

(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2011-522265

(P2011-522265A)

(43) 公表日 平成23年7月28日(2011.7.28)

| | | |
|-------------------------------|--------------|-------------|
| (51) Int.Cl. | F I | テーマコード (参考) |
| GO 1 N 33/68 (2006.01) | GO 1 N 33/68 | 2 GO 4 5 |
| GO 1 N 33/53 (2006.01) | GO 1 N 33/53 | D |

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 27 頁)

| | |
|---|--|
| <p>(21) 出願番号 特願2011-512024 (P2011-512024)</p> <p>(86) (22) 出願日 平成21年6月4日 (2009.6.4)</p> <p>(85) 翻訳文提出日 平成23年2月7日 (2011.2.7)</p> <p>(86) 国際出願番号 PCT/EP2009/004016</p> <p>(87) 国際公開番号 W02009/146915</p> <p>(87) 国際公開日 平成21年12月10日 (2009.12.10)</p> <p>(31) 優先権主張番号 61/129,093</p> <p>(32) 優先日 平成20年6月4日 (2008.6.4)</p> <p>(33) 優先権主張国 米国 (US)</p> | <p>(71) 出願人 508362608 プロテオシス アクチエンゲゼルシャフト ProteoSys AG ドイツ連邦共和国 マインツ カールーツ アイス-シュトラッセ 51 Carl-Zeiss-Strasse 51, D-55129 Mainz, Germany</p> <p>(74) 代理人 100099483 弁理士 久野 琢也</p> <p>(74) 代理人 100061815 弁理士 矢野 敏雄</p> <p>(74) 代理人 100112793 弁理士 高橋 佳大</p> |
|---|--|

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 化学物質の発生毒性及び胚性毒性の *in vitro* 試験のためのタンパク質バイオマーカー

(57) 【要約】

現在、化学薬品の毒性学的評価は主として *in vivo* で種々の動物種を使用して、更にヒトの臨床的、生化学的、病理学的及び形態学的データを考慮して実施される。過去数年にわたり、幾つかの物質が子供に特に有害であることが次第に明らかになり、したがって発生中のヒトの脳の特異的な脆弱性に対して焦点が当てられている。一方で、既知の神経毒性又は催奇形性（特に神経催奇形性）危険性を有する物質を更に胚毒性についても試験するようとの勧告がある。その上、アメリカ環境保護庁（EPA）は農薬についての胚毒性試験を要求している。物質が医薬として使用されるものである場合には更なる試験が要求される（S7A Safety Pharmacology Studies for Human Pharmaceuticals, Guidelines of the International Conference on Harmonization, ICH, 2001）。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

物質の発生毒性の測定のための *in vitro* 方法であって、

(i) 細胞試料をこの物質に曝露する工程、及び

(i i) この細胞試料中の 1 又は複数のタンパク質バイオマーカーの変動をこの物質に対する曝露の結果として検出する工程を含み、

その際、タンパク質バイオマーカーが、ヒートショックタンパク質ベータ 1 (H s p B 1)、R a s - G T P アーゼ活性化タンパク質 S H 3 ドメイン結合タンパク質 (G 3 B P)、R a n 結合タンパク質 5 (R a n B P 5)、カルレティキュリン (C a l r)、ジヒドロピリミジナーゼ様 2 (D R P 2)、ストレス誘発性ホスホタンパク質 1 (S T I P 1)、U 2 a f 2 タンパク質 (U 2 A F)、カルシウム結合タンパク質 3 9、アイソフォーム C R A _ b (C a b 3 9)、N m r A 様ファミリドメイン含有 1 (N M R L 1)、及びこの後翻訳アイソフォームからなる群から選択される *in vitro* 方法。

10

【請求項 2】

細胞試料が器官試料、組織、体液、細胞、及び細胞ライセートからなる群から選択される請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】

細胞試料が脊椎動物細胞、特に哺乳類細胞、例えばヒト細胞を含む請求項 1 記載の方法

【請求項 4】

細胞試料が幹細胞、特に全能性、万能性、多能性及び / 又は複分化性幹細胞を含む請求項 1 記載の方法。

20

【請求項 5】

細胞試料が胚性幹細胞を含む、胚毒性の決定のための請求項 1 記載の方法。

【請求項 6】

工程 (i i) が 1 又は複数のバイオマーカーの定性的な又は定量的な測定を含む請求項 1 記載の方法。

【請求項 7】

細胞試料中の 1 又は複数のタンパク質バイオマーカーの変動を連続的に測定する請求項 1 記載の方法。

30

【請求項 8】

1 又は複数のバイオマーカーの測定が免疫学的アッセイ、活性アッセイ、及び / 又は分子アッセイを含む請求項 1 記載の方法。

【請求項 9】

1 又は複数のバイオマーカーの測定が蛍光検出を含む請求項 1 記載の方法。

【請求項 10】

更に、ヒートショックタンパク質 8 (H S P 8)、ストレス誘発性ホスホタンパク質 1 (P - アイソフォーム 2)、ファシンホモログ 1 アクチン束形成タンパク質 (F s c n 1)、及び異質核リボ核リボ核タンパク質 A / B アイソフォーム 2、及びこの後翻訳アイソフォームを含む群から選択される少なくとも 1 の更なるタンパク質バイオマーカーの測定を含む請求項 1 記載の方法。

40

【請求項 11】

物質の発生毒性の測定のためのバイオマーカーとしての、ヒートショックタンパク質ベータ 1 (H s p B 1)、R a s - G T P アーゼ活性化タンパク質 S H 3 ドメイン結合タンパク質 (G 3 B P)、R a n 結合タンパク質 5 (R a n B P 5)、カルレティキュリン (C a l r)、ジヒドロピリミジナーゼ様 2 (D R P 2)、ストレス誘発性ホスホタンパク質 1 (S T I P 1)、U 2 a f 2 タンパク質 (U 2 A F)、カルシウム結合タンパク質 3 9、アイソフォーム C R A _ b (C a b 3 9)、N m r A 様ファミリドメイン含有 1 (N M R L 1)、ヒートショックタンパク質 8 (H S P 8)、ファシンホモログ 1、アクチン束形成タンパク質 (F s c n 1)、ヘテロ核リボ核タンパク質 A / B アイソフォーム 2

50

(h n R N P) からなる群から選択される 1 又は複数のタンパク質の使用。

【請求項 1 2】

胚毒性の測定のための請求項 1 1 記載の使用。

【請求項 1 3】

1 又は複数の細胞試料、及び

ヒートショックタンパク質ベータ 1 (H s p B 1)、R a s - G T P アーゼ活性化タンパク質 S H 3 ドメイン結合タンパク質 (G 3 B P)、R a n 結合タンパク質 5 (R a n B P 5)、カルレティキュリン (C a l r)、ジヒドロピリミジナーゼ様 2 (D R P 2)、ストレス誘発性ホスホタンパク質 1 (S T I P 1)、U 2 a f 2 タンパク質 (U 2 A F)、カルシウム結合タンパク質 3 9、アイソフォーム C R A _ _ b (C a b 3 9)、N m r A 様ファミリードメイン含有 1 (N M R L 1) 及びこの後翻訳アイソフォーム、ヒートショックタンパク質 8 (H S P 8)、ファシンホモログ 1、アクチン束形成タンパク質 (F s c n 1)、ヘテロ核リボ核タンパク質 A / B アイソフォーム 2 (h n R N P) からなる群から選択される 1 又は複数のタンパク質バイオマーカーの測定のための手段を含む、物質の発生毒性の測定のためのキット。

10

【請求項 1 4】

細胞試料は胚性幹細胞、特にヒトの胚性幹細胞を含む請求項 1 3 記載のキット。

【請求項 1 5】

更に、ヒートショックタンパク質 8 (H S P 8)、ファシンホモログ 1、アクチン束形成タンパク質 (F s c n 1)、ヘテロ核リボ核タンパク質 A / B アイソフォーム 2 (h n R N P) からなる群から選択される少なくとも 1 の更なるタンパク質バイオマーカーの測定のための手段を含む請求項 1 3 記載のキット。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

発明の詳細な説明

背景技術

現在、化学薬品の毒性学的評価は主として *i n v i v o* で種々の動物種を使用して、更にヒトの臨床的、生化学的、病理学的及び形態学的データを考慮して実施される。過去数年にわたり、幾つかの物質が子供に特に有害であることが次第に明らかになり、このようにして発達中のヒトの脳の特殊な脆弱性に対して焦点が当てられている。一方で、既知の神経毒性又は催奇形性 (特に神経催奇形性) 危険性を有する物質を更に胚毒性についても試験するようにとの勧告がある。その上、アメリカ環境保護庁 (E P A) は農薬についての胚毒性試験を要求している。物質が医薬として使用されるものである場合には更なる試験が要求される (S7A Safety Pharmacology Studies for Human Pharmaceuticals, Guidelines of the International Conference on Harmonization, ICH, 2001)。

30

【0 0 0 2】

化学薬品の発生神経毒性の検査は、アメリカ E P A (試験ガイドライン 8 7 0 . 6 3 0 0 0) のガイドライン及び O E C D (O E C D ガイドライン 4 2 6) のドラフトガイドラインにより規制されている。これらガイドラインによる *i n v i v o* 研究は、試験動物 (通常ラット) の脳の形態学的検査、一連の挙動試験、若年動物 (成年段階まで) の発達の検査、グリオーシス及び細胞毒性についてのバイオマーカーの測定、及びその上更なるバイオマーカーの検査を含む。これら毒性試験は極めて多数の試験動物を必要とする: 約 1 4 0 匹の母系動物及び 1 0 0 0 匹のその子孫が各物質につき 3 ~ 4 ヶ月で消費されるだろう。技術的及びロジスティック的要求のために、これら *i n v i v o* 試験は極めて人員及びコスト集約的である。しかしながら、決定的な点は、相応するガイドライン及び動物においては信頼性がありかつ疑いのない終点が明らかに定義されることができないことである。この現在の試験が中枢神経系のヒト発生及び関連する毒性について正しく予測するものであるかは分からない。U S においてはこの状況のために動物権の請願及び P E T A のような保護団体によりガイドライン O P P T S 8 7 0 . 6 3 0 0 が撤回された。

40

50

【0003】

現在では、約100000の化学物質がEU市場で提供されている。しかし、信頼できる毒性学的データは、これら物質の少ないパーセンテージにだけ提供されている。とりわけ1981年前に市販された化学薬品については安全性データが欠失している。したがって、従業員、消費者及び環境のための危険性は包括的に評価されることができない。この満足のいかない状況を改善すべく、欧州委員会はRegistration, Evaluation and Authorization of Chemicalsを表すいわゆるREACHコンセプトを提出した。REACHの狙いは、年間1トンより多い体積で生産、使用又は輸出される化学物質の危険性をシステムチックに評価することである。化学薬品の安全性の証明は製造者及び二次加工業者に負担を課すものである。ヨーロッパでのREACH立法化及びUS及び日本での類似のなりゆき(Schrattenholz and Klemm, 2006及び2007)に関して、発生神経毒性について化学薬品を試験するようにとの要求により、予期できる将来には試験動物の消費が極めて増加するようになるだろう。

10

【0004】

この背景では、毒性関連スクリーニングのための、高度に予測性の、時間効率的な*in vitro*試験の開発がますます重要である。細胞培養モデルは、多くの論議を引き起こし、問題を含む、時には不快な動物実験に対する代替策として位置づけられるだろう。この目的は、極めてコスト及び時間集約的である、神経毒性、特に神経発生毒性の評価のための立法化により現在要求される動物試験を代替することである。

20

【0005】

*in vitro*モデルは数年にわたり薬理学的産業の分野において利用されてきている。この多くの現在の*in vitro*アッセイは、胚性幹細胞を使用する分化モデルを伴う。胚性幹細胞試験(EST)は極めて期待できる結果を示してきており、この試験は、強力な催奇形性物質を中程度の胚性毒性の又は非胚性毒性の化合物と区別することができた(Spielmann et al., 1997)。ESTは、*in vitro*での胚性毒性を試験するために、培養中に分化するマウス胚性幹細胞の能力を利用する。このモデルは一部限定されており、というのも、毒性学的終点が心臓分化を損なう化合物についてのみ定義されるからである。

【0006】

このようにして、化学薬品及び医薬品の毒性を、信頼性をもって決定するための改善した*in vitro*方法について当分野で要求が残っている。特に、発生毒性のための、新規の、迅速かつインテリジェントな*in vitro*試験戦略を提供することについて当分野で要求がある。

30

【0007】

本発明の課題は、化学物質の毒性、特に発生毒性を*in vitro*スクリーニングするための方法及び試薬を提供することである。

【0008】

発明の詳細な説明

本発明者らは、特定のタンパク質バイオマーカーが化学薬品及び医薬品化合物の発生毒性のために診断的であることを見出した。これらバイオマーカーに対する物質の影響力は、この物質の発生毒性について予測するものである。前記影響力は、細胞試料(その際少なくとも1のタンパク質バイオマーカーが生じる)を物質と接触させ、この物質に対する曝露の結果として細胞試料中での前記タンパク質バイオマーカーの変動を測定することにより測定されることができる。

40

【0009】

一観点において、本発明は、

(i) 細胞試料を物質に曝露する工程、及び
(ii) この細胞試料中の1又は複数のタンパク質バイオマーカーの変動をこの物質に対する曝露の結果として検出する工程を含む、
物質の発生毒性の測定のための*in vitro*方法を提供する。

50

【0010】

本発明の「タンパク質バイオマーカー」は、ヒートショックタンパク質ベータ1 (HspB1)、Ras-GTPアーゼ活性化タンパク質SH3ドメイン結合タンパク質 (G3BP)、Ran結合タンパク質5 (RanBP5)、カルレチキュリン (Calr)、ジヒドロピリミジナーゼ様2 (DRP2)、ストレス誘発性ホスホタンパク質1 (STIP1)、U2af2タンパク質 (U2AF)、カルシウム結合タンパク質39、アイソフォームCRA__b (Cab39)、NmrA様ファミリドメイン含有1 (NMRL1)、及びこの後翻訳アイソフォームからなる群から選択される。

【0011】

本発明のバイオマーカーは良く知られたタンパク質である。このタンパク質の一般的な命名法は表1にまとめてある：

10

【0012】

表1

【表 1】

| タンパク質名 | 請求項で 使用の略称 | 文献中で表される同義語 | BLAST/Expasy サーチ による高相同性タンパク質 |
|--|---------------|---|--|
| ヒートショックタンパク質 β -1 | HspB1 | ヒートショック 27 kDa タンパク質 ; HSP 27; 成長関連 25 kDa タンパク質 ; P25; HSP25; | アルファ結晶性B鎖 |
| Ras-GTP アーゼ 活性化タンパク質 SH3-ドメイン 結合タンパク質 | G3BP | Ras-GDP- 会合 エンドリボヌクレアーゼ ; G3BP; G3BP タンパク質 ; MKIAA4115 タンパク質 | |
| Ran 結合タンパク質 5 | RanBP 5 | インポーチンサブユニット β -3; カリオフェリン β -3; Kap β 3 タンパク質 ; karybeta3 | HEAT 繰り返しファミリー タンパク質 |
| カルレティキュリン | Calr | Calr タンパク質 ; Crc タンパク質 | カルレティキュリン 前駆体 ; カルレティキュリン 様 タンパク質 ;カルレティキュリン ファミリータンパク質 |
| ジヒドロピリミナーゼ様 2 | DRP2 | Ulip2タンパク質 D-ヒダントイナーゼ- 及び ジヒドロピリミナーゼ- 関連タンパク質 , コラブシン 応答メディエーター タンパク質 ; Dpysl2-prov タンパク質 ; Cmp2 タンパク質 | DRP/CRMP/DPYSL タンパク質 1 及び 3-4 |
| ストレス誘発 ホスホタンパク質 1 | STIP1 | STIP1 タンパク質 ; sti1- 様 タンパク質 ; STI1 | ヒートショックタンパク質 60; Hsc70/Hsp90- 組織化タンパク質 HOP; TPR ドメイン 含有タンパク質 |
| U2af2 タンパク質 | U2AF | U2 小核性 RNA 補助因子 2; スプライシング因子 U2AF 65 kDa サブユニット U2 小核リボヌクレオタンパク質 補助因子 ; スプライシング因子 u2af 大サブユニット | |
| カルシウム結合 タンパク質 39, アイソフォーム CRA_b | Cab39 | Cab39タンパク質 ; MO25-様 タンパク質 ; MGC68674 タンパク質 | |
| NmrA-様 ファミリードメイン 含有 1 | NMRL1 | NmrA-様 タンパク質 前駆体 ; NmrA ファミリー タンパク質 | |

10

20

30

40

【 0 0 1 3 】

「発生毒性」との用語は、妊娠の間に誘発されるか親の曝露の結果としての全ての有害作用に関する。特に、発生毒性は胚毒性を包含する。

【 0 0 1 4 】

本発明の方法における使用に適した「細胞試料」は、細胞又は細胞成分であって少なくとも1の上述のタンパク質バイオマーカーを生じることができるものを含む全ての試料で

50

ある。細胞試料は、例えば、器官、器官試料、組織、体液、細胞又は細胞ライセートから選択されてよい。

【0015】

細胞試料は好ましくは脊椎動物由来である。特に好ましいのは哺乳類の細胞試料であり、特にヒト由来である。

【0016】

好ましい一実施態様によれば、細胞試料は幹細胞を含む。幹細胞は、全能性 (omnipotent)、万能性 (pluripotent)、多能性 (multipotent) 及び / 又は複分化性幹細胞 (oligopotent) であってよい。特に好ましいのは胚性幹細胞である。最も好ましくは幹細胞はヒト胚性幹細胞 (hESC) である。

10

【0017】

本発明の方法において、工程 (i) において細胞試料が発生毒性について試験すべき物質に曝露される。好ましくは、細胞試料を試験すべき物質と接触させる前に、この1又は複数のバイオマーカのベースライン値がこの試料中で測定される。

【0018】

続いて、工程 (ii) において、細胞試料中の1又は複数のバイオマーカの変動を物質に対する曝露の結果として検出する。

【0019】

この検出は、1又は複数のタンパク質バイオマーカの定性的及び / 又は定量的な測定を含んでよい。本発明のバイオマーカは良く知られたタンパク質であり、この検出はこの分野の通常の知識内にある。例えば、この検出は、免疫学的アッセイ又はイムノアッセイを利用して実施されてよい。イムノアッセイにおいて1又は複数のタンパク質バイオマーカの存在がその抗原に対する1の又は複数の抗体の反応を用いて決定される。このアッセイは、その抗原に対する抗体の特異的結合を利用する。本発明のタンパク質バイオマーカの検出において、このバイオマーカは抗原を提示する。好ましくは、これら検出のためにモノクローナル抗体が使用され、というのもこれらは通常は特定分子の一部にだけ結合し、したがって、他の分子の存在によりあまり容易く混乱されない、より特異的かつ正確な試験を提供する。

20

【0020】

本発明の1又は複数のバイオマーカの検出のためには、この細胞試料と試験すべき物質が接触したときのこの活性、特にこの活性の変動を測定することもできる。

30

【0021】

本発明のタンパク質バイオマーカの量は、この分野において知られている種々の方法により達成可能である。例えば、イムノアッセイにおいて抗体がこのタンパク質バイオマーカのためにラベル化されていてよい。このラベルは、酵素、放射性同位体、磁性ラベル又は蛍光ラベルからなっていてよい。本発明のタンパク質バイオマーカの検出のための他の適した技術は、ウェスタンブロット及びELISAを含む。

【0022】

本発明の好ましい一実施態様において、試験すべき物質を細胞試料と接触させたときの1又は複数のバイオマーカの変動が連続的に検出される。連続アッセイのための例は、分光光度アッセイ、蛍光的 (fluorimetric) アッセイ又は化学発光アッセイである。又は、試験すべき物質と細胞試料との接触後に、1又は複数のタンパク質バイオマーカが不連続的に1回又は複数回測定される。例えば細胞試料又はこの抽出物は、クロマトグラフィ分離、例えば2又は3次元ゲル電気泳動、例えばSDS-PAGEにかけられてよい。この分離されたタンパク質は染色により可視化されてよい。このタンパク質の分子アッセイは、例えば質量分析により実施されてよい。

40

【0023】

本発明の方法の好ましい一観点によれば、少なくとも1の更なるバイオマーカが測定される。この1又は複数の更なるバイオマーカは好ましくは、一般的な細胞毒性のためのマーカである。このようにして、発生毒性と一般毒性を区別できる。物質適用とは独

50

立して挙動するが、EC50測定に相関している例示的なマーカーは次のものである：ヒートショックタンパク質8（HSP8）、ストレス誘発性ホスホタンパク質1（P-アイソフォーム2）、ファシンホモログ1アクチン束形成タンパク質（Fscn1）、異質核リボ核リボ核タンパク質A/Bアイソフォーム2、及びこの後翻訳アイソフォーム。この好ましい更なるバイオマーカーの一般的な命名法は表2にまとめてある：

【0024】

表2：一般的な毒性についてのマーカー

【表2】

| タンパク質名 | 請求項で 使用の略称 | 文献中で表される同義語 | BLAST/Expasyサーチ による高相同性タンパク質 |
|--------------------------------|---------------|--|--|
| ヒートショックタンパク質 8 | HSP8 | ヒートショック同族タンパク質 71 kDaタンパク質；ヒート ショック70kDaタンパク質8 アイソフォーム 1；Hsc70 タンパク質；MGC53952 タンパク質；ヒートショック タンパク質 70 HSP70； HSP71；HSC70； HSC71 | |
| ファシンホモログ 1,アクチン束形成 タンパク質 | Fscn1 | Fscn1 タンパク質 | Fscn タンパク質 2 及び 3 |
| 異質核リボヌクレオ | hnRNP | タイプ A/B hnRNP p38； タイプ A/B hnRNP p40； Hnrpab タンパク質；AIF- | Musashi ホモログ； RNA-結合タンパク質 Musashi ホモログ |
| タンパク質A/B アイソフォーム 2 | | C1；S1 タンパク質 C2； 核酸結合因子 pRM10； 単鎖 D box 結合因子 | |

10

20

30

【0025】

本発明の更なる一実施態様は、物質の発生毒性の評価のためのマーカーとしての上で定義した通りの1又は複数のタンパク質バイオマーカーの使用に関する。このタンパク質バイオマーカーは、毒性、発生毒性又は胚性毒性（embryotoxicity）について、全ての知られたin vivo又はin vitroモデルにおいてモニターされてよい。

【0026】

本発明の別の観点は、1又は複数の細胞試料を含む物質の発生毒性の測定のためのキットであり、その際好ましい試料は上で定義した通りである。このキットは更に、1又は複数のタンパク質バイオマーカーの測定のための手段を含む。本発明の好ましい一実施態様によれば、このキットは更に、少なくとも1の更なるバイオマーカーを測定するための手段を含む。この1又は複数の更なるバイオマーカーは好ましくは、一般的な細胞毒性のためのマーカーである。最も好ましくは、このキットは、この更なるマーカーの測定のための手段を含み、これはヒートショックタンパク質8（HSP8）、ストレス誘発性ホスホタンパク質1（P-アイソフォーム2）、ファシンホモログ1アクチン束形成タンパク質（Fscn1）、異質核リボ核リボ核タンパク質A/B（Heterologous nuclear ribonucleoproteinA/B）アイソフォーム2、及びこの後翻訳アイソフォームである。

40

【0027】

本発明のタンパク質バイオマーカーは良く知られたタンパク質である。しかしながら、本発明は、特定のタンパク質が化学薬品及び医薬品化合物の発生毒性のための診断性バイ

50

オマーカーであることを初めて説明する。

【図面の簡単な説明】

【0028】

【図1】図1は、ESTモデルにおいて物質処理によりディファレンシャルに影響を受けるタンパク質のクラスター分析を示す図である。

【0029】

実験的背景

本発明者らは、発生毒性に関連した齧歯類及びヒト試料からのタンパク質バイオマーカーの定量的及び統計学的分析にディファレンシャルプロテオミクス技術を適用している。

これら試料は次のものを含んだ：

- ・2の独立した実験室におけるEST試験のバリデーションについて実施した種々の実験からのタンパク質ライセート。標準化したプロトコル（ECVAMバリデーションされた代替試験）によりマウス胚性幹細胞から分化した心筋細胞を、既知の胚毒性効力を有する一連の物質に曝露し、用量依存的に機能制御した。

- ・既知の胚毒性物質に対する曝露後にマウス胚性幹細胞から分化した、神経細胞培養物からのタンパク質ライセート。

- ・既知の胚毒性物質に対する曝露後にヒト胚性幹細胞から分化した、神経細胞培養物からのタンパク質ライセート。

【0030】

神経性に分化したヒト胚性幹細胞からの高品質ライセートをこのタイプのディファレンシャルプロテオミクス分析にかけた。このhESC培養物をメチル水銀及びバルブプロ酸で処理した。試料（処理済み及び未処理の未分化hESC及びそれぞれの神経性前駆体を含む）を放射線標識し、前もって説明されているように、高解像度2D-PAGEを用いたディファレンシャル定量パターン分析にかけた（例えば、Schrattenholz & Groebe 2007; Groebe et al., 2007; Wozny et al., 2007）：177タンパク質スポットがこの処理によりディファレンシャルに影響を受けることが見出され、そのうち多くの重複（redundant）後翻訳アイソフォームが、自動化高スループットMALDI-TOFF質量分析を用いてこれまでに同定されている。同定したタンパク質のうち、核の、細胞骨格の、細胞外のマトリックス及びストレスタンパク質、及びタンパク質ターンオーバーに関連するタンパク質が存在する。これら知見の重要性は、mESC（心筋細胞、EST試験及びmESC神経）からの材料から得られた相応する結果の文脈において見受けるべきであり、以下において説明される。

【0031】

同様にして、パートナーにより神経細胞へと分化した、MgHgCl₂処理されたmESCからのライセート、及び、心筋細胞へと分化したmESCからのライセート（バリデーションされたEST試験のデータベースの拡張からの材料）であって異なる実験室において物質-処理後に得られたものを検査した。mESC神経細胞については、93のディファレンシャルスポットが見出され、同定された。この相応するバイオマーカーシグネチャーの生物学的重要性を以下において、更なる、しかし類似しかつ近接する、心筋細胞からのデータの文脈において説明する。

【0032】

最大のデータセットが2つの独立した実験室でESTモデルにおいて物質試験からのライセートを用いて、及び、前もって成功して試験し、公開されたプールスキーム（pooling scheme）を適用して獲得された。この戦略の鍵は、2D-PAGE又は多次元LCによる複雑な生物学的試料の分析後のタンパク質スポット及び/又はピークの複雑なパターンの定量的かつ統計学的に信頼性のある制御である（Groebe et al., 2007, Soskic et al., 2008）。

【0033】

2つの場で試験された物質は、ジノセブ、ニトロフェン、オクラトキシン-A、ロバスタチン、MAM、-アミノプロプリオニトリル、メトクロプラミジン（Metoclopramide

10

20

30

40

50

)、ドキシラミン、D - ペニシリンアミン、プラバスタチン、ワルファリン及びフロセミドを含んだ。各物質処理 E S T ライセートについての個々のディファレンシャル分析にわたって、380 のディファレンシャルタンパク質が見出され、自動化高スループット M A L D I - T O F 質量分析により同定した。広範な後翻訳修飾を示す重複タンパク質アイソフォームのかなりの数が存在した。このディファレンシャル定量データをクラスター分析にかけ(以下の図 1 に示される)、これによりこの物質を極めて意義深く分類する 3 つのクラスターが明らかになった: クラスター 1 は、主として高度に胚毒性の物質を、クラスター 2 は非胚毒性の物質を、クラスター 3 はむしろ中程度の胚毒性の物質を含む。この生物学的側面が数の観点でなく I C 5 0 値の観点においてだけ制御されるにもかかわらず、活性増幅及び細胞種のパーセンテージ、i . e . は、極めて大きい程度の異質性及び確率性を有することは留意すべきであり、にもかかわらず多量の分子データは以下のことを明らかにする:

- 1 . この分子シグネチャーは物質作用を分類できる。
- 2 . これらは失敗したか又は極めて異常 (aberrant) な実験を示すのにも役立つ。
- 3 . 約 1 5 ~ 2 0 のタンパク質バイオマーカーだけが有意に振る舞い、全ての物質について代表的である。
- 4 . これらの幾つか及び興味深いことに主として細胞骨格タンパク質が、物質又はクラスターとは独立して、全ての条件について均一な挙動を示す。我々はこれを一般的な細胞毒性又は細胞ストレスについて一層代表的なものと解釈する。
- 5 . しかし、幾つかの重複アイソフォームにおいて存在する数種のタンパク質バイオマーカーは、物質の想定される胚毒性に依存して段階的な様式で明らかに挙動する。これらは r a s 経路の制御因子及び小 G P T アーゼまた同様にカルシウム依存性 I P 3 経路の制御因子も含む。これら経路及びタンパク質は胚形成において十分確立された役割を有し、かつ、胚毒性の文脈において極端にもっともらしい。
- 6 . 進行するバイオインフォマティクス努力及びデータマイニングは、これらわずかな (> 1 0) バイオマーカー候補が胚毒性のための真のマーカーである可能性を有することを示す。

【 0 0 3 4 】

M g H g C l 及びバルプロ酸で処理された h E S C 及び m E S C 由来のニューロンから同定されたタンパク質とこれらシグネチャーとの部分オーバーラップが存在し、これは一般的な胚毒性について基礎となるマーカーの一般的な重要性を指し示す。

【 0 0 3 5 】

胚毒性のためのこの測定されたタンパク質バイオマーカーは表 3 に示されている。

【 0 0 3 6 】

表 3 : 胚毒性のためのタンパク質バイオマーカー

10

20

30

【表 3】

| タンパク質名 | マウスホモログ のための Gene bank 受託 # | クラスター 1 | クラスター 2 | クラスター 3 |
|--|--|---------|---------|---------|
| ヒートショックタンパク質 ベータ 1 (HspB1) (ヒート ショック 27 kDa タンパク質) (HSP 27) (成長関連 25 kDa タンパク質) (P25) (HSP25) | gi 547679 gi 7305173 | 下 | 上 | 上 |
| Ras-GTP アーゼ 活性化タンパク質 SH3- ドメイン 結合タンパク質 | gi 7305075 | 上 | 下 | 上 |
| Ras-GDP-会合 エンドリボヌクレアーゼ G3BP | | | | |
| Ran 結合タンパク質 5 | gi 12057236 gi 29789199 gi 148668272 | 下 | 上 | 下 |
| | gi 6680836 | 上 | 変化なし | 上 |
| 名称のないタンパク質産物 (カルレティキュリンファミリー) | gi 74200069 | 上 | 変化なし | 上 |
| ジヒドロピリミナーゼ様 2 (Ulip2 タンパク質) D-ヒダントイナーゼ 及び ジヒドロピリミナーゼ - 関連タンパク質, コラプシン応答メディエーター タンパク質 | gi 40254595 gi 1915913 | 下 | 下 | 上 |
| ストレス誘発 ホスホタンパク質 1 (P- アイソフォーム 1) | gi 13277819 | 下 | 上 | 変化なし |
| U2af2タンパク質 | gi 63101571 | 変化なし | 下 | 変化なし |
| カルシウム結合タンパク質 39, アイソフォーム CRA b | gi 148708308 gi 18044843 | 上 | 変化なし | 変化なし |
| NmrA-様 ファミリー ドメイン含有 1 | gi 24431937 | 下 | 上 | 下 |

10

20

30

40

【 0 0 3 7 】

クラスター 1 は、高度に胚毒性である物質ジノセブ、オクラトキシン、ニトロフェン、ロバスタチンを用いた E S T モデルの処理後の相応するマーカータンパク質の変化を示す；クラスター 2 は、このモデルにおいて非胚毒性物質が使用された場合（ - アミノプロプリオニトリル、メトクロプラミジン、ドキシラミン、D - ペニシルアミン）の状況を、クラスター 3 は中程度の胚毒性である物質、例えばプラバスタチン及びフロセミドの適用の作用を示す。これらマーカーの組み合わせにより物質の *in vitro* 胚毒性特性を区別することが可能になる。

【 0 0 3 8 】

50

物質適用とは独立して挙動するがESTモデルにおいてEC50測定と相関しているマーカーはむしろ一般的な細胞毒性を代表し、表4に示される。

【0039】

表4

【表4】

| タンパク質名 | マウスホモログ のための Gene bank 受託 # | クラスター 1 | クラスター 2 | クラスター 3 |
|---|--|---------|---------|---------|
| ヒートショックタンパク質 8 | gi 42542422 | 下 | 下 | 下 |
| ストレス誘発 ホスホタンパク質 1 (P-アイソフォーム 2) | gi 13277819 | 下 | 下 | 下 |
| Fscn1タンパク質, ファシン ホモログ 1, アクチン束形成タンパク質 | gi 144719132 gi 113680348 | 下 | 下 | 下 |
| 異質核リボヌクレオタンパク質 A/B アイソフォーム 2 | gi 6754222 gi 26345118 gi 12851175 | 上 | 上 | 上 |

10

20

【0040】

これらタンパク質に関連する文献にはこの表中のGene bank受託番号を使用してアクセスできる。特に、Ras-GTPアーゼ活性化タンパク質SH-3ドメイン結合タンパク質(G3BP)、ジヒドロピリミジナーゼ-関連タンパク質2(DRP2)及びRan結合タンパク質5(RanBP5)は、発生、神経発生及び胚形成において報告された役割を有する。G3BPについては胎児成長及び胚形成における決定的な役割が示されており(Zekri et al., 2005; Lypowy et al., 2005)、重要な発癌経路、例えばp53腫瘍抑制経路における関連のように、ヒトの腫瘍発生における決定的な工程である(Kim et al., 2007)。レセプターチロシンキナーゼ(RTK)/Ras-GTPアーゼ/MAPキナーゼ(MAPK)シグナリング経路が多く様々な生物学的プロセスを

30

【0041】

RanBP5の場合に同じことが当てはまり、というのはRanも同様に、上述のように処理された小GTPアーゼのRasスーパーファミリーの一員であるからである(Lundquist 2006)。

【0042】

RanBP = カリオフェリン又はトランスポートンは非常に多数のRNA結合タンパク質を核結合基質中へと細胞質中で移入し、これらを核孔複合体を通じてターゲット化し、ここでRanGTPは核中へとこれらを解離させる(例えばCansizoglu and Chook 2007)。重ねて、分化、発生及び発癌に対する役割は明白である(Teng et al., 2007)。

40

【0043】

当初はヒト中で同定されたDRP遺伝子ファミリーの4つのメンバーが哺乳類及びニワトリの胎児及び新生児脳中で主として発現されることが見出され、そして、神経系の発生における細胞内シグナル変換器であると示唆されてきた(Kitamura et al., 1999; Arimura et al., 2004; Schmidt and Strittmatter, 2007;)。DRP-2は脳の発達の間成長する軸索の経路探索に寄与すると報告されてきている(Weitzdoerfer et al., 2001; Inagaki et al., 2000)。DRP2は、神経性ストレスに対する応答において役割を果た

50

すことも示されている（例えばSommer et al., 2004; Butterfield et al., 2006）。

【0044】

興味深いことに、HspB1についても、栄養膜細胞の分化における鍵となる役割が最近報告されており、これは胎盤の適切な確立のための決定的なプロセスであり、したがって胚発生の維持に必要である（Winger et al., 2007）。HspB1は、マイトジェン活性化タンパク質キナーゼ（MAPK）経路の一部であり、幾つかの重要な細胞プロセスを媒介し、これは着床前の発生を調節しているようである（Natale et al., 2004）。

【0045】

まとめると、胚形成及び新生児発育において見出されたタンパク質の役割は極めて確からしく、本出願により明らかにされるこの詳細な分子的情報は*in vitro*での可能性のある胚毒性物質の影響力を予想するのに役立つだろう。

10

【0046】

図面

図1は、ESTモデルにおいて物質処理によりディファレンシャルに影響を受けるタンパク質のクラスター分析を示す。赤はタンパク質ライセートにおける発現の上方制御を、緑は下方制御を示す。全ての条件にわたり物質 - 及びクラスター - 依存的に明らかに挙動するタンパク質はわずかしかなかった；これらは胚毒性のマーカ-のための期待ができる候補である。

【0047】

参考文献

Arimura N, Menager C, Fukata Y, Kaibuchi K. Role of CRMP-2 in neuronal polarity. *J Neurobiol.* 2004 Jan;58(1):34-47.

Balls, M.; Goldberg, A.M.; Fentem, J. H.; Broadhead, C.L.; Burch, R.L.; Festing, M.F.; Frazier, J.M.; Hendriksen, C.F.; Jennings, M.; van der Kamp, M.D.; Morton, D.B.; Rowan, A.N.; Russell, C.; Russell, W.M.; Spielmann, H.; Stephens, M.L.; Stokes, W.S.; Straughan, D.W.; Yager, J.D.; Zurlo, J.; van Zutphen, B.F. (1995) The three Rs: the way forward: the report and recommendations of ECVAM Workshop 11 ATLA 23, 838-866.

10

Butterfield DA, Perluigi M, Sultana R. Oxidative stress in Alzheimer's disease brain: new insights from redox proteomics. *Eur J Pharmacol.* 2006 Sep 1;545(1):39-50. Epub 2006 Jun 15.

20

Cansizoglu AE, Chook YM. Conformational heterogeneity of karyopherin beta2 is segmental. *Structure.* 2007 Nov;15(11):1431-41.

Genschow, E., Spielmann, H., Scholz, G., Pohl, I., Seiler, A., Cleman, N., Bremer, S. and Becker, K. (2004). Validation of the embryonic stem cell test in the international ECVAM validation study on three in vitro embryotoxicity tests. *ATLA* 32, 209-244.

30

Genschow, E., Spielmann, H., Scholz, G., Seiler, A., Brown, N., Piersma, A.,

[0 0 4 8]

Brady, M., Huuskonen, H., Paillard, F., Bremer S., Clemann, N. and Becker, K. (2002) The ECVAM international validation study on in vitro embryotoxicity tests. Results of the definitive phase and evaluation of prediction models. *ATLA*, 30, 151-176.

Groebe K, Krause F, Kunstmann B, Unterluggauer H, Sastri C, Stegmann W, Wozny W, Schwall GP, Poznanović S, Dencher NA, Jansen-Dürr P, Osiewacz HD and Schratzenholz A (2007) Differential proteomic profiling of mitochondrial preparations from *Podospora anserina*, rat and human reveals distinct patterns of age-related oxidative changes, *Exp. Gerontology*, 42, 887-898. 10

Inagaki H, Kato Y, Hamajima N, Nonaka M, Sasaki M, Eimoto T. Differential expression of dihydropyrimidinase-related protein genes in developing and adult enteric nervous system. *Histochem Cell Biol.* 2000 Jan;113(1):37-41. 20

Kim MM, Wiederschain D, Kennedy D, Hansen E, Yuan ZM. Modulation of p53 and MDM2 activity by novel interaction with Ras-GAP binding proteins (G3BP). *Oncogene.* 2007 Jun 21;26(29):4209-15. Epub 2007 Feb 5.

Kitamura K, Takayama M, Hamajima N, Nakanishi M, Sasaki M, Endo Y, Takemoto T, Kimura H, Iwaki M, Nonaka M. Characterization of the human dihydropyrimidinase-related protein 2 (DRP-2) gene. *DNA Res.* 1999 Oct 29;6(5):291-7. 30

Kratz CP, Niemeyer CM, Zenker M. An unexpected new role of mutant Ras: perturbation of human embryonic development. *J Mol Med.* 2007 Mar;85(3): 227-35. Epub 2007 Jan 9. 40

Lundquist EA. Small GTPases. *WormBook.* 2006 Jan 17;:1-18.

Lypowy J, Chen IY, Abdellatif M An alliance between Ras GTPase-activating protein, filamin C, and RasGTPase-activating protein SH3 domain-binding

protein regulates myocyte growth. *J Biol Chem.* 2005 Jul 8;280(27):25717-28. Epub 2005 May 9.

Natale DR, Paliga AJ, Beier F, D'Souza SJ, Watson AJ. p38 MAPK signaling during murine preimplantation development. *Dev Biol.* 2004 Apr 1;268(1):76-88.

10

Omerovic J, Laude AJ, Prior IA. Ras proteins: paradigms for compartmentalised and isoform-specific signalling. *Cell Mol Life Sci.* 2007 Oct;64(19-20):2575-89.

Piersma. A.H., Genschow, E., Verhoef, A., Spanjersberg, M.Q.I., Brown, N.A., Brady, M., Burns, A., Clemann, N., Seiler, A., Spielmann, H. (2004). Validation of the postimplantation rat whole embryo culture test in the international ECVAM validation study on three in vitro embryotoxicity tests. *ATLA* 32, 275-307.

20

Schmidt EF, Strittmatter SM. The CRMP family of proteins and their role in Sema3A signaling. *Adv Exp Med Biol.* 2007;600:1-11.

Schrattenholz A and Groebe K (2007) What does it need to be a biomarker? Relationships between resolution, differential quantification and statistical validation of protein surrogate biomarkers. *Electrophoresis*, 28(12), 1970-1979.

30

Schrattenholz A. and Klemm M. How Human Embryonic Stem Cell Research Can Impact In Vitro Drug Screening Technologies of the Future. In: *Drug Testing in vitro* by Marx U. and Sandig V. (eds.), 2006 Wiley-VCH, Weinheim 205-228.

40

Schrattenholz A and Klemm M (2007) Neuronal Cell Culture from Human Embryonic Stem Cells as *in vitro* Model for Neuroprotection. *ALTEX*, 24(1), 9-15.

Seiler, A., Buesen, R., Visan, A., and Spielmann, H. (2005). Use of Murine Embryonic Stem Cells in Embryotoxicity Assays: The Embryonic Stem Cell Test. In: *Methods in Molecular Biology: Embryonic Stem Cells - II*, Edited by: K. Turksen, *Humana Press*, Totowa, NJ, USA. *in press*.

Seiler, A., Visan, A., Buesen, R., Slawik, B., Genschow, E., and Spielmann H. (2004). Improvement of an *in vitro* stem cell assay (EST) for developmental toxicity by establishing molecular endpoints of tissue-specific development. *Reproductive Toxicology* 18: 231-240. 10

Sommer S, Hunzinger C, Schillo S, Klemm M, Biefang-Arndt K, Schwall G, Pütter S, Hoelzer K, Schroer K, Stegmann W, Schrattenholz A (2004) Molecular analysis of homocysteic acid-induced neuronal stress. *Journal of Proteome Research* 3(3), 572-581. 20

Šoškić V, Groebe K and Schrattenholz A (2008). Nonenzymatic posttranslational modifications in ageing. *Exp. Gerontology* 43(4), *in press*.

Teng SC, Wu KJ, Tseng SF, Wong CW, Kao L. Importin KPNA2, NBS1, DNA repair and tumorigenesis. *J Mol Histol.* 2006 Sep;37(5-7):293-9. Epub 2006 Jun 3. 30

Weitzdoerfer R, Fountoulakis M, Lubec G. Aberrant expression of dihydropyrimidinase related proteins-2,-3 and -4 in fetal Down syndrome brain. *J Neural Transm Suppl.* 2001;(61):95-107.

Winger QA, Guttormsen J, Gavin H, Bhushan F Heat shock protein 1 and the mitogen-activated protein kinase 14 pathway are important for mouse trophoblast stem cell differentiation. *Biol Reprod.* 2007 May;76(5):884-91. Epub 2007 Jan 31. 40

Wodarz A, Näthke I. Cell polarity in development and cancer. *Nat Cell Biol.*

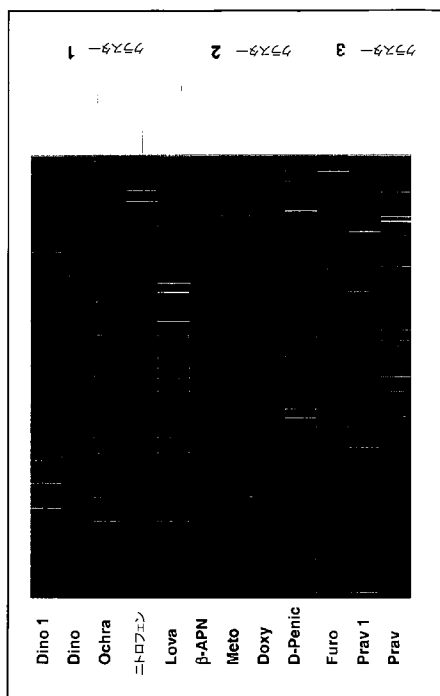
2007 Sep;9(9):1016-24.

Wozny W, Schroer K, Schwall GP, Poznanović S, Stegmann W, Dietz K, Rogatsch H, Schaefer G, Huebl H, Klocker H, Schratzenholz A, Cahill MA (2007) Differential radioactive quantification of protein abundance ratios between benign and malignant prostate tissues: cancer association of annexin A3. *Proteomics*, 7(2), 313-322.

10

Zekri L, Chebli K, Tourrière H, Nielsen FC, Hansen TV, Rami A, Tazi J. Control of fetal growth and neonatal survival by the RasGAP-associated endoribonuclease G3BP. *Mol Cell Biol*. 2005 Oct;25(19):8703-16.

【 図 1 】



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2009/004016

| | | |
|---|--|---|
| A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. G01N33/50 | | |
| According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC | | |
| B. FIELDS SEARCHED | | |
| Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N | | |
| Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched | | |
| Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, Sequence Search | | |
| C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| X | WU W. ET AL.: "Expression of the 25-kDa heat-shock protein (HSP27) correlates with resistance to the toxicity of cadmium chloride, mercuric chloride, cis-platinum(II)-diammine dichloride, or sodium arsenite in mouse embryonic stem cells transfected with sense or antisense HSP27 cDNA" TOXICOL. APPL. PHARMACOL., vol. 141, no. 1, 1 November 1996 (1996-11-01), pages 330-339, XP004844998 abstract page 330, right-hand column, paragraph 1 - page 331, left-hand column, paragraph 1 page 337, left-hand column - page 338, left-hand column ----- -/-- | 1-15 |
| <input checked="" type="checkbox"/> | Further documents are listed in the continuation of Box C. | <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex. |
| * Special categories of cited documents : | | |
| <p>*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>*E* earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>*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)</p> <p>*O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>*P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>*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</p> <p>*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</p> <p>*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.</p> <p>*&* document member of the same patent family</p> | | |
| Date of the actual completion of the international search 12 November 2009 | | Date of mailing of the international search report 18/01/2010 |
| Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016 | | Authorized officer Giry, Murielle |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

| |
|---|
| International application No PCT/EP2009/004016 |
|---|

| C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
|--|---|-----------------------|
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| X | KRONE P.H. ET AL.: "Use of fish liver PLHC-1 cells and zebrafish embryos in cytotoxicity assays" METHODS, vol. 35, no. 2, 1 February 2005 (2005-02-01), pages 176-187, XP004762302 abstract page 176, left-hand column - page 178, left-hand column | 1-15 |
| Y | USAMI M. ET AL.: "Proteomic analysis of selenium embryotoxicity in cultured postimplantation rat embryos" BIRTH DEFECTS RES. (PART B), vol. 83, no. 2, April 2008 (2008-04), pages 80-96, XP002554707 abstract page 81, left-hand column - page 85, column 1 tables 3, 5 | 1-15 |
| Y | BUESEN R. ET AL.: "Establishing predictive molecular markers of differentiation as toxicological endpoints in the embryonic stem cell test (EST)" NAUNYN-SCHMIEDEBERG'S ARCHIVES OF PHARMACOLOGY, vol. 372, no. suppl. 1, March 2006 (2006-03), page 130, XP009125434 abstract | 1-15 |
| Y | BUESEN R. ET AL.: "In vitro estimation of the embryotoxic potency of valproic acid derivatives employing the embryonic stem cell test (EST)" NAUNYN-SCHMIEDEBERG'S ARCHIVES OF PHARMACOLOGY, vol. 375, no. suppl. 1, March 2007 (2007-03), page 97, XP009125435 abstract | 1-15 |
| Y | LITTLE S.A. ET AL.: "Induction of heat shock protein 27 (HSP 27) in early postimplantation rat embryos after exposure to hyperthermia" TERATOLOGY, vol. 51, no. 3, 1995, page 158, XP009125458 abstract | 1-15 |

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2009/004016

| C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
|--|---|-----------------------|
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| A | BATTERSBY A. ET AL.: "Comparative proteomic analysis reveals differential expression of Hsp25 following the directed differentiation of mouse embryonic stem cells" BIOCHIM. BIOPHYS. ACTA, vol. 1773, no. 2, 23 January 2007 (2007-01-23), pages 147-156, XP005855829 abstract page 154, left-hand column - page 155, left-hand column | 1-15 |
| A | MEHLEN P. ET AL.: "hsp27 as a switch between differentiation and apoptosis in murine embryonic stem cells" J. BIOL. CHEM., vol. 272, no. 50, 12 December 1997 (1997-12-12), pages 31657-31665, XP002511558 abstract page 31663, left-hand column - right-hand column, paragraph 2 | 1-15 |
| A | SCHRATTENHOLZ A. ET AL.: "What does it need to be a biomarker? Relationships between resolution, differential quantification and statistical validation of protein surrogate biomarkers" ELECTROPHORESIS, vol. 28, no. 12, June 2007 (2007-06), pages 1970-1979, XP002554708 abstract paragraph [0004] | 1-15 |
| A | HUNZINGER C. ET AL.: "Comparison of different separation technologies for proteome analyses: Isoform resolution as a prerequisite for the definition of protein biomarkers on the level of posttranslational modifications" J. CHROMATOGR. A, vol. 1123, no. 2, 11 August 2006 (2006-08-11), pages 170-181, XP024967760 abstract paragraph [0004] | 1-15 |
| Y,P | WO 2008/107912 A2 (RELIANCE LIFE SCIENCES PVT. LTD. [IN]) 12 September 2008 (2008-09-12) abstract claims 1-25 | 1-15 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2009/004016

| C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
|--|---|-----------------------|
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| Y,P | <p>MALTMAN D.J. ET AL.: "Proteomic profiling of the stem cell response to retinoic acid and synthetic retinoid analogues: identification of major retinoid-inducible proteins" MOL. BIOSYST., vol. 5, no. 5, 2009, pages 458-471, XP009125421 the whole document</p> | 1-15 |
| T | <p>----- DATABASE BIOSIS [Online] BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE; September 2009 (2009-09), SCHRATTENHOLZ A.: "Proteomic surrogate biomarkers for in vitro testing of embryotoxicity: Quantitative differential investigation of ESC models" XP002554710 Database accession no. PREV200900601873 abstract & TOXICOL. LETTERS, vol. 189, no. Sp. Iss. SI, 13 September 2009 (2009-09-13), page S31, 46th Congress of the European-Societies-of-Toxicology; Dresden, Germany; September 13 -16, 2009</p> | 1-15 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2009/004016**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1-15(partially)

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/EP2009/004016

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-15(partially)

Method for determining developmental toxicity of a substance by detecting variation of at least heat shock protein beta 1 (HspB1) and kit therefor.

2. claims: 1-15(partially)

Method for determining developmental toxicity of a substance by detecting variation of at least Ras GTPase activating protein SH3 domain binding protein (G3BP) and kit therefor.

3. claims: 1-15(partially)

Method for determining developmental toxicity of a substance by detecting variation of at least Ran binding protein 5 (RanBP5) and kit therefor.

4. claims: 1-15(partially)

Method for determining developmental toxicity of a substance by detecting variation of at least calreticulin (calr) and kit therefor.

5. claims: 1-15(partially)

Method for determining developmental toxicity of a substance by detecting variation of at least dihydropyrimidinase-like 2 (DRP2) and kit therefor.

6. claims: 1-15(partially)

Method for determining developmental toxicity of a substance by detecting variation of at least stress-induced phosphoprotein 1 (STIP1) and kit therefor.

7. claims: 1-15(partially)

Method for determining developmental toxicity of a substance by detecting variation of at least U2af2 protein (U2AF) and kit therefor.

8. claims: 1-15(partially)

International Application No. PCT/EP2009 /004016

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Method for determining developmental toxicity of a substance
by detecting variation of at least calcium binding protein
39 isoform CRA_b (Cab39) and kit therefor.

9. claims: 1-15(partially)

Method for determining developmental toxicity of a substance
by detecting variation of at least NmrA-like family domain
containing 1 (NMRL1) and kit therefor.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2009/004016

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|--|------------------|-------------------------|------------------|
| WO 2008107912 | A2 | NONE | |

フロントページの続き

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

(74)代理人 100128679

弁理士 星 公弘

(74)代理人 100135633

弁理士 二宮 浩康

(74)代理人 100156812

弁理士 篠 良一

(74)代理人 100114890

弁理士 アインゼル・フェリックス = ラインハルト

(72)発明者 アンドレ シュラッテンホルツ

ドイツ連邦共和国 マインツ フ라우エンロープシュトラッセ 9 3 アー

F ターム(参考) 2G045 BB16 CB01 DA36 FB03 FB12

| | | | |
|----------------|--|---------|------------|
| 专利名称(译) | 蛋白质生物标志物用于体外测试化学毒性和胚胎毒性 | | |
| 公开(公告)号 | JP2011522265A | 公开(公告)日 | 2011-07-28 |
| 申请号 | JP2011512024 | 申请日 | 2009-06-04 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 普罗迪奥塞斯股份公司 | | |
| 申请(专利权)人(译) | Puroteoshisu股份公司 | | |
| [标]发明人 | アンドレシュラッテンホルツ | | |
| 发明人 | アンドレ シュラッテンホルツ | | |
| IPC分类号 | G01N33/68 G01N33/53 | | |
| CPC分类号 | G01N33/5073 G01N33/5014 | | |
| FI分类号 | G01N33/68 G01N33/53.D | | |
| F-TERM分类号 | 2G045/BB16 2G045/CB01 2G045/DA36 2G045/FB03 2G045/FB12 | | |
| 代理人(译) | 矢野俊夫 星 公弘 二宮和也HiroshiYasushi 四野良一 | | |
| 优先权 | 61/129093 2008-06-04 US | | |
| 外部链接 | Espacenet | | |

摘要(译)

目前，化学品的毒理学评估主要在体内使用各种动物物种进行，并且还考虑人类临床，生物化学，病理学和形态学数据。在过去几年中，越来越清楚的是，某些物质对儿童特别有害，因此人们关注发展中人类大脑的特殊脆弱性。同时，建议测试具有已知神经毒性或致畸（特别是神经致畸）风险的物质，另外还有胚胎毒性。此外，美国环境保护署（EPA）要求对农药进行胚胎毒性试验。如果物质应用作药物，则需要进一步测试（S7A安全药理学研究人类药物，国际协调会议指南，ICH，2001）。

| タンパク質名 | 請求項で使用する略称 | 文献中で表される同義語 | BLAST/ExPASy サーチャによる高相同性タンパク質 |
|---------------------------------------|------------|---|--|
| ヒートショックタンパク質 β -1 | HspB1 | ヒートショック 27 kDa タンパク質; HSP 27; 成長関連 P25; HSP25; | アルファ結晶性 B 鎖 |
| Ras-GTP アーゼ 活性化タンパク質 SH3-ドメイン 結合タンパク質 | G3BP | Ras-GDP- 結合 エンドリホスホクラーゼ; G3BP; G3BP タンパク質; MKIAA4115 タンパク質 | |
| Ran 結合タンパク質 5 | RanBP 5 | インボーチンサブユニット β -3; カリオフィリン β -3; Kap β 3 タンパク質; karybeta3 | HEAT 繰り返しファミリー タンパク質 |
| カルレチキユリン | Calr | Calr タンパク質; Crc タンパク質 | カルレチキユリン 前駆体; カルレチキユリン 様 タンパク質;カルレチキユリン ファミリータンパク質 |
| ジヒドロピリミナーゼ様 2 | DRP2 | Ulp2 タンパク質 D- ヒダントイナーゼ- 及び ジヒドロピリミナーゼ- 関連タンパク質; コラプシン 応答メチエーター タンパク質; Dpyal2-prov タンパク質; Cmp2 タンパク質 | DRP/GRMP/DPYSL タンパク質 1 及び 3-4 |
| ストレス誘発 ホスホタンパク質 1 | STIP1 | STIP1 タンパク質; sti1- 様 タンパク質; STI1 | ヒートショックタンパク質 60; Hsc70/Hsp90- 組織化タンパク質 HOP; TPR ドメイン 含有タンパク質 |
| U2af2 タンパク質 | U2AF | U2 小核性 RNA 補助因子 2; スプライシング因子 U2AF 65 kDa サブユニット U2 小核リボヌクレオタンパク質 補助因子; スプライシング因子 u2af 次サブユニット | |
| カルシウム結合 タンパク質 39; アイソフォーム CRA_b | Cab39 | Cab39 タンパク質; MC25-様 タンパク質; MGC68674 | |
| NmrA-様 ファミリードメイン 含有 1 | NMRL1 | NmrA- 様 タンパク質 前駆体; NmrA ファミリー タンパク質 | |