 µU/ml growth hormone, 20 mU/ml prolactin, 10 µg/ml glucagon, 50 ng/ml EGF, 10^{-8}M dexamethasone, 10^{-9}M T3, $3X10^{-10}$M selenium, 10^{-7}M copper and 10^{-10}M zinc (medium containing the foregoing is hereinafter referred to as "medium A"). Alternatively, the medium further contains 0.4% bovine serum albumin, 76 mEq per liter of free fatty acid mixture having 31% palmitic acid, 2.8% palmitoleic acid, 11.6% stearic acid, 13.4% oleic acid, 35.6% linoleic acid and 5.6% linolenic acid (medium containing the foregoing is hereinafter referred to as "medium B"). Medium A or B containing 10^{-6}M dexamathasone, 0.1 to 100 µg/ml insulin, 50 ng/ml multi-stimulating activity (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO), 25 to 100 ng/ml EGF, 10^{-4}M norepinephrine, 25 µl/ml hepatopoietins and 10 ng/ml FGF's, can also be used. Liver precursor cells obtained by this method are analyzed according to the present invention as described below.

Method 2:

Hepatoblasts are isolated according to the methods described in Reid et al., U.S. Patent No. 6,069,005. Briefly, livers are dissected from rat fetuses of gestational day 14, and placed in fresh ice-cold Hank's Salt Solution (HBSS). After all tissues are collected and non-hepatic tissue removed, HBSS-5 mM EGTA is added to a final EGTA concentration of 1 mM. Livers are then gently triturated 6 to 8 times to partially disaggregate the tissue and then centrifuged at

400 g for 5 minutes at 4°C. All subsequent centrifugation steps are performed at the same settings. Supernatant is removed and the pellet of cells and tissue resuspended in 0.6% collagenase D (Boehringer Mannheim, Indianapolis, Ind.) in HBSS containing 1 mM $CaCl_2$, gently triturated and then stirred at 37°C for 15 minutes. The dispersed cells are pooled, suspended in HBSS containing 1 mM EGTA and filtered through a 46 μm tissue collector (Bellco Glass, Inc., Vineland, N.Y.). The cell suspension is centrifuged and cells resuspended in HBSS supplemented with MEM amino acids, MEM vitamins, MEM non-essential amino acids, insulin (10 μg/ml), iron-saturated transferrin (10 μg/ml), free fatty acids (7.6 mEq/L), trace elements, albumin (0.1%, fraction V, fatty acid free, Miles Inc., Kankakee, Ill.), myo-inositol (0.5 mM) and gentamicin (10 μg/ml, Gibco BRL, Grand Island, N.Y.) (HBSS-MEM). Cell number and viability are determined by hemacytometer and trypan blue exclusion.

To remove erythroid cells, panning dishes prepared according to standard procedure with a rabbit anti-rat RBC IgG (Rockland Inc., Gilbertsville, Pa.) are used. Antibodies (0.5 mg/dish) diluted in 0.05M Tris pH 9.5 are poured on 100 mm^2 bacteriological polystyrene petri dishes (Falcon, Lincoln Park, N.J.). The dishes are swirled to evenly coat the surface and incubated at room temperature for about 40 minutes. Coated dishes are washed four times with PBS and once with HBSS containing 0.1% BSA prior to use.

Cell suspension containing up to $3X10^7$ cells are incubated at 4°C for about 10 minutes in the dishes coated with the rabbit anti-rat RBC IgG. Non-adherent cells are removed by aspiration and the plates washed three times with HBSS-0.1% BSA-0.2mM EGTA and centrifuged. The cell pellet is resuspended in HBSS-MEM, and RBC panning repeated. Following the second RBC panning, cell number and viability are determined again.

Cells recovered after RBC panning are then labeled in suspension by incubating with mouse monoclonal antibody OX-43 (1/200=15 μg/ml, MCA 276, Bioproducts for Science, Indianapolis, Ind.) and monoclonal antibody 374.3 (1/500-1/750, available from R. Faris and D. Hixon, Brown University, Providence, R.I.) simultaneously at 4°C for 40 minutes. Secondary antibodies are

PE-conjugated anti-mouse IgG, heavy chain specific (Southern Biotechnology Inc., Ala.) and FITC-conjugated anti-mouse IgM, heavy chain specific (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.).

Cells before and after sorting are maintained at 4°C and in HBSS-MEM. After antibody labeling, propidium iodide at 10 μg/ml is added to each sample. Fluorescence activated cell sorting is performed with a Becton Dickinson FACSTAR+ (San Jose, CA) using a 4W argon laser with 60 mW of power and a 100 μm nozzle. Fluorescent emission at 488 nm excitation is collected after passing through a 530/30 nm band pass filter for FITC and 585/42 nm for PE. Fluorescence measurements are performed using logarithmic amplification on biparametric plots of FL1 (FITC) vs. FL2 (PE). Cells are considered positive when fluorescence is greater than 95% of the negative control cells.

For measurement of physical characteristics of cells, FACSTAR+ parameteres are FSC gain 8 and SSC gain 8. HBSS is utilized as sheath fluid. List mode data are obtained and analyzed using LysisII software.

To determine positivity to a single antibody dot plots of fluoresnce vs. side scatter are used. Density plots FL1 vs. FL2 are used to select populations with respect to expression of both antigens. A sort enhancement module is used for non-rectangular gating and use of multiparametric gating to select populations of interest.

Sorted cells from all populations are plated in a serum-free, hormonally-defined medium with α-MEM as the basal medium to which the following components are added: insulin (10 μg/ml); EGF (0.01 μg/ml, Upstate Biotechnology, Lake Placid, N.Y.); growth hormone (10 μU/ml); prolactin (20 mU/ml); Triiodothyronine (10^{-7} M); dexamethasone (10^{-7} M); iron saturated transferrin (10 μg/ml); folinic acid (10^{-8} M, Gibco BRL, Grand Island, N.Y.), free fatty acid mixture (7.6 mEq/L; Nu-Chek-Prep, Elysian, Minn.); putrescine (0.02 μg/ml); hypoxanthine (0.24 μg/ml); thymidine (0.07 μg/ml); bovine albumin (0.1%, fraction V, fatty acid free, Miles Inc. Kankakee, Ill.); trace elements; $CuSO_4.5H_2O$ (0.0000025 mg/l), $FeSO_4.7H_2O$ (0.8 mg/l), $MnSO_4.7H_2O$ (0.0000024

mg/l), $(NH_4)_6Mo_7O_2.4H_2O$ (0.0012 mg/l), $NiCl_2.6H_2O$ (0.000012 mg/l), NH_4VO_3 (0.000058 mg/l), H_2SeO_3 (0.00039 mg/l); Hepes (31 mM) and Gentamicin (10 μg/ml, Gibco BRL, Grand Island, N.Y.) [HDM]. Reagents are supplied by Sigma Chemical Company, St. Louis, Mo., unless otherwise specified. The trace element mix is available from Dr. I. Lemishka, Princeton University, NJ.

Aliquots of each cultured population as well as cytospins of various cell suspensions are fixed with ice-cold ethanol or acetone. After blocking with PBS containing 1% BSA for 30 minutes at room temperature, the fixed cells are studied by indirect immunofluorescence using the following primary antibodies: polyclonal rabbit-anti-rat albumin (United States Biochemical Corporation, Cleveland, Ohio), rabbit-anti-mouse AFP antiserum (ICN Biomedical, In., Costa Mesa, Calif.), monoclonal mouse-anti-human cytokeratin 19 (Amersham Life Science, Arlington Heights, Ill.), polyclonal rabbit-anti-human IGF II receptor (Dr. Michael Czech, University of Worchester, Mass.), mouse monoclonal anti-rat-Thy-1 (OX-7, Bioproducts for Science, Indianapolis, Ind.), monoclonal mouse-anti-desmin (Boehringer Mannheim, Indianapolis, Ind.), and 258.26, a monoclonal mouse-anti-rat antibody identifying postnatal hepatocytes as well as some fetal liver parenchymal cells (Drs. R. Faris and D. Hixon, Brown University, RI). Second antibodies include species specific Rhodamine conjugated antibodies corresponding to the primary antibodies. Negative controls consist of cells stained with mouse or rabbit IgG or mouse isotype controls. Freshly isolated adult hepatocytes are used as positive controls for albumin staining. Gamma-glutamyltranspeptidase (GGT) is assayed by immunochemistry on ethanol fixed cells using the method described by Rutenberg et al., *J. Hist. Cyt.* (1969), Vol. 17, pp. 517-526.

The cell population containing primarily immature, progenitor liver cells is identified as the population expressing albumin, alpha-fetoprotein and GGT. In some instances, the identity of the cells are confirmed by Northern and/or Western blot analysis for markers of these cells, which are described herein and known in the art.

The liver progenitor cells obtained are maintained in HDM and analyzed according to the present invention as described below.

Method 3:

Livers are dissected from rat fetuses at day 15 of gestation and placed into ice-cold, Ca^{2+}-free HBSS containing 0.8 mM $MgCl_2$, 20 mM HEPES, pH7.3 and gently agitated at room temperature for about 1 minute. After removal of non-hepatic tissue, livers are gently triturated and then stirred at 37°C for about 10-15 minutes with 0.6% type IV collagenase (Sigma Chemical Co., Lot 11H6830, St. Louis, Mo.) in HBSS containing 1 mM $CaCl_2$ and 0.06% DNAse I (Boehringer Mannheim, Indianapolis, Ind.). At 5 minute intervals, tissue fragments are allowed to sediment at 1 g. Supernatant is recovered and fresh collagenase solution added. The dispersed cells are pooled, suspended in HBSS containing 5 mM EGTA and filtered through a 46 μm tissue collector (Bellco Glass, Inc., Vineland, N.Y.) under 1 g. The resultant cell suspension is centrifuged at 4°C for about 5 minutes under 450 g. The cell pellet is resuspended in HBSS containing 0.2 mM EGTA and 0.5% BSA (HBSS-EGTA-0.5% BSA), and the cell number is estimated. Cell viability is assessed by exclusion of 0.04% trypan blue, and an aliquot of the suspension is centrifuged at 450 *g* for about 5 minutes.

To immunoadhere hemopoietic and endothelial cells onto antibody-coated polystyrene dishes, panning dishes are prepared according to standard procedures with rabbit anti-rat RBC IgG (Inter-cell Technologies, Inc., Hopewell, N.J.) and goat IgG directed towards mouse whole IgG molecule (M-3014, Sigma, St. Louis, Mo.). Antibodies (0.5 mg/dish) diluted in 0.05M Tris pH 9.5 are poured on 100 mm^2 bacteriological polystyrene petri dishes (Flacon, Lincoln Park, N.J.) to evenly coat the surface and incubated at room temperature for about 40 minutes. Coated dishes are washed with PBS and then HBSS containing 0.1% BSA prior to use.

Cell suspension containing up to $3X10^7$ cells is incubated at 4°C for 10 minutes in the coated dishes. Supernatant containing non-adherent cells is removed by gentle aspiration while tilting and swirling, combined with washes of

HBSS-EGTA-0.1% BSA, and centrifuged at 4°C for about 5 minutes under 450 *g*. Cells are pooled and repanned with a fresh dish coated with rabbit anti-rat RBS IgG. Non-adherent cells are then removed as above and resuspended with HBSS-EGTA-0.5% BSA to a concentration of $1X10^7$/ml. The enriched hepatoblasts are then incubated simultaneously at 4°C for 40 minutes with mouse monoclonal antibody OX-43 (15 μg/ml, MCA 276, Serotec, Indianapolis, Ind.). After washing, enrichment for hepatoblasts is achieved by panning cells at 4°C for 10 minutes in a dish coated with the goat anti-mouse whole IgG antibody. Non-adherent cells are removed as above.

The liver progenitor cells obtained are maintained in HDM (see method 3 above) and analyzed according to the present invention as described below.

Method 4:

Liver progenitor cells are isolated according to the methods described in Naughton et al., U.S. Patent No. 5,559,022. Briefly, liver is removed from adult rats according to standard procedures. The liver is placed on a modified Buchner funner and perfused with a buffer containing Ca^{2+} and 0.05 g/dl type IV collagenase (Sigma Chemical Co., MO) in a recirculating system for about 15-20 min. The liver is then transferred to a Petri dish containing collagenase buffer supplemented with 1.5% BSA and the hepatocytes are liberated into suspension after the perforation of Glisson's capsule, filtered through a 185 μm nylon sieve, pelleted by centrifugation, and resuspended in complete medium, DMEM conditioned with 6% fetal bovine serum and 10% equine serum and supplemented with 35 μl glucagon (Sigma #G9261), 10 μg insulin (Sigma #14011), 0.25 g glucose, and 250 μl hydrocortisone hemisuccinate per 500 ml of medium. Hepatic cells are separated into subpopulations using Percoll gradient centrifugation.

To obtain liver progenitor cells, a population of large (about 30 μm in diameter), acidophilic cells which proliferate and differentiate in culture to cells resembling mature hepatocytes is separated as follows: single cell suspensions of

freshly isolated liver cells are centrifuged (500Xg/5 min) and the pellet is resuspended in medium. The cell suspension is layered over 25 ml of a 70% v/v solution of 'neat' Percoll and 1XPBS and centrifuged at 800Xg for 10 min. The two lower zones (of 4) are pooled, washed, and centrifuged against 25%/50% (v/v/,neat Percoll/1XPBS) discontinuous gradient yielding a distinct interface zone and a pellet. The interface (density=1.0381 g/ml) consists of about 90% large, lightly acidophilic, mono- or binuclear cells with multiple, prominent nucleoli. Liver precursor cells obtained by this method are then analyzed according to the present invention as described below.

Method 5:

Liver progenitor cells are isolated according to the methods described in Faris, PCT Publication WO00/03001. Briefly, liver is excised, minced and placed in a suspension buffer containing HBSS with 0.1 M Hepes. The minced tissue is incubated at 37°C on a stirring plate for about 40-50 minutes. The combined suspension is sequentially filtered through a 230 micron steel mesh filter, and a 60 micron nylon mesh filter. Remnants remaining on the filters are washed off and placed in digestion buffer, which is a CMF media (Gibco) solution containing 0.02 g of bovine serum albumin, 0.1M Hepes, $CaCl_2$ (500 mM), STI (0.025 g/100 ml; Gibco), and collagenase Type IV (60 units/ml), @pH 7.4-7.5. Cells are incubated at 37°C in a shaker water bath. After 20 minutes, the cell suspension is removed to a tube and allowed to settle by gravity.

The supernatant and the remnant (settled material) are then separated. The supernatant is decanted and centrifuged at 80 X g for 5 minutes. Fresh digestion buffer is added to the cells and the cells placed back in the shaking water bath. The pellet remaining after the centrifugation is resuspended with washing buffer (DMEM-F12 and BSA (1 g/100 ml), @pH 7.2-7.3.

The cell suspension is filtered through a 60 micron nylon mesh filter and then mixed with an equal volume of 90% Percoll and 10% 10x DMEM-F12. This is centrifuged at 300 X g for about 5 minutes. The pellet is resuspended in

washing buffer (as described above), and centrifuged at 120 X g for about 5 minutes. The pellet is then resuspended in washing buffer.

Dynabeads conjugated to a mouse monoclonal antibody specific for rat bile duct and mesothelial cells (IgG_{2a}) are added to the cell suspension, and incubated at 4°C on a rotator for about 10 minutes. The suspension is then placed on a magnet to remove antibody-positive cells, which are discarded. This step is repeated at least 3 more times. The antibody-negative cells are subjected to more incubations with Dynabeads conjugated to an antibody specific for CCAM (e.g., anti-rat cell-CAM 105; Endogen), and antibody-positive cells with a stem cell attached (e.g., cell clusters such as doublets and triplets) are cultured and cytospinned.

Isolated cell clusters are trypsinized to dissociate the cell clusters, then exposed to antibodies specific for cell markers such as CK19 (Amersham), CCAM (Endogen), dipeptidyl peptidase-4 (Endogen) in combination with magnetic beads or FACS sorting to enrich for the stem cells.

Liver precursor cells obtained by this method are analyzed according to the present invention as described below.

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

Cells isolated as described above are plated at high density (e.g., 50,000 to 100,000 cells/cm² per well) in wells coated with type I collagen extracted from rat tail tendon, to allow differentiation of 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 LSCs. On the same day, another drug with pre-determined toxicity, such as erythromycin estolate (Sigma, catalog number E8630), 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 analyzed. Cytoplasmic and nuclear lysates are also taken on day zero prior to exposure to any test chemical compositions to serve as additional controls.

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 µL are collected for each column using the column equilibrated buffer.

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.

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 µl 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 µL of saturated sinapinic acid ("SPA") in 50% acetonitrile with 0.5% trifluroacetic 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.

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 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 LSC 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 LSCs. 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

	Toxicities							
Drugs	Dev	Liver	CV	GI	CNS	Renal	Blood	Mechanism
chloroquinoxaline sulfonamide			+			+		?
didemnin B				+				?
cyclosophosphamide			+					alkylator
bizelesin							+	alkylator

carboplatin				+			+	alkylator
cisplatin				+		+	+	alkylator
oxaliplatin					+			alkylator
ecteinascidin 743							+	alkylator
penclomedine					+			alkylator
methotrexate	+	+						anti-metabolite
fazarabine							+	anti-metabolite
fludarabine							+	anti-metabolite
flavopiridol				+				CdK inhibitor
doxorubicin			+					DNA intercalator
amonafide							+	DNA intercalator
daunorubicin			+				+	DNA syn inhib
gemcitabine		+					+	DNA syn inhib
etoposide							+	DNA syn inhib
deoxyspergualin			+					immunosuppression
camptothecin							+	topo-I inhibitor
9 aminocamptothecin							+	topo-I inhibitor
topotecan							+	topo-I inhibitor
merbarone						+		topo-II inhibitor
dolastatin 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 system

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 LSC culture not exposed to the compound or, where appropriate, LSC 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 LSC cultures treated with a variety of agents.

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 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 LSCs 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 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 simultaneous monitoring of more than 10,000 different genes.

Briefly, RNAs are isolated from control and treated LSCs. Total RNA are prepared using the RNAeasy 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 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 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 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 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 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 LSC cultures for its effects on growth, differentiation and RNA expression. Cell counts (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 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 LSC gene expression compared to control drugs or non-treated cells and for determining whether a change in RNA in the cells is relevant.

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 LSC cultures are prepared in either 0.1% SDS or Triton-X100 (0.5%) and an equal protein mass is 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 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.

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 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 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 in humans cause similar changes in protein expression in LSCs. Each drug is analyzed on at least 3 separate groups of LSCs.

All publications and patent applications cited in this specification are 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 readily apparent to those of ordinary skill in the art in light of the teachings of this invention that certain changes and modifications may be made thereto without departing from the spirit or scope of the appended claims.

CLAIMS

WHAT IS CLAIMED IS:

1. A method of creating a molecular profile of a chemical composition, comprising the steps of:

a) contacting an isolated population of mammalian liver stem cells (LSCs) with the chemical composition; and

b) recording alterations in gene expression or protein expression in the mammalian LSCs 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:

a) contacting an isolated population of mammalian liver stem cells (LSCs) with a chemical composition having predetermined toxicities;

b) recording alterations in gene expression or protein expression in the mammalian LSCs in 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) 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.

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.

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 LSCs 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.

14. The method of claim 2, wherein the LSCs 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 myotoxins.

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

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).

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

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 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:

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

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).

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

25. The method of claim 21, 22 or 23, further wherein the LSCs are of human.

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.

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.

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.

29. The method of claim 21, 22 or 23, further wherein the LSCs are of non-human mammals.

30. The method of claim 29, wherein the non-human mammals are rodents.

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.

32. The method of claim 29, 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.

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.

34. An integrated system for comparing the molecular profile in LSCs of a chemical composition to a library of molecular profiles in LSCs 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 LSCs of chemical compositions having predetermined toxicities.

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

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.

38. An integrated system for correlating the molecular profile in LSCs 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 LSCs of chemical compositions with predetermined toxicities and a program suitable for molecular profile-toxicity correlation.

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 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.

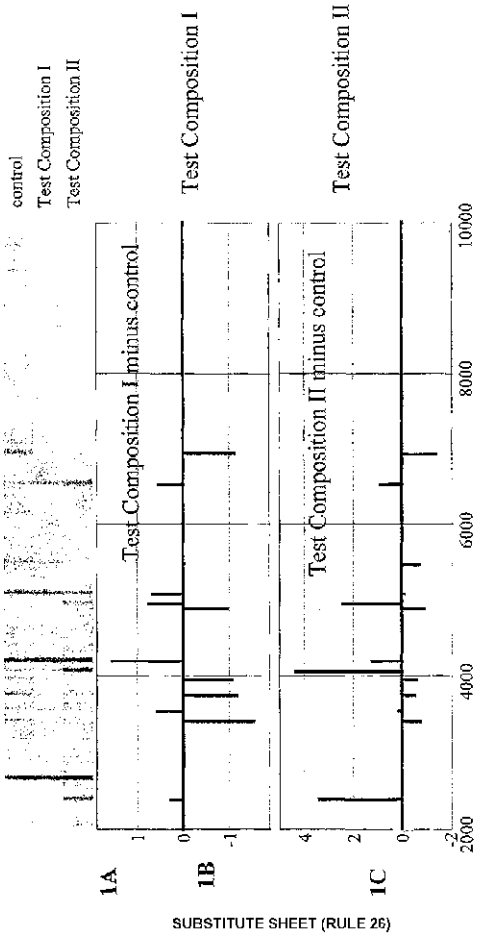
control
Test Composition I
Test Composition II
Test Composition I minus control
Test Composition II minus control
1A
1B
1C
Molecular weight
2000
4000
6000
8000
10000

Figure 1

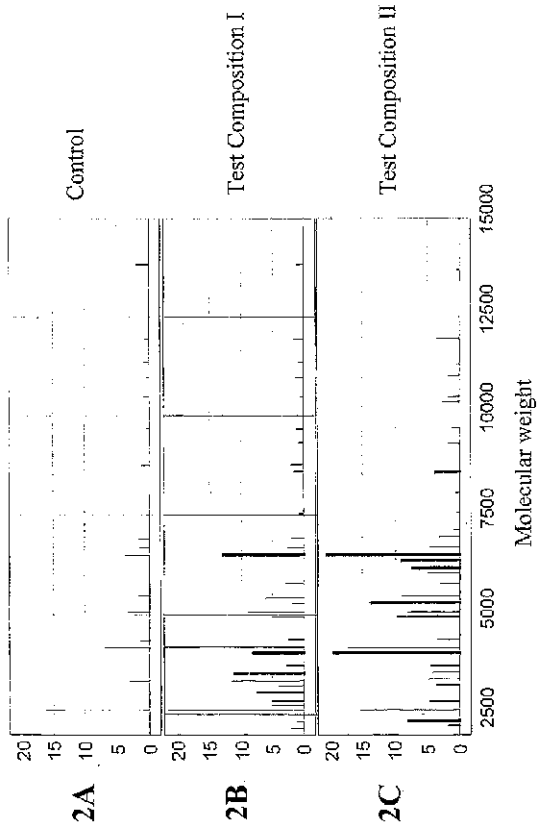
Control
Test Composition I
Test Composition II
2A
2B
2C
0
5
10
15
20
2500
5000
7500
10000
12500
15000
Molecular weight

Figure 2

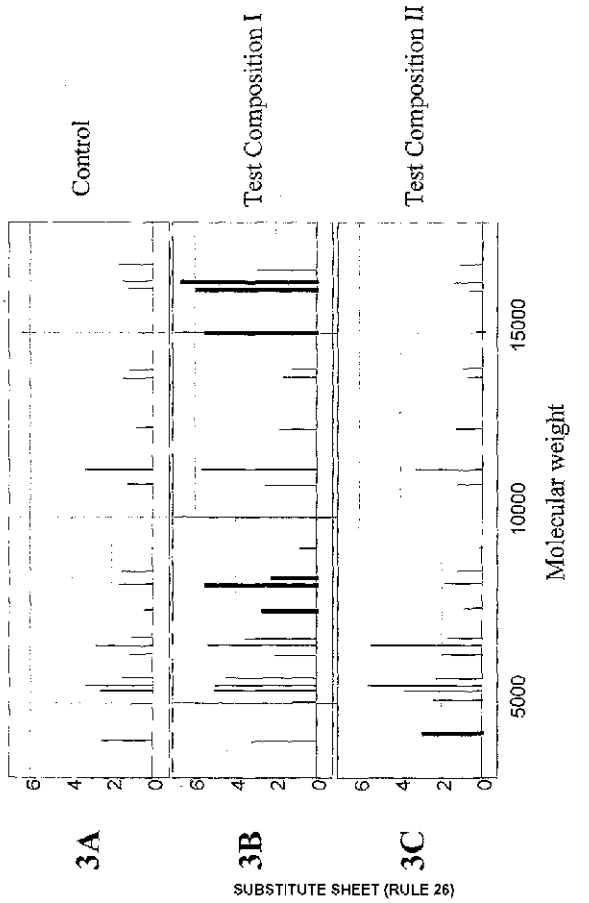
Control
Test Composition I
Test Composition II
0
2
4
6
5000
10000
15000
Molecular weight
3A
3B
3C

Figure 3

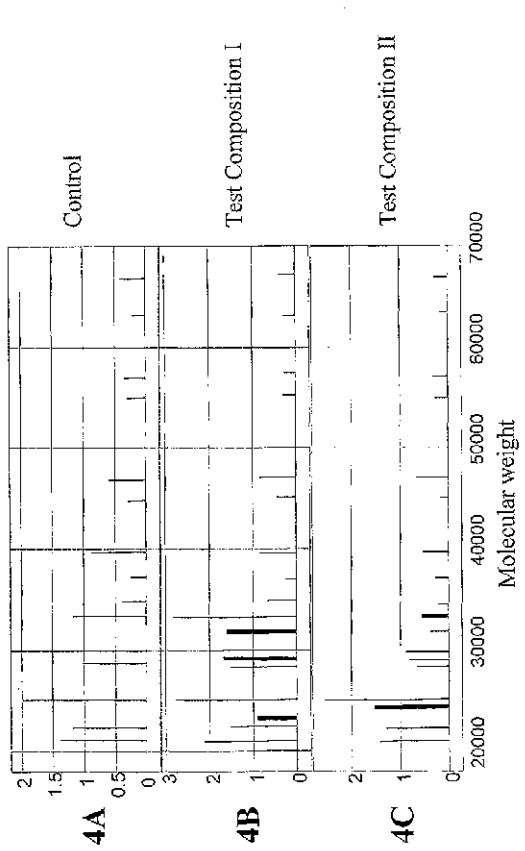
Control
Test Composition I
Test Composition II
2
1.5
1
0.5
0
3
2
1
0
2
1
0
4A
4B
4C
20000
30000
40000
50000
60000
70000
Molecular weight

Figure 4

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter Application No
PCT/US 01/19187

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 G01N33/50 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 data base consulted during the international search (name of data base and, 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.
Y	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
Y	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

-/--

[X] Further documents are listed in the continuation of box C. [X] 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.
'&' document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
12 November 2001	21/11/2001

Name and mailing address of the ISA	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Osborne, H

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/US 01/19187

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	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
Y	US 5 576 207 A (REID LOLA M ET AL) 19 November 1996 (1996-11-19) cited in the application see abstract	1-41
A	WO 99 23254 A (AFFYMETRIX INC ;NAIR ARCHANA (US); LOCKHART DAVID J (US); WARRINGT) 14 May 1999 (1999-05-14) claims 1-22	1-35
A	MAIER ET AL: "AUTOMATED ARRAY TECHNOLOGIES FOR GENE EXPRESSION PROFILING" DRUG DISCOVERY TODAY, ELSEVIER SCIENCE LTD, GB, vol. 2, no. 8, August 1997 (1997-08), pages 315-324, XP002103832 ISSN: 1359-6446 the whole document	1-35
A	WO 97 13877 A (LYNX THERAPEUTICS INC ;MARTIN DAVID W (US)) 17 April 1997 (1997-04-17) claims 1-30	1-35

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

ation on patent family members

Interna Application No
PCT/US 01/19187

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
US 5576207	A	19-11-1996	US	6146889	A	14-11-2000
			US	5789246	A	04-08-1998
			AU	667680	B2	04-04-1996
			AU	2402092	A	02-03-1993
			CA	2115140	A1	18-02-1993
			EP	0597964	A1	25-05-1994
			JP	7501206	T	09-02-1995
			WO	9303142	A1	18-02-1993
			US	6242252	B1	05-06-2001
			US	6069005	A	30-05-2000
WO 9923254	A	14-05-1999	AU	1287799	A	24-05-1999
			EP	1027456	A1	16-08-2000
			WO	9923254	A1	14-05-1999
			US	6033860	A	07-03-2000
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

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)

フロントページの続き

(51)Int.Cl.[7]	FI		テーマコード（参考）
Ｇ０１Ｎ 27/62	Ｇ０１Ｎ 33/15	Ｚ	４Ｂ０６５
Ｇ０１Ｎ 33/15	Ｇ０１Ｎ 33/50	Ｚ	
Ｇ０１Ｎ 33/50	Ｇ０１Ｎ 33/53	Ｄ	
Ｇ０１Ｎ 33/53	Ｇ０１Ｎ 33/53	Ｍ	
Ｇ０１Ｎ 33/566	Ｇ０１Ｎ 33/566		
// Ｃ１２Ｍ 1/00	Ｃ１２Ｎ 5/00	Ｅ	
	Ｃ１２Ｍ 1/00	Ａ	

(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) 2G043 BA16 DA02 EA01 EA13 EA17 FA02 KA09 LA02 LA03
2G045 AA40 DA12 DA13 DA14 FA11 FA34 FB07 JA01
4B024 AA11 BA41 CA01 GA18 HA12 HA15
4B029 AA07 AA23 BB15 BB20 CC03 FA09
4B063 QA20 QQ08 QQ53 QQ79 QQ96 QR32 QR48 QR82 QS33 QS34
QX01
4B065 AA91X AC20 BB40 CA44 CA46

专利名称(译)	使用肝干细胞分类毒性		
公开(公告)号	JP2004503256A	公开(公告)日	2004-02-05
申请号	JP2002510944	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	A01K67/027 C12M1/00 C12N5/06 C12N15/09 C12Q1/68 C12Q1/6809 G01N21/64 G01N27/62 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/566		
CPC分类号	C12Q1/6809 G01N33/5014		
FI分类号	C12N15/00.F A01K67/027 C12Q1/68.A G01N21/64.F G01N27/62.V G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/566 C12N5/00.E C12M1/00.A		
F-TERM分类号	2G043/BA16 2G043/DA02 2G043/EA01 2G043/EA13 2G043/EA17 2G043/FA02 2G043/KA09 2G043/LA02 2G043/LA03 2G045/AA40 2G045/DA12 2G045/DA13 2G045/DA14 2G045/FA11 2G045/FA34 2G045/FB07 2G045/JA01 4B024/AA11 4B024/BA41 4B024/CA01 4B024/GA18 4B024/HA12 4B024/HA15 4B029/AA07 4B029/AA23 4B029/BB15 4B029/BB20 4B029/CC03 4B029/FA09 4B063/QA20 4B063/QQ08 4B063/QQ53 4B063/QQ79 4B063/QQ96 4B063/QR32 4B063/QR48 4B063/QR82 4B063/QS33 4B063/QS34 4B063/QX01 4B065/AA91X 4B065/AC20 4B065/BB40 4B065/CA44 4B065/CA46		
代理人(译)	夏木森下		
优先权	60/211606 2000-06-14 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供了用于鉴定和分型化学组合物的毒性以及用于筛选新组合物的毒性的方法和系统。本发明涉及检测基因或蛋白质表达的改变，从而在与已知和未知毒性的各种化学组合物接触的分离的哺乳动物LSCs中建立分子谱，并将分子谱与化学组合物的毒性相关联。

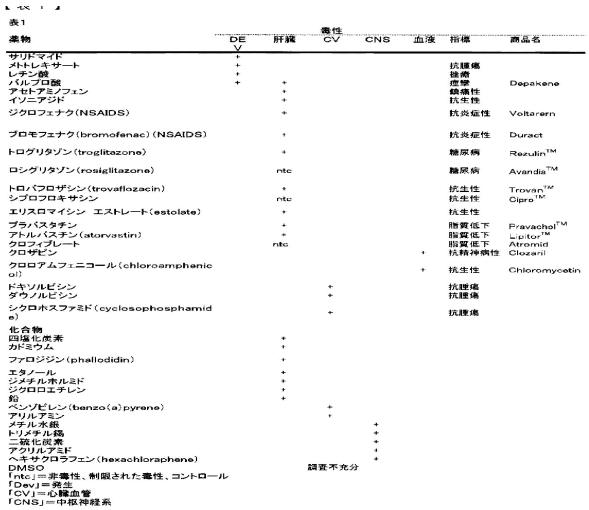

表1

薬物	毒性 DEV	肝臓	CV	CNS	血液	指標	商品名
サリドマイド	+						
メトトレキサート	+					抗腫瘍	
レチン酸	+					抵癌	
バルプロ酸	+	+				虚弱	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	Voltarern
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	Clozani
クロロアムフェニコール(chloroamphenicol)					+	抗生性	Chloromycetin
ドキソルビシン			+			抗腫瘍	
ダウノルビシン			+			抗腫瘍	
シクロホスファミド(cyclosophosphamide)			+			抗腫瘍	
化合物							
四塩化炭素		+					
カドミウム		+					
ファロジジン(phallodidin)		+					
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(hexachloraphene)				+			
DMSO			調査不充分				

「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