

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2014-16337

(P2014-16337A)

(43) 公開日 平成26年1月30日(2014.1.30)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/50 (2006.01)	GO 1 N 33/50 Z	2GO45
GO 1 N 33/15 (2006.01)	GO 1 N 33/15 Z	4BO63
GO 1 N 33/49 (2006.01)	GO 1 N 33/49 K	
GO 1 N 33/536 (2006.01)	GO 1 N 33/536 D	
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02	

審査請求 有 請求項の数 1 O L 外国語出願 (全 96 頁)

(21) 出願番号	特願2013-43630 (P2013-43630)	(71) 出願人	506099775
(22) 出願日	平成25年3月6日 (2013.3.6)		オデュッセイ セラ インコーポレイテッド
(62) 分割の表示	特願2007-527980 (P2007-527980) の分割		アメリカ合衆国 カリフォルニア州 94 583 サン ラモン ノーリス キャニ オン ロード 4550 스위트 14 0
原出願日	平成17年8月18日 (2005.8.18)	(74) 代理人	110000109
(31) 優先権主張番号	60/602, 317		特許業務法人特許事務所サイクス
(32) 優先日	平成16年8月18日 (2004.8.18)	(72) 発明者	ウェストウィック ジョン ケイ
(33) 優先権主張国	米国 (US)		アメリカ合衆国 カリフォルニア州 94 583 サン ラモン ジャマイカ ドラ イヴ 85
(31) 優先権主張番号	11/205, 021		
(32) 優先日	平成17年8月17日 (2005.8.17)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】細胞ベースアッセイを用いた薬物の薬理的プロファイリング

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】化合物について薬理的プロファイリングと共に安全性プロファイルを確立するための方法を提供する。

【解決手段】化合物(類)の分析方法であって、(A)無傷細胞中における2個以上の巨大分子の量及び/又は翻訳後修飾に対する上記化合物の作用を試験する工程、(B)上記試験の結果に基づいて薬理的プロファイルを構築する工程、及び(C)上記プロファイルを安全性特性が確立している薬物のプロファイルと比較する工程、を含む。さらに、本発明はまたアッセイパネルを含む構成物に関するものであり、上記パネルは蛋白の量及び/又は翻訳後修飾に対する少なくとも1つのハイコンテンツアッセイ及び、蛋白-蛋白相互作用の量及び/又は細胞内位置に対する少なくとも1つのハイコンテンツアッセイを含む。

【選択図】なし

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

化合物（類）の分析方法であって、(A) アッセイパネルを構築する工程、但し、上記パネルは無傷細胞中における2個以上の巨大分子の量及び／又は翻訳後修飾についてのアッセイを含む；(B) 上記パネル中の上記アッセイの活性に対する化合物（類）の作用を試験する工程；及び(C) 上記アッセイの結果を使用して望ましい活性を有する化合物を同定する工程、を含む方法。

**【請求項 2】**

化合物についての安全性プロファイルを確立する方法であって、(A) 無傷細胞中における2個以上の巨大分子の量及び／又は翻訳後修飾に対する上記化合物の作用を試験する工程；(B) 上記試験の結果に基づいて薬理的プロファイルを構築する工程；及び(C) 上記プロファイルを安全性特性が確立している薬物のプロファイルと比較する工程、を含む方法。

10

**【請求項 3】**

化合物についての毒性プロファイルを確立する方法であって、(A) 無傷細胞中における2個以上の巨大分子の量及び／又は翻訳後修飾に対する上記化合物の作用を試験する工程；(B) 上記試験の結果に基づいて薬理的プロファイルを構築する工程；及び(C) 上記プロファイルを既知の有害又は有毒な特性を有する薬物のプロファイルと比較する工程、を含む方法。

**【請求項 4】**

微量定量プレートフォーマットまたはアレイフォーマットで行われる、請求項 1、2、又は3に記載の方法。

20

**【請求項 5】**

フローサイトメトリー、自動顕微鏡、及び／又は自動画像分析によって行われる、請求項 1、2、又は3に記載の方法。

**【請求項 6】**

薬物毒性の基礎となる細胞経路を同定する方法であって、(A) 無傷細胞中における2個以上の巨大分子の量及び／又は翻訳後修飾に対する毒性化合物の作用を試験する工程；及び(B) 上記試験の結果を使用して毒性に関係する修飾パターンを同定する工程、を含む方法。

30

**【請求項 7】**

化合物の薬理的プロファイリングを行なう方法であって、(a) 細胞ベースのアッセイのパネルを構築する工程、但し、上記アッセイは2個以上の巨大分子の量及び／又は翻訳後修飾を含む；(b) 上記細胞を上記化合物に接触させる工程；(c) 上記細胞ベースアッセイを行う上記細胞におけるシグナルの量及び／又は細胞内位置を測定する工程；(d) (c)の結果を使用して上記化合物についての薬理的プロファイルを構築する工程、を含む方法。

**【請求項 8】**

化合物の薬理的プロファイリングを行なう方法であって、(a) 無傷細胞中で免疫蛍光アッセイのパネルを構築する工程；(b) 上記細胞を上記化合物に接触させる工程；(c) 上記パネルのメンバー中の蛍光シグナルを定量する工程；(d) (c)の結果を使用して上記化合物についての薬理的プロファイルを構築する工程、を含む方法。

40

**【請求項 9】**

アッセイパネルであって、上記パネルが2個以上の巨大分子の量及び／又は翻訳後修飾に対する免疫蛍光アッセイを含み、上記アッセイが自動顕微鏡検査法または自動画像分析によって行なわれるアッセイパネル。

**【請求項 10】**

アッセイパネルを含む構成物であって、上記パネルが2個以上の蛋白の量及び／又は翻訳後修飾に対するハイコンテンツアッセイを含む構成物。

**【請求項 11】**

50

アッセイパネルを含む構成物であって、上記パネルが蛋白の量及び/又は翻訳後修飾に対する少なくとも1つのハイコンテンツアッセイ及び、蛋白-蛋白相互作用の量及び/又は細胞内位置に対する少なくとも1つのハイコンテンツアッセイを含む構成物。

【請求項12】

アッセイパネルを含む構成物であって、上記パネルが免疫蛍光アッセイである少なくとも1つのアッセイ及び、非免疫蛍光アッセイである少なくとも1つのアッセイを含む構成物。

【請求項13】

細胞ベースのハイコンテンツアッセイのパネルであって、上記パネルが2個以上の抗体を含み、少なくとも1つの抗体は表1に示されるリストから選択されるパネル。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本出願は、2004年8月18日出願の米国仮出願No.60/602,317、発明の名称「細胞ベースアッセイを用いた薬物の薬理的プロファイリング」の35 U.S.C. セクション119による優先権を主張するものであり、その開示の全てを参照により本明細書に含める。

【背景技術】

【0002】

医薬品産業の中心課題はヒトにおいて安全かつ有効な薬物を開発することである。治療上の標的に結合する絶妙に選択的な化合物でさえも、生きた細胞中では全く予期しない作用、あるいは「オフ経路(off-pathway)」の作用を有することがあり、そのような作用は前臨床的に及び臨床的に高価な失敗をもたらしかねない。本発明の目的上、ある化合物が標的として意図したものの以外の細胞標的又は経路における、その化合物の何らかの活性を「オフ経路」の活性と定義する。

20

【0003】

臨床試験で薬物の75%が脱落することで証明されるように、医薬品産業で利用可能な研究ツールの数にもかかわらず、新しい薬物の開発は費用がかかり予測不能のプロセスである。我々の中心課題は、薬物候補の生物活性の全領域について理解することが、臨床試験に先立って薬物の副作用の可能性を突き止める手助けになるであろうというものである。付随する前提としては、新薬の開発における失敗の全てではないとしても多くは新薬のオフ経路作用が原因であるというものである。

30

【0004】

近年、リード化合物の選択性及びオフ経路の活性を評価する方法を確立するために多数の試みがなされてきた。このような方法には以下のやり方のうち1つ以上が含まれることが多い：(a) 問題の試験化合物が精製された蛋白にインビトロで結合又は阻害する能力を測定すること；(b) 試験化合物で細胞（又は生物体全体）を処理し；細胞抽出液又はライセートを調製し；その後、試験化合物に反応した抽出液又はライセート中の様々な遺伝子転写物の量の変化を測定すること；(c) 試験化合物で細胞（又は生物体全体）を処理し；細胞抽出液又はライセートを調製し；その後、試験化合物に反応した細胞抽出液又はライセート中の蛋白の活性、量又はリン酸化状態の変化を測定する；或いは、(d) 細胞又は組織の抽出液又はライセートを調製し、次にその抽出液又はライセートをビーズ等の固体表面に結合させた試験化合物に接触させ；試験化合物に結合する蛋白を同定すること。これらの各アプローチについて、より詳細に以下に述べる。

40

【0005】

最初の例では、精製した酵素又は受容体に対して試験化合物をインビトロで個別に試験して、意図した標的以外の蛋白に結合及び/又は阻害する能力を測定することができる。薬物又は受容体の活性の測定方法は広く普及しており当業者に周知である。それらには酵素結合免疫吸着アッセイ；放射性リガンド結合アッセイ；酵素反応生成物の測定用の放射性、化学発光性及び発光性アッセイ；並びに蛋白標的の特性によって異なる他の生化学的技術が含まれる。例えば、キナーゼは薬物標的として広く普及しており、キナーゼ阻害剤

50

の選択性を評価する方法が開発されている。キナーゼ類は、細胞内でのシグナル伝達カスケードの調節を含む多くの重要なプロセスを制御しており、医薬上の標的として熱心に追求されてきた。ヒトゲノムによってコード化されるキナーゼには500以上の別個のものがあり、そのためこれは創薬の標的として特に成果の多い種類となっている。Gleevec(登録商標)のような薬物は癌の治療用として市場に出るに至っており、20以上の他のキナーゼ阻害剤が癌から慢性関節リウマチに及ぶ疾患で臨床試験中である。そのような化合物のほとんどはキナーゼ標的のATP結合部位に結合する。キナーゼのATP結合部位は相同性が高いため、意図する標的に対して特異性の高い薬物分子を開発することは困難であった。その結果、様々な会社がリード化合物の選択性を評価することを目指したキナーゼ阻害剤プロファイリング用の製品とサービスを確立してきた。広く用いられているプロファイリング方法としては、何十もの別個の精製キナーゼに対してリード化合物をインビトロで試験し、どのキナーゼがその化合物によって阻害されるかを判定する方法が挙げられる。そのような方法は、「キノム(kinome)」マッピングの完成やヒト・キナーゼをコード化する完全長遺伝子が利用できることにより、迅速で、安価で、かつ総合的なものとなる。このようなプロファイリングサービス及び関連製品の提供元としてはアクティブX・バイオサイエンス社、キネクス社及びパンラブス社が挙げられる。キナーゼプロファイリング製品の提供元としては、ベクトン・ディキンソン社(パワープロット)、ルミネックス社(xMAPテクノロジー)、セル・シグナリング・テクノロジー社、アップステート・バイオテクノロジー社、カルピオケム社、及び他の多くの試薬と計測機器の販売元が挙げられる。

10

20

#### 【0006】

このようなインビトロでの手法は薬理的プロファイリングについて言えば重大な欠点を持つ。最も重大な制約は、選択性の高いキナーゼ阻害剤でさえも、キナーゼではないおびただしい数の他の蛋白に結合、活性化、又は阻害することがありうるということである。そのようなオフ標的又はオフ経路の活性は予測不能であり、どのようなキナーゼ特異的アッセイでも評価することができない。よりの得た言い方をすると、生物環境を表わす何万もの蛋白の各々について個々にアッセイすることは単に実現不可能であるために、精製蛋白に基づく真に総括的な手法を確立することは不可能である。

#### 【0007】

この点に関して、細胞又は組織のライセート中で蛋白への薬物の結合を検出することができる方法は、インビトロのアッセイよりも優れている。ハイスループット法は、ビーズ又は他の固体表面への試験化合物の結合、組織又は細胞の抽出液又はライセートの調製、及び質量分光法、免疫沈降又はフローサイトメトリーによるビーズに結合した蛋白の分析を含むものとして開発されている。この手法の第二の形態では、細胞又は動物個体に試験化合物を投与し、細胞又は組織のライセートを調製し、ライセート中の蛋白の翻訳後の修飾状態を評価する。後者の方法は、個々の蛋白のリン酸化された形態にのみ結合する修飾特異性抗体の急速に膨張しつつあるコレクションによって可能となる。細胞ライセート中の蛋白は典型的には2次元ゲル電気泳動によって分離した後ウエスタンブロッティング法を使用して調べるか、又はビーズ上若しくは抗体アレイ上のリン酸特異抗体の多重配列によって分析する(例えば、Nielsen et al., 2003, PNAS 100: 9330-9335)。

30

40

#### 【0008】

細胞ライセートに依存する方法はしばしば、生理的なレベルよりもはるかに多い量の化合物を必要とする。より重大なことに、細胞又は組織を粉碎する際に、蛋白をその天然の細胞内環境から取り出す結果として人為的現象が起こりうる。生細胞を構築している複雑な生化学経路内での薬物の作用様式を評価するためには、薬物活性について細胞全体にわたって広く目を向ける必要がある。

#### 【0009】

最も薬理的なプロファイリングは蛋白活性に基づくものではなく、DNAマイクロアレイ(遺伝子チップ)を用いて行なわれる。マイクロアレイは毒性ゲノム科学(toxicogenomics)の領域を生み出した。細胞又は動物体に問題の薬物又は化合物を投与する。一定の時間又は日数の後、メッセンジャーRNAを細胞又は組織から単離する。薬物の非存在下及び

50

存在下での何千もの個々のmRNAの発現パターンを比較する。化合物が1つ以上の経路の最終的な転写活性に影響を及ぼす状況下で、転写のプロファイリングにより化合物間の違いを明らかにすることができる。残念なことに、個々のmRNA分子のレベルの変化は、単一の時点に対応する蛋白のレベル又は活性に必ずしも直接相関関係にあるわけではない。更に、多くの蛋白は多数の翻訳後修飾及び生物分子相互作用を受け、それが組織又は細胞内の蛋白の機能及び活性に影響を及ぼすこともありうる。従って、存在するmRNA種の全て、及びそれらが特定の時点において存在するレベルを単に同定するだけでは、特定の薬物の全体像をとらえることはできないであろう。最終的に、転写リポーターアッセイは化学的薬剤に対する経路の反応についての情報を提供する能力はあるが、そのようなアッセイは化合物の作用点ではなく、経路の活性化又は抑制の結果を単に測定するだけである。標的を設定した非常に選択的な薬物でさえも何十もの遺伝子の転写に影響を及ぼすことがあり、そのことが遺伝子チップ実験の結果の解釈を困難な作業にしている。

10

#### 【0010】

理想的には、生細胞に薬物を投与し、経路内の特定のポイントで数分又は数時間以内に薬物の作用を測定できるとよい。転写リポーターアッセイとは異なり、経路内で個々の蛋白をモニターすることにより得られた情報は、細胞シグナル伝達経路の終点ではなく、特定の分岐点又は結節における薬物の作用を反映するにちがいない。細胞ライセートを用いて行なわれる薬物プロファイリングとは異なり、無傷細胞を使用することにより薬物の生理学的に妥当な濃度での研究が可能になるであろう。従って、我々は無傷細胞で全体的な薬理学的プロファイリングのための戦略及び方法を確立すべく努力した。理想的には、そのような方法は以下の特性を持つことになる：(a) 上記方法は無傷細胞又は組織に適用でき、細胞溶解を必要としない；(b) 上記方法は任意の種類、標的、又は薬物作用メカニズムに適用することができる；(c) 上記方法は、問題の薬物の作用メカニズムの詳細な情報を提供することができる；(d) 上記方法は既製の機械使用による大規模な自動分析法に適用可能である。特に我々は無傷のヒト細胞におけるシグナル伝達事象の直接測定が薬理学的プロファイリングに使用可能かどうかを判断するために努力した。

20

#### 【0011】

本発明の背景は以下のとおりである。作用物質の受容体への結合が他のシグナル伝達分子が介在する細胞内事象のカスケードを誘導する。これらの事象が細胞内事象の統合されたカスケードを引き起こし、それらが生細胞の行動に影響を及ぼす。経路の作用物質、拮抗剤又は阻害剤の添加により、特定の蛋白又は他の巨大分子の翻訳後修飾がダイナミックに生じることが多い。そのようなシグナル伝達カスケードは、それぞれキナーゼ及びホスファターゼによるリン酸化及び脱リン酸化のような、蛋白の翻訳後修飾のサイクルをしばしば含む。これらの事象は別個のプロテイン・キナーゼによって行われ、それらはセリン、スレオニン又はチロシン残基において他の蛋白をリン酸化する。次に、プロテイン・ホスファターゼは他の蛋白の脱リン酸化の役割をになう。リン酸特異抗体は、蛋白のリン酸化及び脱リン酸化の結果生じるリン酸化状態の正味の変化の検出を可能にさせる。このような抗体は研究機関の標準試薬になっており、多くのインビトロの方法と共に使用される。それらの方法としてはウェスタンブロッティング、免疫沈降、ELISA（酵素結合免疫吸着アッセイ）及び多重ビーズアッセイが挙げられる。様々な企業がそのような抗体を販売しており、パイオ・ラッド・ラボラトリーズ社、セル・シグナリング・テクノロジー社、カルピオケム社、及びベクトン・ディキンソン社が挙げられる。そのような抗体はフローサイトメトリー及び免疫蛍光検査法によって無傷細胞を分析するために使用することができる。

30

40

#### 【0012】

リン酸特異抗体は個々のシグナル伝達蛋白及び経路の多様な研究検査に適用されてきた。これらの研究の大部分は細胞又は組織のライセートを必要とする。無傷細胞における薬理学的プロファイリングについて、先行技術は全く沈黙している。本発明の目的上、我々は無傷細胞における蛋白の定量化及び/又は位置測定を可能にする方法に注目している。特に、創薬の目的上、我々はヒトの細胞における薬理学的プロファイリングに注目してい

50

る。本発明の好ましい態様では、ハイコンテンツ画像処理システム及び/又は自動顕微鏡検査法と組み合わせてヒトの細胞における免疫蛍光アッセイを使用する。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0013】

薬物、薬物候補及び薬物リードのゲノム全体に渡る規模での薬理学的プロファイリングのための方法を提供することが本発明の課題である。

さらに、化合物の活性、特異性、能力、時間経過及び作用機序を大規模に評価する方法を提供することも本発明の課題である。

【0014】

また、生細胞の状況における化合物の選択性を測定できるようにすることも本発明の課題である。

問題の細胞の生物学的状況における化合物のオフ経路作用、副作用又は毒性作用の可能性の検出を可能にすることも本発明の別の課題である。

【0015】

望ましい薬理学的プロファイルが得られるまで、反復方式でリード化合物のコレクション又はシリーズの薬理学的プロファイリングを行なうことにより、リード最適化を可能にすることが本発明の別の課題である。

さらに、望ましくない特性又は毒性を有する薬物候補のふるい落としを可能にすることも本発明の課題である。

【0016】

さらに、新規の薬物候補のための前臨床の安全性プロファイルを確立することも本発明の課題である。

さらに、臨床試験に先立ってリード化合物の意図されたものでない作用を同定することにより、創薬プロセスの効率を改善することも本発明の課題である。

【0017】

さらに、臨床試験に先立って副作用、毒性作用、又は他のオフ経路作用を同定することにより、クラス中1位の薬物の安全性を改善することも本発明の課題である。

医薬品添加剤、担体又は薬物送達剤のプラス又はマイナスの作用を同定することも本発明の別の課題である。

【0018】

さらに、予定された特性を有する「デザイナードラッグ」の開発に適した方法を提供することも本発明の課題である。

既知の薬物について新しい効能の同定を可能にすることが本発明の別の課題である。

【0019】

任意の生化学経路における任意のクラスの薬剤の活性を分析する方法を提供することが本発明の別の課題である。

さらに、薬物毒性の基礎となる生化学経路の同定を可能にすることも本発明の課題である。

【0020】

さらに、広範囲の疾患において薬物の有効性の基礎となる生化学経路の同定を可能にすることも本発明の課題である。

さらに、創薬と評価に有用な方法、アッセイ及び構成物を提供することも本発明の課題である。

薬理学的プロファイリングに適したアッセイのパネルを提供することが本発明の別の課題である。

【0021】

本発明は、問題の任意の経路、遺伝子、遺伝子ライブラリー、薬物標的クラス、レポーター蛋白、検出モード、合成又は天然生成物、化学物質、アッセイフォーマット、自動器機使用又は細胞のタイプに広く適用可能であるという利点を持つ。

10

20

30

40

50

## 【課題を解決するための手段】

## 【0022】

本発明は、医薬上の発見のための上記の要件を満たすことを目指すものである。薬理的に活性な薬剤の作用機序、選択性、及び副作用又はオフ経路作用を同定するために細胞ベースのアッセイを使用できることを本発明は開示する。本発明は細胞ベースのアッセイに基づく薬物分析及び薬理的プロファイリングを実行するための一般的な戦略を提供するものである。本発明の好ましい態様は、無傷細胞におけるハイコンテンツ・アッセイを含む。本発明の新規の方法により以下のことが可能になる：(1)特定の細胞応答の分子構造の、そのような細胞構造を可能にしている個々の分子のレベルにおける、直接的な視覚化；(2)以前には不可能であった方法による細胞のシグナル伝達ネットワーク上の薬物作用の直接的定量分析；及び(3)リード化合物及びリード薬物のそれらの作用機序に無関係な、定量的かつ予測的な薬理的プロファイルの作成。

10

## 【0023】

細胞応答は細胞内の区画中に存在する蛋白の複雑なネットワークによって媒介されている。細胞増殖、細胞死(アポトーシス)、化学走性、転移などはすべて、細胞行動を協力して調節している蛋白のレベルで制御されている。本発明により生化学ネットワークに対する化合物の作用の大規模な定量分析が可能になる。重要なのは、本発明が広い範囲の化学構造及び薬物標的を対象としており、キナーゼに限定されていた以前の方法を越える利点があるということである。本発明により、任意の既知又は新規の薬物クラス又は標的クラスについて、また全く未知の作用機序を有する化合物についても、任意の化合物の活性スペクトルを分析することができる。我々は巨大分子(蛋白)の翻訳後修飾に対する細胞ベースアッセイを用いて、任意のクラスの薬物又は標的のプロファイリングが行なえることを教示する。本発明により研究することができる薬物標的クラスとしてはG蛋白共役受容体、成長因子受容体、プロテアーゼ阻害剤、核ホルモン受容体、膜ホルモン受容体、キナーゼ、ホスファターゼ、ヒドロラーゼ、プロテアソーム阻害剤、及び他の既知の標的クラスが挙げられる。問題の化合物の標的又は作用機序が未知の場合、本方法により作用機序の同定が可能になるであろう。

20

## 【0024】

本発明の原理は細胞ネットワークの接続性に依存しており、薬物標的の下流に存在するものであるが物理的に連結している巨大分子の、翻訳後の修飾状態における測定可能な変化によって、経路中の特定のポイントでの薬物の作用を測定することができる。例えば、経路作用物質による標準的なシグナル伝達経路に対する刺激は、その経路に關与するキープ蛋白のリン酸化を導くことが多い。そのため、経路作用物質の非存在下及び存在下における2個以上のリン酸蛋白の量及び/又は位置の定量化により、薬物作用の評価が可能になるであろう。このようにリン酸蛋白は経路活性の標識として役に立つ。例えば、標識の上流に作用する薬物は細胞の刺激に反応して標識のリン酸化を遮断又は阻害すると考えられる(図2参照)。従って、化合物の非存在下又は存在下におけるリン酸蛋白のリン酸化状態によって、試験化合物がその経路に作用するかどうか明らかになり、それによって薬物選択性についての情報を得ることができる。この原理により、一つのアッセイで無傷細胞における数十の事象に関する報告が可能になる。このことは同時に、問題の薬物によって影響を受けるかもしれない全ての蛋白についてアッセイを構築する必要はないということの意味する。パネル中の多数のアッセイ(標識)を組み合わせることにより、活性の全スペクトルを同定することができ；活性のプロファイルを既知の薬物のそれと比較することができ；かつ、望ましくないプロファイルに基づいてリード化合物をふるい落とすことができる。

30

40

## 【0025】

本発明は無傷細胞において修飾された蛋白を定量及び/又は位置測定するための直接的な方法を必要とする。本発明は、問題の化合物をそれらの活性のプロファイルを得るために細胞アッセイパネルに対して試験することを必要とする。多種多様な抗体、プローブおよび染料を本発明と共に使用することができる。適当な抗体の例を表1に示す。これら及

50

び他の抗体又は標的プローブを多種多様な生物学用色素又は染料と共に使用することができ、それらの例としては、細胞内区画（核、膜、細胞質ゾル、ミトコンドリア、ゴルジ体など）用染料；カルシウム感受性色素のようなイオン感受性色素；細胞周期内でのアポトーシス又は変化を測定する色素；DNA挿入色素；及び他の一般に使用される生化学用及び細胞生物学用試薬が挙げられる。例えば、細胞内区画の共同染色により薬物作用の詳細を評価することが可能になるであろう。このような生化学用試薬及びそれらの使用方法は当業者に周知である。

#### 【 0 0 2 6 】

リン酸特異抗体に加えて、他の修飾状態特異的抗体も、細胞中で翻訳後修飾を受ける任意の巨大分子に対して原則的に作成することができる。そのような新しい試薬も本発明と共に使用することができる。そのような翻訳後修飾としてはメチル化、アセチル化、ファルネシル化、グリコシル化、ミリスチル化、ユビキチン化、スモイル化及び他の修飾が含まれる。ここに述べるように、そのような変質は免疫蛍光検査法と組み合わせた抗体を使用して検知することもできる；しかしながら、方法は抗体の使用に限定されるものではない。本発明が試薬若しくは試薬クラス、又はそれらの使用に際してのプロトコールについて特定のものに限定されないことに注目することが重要である。標的又は経路活性の代替（非抗体）プローブも、それらが以下の条件を満たせば使用することができる；すなわち、(a) 細胞内の巨大分子における変化に示差的に結合し、薬物作用に関連した経路活性、細胞シグナル伝達、又は細胞状態の変化を反映する；(b) 非結合状態では細胞から洗い流すことができ、結合したプローブを非結合プローブのバックグラウンドを除いて検出することができる；及び (c) 直接又は間接的に、例えば蛍光法又は発光法により検出できる。多様な有機分子、ペプチド、リガンド、天然生成物、ヌクレオシド及び他のプローブを直接的に、例えば蛍光若しくは発光色素又は量子ドットを用いたラベルを付けることにより、或いは間接的に、例えばプローブがその標的に結合した時にそれを認識する抗体の助けを借りる免疫蛍光検査法により、検出することができる。そのようなプローブとしてはリガンド、天然又は非天然基質、競合的結合分子、ペプチド、ヌクレオシド、及び標的の翻訳後修飾状態に基づいて示差的に標的に結合する他の多様なプローブが挙げられる。いくつかの方法及びレポーターが種々の状況に対して、より良く適合することが当業者に認識されるであろう。特定の試薬、固定方法及び染色方法は、異なる細胞型及び異なる経路又は標的について最適度高い場合も低い場合もありうる。

#### 【 0 0 2 7 】

##### [表 1]

表 1. 本発明と共に使用しうる標的化試薬の例

Akt (pS472/pS473)、リン酸特異(PKBa)抗体  
 カベオリン (pY14)、リン酸特異抗体  
 Cdk1/Cdc2 (pY15)、リン酸特異抗体  
 eNOS (pS1177)、リン酸特異抗体  
 eNOS (pT495)、リン酸特異抗体  
 ERK1/2 (pT202/pY204)、リン酸特異抗体 (p44/42 MAPK)  
 FAK (pY397)、リン酸特異抗体  
 IκBa (pS32/pS36)、リン酸特異抗体  
 インテグリン b3 (pY759)、リン酸特異抗体  
 JNK (pT183/pY185)、リン酸特異抗体  
 Lck (pY505)、リン酸特異抗体  
 p38 MAPK (pT180/pY182)、リン酸特異抗体  
 p120 カテニン (pY228)、リン酸特異抗体  
 p120 カテニン (pY280)、リン酸特異抗体  
 p120 カテニン (pY96)、リン酸特異抗体  
 パキシリン (pY118)、リン酸特異抗体  
 ホスホリパーゼ Cγ (pY783)、リン酸特異抗体

10

20

30

40

50

PKAR11b (pS114)、リン酸特異抗体	
14-3-3 バインディングモチーフ リン酸特異抗体	
4E-BP1 リン酸特異抗体	
AcCoA カルボキシラーゼ (アセチルCoA) リン酸特異抗体	
アダシン リン酸特異抗体	
AFX リン酸特異抗体	
AIK (オーロラ2) リン酸特異抗体	
Akt (PKB) リン酸特異抗体	
Akt (PKB) 基質 リン酸特異抗体	
ALK リン酸特異抗体	10
AMPK alpha リン酸特異抗体	
AMPK beta1 リン酸特異抗体	
APP リン酸特異抗体	
Arg-X-Tyr / Phe-X-pSer モチーフ リン酸特異抗体	
アレスチン1, beta リン酸特異抗体	
ASK1 リン酸特異抗体	
ATF-2 リン酸特異抗体	
ATM / ATR 基質 リン酸特異抗体	
オーロラ2 (AIK) リン酸特異抗体	
Bad リン酸特異抗体	20
Bcl-2 リン酸特異抗体	
Bcr リン酸特異抗体	
Bim EL リン酸特異抗体	
BLNK リン酸特異抗体	
BMK1 (ERK5) リン酸特異抗体	
BRCA1 リン酸特異抗体	
Btk リン酸特異抗体	
C/EBP alpha リン酸特異抗体	
C/EBP beta リン酸特異抗体	
c-Abl リン酸特異抗体	30
CAKb リン酸特異抗体	
カルデスモン リン酸特異抗体	
CaM キナーゼII リン酸特異抗体	
Cas, p130 リン酸特異抗体	
カテニン、beta リン酸特異抗体	
カテニン、p120 リン酸特異抗体	
カベオリン1 リン酸特異抗体	
カベオリン2 リン酸特異抗体	
カベオリン リン酸特異抗体	
c-Cbl リン酸特異抗体	40
CD117 (c-Kit) リン酸特異抗体	
CD19 リン酸特異抗体	
cdc2 p34 リン酸特異抗体	
cdc2 リン酸特異抗体	
cdc25 C リン酸特異抗体	
cdk1 リン酸特異抗体	
cdk2 リン酸特異抗体	
CDKs 基質 リン酸特異抗体	
CENP-A リン酸特異抗体	
c-erbB-2 リン酸特異抗体	50

Chk1 リン酸特異抗体	
Chk2 リン酸特異抗体	
c-Jun リン酸特異抗体	
c-Kit (CD117) リン酸特異抗体	
c-Met リン酸特異抗体	
c-Myc リン酸特異抗体	
コフィリン2 リン酸特異抗体	
コフィリン リン酸特異抗体	
コネキシン43 リン酸特異抗体	
コルタクチン リン酸特異抗体	10
CPI-17 リン酸特異抗体	
cPLA2 リン酸特異抗体	
c-Raf (Raf1) リン酸特異抗体	
CREB リン酸特異抗体	
c-Ret リン酸特異抗体	
CrkII リン酸特異抗体	
CrkL リン酸特異抗体	
サイクリンB1 リン酸特異抗体	
DARPP-32 リン酸特異抗体	
DNA-トポイソメラーゼII alpha リン酸特異抗体	20
Dok-2, p56 リン酸特異抗体	
eEF2 リン酸特異抗体	
eEF2k リン酸特異抗体	
EGF レセプター(EGFR) リン酸特異抗体	
eIF2 alpha リン酸特異抗体	
eIF2B epsilon リン酸特異抗体	
eIF4 epsilon リン酸特異抗体	
eIF4 gamma リン酸特異抗体	
Elk-1 リン酸特異抗体	
eNOS リン酸特異抗体	30
EphA3 リン酸特異抗体	
エフリンB リン酸特異抗体	
erbB-2 リン酸特異抗体	
ERK1 / ERK2 リン酸特異抗体	
ERK5 (BMK1) リン酸特異抗体	
エストロゲンレセプター-alpha (ER-a) リン酸特異抗体	
Etk リン酸特異抗体	
エズリン リン酸特異抗体	
FADD リン酸特異抗体	
FAK リン酸特異抗体	40
FAK2 リン酸特異抗体	
Fc gamma RIIb リン酸特異抗体	
FGFレセプター (FGFR) リン酸特異抗体	
FKHR リン酸特異抗体	
FKHRL1 リン酸特異抗体	
FLT3 リン酸特異抗体	
FRS2-alpha リン酸特異抗体	
Gab1 リン酸特異抗体	
Gab2 リン酸特異抗体	
GABA B レセプター リン酸特異抗体	50

GAP-43 リン酸特異抗体	
GATA4 リン酸特異抗体	
GFAP リン酸特異抗体	
グルココルチコイドレセプター リン酸特異抗体	
GluR1 (グルタメートレセプター-1) リン酸特異抗体	
GluR2 (グルタメートレセプター-2) リン酸特異抗体	
グリコーゲンシンターゼ リン酸特異抗体	
GRB10 リン酸特異抗体	
GRK2 リン酸特異抗体	
GSK-3 alpha / beta リン酸特異抗体	10
GSK-3 alpha リン酸特異抗体	
GSK-3 beta (グリコーゲンシンターゼキナーゼ) リン酸特異抗体	
GSK-3 beta リン酸特異抗体	
GSK-3 リン酸特異抗体	
H2A.X リン酸特異抗体	
Hck リン酸特異抗体	
HER-2 (ErbB2) リン酸特異抗体	
ヒストンH1 リン酸特異抗体	
ヒストンH2A.X リン酸特異抗体	
ヒストンH2B リン酸特異抗体	20
ヒストンH3 リン酸特異抗体	
HMGN1 (HMG-14) リン酸特異抗体	
Hsp27 (ヒートショックオウロテイン27) リン酸特異抗体	
IkBa (I kappa B-alpha) リン酸特異抗体	
インテグリンalpha-4 リン酸特異抗体	
インテグリンbeta-1 リン酸特異抗体	
インテグリンbeta-3 リン酸特異抗体	
IR (インシュリンレセプター) リン酸特異抗体	
IR / IGF1R (インシュリン/インシュリン様成長因子-1レセプター) リン酸特異抗体	
IRS-1 リン酸特異抗体	30
IRS-2 リン酸特異抗体	
Jak1 リン酸特異抗体	
Jak2 リン酸特異抗体	
JNK (SAPK) リン酸特異抗体	
Jun リン酸特異抗体	
KDR リン酸特異抗体	
ケラチン18 リン酸特異抗体	
ケラチン8 リン酸特異抗体	
キナーゼ基質 リン酸特異抗体	
Kip1, p27 リン酸特異抗体	40
LAT リン酸特異抗体	
Lck リン酸特異抗体	
レプチンレセプター リン酸特異抗体	
LKB1 リン酸特異抗体	
Lyn リン酸特異抗体	
MAPキナーゼ / CDK基質 リン酸特異抗体	
MAPキナーゼ, p38 リン酸特異抗体	
MAPキナーゼ, p44 / 42 リン酸特異抗体	
MAPKAPキナーゼ1a (Rsk1) リン酸特異抗体	
MAPKAPキナーゼ2 リン酸特異抗体	50

MARCKS リン酸特異抗体	
ミューテーションプロモーターファクター (MPF) リン酸特異抗体	
M-CSFレセプター リン酸特異抗体	
MDM2 リン酸特異抗体	
MEK1 / MEK2 リン酸特異抗体	
MEK1 リン酸特異抗体	
MEK2 リン酸特異抗体	
MEK4 リン酸特異抗体	
MEK7 リン酸特異抗体	
Met リン酸特異抗体	10
MKK3 / MKK6 リン酸特異抗体	
MKK4 (SEK1) リン酸特異抗体	
MKK7 リン酸特異抗体	
MLC リン酸特異抗体	
MLK3 リン酸特異抗体	
Mnk1 リン酸特異抗体	
MPM2 リン酸特異抗体	
MSK1 リン酸特異抗体	
mTOR リン酸特異抗体	
ミエリンベースックプロテイン (MBP) リン酸特異抗体	20
ミオシンライトチェーン2 リン酸特異抗体	
MYPT1 リン酸特異抗体	
neu (Her2) リン酸特異抗体	
ニューロフィラメント リン酸特異抗体	
NFAT1 リン酸特異抗体	
NF-kappa B p65 リン酸特異抗体	
ニブリン (p95 / NBS1) リン酸特異抗体	
ナイトリックオキシドシンターゼ、エンドテリアル (eNOS) リン酸特異抗体	
ナイトリックオキシドシンターゼ、ニューロナル (nNOS) リン酸特異抗体	
NMDA レセプター-1 (NMDAR1) リン酸特異抗体	30
NMDA レセプター-2B (NMDA NR2B) リン酸特異抗体	
nNOS リン酸特異抗体	
NPM リン酸特異抗体	
オピオイドレセプター、delta リン酸特異抗体	
オピオイドレセプター、mu リン酸特異抗体	
p53 リン酸特異抗体	
PAK1 / 2 / 3 リン酸特異抗体	
PAK2 リン酸特異抗体	
パキシリン リン酸特異抗体	
パキシリン リン酸特異抗体	40
PDGF レセプター-alpha / beta リン酸特異抗体	
PDGF レセプター-alpha リン酸特異抗体	
PDGF レセプター-beta リン酸特異抗体	
PDGFRb (血小板由来成長因子レセプター-beta) リン酸特異抗体	
PDK1 ドッキングモチーフ リン酸特異抗体	
PDK1 リン酸特異抗体	
PDK1基質 リン酸特異抗体	
PERK リン酸特異抗体	
PFK-2 リン酸特異抗体	
Phe リン酸特異抗体	50

ホスホランバン リン酸特異抗体	
ホスホリパーゼC gamma-1 リン酸特異抗体	
ホスホチロシンIgG リン酸特異抗体	
phox, p40 リン酸特異抗体	
PI3Kバインディングモチーフ, p85 リン酸特異抗体	
Pin1 リン酸特異抗体	
PKA基質 リン酸特異抗体	
PKB (Akt) リン酸特異抗体	
PKB (Akt)基質 リン酸特異抗体	
PKC alpha / beta II リン酸特異抗体	10
PKC alpha リン酸特異抗体	
PKC delta / theta リン酸特異抗体	
PKC delta リン酸特異抗体	
PKC epsilon リン酸特異抗体	
PKC eta リン酸特異抗体	
PKC gamma リン酸特異抗体	
PKC リン酸特異抗体	
PKC基質 リン酸特異抗体	
PKC theta リン酸特異抗体	
PKC zeta / lambda リン酸特異抗体	20
PKD (PKC mu) リン酸特異抗体	
PKD2 リン酸特異抗体	
PKR リン酸特異抗体	
PLC beta 3 リン酸特異抗体	
PLC gamma 1 リン酸特異抗体	
PLC gamma 2 リン酸特異抗体	
PLD1 リン酸特異抗体	
PP1 alpha リン酸特異抗体	
PP2A リン酸特異抗体	
PPAR Alpha リン酸特異抗体	30
PRAS40 リン酸特異抗体	
プレセニリン-2 リン酸特異抗体	
PRK2 (pan-PDK1リン酸化サイト) リン酸特異抗体	
プロゲステロンレセプター リン酸特異抗体	
プロテインキナーゼA, RII (PKARII) リン酸特異抗体	
プロテインキナーゼB リン酸特異抗体	
プロテインキナーゼB基質 リン酸特異抗体	
プロテインキナーゼC, alpha (PKCa) リン酸特異抗体	
プロテインキナーゼC, epsilon (PKCe) リン酸特異抗体	
PTEN リン酸特異抗体	40
Pyk2 リン酸特異抗体	
Rac1 / cdc42 リン酸特異抗体	
Rac-Pk リン酸特異抗体	
Rac-Pk基質 リン酸特異抗体	
Rad 17 リン酸特異抗体	
Rad17 リン酸特異抗体	
Raf-1 リン酸特異抗体	
Ras-GRF1 リン酸特異抗体	
Rb (レチノブラストーマプロテイン) リン酸特異抗体	
Ret リン酸特異抗体	50

リボゾーマルプロテインS6 リン酸特異抗体	
RNAポリメラーゼII リン酸特異抗体	
Rsk, p90 リン酸特異抗体	
Rsk1 (MAPKAP K1a) リン酸特異抗体	
Rsk3 リン酸特異抗体	
S6キナーゼ リン酸特異抗体	
S6キナーゼ, p70 リン酸特異抗体	
S6ペプチド基質 リン酸特異抗体	
SAPK (JNK) リン酸特異抗体	
SAPK2 (ストレス活性化プロテインキナーゼ, SKK3, MKK3) リン酸特異抗体	10
SEK1 (MKK4) リン酸特異抗体	
セロトニン-N-AT リン酸特異抗体	
セロトニン-N-AT リン酸特異抗体	
SGK リン酸特異抗体	
Shc リン酸特異抗体	
SHIP1 リン酸特異抗体	
SHP-2 リン酸特異抗体	
SLP-76 リン酸特異抗体	
Smad1 リン酸特異抗体	
Smad2 リン酸特異抗体	20
SMC1 リン酸特異抗体	
SMC3 リン酸特異抗体	
SOX-9 リン酸特異抗体	
Src ファミリーネガティブ制御サイト リン酸特異抗体	
Srcファミリー リン酸特異抗体	
Src リン酸特異抗体	
Stat1 リン酸特異抗体	
Stat2 リン酸特異抗体	
Stat3 リン酸特異抗体	
Stat4 リン酸特異抗体	30
Stat5 リン酸特異抗体	
Stat5A / Stat5B リン酸特異抗体	
Stat5ab リン酸特異抗体	
Stat6 リン酸特異抗体	
Syk リン酸特異抗体	
シナプシン リン酸特異抗体	
シナプシン サイト1 リン酸特異抗体	
Tau リン酸特異抗体	
Tie 2 リン酸特異抗体	
Trk A リン酸特異抗体	40
トロポニンI、カルディアック リン酸特異抗体	
チューベリン リン酸特異抗体	
Tyk 2 リン酸特異抗体	
チロシンヒドロキシラーゼ リン酸特異抗体	
チロシン リン酸特異抗体	
VASP リン酸特異抗体	
Vav1 リン酸特異抗体	
Vav3 リン酸特異抗体	
VEGFレセプター-2 リン酸特異抗体	
Zap-70 リン酸特異抗体	50

## 【0028】

本発明は、分析用には選ばれるタイプの細胞又は組織に制限されるものではない。細胞のタイプは、ヒト細胞、哺乳動物細胞（マウス、サル、ハムスター、ラット、ウサギ又は他の種）、植物プロトプラスト、酵母菌、真菌又は他の任意のタイプの問題の細胞でもよい。上記細胞はまた、細胞株又は一次細胞でもよい。創薬の目的からヒト細胞が好ましいが、哺乳動物の細胞も使用できる。上記細胞は、無傷の組織若しくは動物の成分、又は全身のものでもよく、或いは、生体サンプル又は器官から単離したのもでもよい。例えば、本発明を、キーとなる経路を遮断する抗真菌剤を同定するために真菌細胞に使用することもでき；或いは、生長関連経路を刺激するか、又は疾患経路を遮断する化学薬剤を同定するために植物細胞に使用することもできる。重要なことに、本発明は哺乳動物又はヒトの細胞中で、疾患に関係した経路を遮断しオフ経路作用又は副作用を持たない薬剤を同定するために使用することができ、それにより選択性を早期に予測したり、臨床的な安全性の予測モデルを開発することが可能になる。本発明は、癌、糖尿病、心血管疾患、炎症、神経組織変成疾患、及び人類を苦しめる他の慢性又は急性疾患を含む、問題の任意の疾患に対する創薬に関連して使用することができる。

10

## 【0029】

本発明は任意の環境、状況又はシステム中の無傷の細胞又は組織で使用することができる。これには培養細胞、培養組織、及び生きている生物体のものが含まれる。例えば、本発明は、ショウジョウバエ又はゼブラフィッシュのようなモデル生物体で使用することができる。本発明は前臨床試験に、例えばマウスで使用することもできる。マウスを薬物で処理して、その後、多様な細胞又は組織を採取し、免疫蛍光アッセイを構築するために使用することができる。本発明はまたヌードマウスに使用することもでき、例えば、ヒト細胞をヌードマウスに異種移植片として移植し、薬物又は他の化合物をマウスに投与することができる。その後、細胞を移植組織から再抽出し、薬理学的プロファイリングに使用することができる。

20

## 【0030】

任意のタイプの薬物リード又は他の問題の化合物を、ここに提供される方法でプロファイリングすることができる。そのような化合物としては、活性を試験する必要がある合成分子、天然生成物、組み合わせライブラリー、既知若しくは推定上の薬物、リガンド、抗体、ペプチド、小型干渉RNA(siRNAs)又は任意の他の化学薬剤が含まれる。組み合わせライブラリースクリーニング又は他のハイスループットスクリーニングキャンペーンからのスクリーニングヒットを本発明と合わせて使用することもできる。本発明は、より望ましい特性を備えたそれらの化合物を、望ましい特性が劣るそれらの化合物と比較して同定するために使用することができる。従って、本発明は、予期しない属性、望ましくない属性、又は有毒な属性を有するリード化合物の最適化及び/又はふるい落としに使用するのに適している。

30

## 【0031】

化学薬剤に反応してシグナルの量が増加又は減少する場合、正味の蛍光又は発光シグナルを定量することができる。薬物に反応してシグナルの細胞内位置が変化する事象では、細胞を自動顕微鏡法又は画像分析によって画像化し、シグナルの細胞内位置を検出し定量する。ピクセル強度を細胞内位置に変換するのに適した独占及び非独占のアルゴリズムが記述されており、そのようなソフトウェアは市販の機械システムと共に販売されることが多い。そのようなアルゴリズム、ソフトウェア及びハードウェアはいずれも本発明と共に使用することができる。

40

## 【0032】

蛋白によっては翻訳後に修飾されることがない、或いは、本質的に修飾されている - すなわち、それらの修飾が、外部刺激、環境条件、又は他からの動揺に応答して変化することがない。「応答する」という表現により、ある動揺に反応して特別の蛋白が修飾状態及び/又は細胞内分布に変化を受けることを意味する。他の翻訳後修飾はアゴニスト、ホルモン若しくは生長因子が受容体に結合してシグナル伝達カスケードを誘導することによる

50

か、又は細胞内の蛋白若しくは酵素を活性化する小分子に対して、応答し誘導される。他の修飾は、例えば拮抗剤若しくは抗体が受容体に結合して、それによりシグナル伝達カスケードを遮断することによるか、経路にとって不可欠な蛋白をコード化する遺伝子を沈黙させるsiRNAにより、又は経路内の特定の蛋白を阻害する薬物により阻害されることもある。これらの例及びここに提示する方法は、本発明の幅を例示するのが目的であって、本発明の実施について制限を加えるものではない。

#### 【0033】

ここに提供される方法及びアッセイは、アッセイフォーマットや小型化について柔軟に対応できるような、マルチウェル・フォーマット、微量定量プレート、マルチスポット・フォーマット、又はアレイで行ってもよい。アッセイ・フォーマット及び検出モードの選択は、分析するプロセスの生物学的状態及び複合体中の蛋白の機能によって決定される。いずれの場合でも、選ばれたレポーターによって産生されるシグナルの検出に適した任意の装置によって、本発明の対象であるアッセイを読み取ることができると注目すべきである。発光性、蛍光性、又は生物発光性のシグナルは、蛍光マルチウェルプレートリーダー、蛍光活性化セルソーター(FACS)及び、自動セルベース画像処理システムを含む、様々な自動及び/又はハイスループット機器使用システムのいずれか1つを用いて容易に検出及び定量される。後者のシステムによりシグナルの空間的解像が可能になる。ハイコンテントアッセイを自動化するために、セロミクス社、アマシャム社(GEメディカルシステムズ)、Q3DM社(ベックマン・クルター)、エポテック GmbH社、ユニバーサル・イメージング社(モレキュラー・ディバイシーズ)、アトー社(ベクトン・ディンキンソン)及びツァイス社によって開発された自動蛍光画像システム及び自動顕微鏡検査システムを含む、様々な機器使用システムが開発されている。光退色後蛍光回復法(FRAP)及び経時的蛍光顕微鏡検査法も生細胞中の蛋白の移動性を研究するために使用されてきた。

#### 【発明を実施するための最良の形態】

#### 【0034】

薬物のオン経路作用およびオフ経路作用の同定(薬理学的プロファイリング)

我々は、大規模な使用に適した、また特に望ましくない特性を持つリード化合物のふるい落としを行うのに適した創薬のための方法を提供すべく努力した。本発明の作成過程において、我々は3つの仮説を試した。第一の仮説は、特定の経路内の蛋白の翻訳後修飾を定量的かつ動的に測定することにより、化合物又は薬剤によるそれらの経路の活性化又は抑制の事前評価が可能になるであろうというものであった。第二の仮説は、経路の活性化に応答して、いくつかのタイプの動的現象、すなわち、修飾された蛋白の量の増加又は減少、及び/又は、修飾された蛋白のある細胞内区画から別の区画への移動が起きうるというものであった。第三の仮説は、生細胞中の多様な別々の修飾された蛋白に対する薬物作用の定量化及び位置測定により、薬物活性プロファイルの開発が可能になるであろうというものであった。薬理学的プロファイルはヒトの生物学の分野で、望ましいプロファイルを持つ化合物を同定し望ましくないプロファイルを持つ化合物を除去するために使用することができると考えられる。

#### 【0035】

シグナル伝達ネットワークはハイレベルの接続性によって特徴づけられ、シグナルは広範囲な動的蛋白複合体に関係して伝送される。細胞生物学のこの一面を利用して薬物作用をより良く理解するために、我々は翻訳後に修飾された蛋白に対するアッセイを構築した。上記アッセイにより、異なる条件下、すなわち、時間、薬物濃度、前処理刺激などによる特定のシグナル伝達分岐点の活性の調査が可能になる。この手法により経路ネットワーク内での時間的及び空間的レベルで薬物活性をモニターすることができる。複数の標的クラスおよび経路を表現する種々のシグナル伝達分岐点の応答を分析することによって、我々は状況に応じた薬物活性および薬物関係を定義することができる。

#### 【0036】

固定した細胞に抗体を付けることによって、一つの蛋白若しくは蛋白クラス又は他の巨大分子の特定の翻訳後修飾(例えば、リン酸化、アセチル化、ユビキチン化)と共に蛋白

10

20

30

40

50

又は蛋白クラスの絶対量レベルを測定することができる。本発明を作成する際に、修飾状態特異的抗体を用いる細胞ベースのアッセイを、化合物の非存在下又は存在下で蛋白の動的な結合及び解離をモニターするために使用した。我々は生細胞中の多様なリン酸蛋白について定量的蛍光アッセイのパネルを作成し、自動顕微鏡検査により、このアッセイパネルに対する既知の薬物の活性を試験した。無傷の固定細胞はフローサイトメトリー又は顕微鏡検査によって分析することができる。このような方法は自動化でき、アッセイは96ウェル又は384ウェル・プレート中で行うことができる。自動顕微鏡を用いる場合、画像分析と組み合わせ、蛋白若しくは修飾された蛋白（又はクラス若しくは蛋白類）の細胞内位置をこの様式で評価することができ、すなわち自動「ハイコンテンツ」分析が可能になる。フローサイトメトリー及び蛍光分光法もこの目的に使用することができ、それにはシグナルの空間的解像の必要がない。標識ペアの強度及び/又は物理的位置の変化によって検出された応答パターン又は「薬理学的プロファイル」は試験される薬物の作用機序、特異性およびオフ経路作用に関係しており、薬物間の違いがこの手法を用いて容易に検出できるということを我々は証明する。

#### 【0037】

本発明の概略を図3に示す。工程1はプロファイリングすべき化合物、薬物候補又は薬物の選択に関する。工程2は、アッセイパネルに含めるべき蛋白又は他の巨大分子の選択に関する。蛋白は合理的に、例えば経路又は蛋白の予備的知識によって、又は経験的に、同定又は選択することができる。さらに、無制限に多くのアッセイを単純に無作為に構築し、任意の数の薬物及び化合物に対する反応性について経験的に試験し、結果を薬理学的プロファイルに加えることが可能である。工程3は巨大分子（蛋白、DNAなど）の翻訳後修飾に対するアッセイの構築に関する。そのような方法は文献中に十分詳細に記載されており、蛋白が適切に選択され、抗体又はプローブが十分に特異的であって、問題の化合物又は薬物によるシグナル強度又は位置の変化を検出し定量するのに十分な感度がその方法にあるならば、それらの方法は本発明に簡単に適応させることができる。工程4では、化合物又は薬物をそれぞれ特定の時間および薬物濃度において各アッセイに対して試験する。プラス対照およびマイナス対照は各アッセイにおいて各時点および各刺激条件で行う。薬物の結果はそれぞれ対照（無処理、又は二次抗体のみ）の値と比較する。工程5では、アッセイの結果を総合して各化合物の薬理学的プロファイルを確立する。得られたプロファイルは様々な方法で表示することができる。単純なヒストグラムを使用して薬理学的プロファイルを表示することができる。或いは、各スクリーンの結果をここで示すように、赤がシグナル強度又は位置の減少を表わし緑が増加を表わすような、色分けマトリックスで表示する。赤及び緑の明るさの違いは変化の強度を表示するために使用できる。様々な可視化手段および第三者のソフトウェアを使用してプロファイルの表示及び分析を行うこともできる。

#### 【実施例】

#### 【0038】

##### 実験プロトコール

一般的な戦略およびその応用を説明するために、我々はヒト細胞中で特性決定がよくなされている複数の経路について研究した。実験デザインを図4に示す。原理を立証するために、我々は3つの標準的シグナル伝達経路を使用した；すなわち、サイクリックAMP依存性経路；ERK マイトジェン活性化蛋白キナーゼ (MAPK) 経路；及びp38/MAPKAPK2経路である。各経路には生化学の文献中に記録されている他の多くのステップが存在するが、ダイヤグラムは各経路に関連する多数の蛋白のうち選択した少数のみを示している。

#### 【0039】

経路1：ベータ-アドレナリン作動性受容体は、その薬理学的重要性の結果、よく特性決定されている。このG蛋白共役受容体 (GPCR) は小さなGTP結合蛋白、すなわちG<sub>s</sub>を介してアデニルシクラーゼに連結する。この受容体へのイソプロテレノールまたは他のベータアドレナリン作用物質の結合が、アデニルシクラーゼの活性化を導く。アデニルシクラーゼが活性化されると、それはATPのサイクリックAMPへの転換を触媒し、サイクリック

10

20

30

40

50

AMPの細胞内レベルの増加を導く。サイクリックAMP(cAMP)は、プロテインキナーゼA(PKA)として知られるサイクリックAMP依存性プロテインキナーゼを活性化する二次伝達物質である。cAMPのレベルは、アデニル酸シクラーゼによるcAMPの生産調節およびホスホジエステラーゼによるcAMPの破壊を通して制御される。アデニル酸シクラーゼは、細胞内のシグナル伝達経路を詳しく調べることを目的とした研究で広く使用されているジテルペンであるフォルスコリンのような薬剤によって直接活性化することもできる。PKAについて最も特性決定されている基質の1つとして、アドレナリン作用物質または他のPKA活性化物質に反応してセリン133(S133)がリン酸化された転写因子CREBがある。CREBのリン酸化はその標的遺伝子に対する転写活性を増加させることが示されている(Montminy et al)。したがって、フォルスコリンとイソプロテレノールの両方が、生細胞中でPKAの下流の、CREBのリン酸化を含むステップを活性化するものと予想される。それらはすでに知られている活性に基づいて同様の薬理学的プロファイルを有すると考えられる。

10

#### 【0040】

経路2: ERK/MAPKは生長因子により産生されるシグナルの伝達においてキーとなる中継ポイントである。この標準的な成長因子受容体に刺激される経路は、表皮増殖因子(EGF)受容体チロシンキナーゼのような細胞表面受容体によって開始される。活性化されたEGF受容体はアダプター蛋白と、蛋白SOSのようなグアニンヌクレオチド交換因子に結合する。SOSは、次に、Rasのような小さなGTPアーゼを活性化し、続いてB-RafおよびERKを含むキナーゼのカスケードのリン酸化および活性化を導く。ERKのリン酸化のような経路の遠位のステップの活性を測定することによって、上流のステップの活性を推測することができる。我々はこの経路に対して、2個の異なる薬剤、PD98059および17-AAGをプロファイリングした。MEKとして知られるプロテインキナーゼ(MKK1/2)の既知の阻害剤であるPD98059は、転写因子ERK(図4に示す)およびELKを含むその標的の下流にある事象を遮断する。17-AAG(17-アリルアミノ-17-デメトキシゲルダナマイシン)は、現在癌治療の臨床試験中にあるアンサマイシン抗生物質である。17-AAGはHsp90シャペロン蛋白中の高度に保存されたポケットに結合し、その機能を阻害する。Hsp90は、細胞のストレス時の蛋白の再生、およびシグナル伝達蛋白サブセットの配座的な成熟に必要である。17-AAGで細胞を処理することにより、RAF、AKTおよびHER2を含むHsp90クライアント蛋白のプロテアゾーム分解が起きる。(a)十分に特異的な抗リン酸-ERK抗体;(b)EGFに反応する細胞型;(c)十分な量のPD98059;及び(d)無傷細胞中のリン酸-ERKを検出することができる免疫蛍光検査法があれば、生細胞中のリン酸-ERKの量及び/又は位置に対するPD98059および17-AAGの作用を測定することは可能と考えられる。PD98059は相対的に選択的なキナーゼ阻害剤であり、一方17-AAGはHsp90クライアント蛋白の幅広いスペクトルに影響を及ぼす。そのため、両方の薬剤がリン酸-ERKに対するEGFの作用を減少させることが予想されるが、それらは他の経路標識(例えば、経路3)には異なる効果を示すであろう。

20

30

#### 【0041】

経路3:p38セリン/スレオニンプロテインキナーゼはMAPキナーゼ・ファミリーの中で最もよく特性決定されたメンバーである。それは炎症性サイトカイン、エンドトキシンおよび浸透ストレスに反応して活性化される。それはERK類と約50%の相同性を有する。カスケード活性化の上流のステップは十分に定義されていない。しかしながら、p38の下流の活性化が、二特異性キナーゼであるMKK3によるそのリン酸化(TGYモチーフ部位)に続いて起きる。その活性化に続いて、p38がMAPKAPK2をリン酸化し、それが次にHSP27を含むヒートショック蛋白をリン酸化し活性化する。アニソマイシンは、図4に示されるp38経路を含む、細胞中のストレスに関連した経路を活性化することが示されている天然生成物である。SB203580[4-(4-フルオロフェニル)-2-(4-メチルスルフィニルフェニル)-5-(4-ピリジル)1H-イミダゾール]はp38マイトジェン活性化蛋白キナーゼ(MAPK)の非常に特異的な阻害剤であって、インビトロ及びインビボでp38 MAPK機能を調べるツールとして広く使用されている。アニソマイシンがこれらの細胞のp38経路に対して特異的であるならば、アニソマイシンはリン酸-Hsp27を増加させるが、リン酸-CREBまたはリン酸-ERKには効果を示さないはずである。p38に特異的な阻害剤であるSB203580はHsp27に対するアニソマイ

40

50

シンの作用を遮断することが予想される。従って、適切な抗リン酸-Hsp27抗体があれば、我々は生細胞中でアニソマイシンによる経路活性化に反応したHsp27のリン酸化の増加が見られると期待できる。この作用はSB203580により遮断されると考えられる。

#### 【0042】

我々は、3つの経路に対する上記の化合物の作用を評価し、結果を利用して薬剤の薬理的プロファイルを構築した。具体的には、我々は問題の経路における下流の蛋白を標的とするリン酸特異抗体を使用するハイコンテンツ免疫蛍光アッセイを構築することにより経路「標識」のリン酸化状態の変化を評価した。ヒト細胞 (HEK293) を薬物で処理し、3つの下流蛋白のリン酸化状態を表皮増殖因子(EGF)の非存在下および存在下で評価した。その後、細胞を固定し、CREBのリン酸化形態(S133)、ERK1/2 (リン酸 T\*EY\*)、またはリン酸 Hsp27(S78/S82) に対して作成された抗血清をプローブに用いて調べた。活性化ループの中でスレオニン202およびチロシン204がリン酸化されている場合に限りERK1/2抗体はMAPK/ERK1およびMAPK/ERK2プロテインキナーゼを特異的に認識する。これらのアミノ酸のリン酸化がキナーゼの活性化には必要かつ十分であることが示されており、従ってキナーゼの活性化について代理マーカーとなる。薬物処理の後のリン酸化蛋白のレベルおよび細胞内位置の変化は、薬物と問題の経路との間の機能的な関連性を示すと考えられる。

10

#### 【0043】

使用方法の詳細は以下のとおりである。HEK293T細胞を黒色壁のポリリジンコーティングした96ウェルプレート(Greiner)中に30,000/ウェルの密度で接種した。24時間後、細胞をデュプリケートのウェル中で以下のような種々の薬物および刺激の組合わせで処理した：(a) 2  $\mu$ M イソプロテレノールまたは1  $\mu$ M フォルスコリンで15分間；(b) 25  $\mu$ M SB203580または賦形剤(DMSO) で90分間、ただし最後の10分間、10  $\mu$ g/ml アニソマイシンを細胞に加える；(c) 20  $\mu$ M PD98059、25  $\mu$ M SB203580、5  $\mu$ M 17-AAGまたは賦形剤のみで90分間。(d) (c)と同様であるが、薬物処理の最後の5分間、100ng/ml hEGFを細胞に加える。薬物はカルピオケム社から購入し、hEGFはロッシュ社から購入した。上記のように処理した4セットの細胞を調製した。細胞をPBSで一回すすぎ、4%ホルムアルデヒドで10分間固定した。続いて細胞をPBS中0.25%トライトンX-100で透過性にし、3% BSAと共に30分間インキュベートして非特異的抗体の結合を遮蔽した。同一の処理を行った4セットの細胞をその後それぞれ、リン酸化CREB(S133)、Hsp27(Ser82)、又はpERK(T202/Y204) (セル・シグナリング・テクノロジー社) に対するウサギ抗体と共にインキュベートした。対照ウェルはPBS中のウシ血清アルブミン(BSA)を加えてインキュベートした。細胞をPBSですすぎ、Alexa488接合ヤギ抗ウサギ二次抗体 (モレキュラー・プローブス社) と共にインキュベートした。細胞核をHoechst33342 (モレキュラー・プローブス社) で染色した。画像はディスプレイ-1ハイコンテンツイメージングシステム (モレキュラー・デバイス社) を使用して得られた。二次抗体の非特異的結合によるバックグラウンド蛍光は、BSA/PBSを加えて一次抗体を加えずにインキュベートした細胞を用いて決定した。

20

30

#### 【0044】

16ビットグレースケールTIFFフォーマットでの未処理画像をImageJ API/ライブラリー (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>、NIH、MD) を使用して分析した。最初に、蛍光チャンネル (Hoechst及びAlexa488) からの画像をImageJのビルトイン・ローリングボール・アルゴリズムを使用して標準化した [S.R.Sternberg、生物医学的なイメージプロセッシング、Computer, 16(1), 1983年1月]。次に、バックグラウンドからフォアグラウンドを分離するために閾値を確定した。ImageJのパーティクル・アナライザーに基づく反復アルゴリズムを、閾値処理したHoechstチャンネル画像(HI)に適用して、全細胞数を得た。細胞の核領域 (核マスク) も閾値処理したHIから誘導する。プラスの粒子マスクは閾値処理したAlexa488画像(YI)から作成する。グローバルバックグラウンド(gBG)を計算するために、閾値処理していないAlexaシグナルからヒストグラムを取り、最も低い強度ピークのピクセル強度をgBGとした。HoechstマスクおよびAlexaマスクはオーバーラップしており、細胞の相関するサブ領域を定義する。平均値はすべて対応するgBGにより補正した。実験の各セット (アッセイ + 薬物処理 + 処理時間) について、8つの画像からの蛍光粒子をプールした

40

50

。各パラメーターについて、アウトライアーフィルターを適用してグループの範囲（平均 $\pm$ 3SD）外になる粒子を除外した。最終的に各パラメーターのサンプル平均値又は対照平均値をフィルター処理した各グループから得た。薬物処理に関する結果は、各実験の対照値により標準化した。

#### 【0045】

##### 結果

実験の結果を図5-14に示し、最初はサイクリックAMP依存性(CREB)経路である(図5)。マイナス対照のウェル(左下)は二次抗体単独ではシグナルをほとんど又は全く示さず、このことはリン酸-CREBの検出はリン酸特異抗体を伴って成し遂げられることを証明していた。CREBリン酸特異抗体の存在下では、膜/核周辺パターンに主に集中した明らかな警告シグナルが見られた(対照、左上)。免疫蛍光検査の評価によれば、フォルスコリンとイソプロテレノールはいずれも対照(未処理)細胞と比較して、CREBのリン酸化を増加させ、その細胞内分布を主に核パターンに変化させた。これらの作用は蛍光顕微鏡写真で明瞭に見ることができた(図5、上パネル)。対照的に、アニソマイシンは、強度またはリン酸CREBの強度又は細胞内位置にほとんど又は全く効果を示さず、このことでアニソマイシン依存性経路とCREB経路の間には接続性が無いことが証明された。

10

図6に示すように、EGFはリン酸CREBの形成も誘導した。リン酸CREBに対するEGFの作用は、図4に表されるようにEGF依存性経路及びサイクリックAMP依存性経路の間のクロストークと一致している。EGFの作用はPD98059によって減少し、このことはPD化合物がCREB経路に対してオフ経路作用を示すか、又はMEK(PD98059の標的)よりも下のレベルでEGF経路とCREB経路の間にクロストークが生じることを示唆している。これらの結果は、経路に対する作用物質及び薬物の直接的及び間接的作用の両方が、作用物質又は薬物の作用点の下流で起きる事象をアッセイすることにより評価できることを示しており、それは細胞内ネットワークの接続性を薬物活性スペクトルの同定での使用に活かすことができるという前提を立証している。上記の結果はまた、経路を活性化又は阻害する薬物とそれらの経路に影響を及ぼさない薬物を区別する方法の可能性を証明するものである。

20

#### 【0046】

薬物のその予期される標的/経路における示差的活性も観察した。例えば、EGFは予想通りMAPキナーゼ経路を強く刺激し、その結果、高いレベルのERK/MAPキナーゼリン酸化を誘導した(図12-13)。フォルスコリン、イソプロテレノール及びアニソマイシンはこの経路に効果を示さなかった(図11)。キナーゼMEKの既知の阻害剤である化合物PD98059は、予想されたようにEGFに反応してERKのリン酸化を有意に遮断した。7-AAGもERKに対するEGFの作用を減少させるのに有効であった。一方、p38特異的阻害剤であるSB203580でこれらの細胞を処理してもEGF刺激によるERKリン酸化に対して効果はなく、それはSB203580がERKに接続していない経路に選択的に作用するためである。上記の結果は、薬物のオン経路作用を正確に示し、ヒト細胞中の経路に対する薬物選択性を評価する上記方法の能力を証明するものである。

30

#### 【0047】

この戦略により経路間のクロストークも明らかになる。アニソマイシンはアニソマイシン処理細胞におけるリン酸Hsp27の増加によって評価されるようにp38経路を誘導した。アニソマイシンはCREB経路又はERK経路には効果を示さなかったため、アニソマイシンは完全にp38経路に対して選択的であった。SB203580は、アニソマイシンのHsp27への作用を完全に遮断し、それはSB阻害剤の既知の作用機序と一致するものであった。EGFはさらにp38経路の活性化を誘発し(その結果、HSP27リン酸化が起き)、この反応はp38阻害剤であるSB203580によって遮断され、このことはEGF経路とp38経路の間のクロストークがSB203580の作用部位の上流レベルにあることを証明していた。対照的に、MEK阻害剤であるPD98059はEGF誘導によるHsp27リン酸化に効果を示さなかったが、このことはPD98059がMEK/ERK経路について選択的なものであることを示していた。

40

#### 【0048】

図14に見られる薬理学的プロファイルは薬剤間の類似性及び相違性を証明している。こ

50

これらの薬理的プロファイルはある種の作用機序および選択性を有する薬物に対するフィンガープリント（識別特徴）として使用することができる。上記フィンガープリントは望ましい細胞作用を持つ新規化合物を同定し、また望ましくない細胞作用を持つ化合物を除去するために使用することができる。例えば、これらの方法を使用して、EGF、アニソマイシン、またはキナーゼ阻害剤のうちの1つに類似の細胞作用を持つ新規薬剤を同定することができる。既知の毒性作用または副作用を持つ薬剤のプロファイルを確立することにより同様の（毒性作用又は副作用）プロファイルを持つ新規化合物のふるい落としが可能になるであろう。アッセイパネルが拡大するとともに、よりさらに予測力が増すことになるであろう。既知の薬物、脱落した化合物および毒性薬剤のプロファイリングから、確立された臨床的成果を有する薬物のフィンガープリントの開発が可能になるであろう。パネルが拡大するとともに、それらは非常に明確な安全性および有効性のプロファイルを持つ薬物の開発を可能にするであろう。

10

#### 【0049】

本発明の範囲

本発明が、厳密な経路、アッセイ標識、アッセイプロトコール、検出方法、又は特定の機械使用若しくはソフトウェアに限定されるものではないことは当業者に理解されるであろう。本発明は細胞ベースの蛍光または発光アッセイパネル、とりわけ免疫蛍光アッセイを問題の薬物、生物学的薬剤、天然生成物および他の化合物の薬理的プロファイリングに使用することができることを教示するものである。

20

#### 【0050】

本発明と共に使用することができる蛋白またはアッセイ用試薬のタイプ、数または正体の実質的に制限はない。哺乳動物の細胞中では蛋白の翻訳後修飾が何千も起きているようである。これらは構成用であるか動的なもののいずれかであり、余剰であるか余剰でないかのいずれかであろう。動的な（反応性）非余剰分アッセイは、それらが経路動揺に应答するものと考えられるために、薬理的プロファイリングには最も有用なものになると思われる。幸い、単に修飾に対するアッセイを構築し、一連の薬物、siRNAのような遺伝子解析用試薬又は他の化合物に対する反応性についてそれを試験することにより、特定の蛋白または他の巨大分子がプロファイリングに役立つかどうかを経験的に判定することができる。非余剰分アッセイは他のいずれかのアッセイによって提供される情報よりはるかに明確な情報を提供するアッセイである。細胞の機能を調節する経路が徐々に解明されるにつれて、ここに提供される方法に基づいた完全な予測アッセイパネルを構築することが最終的に可能になるであろう。パネルが予測的であるかどうかを判断するのは動物、または人に特定の副作用を引き起こす特性決定がよくなされた薬剤のプロファイルと、同じ作用を引き起こさない薬剤のプロファイルとを比較することにより可能になるであろう。そのようなパネルにより任意の化合物を試験して、その活性スペクトルを決定し、また有害な効果を示唆する何らかのオフ経路活性を判定することができるであろう。上記手法の利点は、これをハイスループットで行い何千ものリード化合物を臨床試験に先立って試験することができる、それにより望ましくないプロファイルを持つ化合物を早期にふるい落とすことができるということにある。

30

#### 【0051】

上記手法の情報量の多さはアッセイされる蛋白の数によるのではなく、カバーされる経路の幅に基づく。より多くの標識を同じ経路に加えることにより、新しい作用機序を定義し、新しい薬物標的となりうるものを同定する際の助けになると考えられるが、必ずしも予測的な能力が追加されるとは限らないであろう。最終的に、個々の細胞経路に対して情報が得られる標識が一つ必要である。完全な予測性を持つプラットフォームは200-500のアッセイにより達成されると考えられる。これらの計算は推論によるものであるが、我々の予測を説明する助けとなるであろう。生化学の文献及び我々自身の経験によると、生化学のネットワークは高度に分岐していることが示唆される。例えば、ヒトの蛋白中の相互作用をマッピングする過程で、我々は1個の蛋白当たり平均5個の相互作用を同定した；この数字は酵母のようなモデル生物体の蛋白相互作用マップと一致している。人間のプロ

40

50

テオームの中に30,000個の蛋白があると仮定すると(但しスプライシング変異体を除く)、1つ以上の分離度で物理的に分離されて約6000個のヒト蛋白-蛋白相互作用があると考えられる(30,000/5)。最終的に、6000個の非余剰的標識の各々が15個の上流での事象の活性について報告する役目をすると仮定するならば、400個の標識コレクションにより細胞中のすべての経路の活性が報告されることになる。

#### 【0052】

本発明は個々の蛋白の修飾の測定に限定されるものではない。蛋白-蛋白相互作用の定量又は位置決定に使用することができる細胞アッセイをそのようなパネルに含めることもできる。そのような測定に適した方法としては蛍光共鳴エネルギー転移(FRET)、生物発光共鳴エネルギー転移(BRET)、蛋白フラグメント相補性アッセイ(PCA)および酵素フラグメント相補性アッセイ(ガラクトシダーゼ相補性)が挙げられる。薬理的プロファイリング用のアッセイパネルを構築するために使用できる細胞アッセイには、個々の蛋白の測定と同様に全細胞の測定も含めることができる。例えば、(全ホスホチロシン抗体により評価される)細胞蛋白のチロシン・リン酸化の全体レベルを、既知化合物及び新規化合物のオン経路およびオフ経路の作用を評価して薬理的プロファイルを確立するために使用することができる。特別のモチーフ(ユビキチン等)の測定も、それにより細胞の代謝状態及び表現型状態の全体的な評価が提供されるため、アッセイパネルの構築に有用であろう。全体的及び特定の細胞プロテアーゼ活性は、蛋白分解でエピトープが消失し、その結果、エピトープ特異抗体を用いた評価でシグナルが減少することにより、評価することができる。GTP対GPCRに共役したG蛋白のようなGDP結合蛋白を識別する抗体を開発して細胞シグナル伝達の成分としてのG蛋白の状態を評価するために使用することもできるであろう。特定の蛋白のスプライシング変異体又はアイソフォームを、例えば標識蛋白の開裂形態のみを認識する抗体を採用して、測定することもできるであろう。そのようなアッセイにより細胞のアポトーシス状態が示されるであろう。さらに、我々は特定のキナーゼのスプライシング変異体であるMKK3対MKK1/2を識別する抗体を使用してみる。これらの薬剤も同じアッセイ中に組み合わせることができる;例えば、リン酸特異的抗BAD抗体を総AKT抗体と組み合わせてアポトーシス経路の2個のキー調節因子を同時に評価することもできる。(アセチル特異的抗ヒストン抗体を用いての)ヒストン・アセチル化の測定により、遺伝子転写のキー調節因子であるアセチル化と脱アセチルの間の総合的バランスの評価が可能になるであろう。上記のように、任意のそのような経路の測定法又は細胞指示薬を細胞用染料と組み合わせてアッセイパネルの情報量を増加させることができる。膜電位を測定することができる色素もそのようなアッセイパネルに有用となるであろう。例えば、ミトコンドリア膜電位用の染料を使用して、種々の細胞作用を有する薬物を識別し、本発明と共同で薬理的プロファイルを構築することができる。

#### 【0053】

蛋白に加えて、DNAや脂質を含む様々な巨大分子が翻訳後に修飾される。DNAのメチル化は、転写の配列特異的調節及び遺伝子特異的調節において重要である。脂質のリン酸化は細胞シグナル伝達の制御において重要である;例えば、イノシトールポリリン酸塩の間のバランスは、二次伝達物質であるイノシトール三リン酸(IP3)のレベルの調整において非常に重要である;また、ホスファチジルコリン、ホスファチジルイノシトールおよびホスファチジルセリンのようなリン脂質の脂肪酸組成は膜流動性と膜浸透性を調節する。修飾状態に特異的な試薬のツールボックスが拡大するとともに、そのようなアッセイが我々が薬理的プロファイリングのために構築しているパネルに加えらるであろう。

#### 【0054】

以下の特許及び出版物に引用されている参考文献を含む内容のすべてを、個々の特許、特許出願又は出版物においてそれぞれ記載されているものと同様の範囲で、あらゆる目的についての全ての内容を参照により組み入れる。

US 6,372,431 Cunningham, et al.

US 6,801,859 Friend, et al.

US 6,673,554 Kauvar, et al.

10

20

30

40

50

US 6,270,964 Michnick, et al.  
US 6,294,330 Michnick, et al.  
US 6,428,951 Michnick, et al.  
US Patent Application 20030108869 Michnick, et al.  
US Patent Application 20020064769 Michnick, et al.  
Nielsen et al., PNAS 100: 9330-9335 (2003)

【 0 0 5 5 】

本発明をその特定の態様の詳細に関して記述しているが、それらが添付の請求項に含まれる限りにおいて、そのような詳細が本発明の範囲を制限するものと見なされることは意図していない。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 5 6 】

【 図 1 】 図1は、本発明の目的を具体例により示すものである。細胞の行動を制御する生化学ネットワークを回路図で表わしている。薬物及び化合物は細胞内において既知の(意図された)作用及び未知の(意図しない)作用を有する。蛋白及び他の分子の翻訳後修飾は動的な事象と言えるものであり、薬物及びリード化合物の既知及び未知の作用を同定するために探る対象とすることができる。

【 図 2 】 図 2 は本発明の基礎となる原理を示す。細胞ネットワークの接続性から、薬物標的の「下流」の事象に対する薬物の作用を測定することにより、経路上の薬物活性の検出が可能になる。蛋白又は他の分子の翻訳後修飾を表わすアッセイを赤で示す。薬物は下流の蛋白の翻訳後修飾状態を減少若しくは増加させるか、又はその細胞内分布を変化させることがある。これらの変化は免疫蛍光検査法又は他の方法を利用して無傷細胞中で測定することができる。経路間のクロストークもこの手法を用いて調べることができ、例えば第1の経路への薬物作用が第2の経路に関与する蛋白の修飾状態の変化をもたらすこともある。

【 図 3 】 図 3 は本発明による薬理学的プロファイリングにおいてキーとなる5つの工程を示す。結果は様々な方法、例えばヒストグラム；マトリックス；輪郭プロット；又は他の適当な表示方法を用いて示すことができる。図3に示すマトリックスにおいて、緑は特定の標識に対するシグナルの増加を表わし、赤はシグナルの減少を表わす。このようなプロファイルは比較、例えば、リード化合物を既知の薬物又は既知の有毒若しくはふるい落とされた化合物と比較する際に有用である。

【 図 4 】 図 4 は本発明の薬理学的プロファイリングにおける原理証明試験のデザインを示す。5個の異なる薬物を3個の異なる経路に対して試験し、それらの作用機序に一致する薬理学的プロファイルが得られた。

【 図 5 】 図 5 は、免疫蛍光検査法での評価による、リン酸-CREBの細胞内位置及び蛍光強度に対するフォルスコリン、イソプロテレノール、アニソマイシン、又はアニソマイシン + SB203580の示差的効果を示す代表的な顕微鏡写真である。マイナス対照ウェル(二次抗体のみ)も示す。

【 図 6 】 図 6 は、免疫蛍光検査法での評価による、リン酸-CREBの細胞内位置及び蛍光強度に対するEGF、EGF + PD98059、EGF + SB203580およびEGF + 17AAGの示差的効果を示す代表的な顕微鏡写真である。

【 図 7 】 図 7 はヒト細胞の核中におけるリン酸-CREBの量に対する薬剤の示差的効果を示す。値は未処理の対照に対する比率で表す。

【 図 8 】 図 8 は、免疫蛍光検査法での評価による、リン酸-Hsp27の細胞内位置及び蛍光強度に対するフォルスコリン、イソプロテレノール、アニソマイシン、又はアニソマイシン + SB203580の示差的効果を示す代表的な顕微鏡写真である。

【 図 9 】 図 9 は、免疫蛍光検査法での評価による、リン酸-Hsp27の細胞内位置及び蛍光強度に対するEGF、EGF + PD98059、EGF + SB203580およびEGF + 17AAGの示差的効果を示す代表的な顕微鏡写真である。

【 図 1 0 】 図 1 0 は、ヒト細胞中におけるリン酸-Hsp27の量に対する薬剤の示差的効果を

10

20

30

40

50

示す。結果は未処理の対照に対する比率で表す。

【図 1 1】図 1 1 は、免疫蛍光検査法での評価による、リン酸-ERKの細胞内位置及び蛍光強度に対するフォルスコリン、イソプロテレノール、アニソマイシン、又はアニソマイシン + SB203580の示差的効果を示す代表的な顕微鏡写真である。

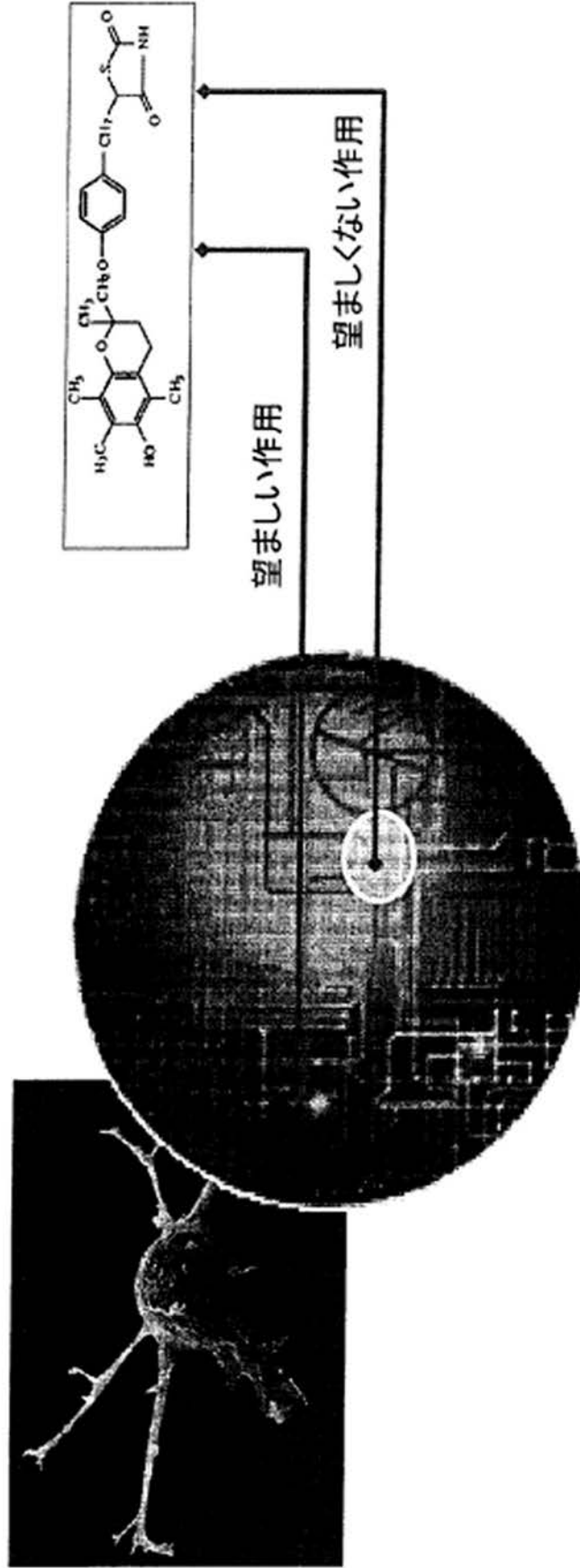
【図 1 2】図 1 2 は、免疫蛍光検査法での評価による、リン酸-ERKの細胞内位置及び蛍光強度に対するEGF、EGF + PD98059、EGF + SB203580およびEGF + 17AAGの示差的効果を示す代表的な顕微鏡写真である。

【図 1 3】図 1 3 は、ヒト細胞中におけるリン酸-ERKの量に対する薬剤の示差的効果を示す。値は未処理の対照に対する比率で表す。

【図 1 4】図 1 4 は、3つの経路での活性に基づいた表示の薬物および生物学的薬剤の薬理学的プロファイルを示す。同じ経路に作用する薬剤（例えば、イソプロテレノールとフォルスコリン）は同様のプロファイルをもたらす。異なる経路に作用する薬剤は異なるプロファイルをもたらす（EGF対アニソマイシン、SB203580対PD98059を比較せよ）。同じ経路に作用する薬剤（例えば、17-AAGおよびPD98059）の間の（使用される用量における）有効性の差も見ることができる。

【 図 1 】

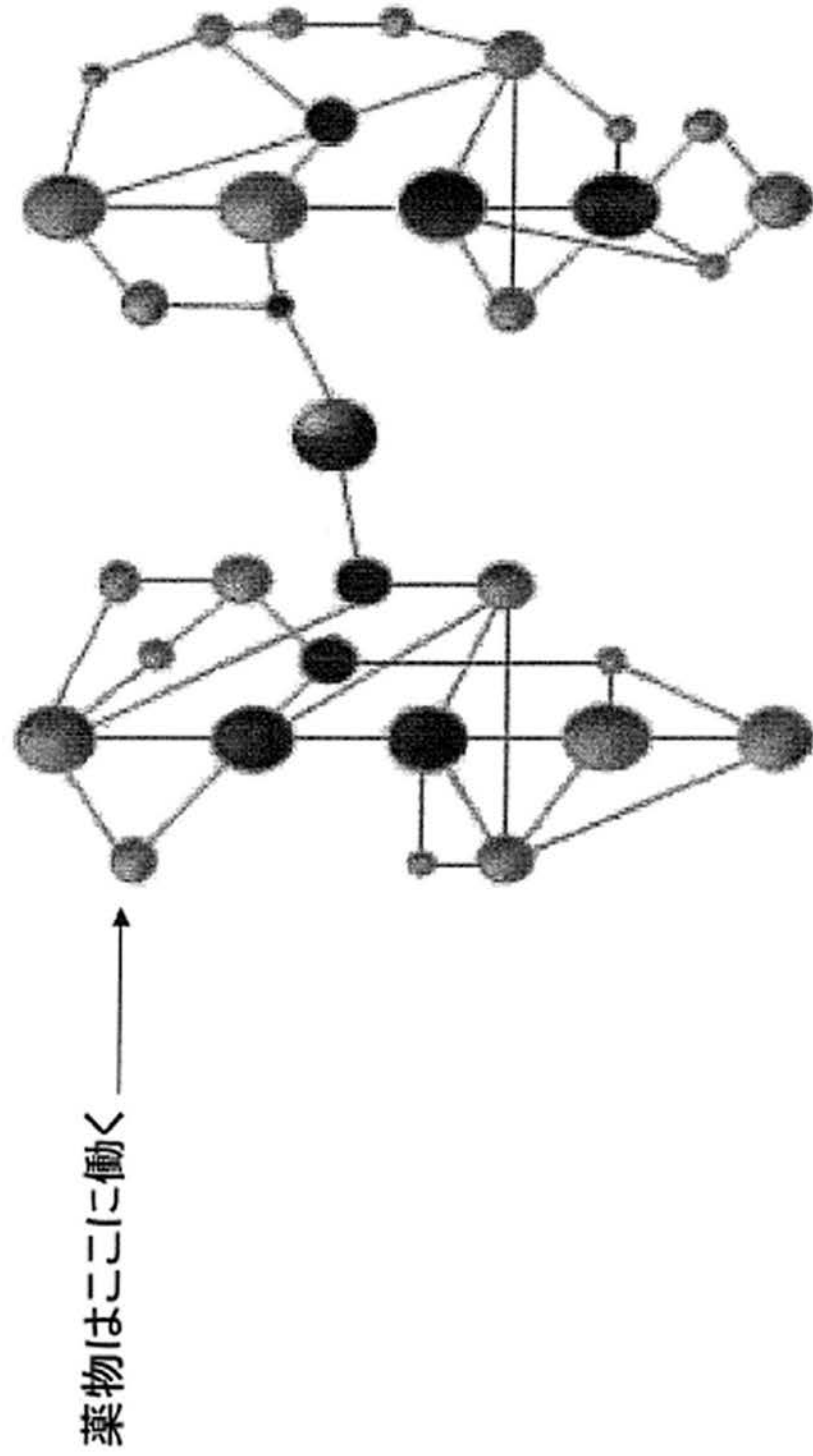
図1. 生細胞中における化合物及び薬物のオン経路及びオフ経路作用の同定



蛋白又は他の巨大分子の翻訳後修飾についての  
細胞ベースアッセイ

【 図 2 】

図2. 細胞ネットワークの接続性により薬物及び他の小分子のオン経路及びオフ経路作用の検出が可能になる



● 蛋白又は他の巨大分子の翻訳後修飾についてのアッセイ

【 図 3 】

図3. 薬理的プロファイリングにおける工程

1. プロファイリングを行う  
化学物質又は生体化合物  
を選択する



3. 翻訳後修飾についての  
セルベースアッセイを構築する




4. 各アッセイにおける各化合物の作用を試験する。



2. 試験する細胞事象(経路、蛋白、標的)を  
選択する

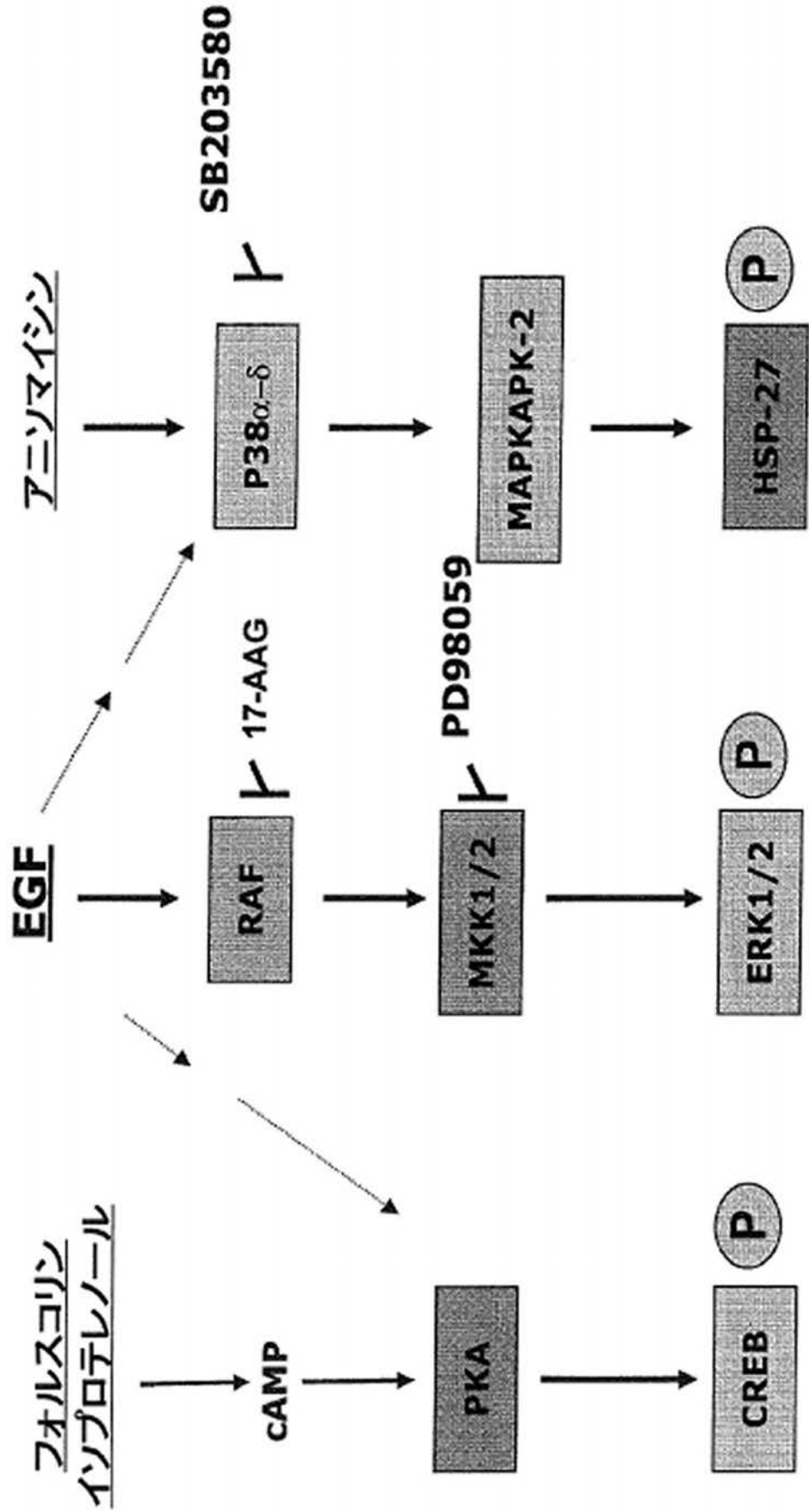


5. 2つ以上のアッセイから得られた結果を総合して、  
各化合物の薬理学的プロファイルを確立する。



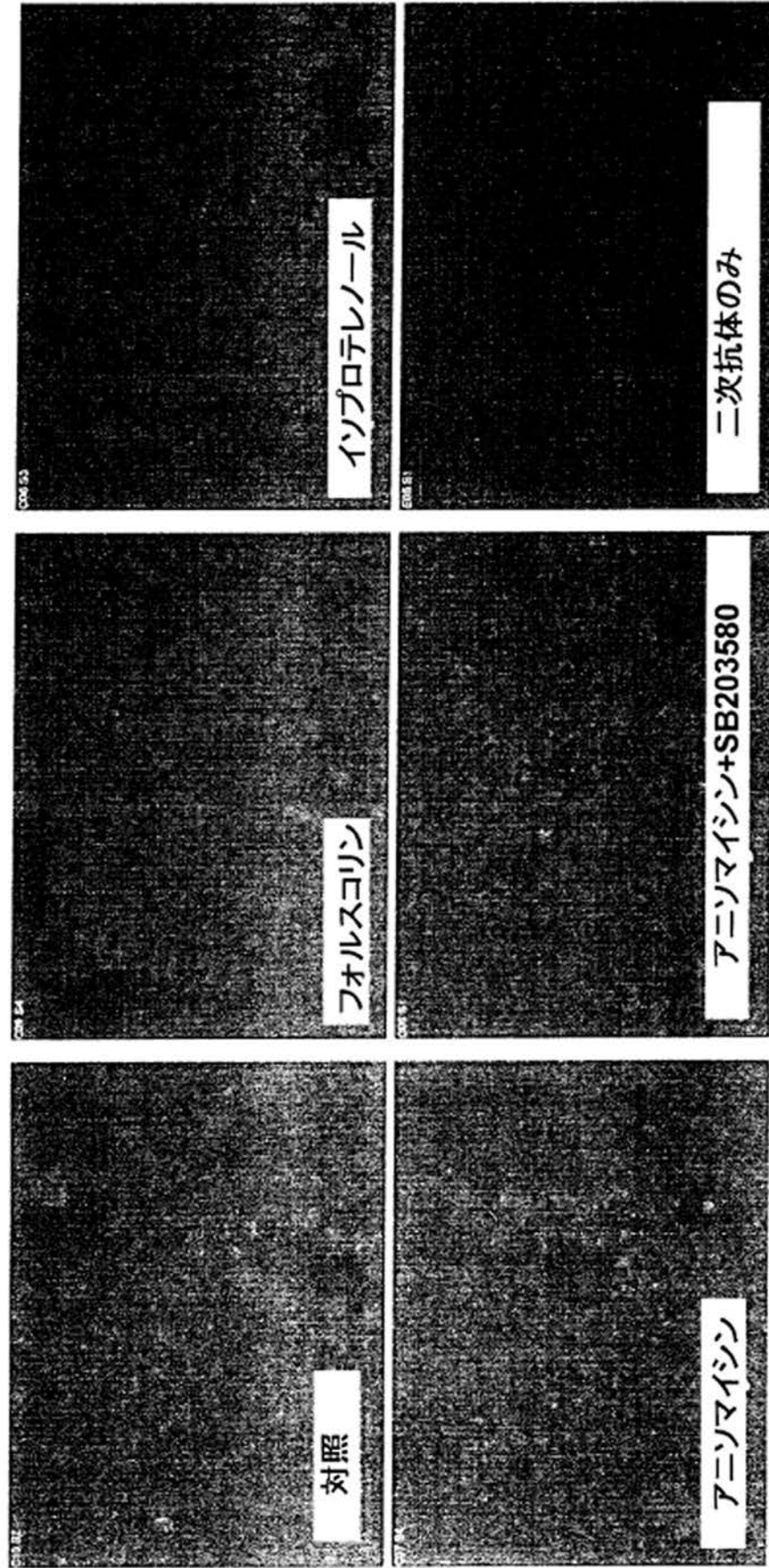
【 図 4 】

図4. 薬理的プロファイリングのための原理立証試験のデザイン



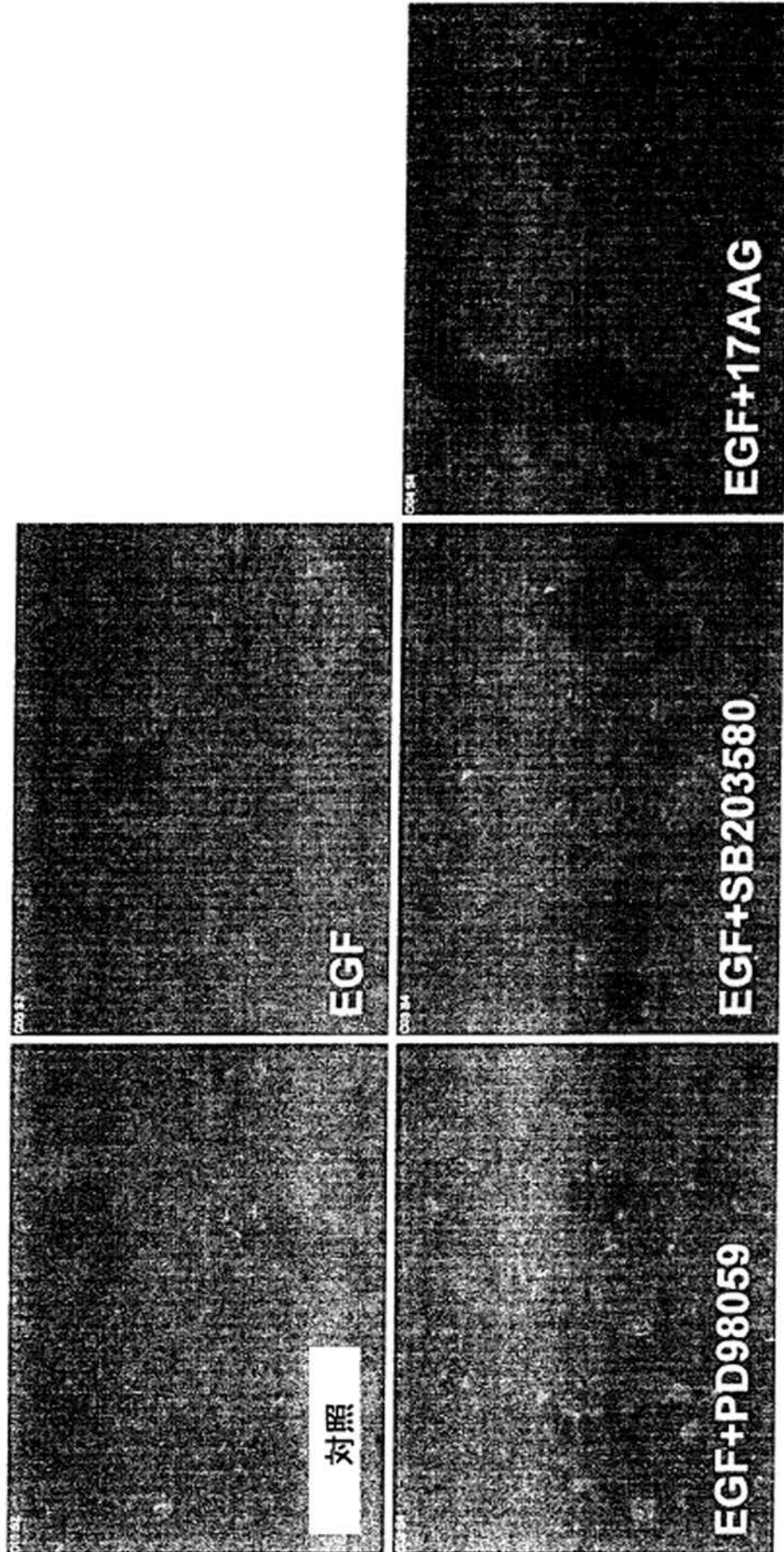
【 図 5 】

図5. HEK293細胞中のリン酸-CREB1に対する薬物類及びアニソマイシンの示差的効果



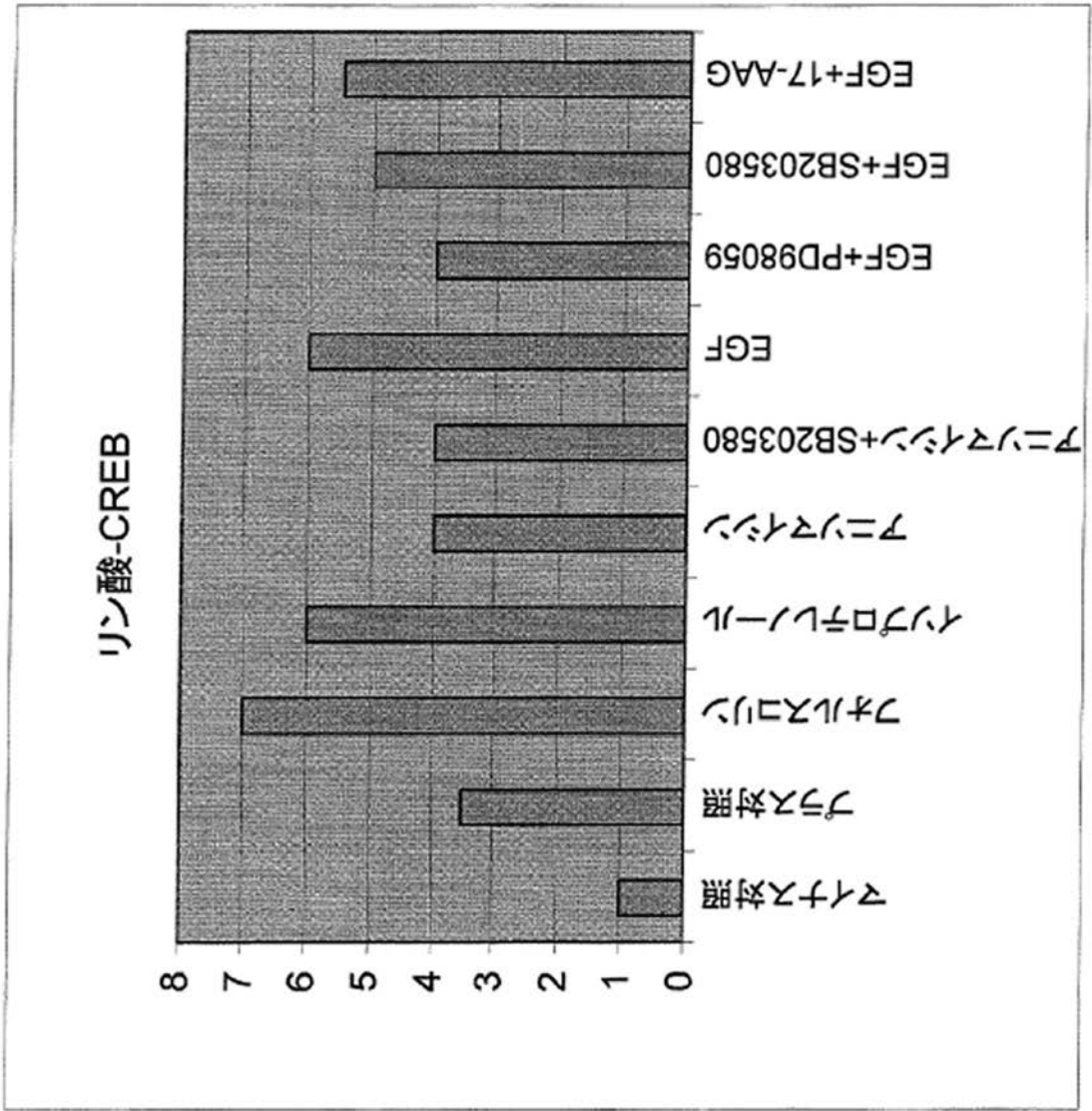
【 図 6 】

図6. ヒト細胞中のリン酸-CREBに対するEGF及び薬物類の示差的効果



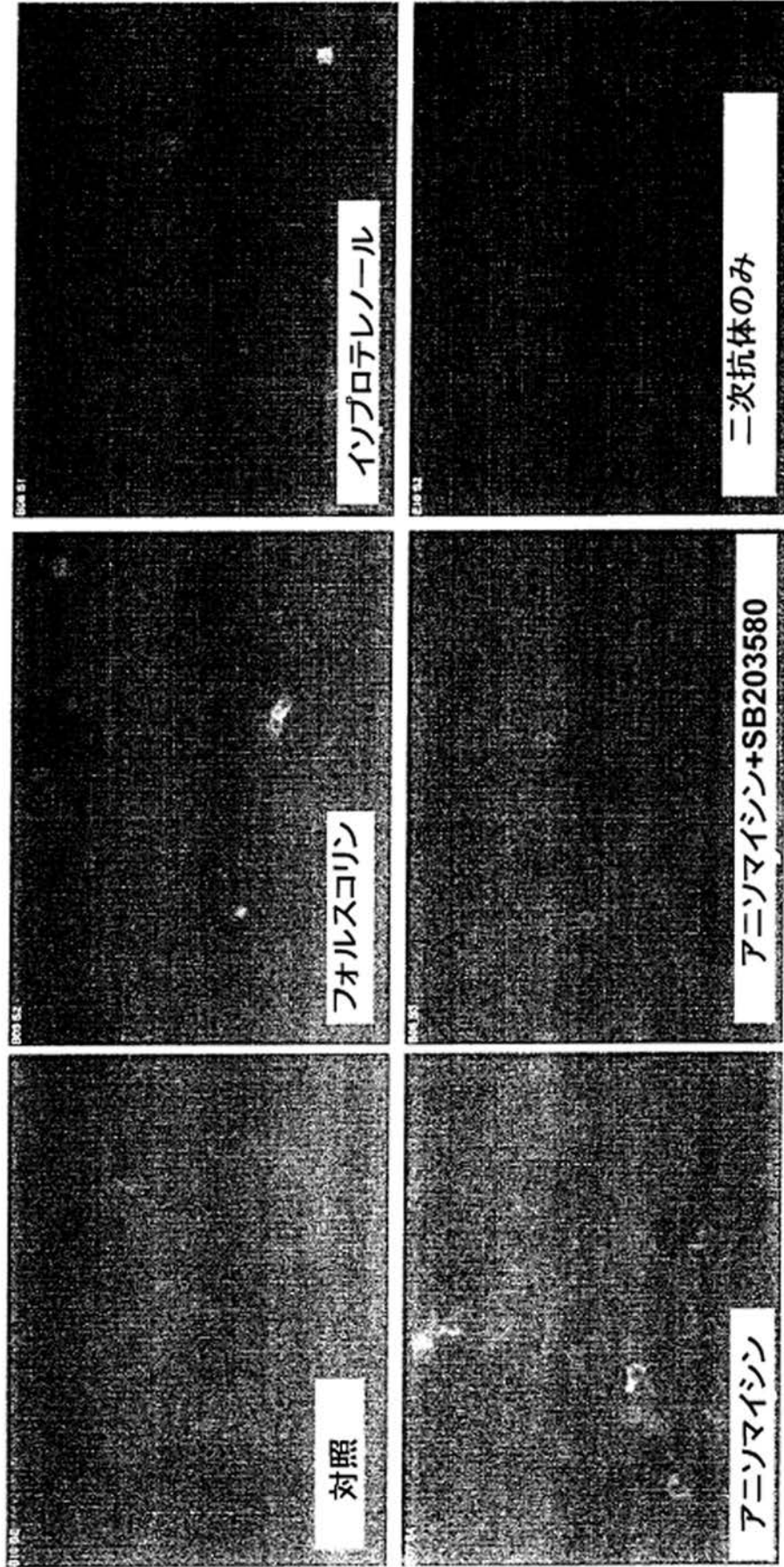
【 図 7 】

図7. 細胞核中のリン酸-CREBの量に対する薬物及び他の薬剤の示差的効果



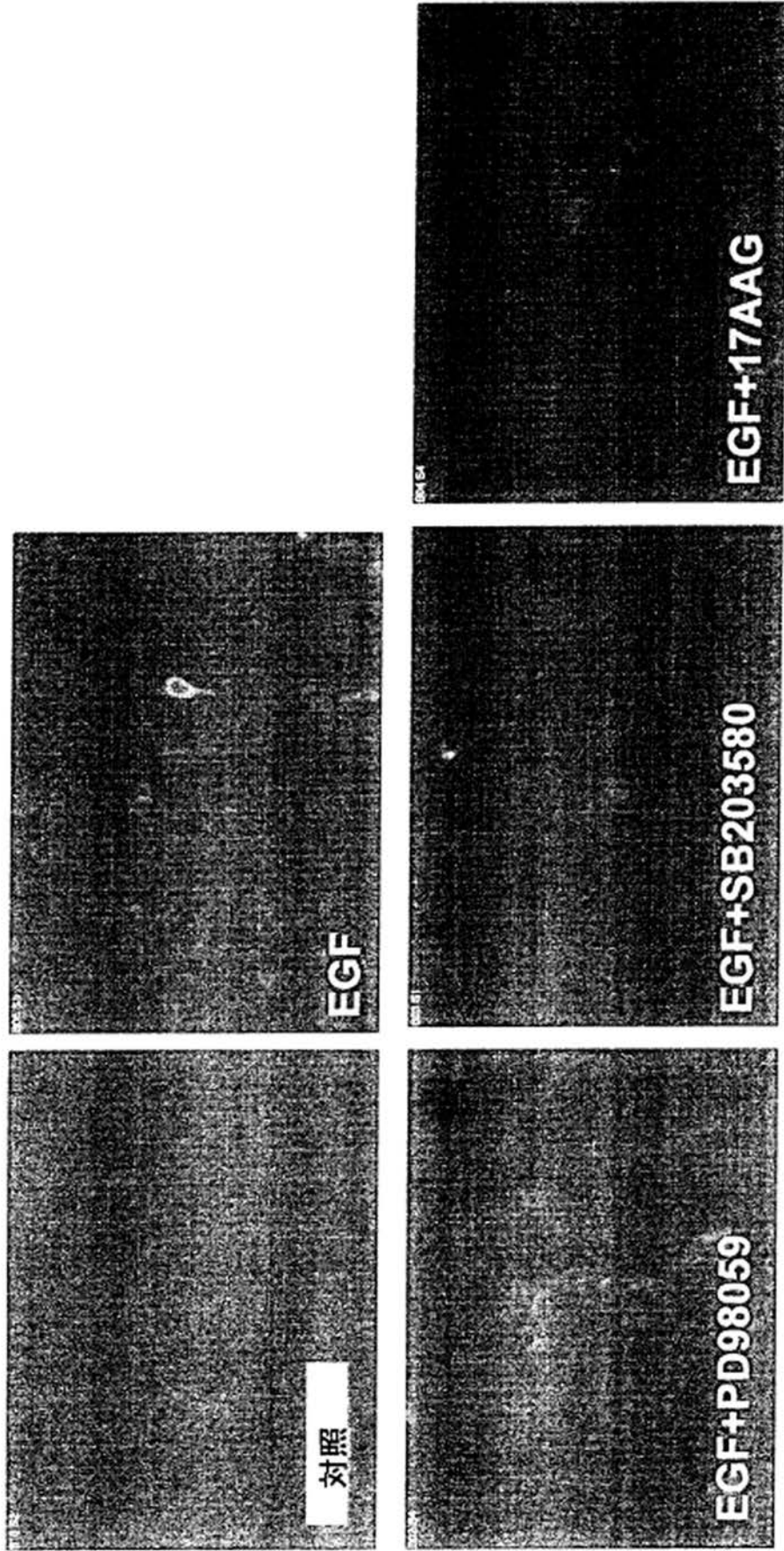
【 図 8 】

図8. リン酸-Hsp27に対する薬物類の示差的効果



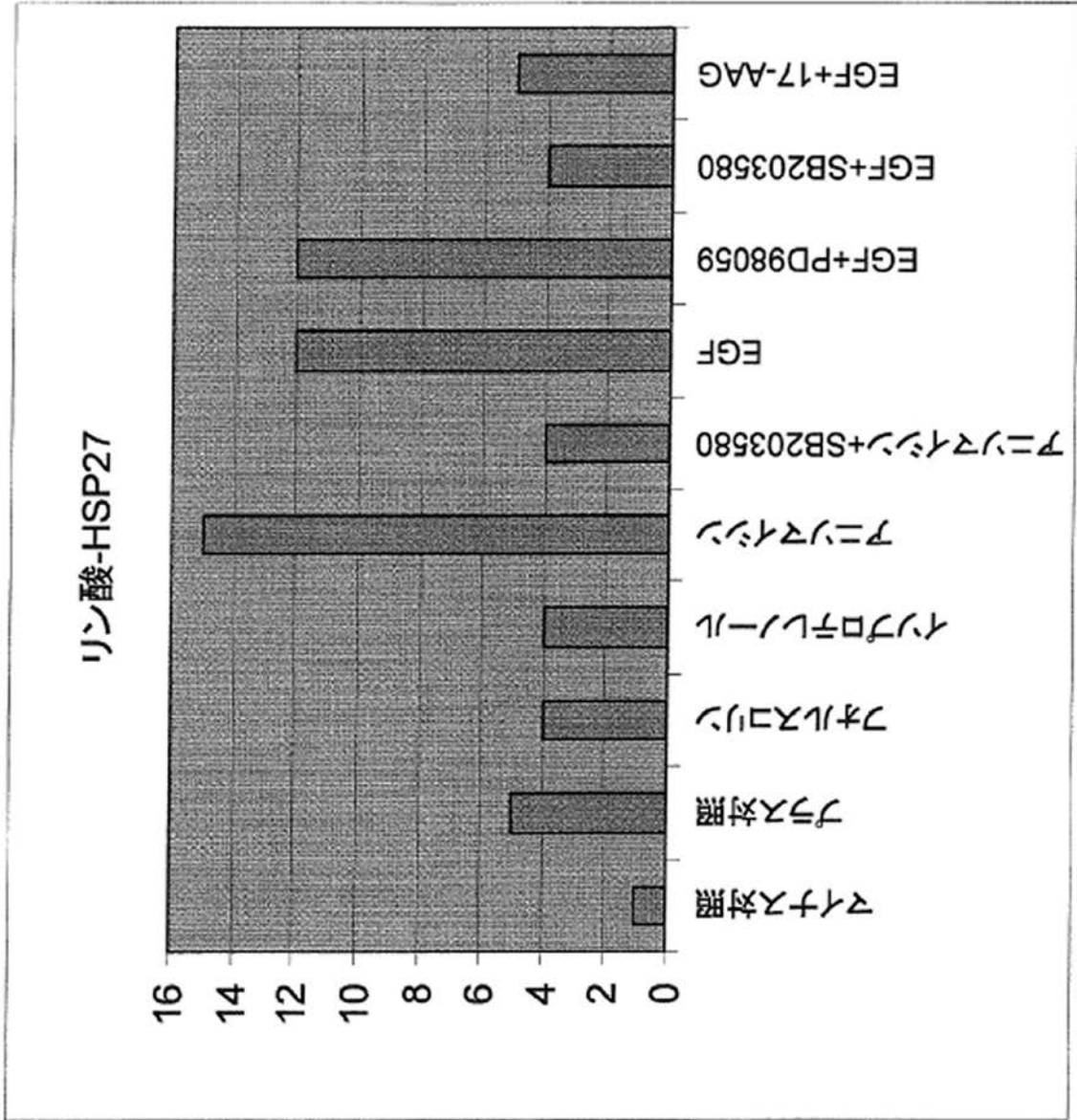
【 図 9 】

図9. ヒト細胞中のリン酸-Hsp27に対するEGF及び薬物類の示差的効果



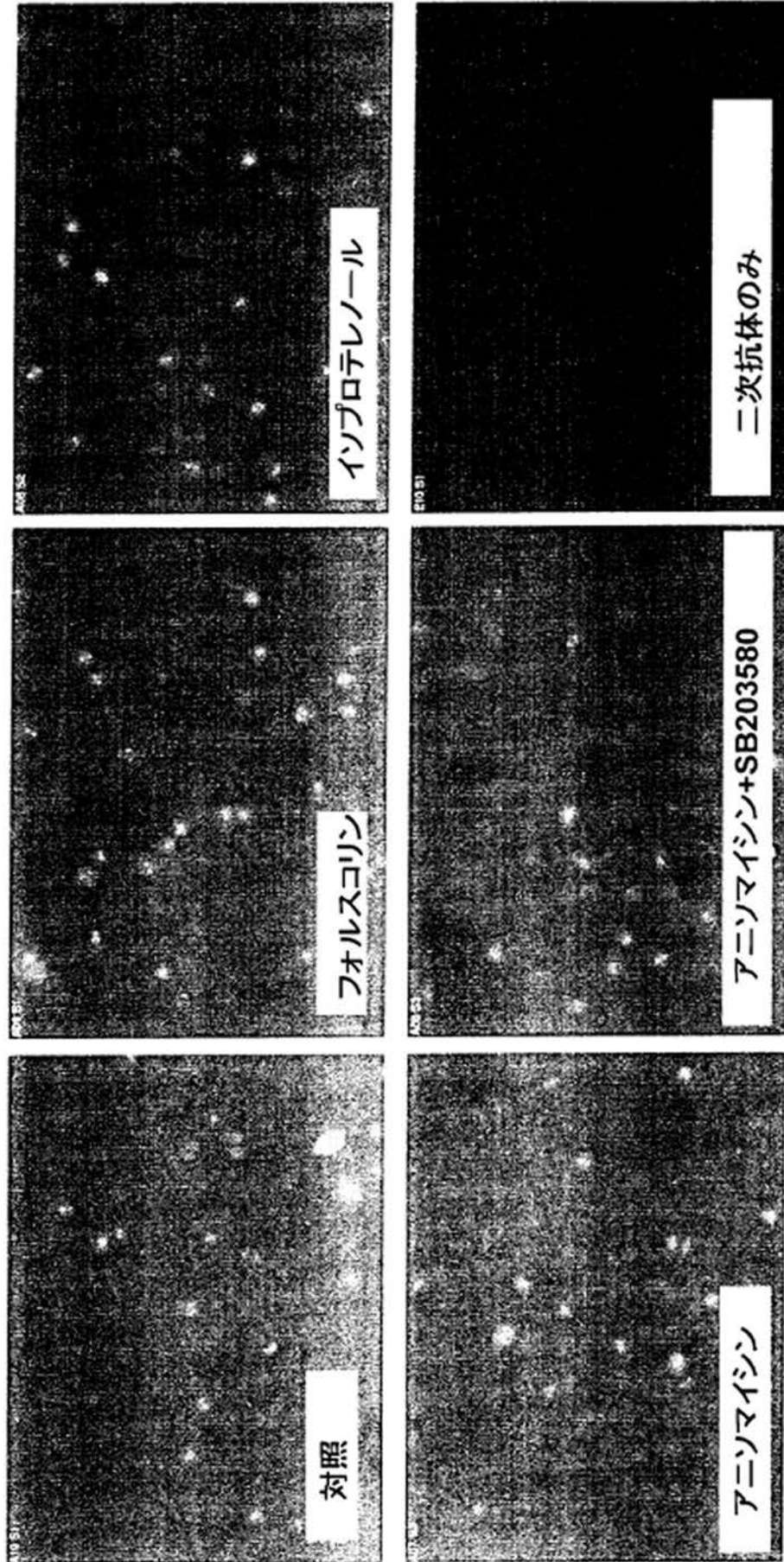
【 図 1 0 】

図10. ヒト細胞中のリン酸-Hsp27の量に対するEGF及び薬物の示差的効果



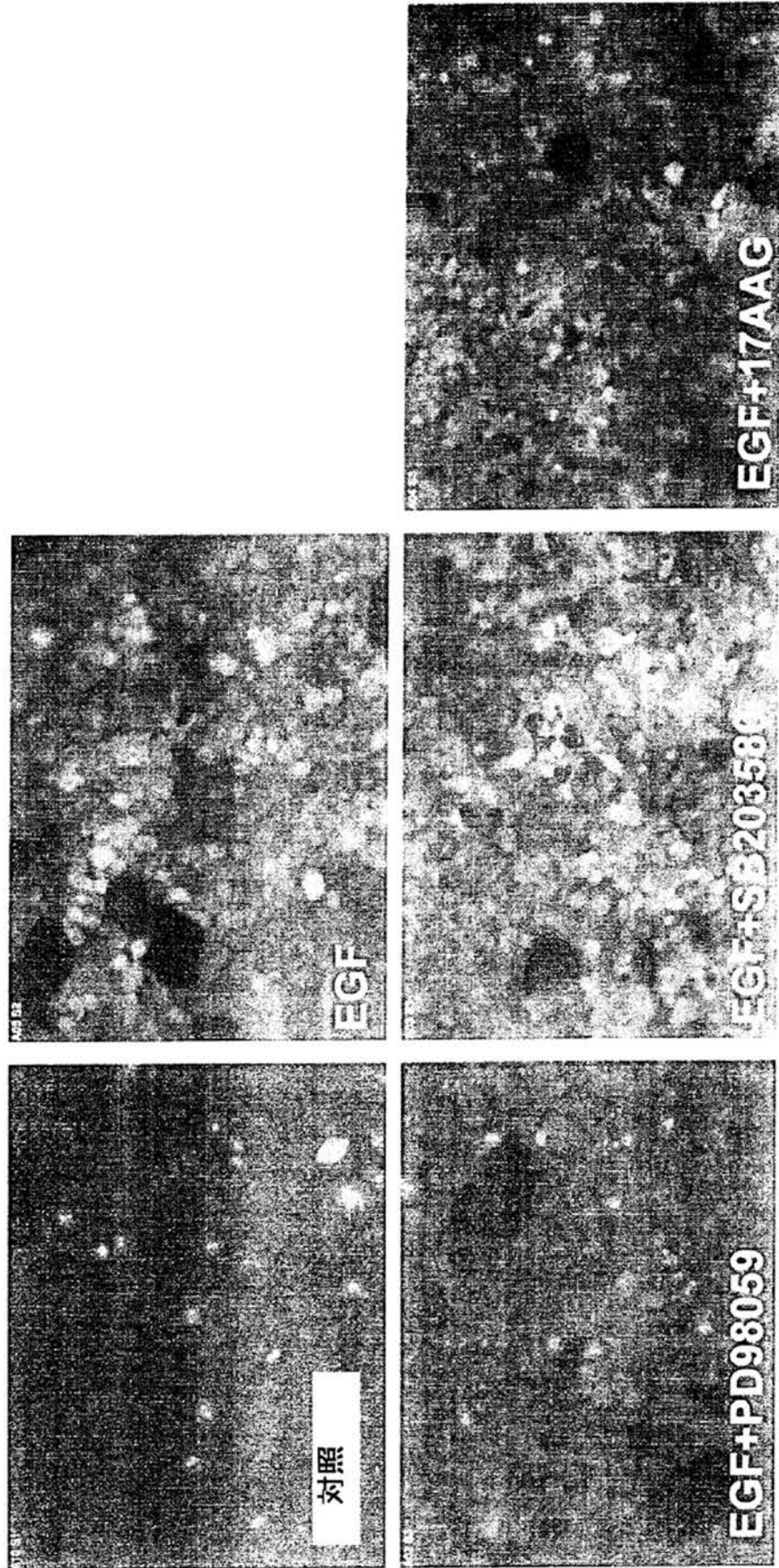
【 図 1 1 】

図11. ヒト細胞中のリン酸-ERKに対する薬物類の示差的効果



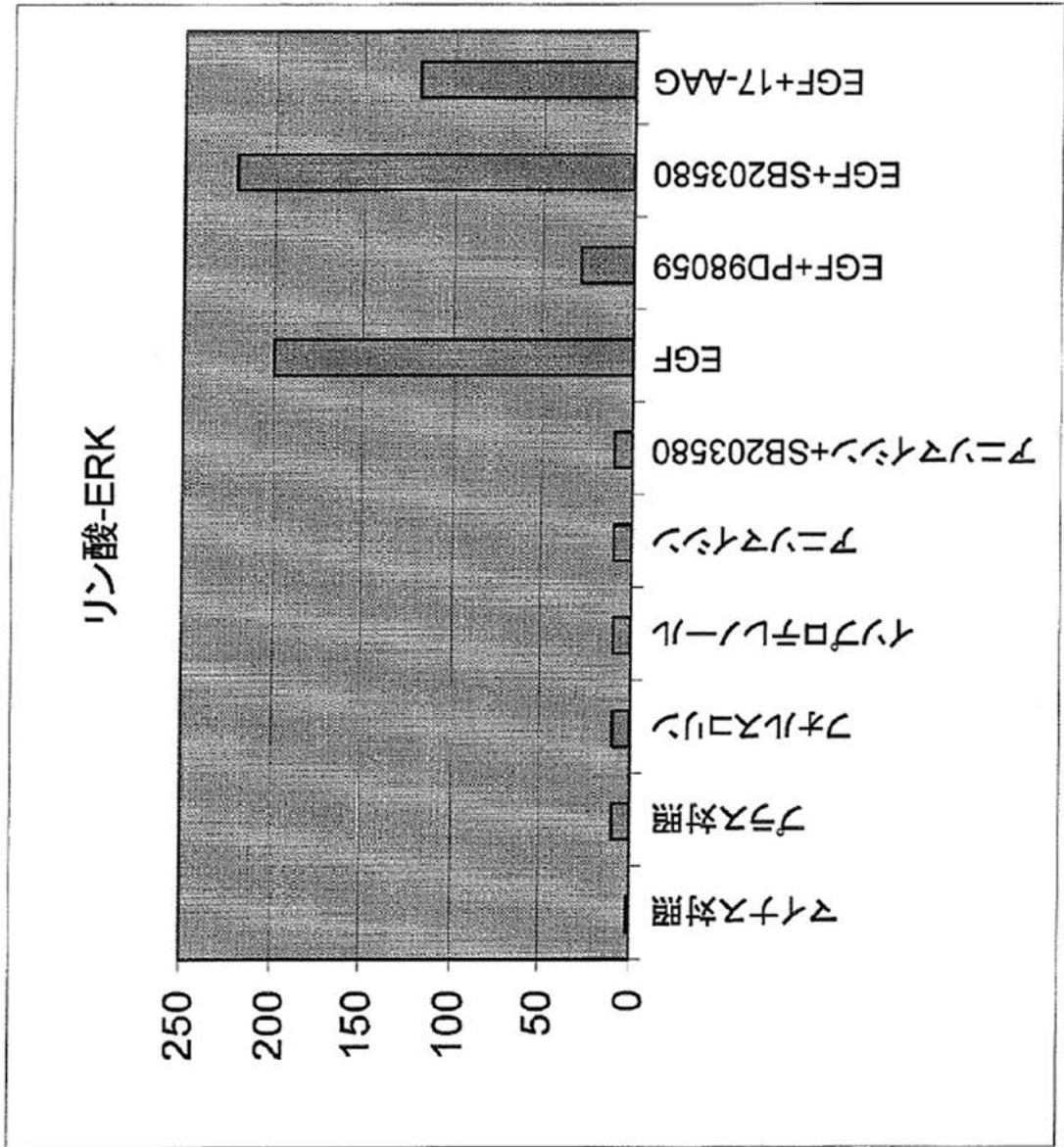
【 図 1 2 】

図12. リン酸-ERKに対するEGF及び薬物類の示差的効果



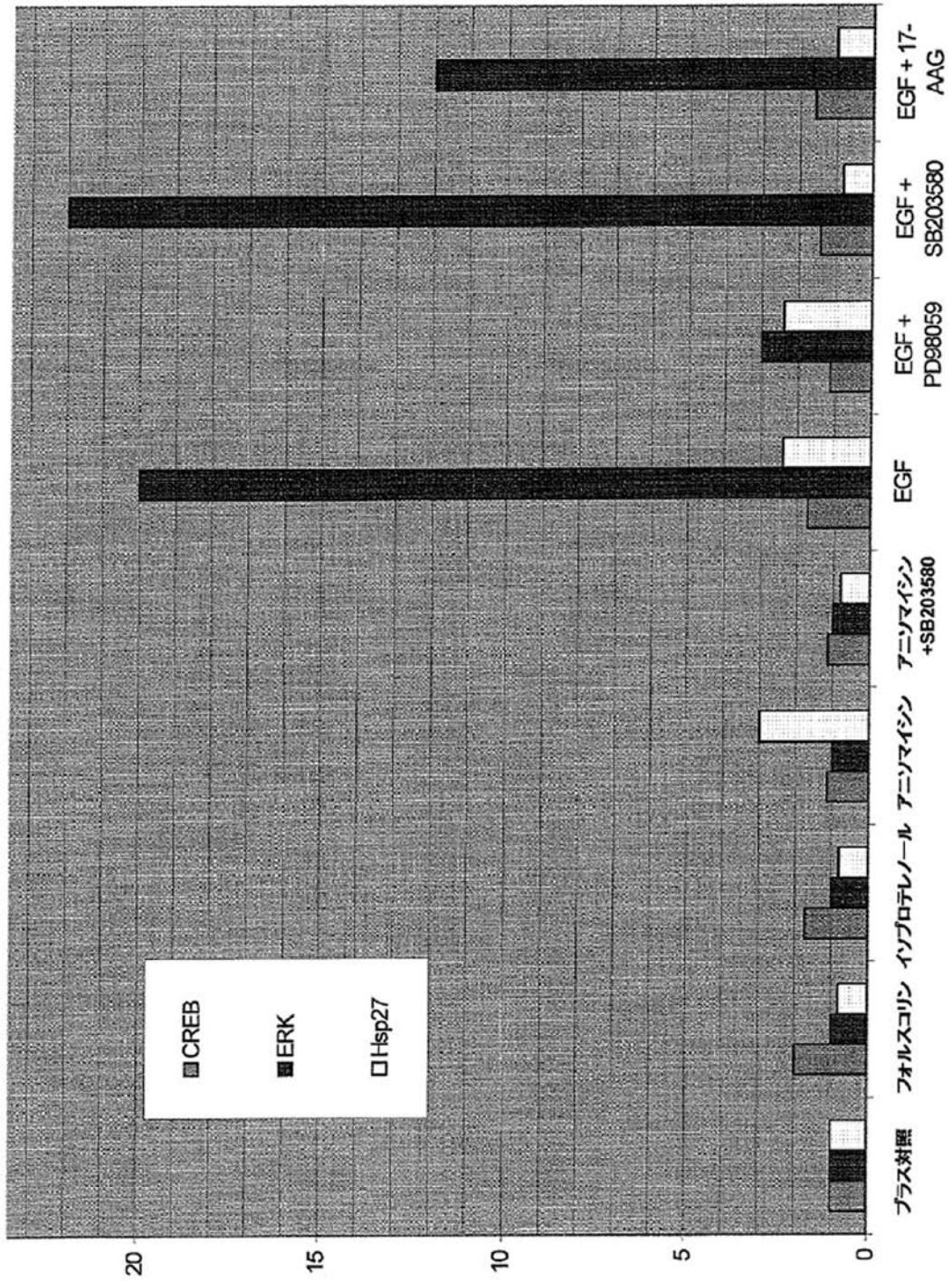
【 図 1 3 】

図13. リン酸-ERKの量に対するEGF及び薬物の示差的効果



【 図 1 4 】

図14. フォルスコリン、イソプロテレノール、アニンマイシン、EGF、SB203580、PD98059及び17-AAGによって作成された薬理的プロファイル



【 手続補正書 】

【 提出日 】 平成25年3月25日 (2013.3.25)

【 手続補正 1 】

【 補正対象書類名 】 特許請求の範囲

【 補正対象項目名 】 全文

【 補正方法 】 変更

## 【補正の内容】

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

化合物（類）の分析方法であって、(A) アッセイパネルを構築する工程、但し、上記パネルは無傷細胞中における2個以上の巨大分子の量及び / 又は翻訳後修飾についてのアッセイを含む；(B) 上記パネル中の上記アッセイの活性に対する化合物（類）の作用を試験する工程；及び(C) 上記アッセイの結果を使用して望ましい活性を有する化合物を同定する工程、を含む方法。

---

フロントページの続き

(72)発明者 ユ ヘレン

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 4 0 4 1 マウンテン ヴィュー エアホーン アベニュー  
ー 7 2 4

(72)発明者 マクドナルド マーニー エル

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 4 5 6 6 プレザントン コーテ ファシル 2 5 3 1

Fターム(参考) 2G045 AA40 CB01 DA36 FA11 FB03 FB12 GC15

4B063 QA01 QA18 QQ08 QR48 QR66 QS36 QS39 QX02

【外国語明細書】

WO 2006/023576

PCT/US2005/029278

**PHARMACOLOGICAL PROFILING OF DRUGS WITH CELL-BASED  
ASSAYS**

This application claims the priority benefit under 35 U.S.C. section 119 of U.S.  
5 Provisional Patent Application No. 60/602,317 entitled "Pharmacological Profiling Of Drugs  
With Cell-Based Assays", filed August 18, 2004, which is in its entirety herein incorporated by  
reference.

**BACKGROUND OF THE INVENTION**

10 The central challenge of the pharmaceutical industry is to develop drugs that are both safe  
and effective in man. Even an exquisitely selective chemical compound that binds to a  
therapeutic target may have completely unexpected or 'off-pathway' effects in living cells,  
leading to expensive pre-clinical and clinical failures. For the purposes of this invention, we  
define 'off-pathway' activity as any activity of a compound on a cellular target or pathway other  
15 than the intended target of the compound.

As evidenced by the 75% failure rate of drugs in clinical trials, the development of new  
drugs is a costly and unpredictable process, despite the number of research tools available to the  
pharmaceutical industry. Our central premise is that an understanding of the full spectrum of  
biological activities of drug candidates would help to identify potentially adverse effects of drugs  
20 prior to clinical trials. A corollary premise is that the off-pathway effects of new drugs are  
responsible for many if not all of the failures in new drug development.

In recent years, numerous attempts have been made to establish methods for assessing the  
selectivity and off-pathway activities of lead compounds. Such methods often include one or  
more of the following: (a) measuring the ability of a test compound of interest to bind to or

WO 2006/023576

PCT/US2005/029278

inhibit purified proteins in vitro; (b) treating cells (or whole organisms) with a test compound; preparing a cell extract or lysate; and then measuring changes in the amount of various gene transcripts in the extract or lysate in response to the test compound; (c) treating cells (or whole organisms) with a test compound; preparing a cell extract or lysate; and then measuring changes  
5 in the activity, amount, or phosphorylation status of proteins in the extract or lysate in response to the test compound; or (d) preparing a cell or tissue extract or lysate, then contacting the extract or lysate with a test compound linked to a solid surface such as a bead; and identifying the proteins that bind to the test compound. Each of these approaches is described in more detail below.

10 In the first instance, test compounds may be individually tested against purified enzymes or receptors in vitro, to determine their ability to bind and/or inhibit proteins other than their intended targets. Methods for the measurement of drug or receptor activity are widespread and are well known to those skilled in the art. They include enzyme-linked immunoabsorbent assays; radioligand binding assays; radioactive, chemiluminescent and luminescent assays for the  
15 measurement of the products of enzyme reactions; and other biochemical techniques that vary based on the characteristics of the protein target. For example, kinases have become widespread as drug targets, and methods have been developed for assessing the selectivity of kinase inhibitors. Kinases control many important processes, including the regulation of signaling cascades within cells and have been avidly pursued as pharmaceutical targets. There are over  
20 500 distinct kinases encoded by the human genome, making this a particularly fruitful class of targets for drug discovery. Drugs such as Gleevec™ have reached the market for the treatment of cancer, and over 20 other kinase inhibitors are in clinical trials for diseases ranging from cancer to rheumatoid arthritis. Most such compounds bind to the ATP-binding site of the kinase

WO 2006/023576

PCT/US2005/029278

target. Since the ATP-binding sites of kinases are highly homologous it has been difficult to develop drug molecules that are highly specific for their intended target. As a result, a variety of companies have established kinase inhibitor profiling products and services designed to assess the selectivity of lead compounds. Widely-used profiling methods include testing of lead  
5 compounds against dozens of individual, purified kinases in vitro to determine which kinases are inhibited by the compound. Such methods are rapid, inexpensive, and increasingly comprehensive as a result of the completion of the mapping of the 'kinome' and the availability of full-length genes encoding human kinases. Providers of such profiling services and related  
10 products include ActivX Biosciences Inc., Kinexus, and PanLabs. Providers of kinase profiling products include Becton Dickinson (PowerBlot), Luminex (xMAP technology), Cell Signaling Technology, Upstate Biotechnology, Calbiochem, and a host of other commercial suppliers of reagents and instrumentation.

Such in vitro approaches have significant drawbacks with respect to pharmacological profiling. The most significant limitation is that that even a highly selective inhibitor of a kinase  
15 may be capable of binding, activating, or inhibiting a plethora of other proteins that are not kinases. Such off-target or off-pathway activities are unpredictable, and cannot be assessed in any kinase-specific assay. More to the point, it is that it is not possible to establish truly global approaches based on purified proteins, because it is simply not feasible to individually assay for each of the tens of thousands of proteins representing the biological milieu.

20 In this regard, methods that are capable of detecting the binding of drugs to proteins within cell or tissue lysates have an advantage over in vitro assays. High-throughput methods have been developed that involve binding the test compound to a bead or other solid surface, preparing tissue or cell extracts or lysates, and analyzing the proteins bound to the bead by mass

WO 2006/023576

PCT/US2005/029278

spectroscopy, immunoprecipitation, or flow cytometry. In a second manifestation of this approach, cells or whole animals are treated with the test compound, a cell or tissue lysate is prepared, and the post-translational modification status of proteins is assessed in the lysate. The latter methodology is enabled by a rapidly expanding collection of modification-specific antibodies that bind only to the phosphorylated form of individual proteins. The proteins in the cell lysates are typically either separated by 2-dimensional gel electrophoresis and then probed using Western blotting techniques, or are analyzed by multiplexed arrays of phospho-specific antibodies on beads or on antibody arrays (e.g. Nielsen et al., 2003, PNAS 100: 9330-9335).

Methods that rely upon cell lysates often require amounts of compound that are far higher than physiological levels. More importantly, when cells or tissues are disrupted, artifacts can occur as a result of removing the proteins from their native subcellular milieu. In order to assess the mode of action of a drug within the complex biochemical pathways that make up a living cell, one needs to cast widely across the cell for drug activity.

Most pharmacological profiling is not based on protein activity but is performed with DNA microarrays (gene chips). Microarrays have spawned the field of toxicogenomics. Cells, or whole animals, are treated with the drug or compound of interest. Following a period of hours or days, messenger RNA is isolated from the cell or tissue. The pattern of expression of thousands of individual mRNAs in the absence and presence of the drug are compared. Transcriptional profiling can reveal differences between compounds, where the compounds affect the ultimate transcriptional activity of one or more pathways. Unfortunately, changes in the level of individual mRNA molecules do not always correlate directly with the level or activity of the corresponding protein at a single point in time. Furthermore, many proteins undergo numerous post-translational modifications and biomolecular interactions, which may

WO 2006/023576

PCT/US2005/029278

affect the functions and activities of proteins within a tissue or cell. Thus, simply identifying all of the mRNA species present and the levels at which they are present at a particular time, may not yield the complete picture of a particular drug. Finally, although transcription reporter assays have the capacity to provide information on the response of a pathway to chemical agents, such  
5 assays only measure the consequence of pathway activation or inhibition, and not the site of action of the compound. Even a targeted and highly selective drug may affect the transcription of dozens of genes, making interpretation of the results of gene chip experiments an arduous task.

Ideally, live cells could be treated with drugs and the effect of the drug could be  
10 measured within minutes or hours at a specific point within a pathway. Unlike transcriptional reporter assays, the information obtained by monitoring an individual protein within a pathway should reflect the effect of a drug on that particular branch or node of a cell signaling pathway, not its endpoint. Unlike drug profiling performed with cell lysates, the use of intact cells would enable studies of physiologically relevant concentrations of drugs. Therefore, we sought to  
15 establish a strategy and methodology for global pharmacological profiling in intact cells. Ideally such a methodology would have the following attributes: (a) the method would be applicable to intact cells or tissues, not requiring cell lysis; (b) the method could be applied to any drug class, target class, or drug mechanism of action; (c) the method would be capable of providing fine detail of the mechanism of action of the drug of interest; (d) the method would be amenable to  
20 large-scale automated analyses using off-the-shelf instrumentation. In particular we sought to determine whether direct measures of signaling events in intact human cells could be used for pharmacological profiling.

WO 2006/023576

PCT/US2005/029278

The background for the present invention is as follows. Binding of agonists to receptors induces a cascade of intracellular events mediated by other signaling molecules. These events cause a coordinated cascade of intracellular events that influences the behavior of the living cell. Often, post-translational modifications of particular proteins or other macromolecules occur dynamically upon addition of an agonist, an antagonist or an inhibitor of a pathway. Frequently, such signaling cascades involve cycles of post-translational modifications of proteins, such as phosphorylation and dephosphorylation by kinases and phosphatases, respectively. These events are carried out by distinct protein kinases, which phosphorylate other proteins on serine, threonine or tyrosine residues. In turn, protein phosphatases are responsible for dephosphorylating other proteins. Phospho-specific antibodies allow for the detection of the net changes in phosphorylation status that result from phosphorylation and dephosphorylation of proteins. Such antibodies have become standard reagents in research laboratories, and are used in conjunction with a number of in vitro methods that include Western blotting, immunoprecipitation, ELISA (enzyme-linked immunoabsorbent assays), and multiplexed bead assays. A variety of commercial entities sell such antibodies, including Bio-Rad Laboratories; Cell Signaling Technology; Calbiochem; and Becton-Dickinson. Such antibodies can be used to analyze intact cells by flow cytometry and by immunofluorescence.

Phospho-specific antibodies have been applied to a variety of research investigations of individual signaling proteins and pathways. The vast majority of these studies involve cell or tissue lysates. The prior art is remarkably silent on pharmacological profiling in intact cells. For the purposes of the present invention we focus on methods that enable the quantification and/or localization of proteins in intact cells. In particular, for the purposes of drug discovery we focus on pharmacological profiling in human cells. A preferred embodiment of the current invention

WO 2006/023576

PCT/US2005/029278

uses immunofluorescence assays in human cells in combination with high-content imaging systems and/or automated microscopy.

**OBJECTS AND ADVANTAGES OF THE INVENTION**

- 5
- It is an object of the present invention to provide a method for pharmacological profiling of drugs, drug candidates, and drug leads on a genome-wide scale.
  - It is a further object of the invention to provide methods for assessing the activity, specificity, potency, time course, and mechanism of action of chemical compounds on a broad scale.
- 10
- It is also an object of the invention to allow determination of the selectivity of a chemical compound within the context of a living cell.
  - It is an additional object of the present invention to allow detection of the potential off-pathway effects, adverse effects, or toxic effects of a chemical compound within the biological context of a cell of interest.
- 15
- It is an additional object of the invention to enable lead optimization, by performing pharmacological profiling of a collection or a series of lead compounds in an iterative manner until a desired pharmacological profile is obtained.
  - A further object of the invention is to enable attrition of drug candidates with undesirable or toxic properties.
- 20
- It is a further object of the invention to establish pre-clinical safety profiles for new drug candidates.

WO 2006/023576

PCT/US2005/029278

- It is a further object of the present invention to improve the efficiency of the drug discovery process by identifying unintended effects of lead compounds prior to clinical trials.
- It is a further object of the present invention to improve the safety of first-in-class drugs by identifying adverse, toxic or other off-pathway effects prior to clinical trials.
- It is an additional object of the present invention to identify positive or negative effects of drug excipients, carriers or drug delivery agents.
- It is a further object of the present invention to provide methods suitable for the development of 'designer drugs' with predetermined properties.
- An additional object of the invention is to enable the identification of new therapeutic indications for known drugs.
- Another object of this invention is to provide a method for analyzing the activity of any class of pharmacological agent on any biochemical pathway.
- A further object of this invention is to enable the identification of the biochemical pathways underlying drug toxicity.
- A further object of this invention is to enable the identification of the biochemical pathways underlying drug efficacy for a broad range of diseases.
- A further object of this invention is to provide methods, assays and compositions useful for drug discovery and evaluation.
- An additional object of the invention is to provide panels of assays suitable for pharmacological profiling.

WO 2006/023576

PCT/US2005/029278

- The present invention has the advantage of being broadly applicable to any pathway, gene, gene library, drug target class, reporter protein, detection mode, synthetic or natural product, chemical entity, assay format, automated instrumentation, or cell type of interest.

5

### SUMMARY OF THE INVENTION

The present invention seeks to fulfill the above-mentioned needs for pharmaceutical discovery. The present invention teaches that cell-based assays can be used to identify the mechanism of action, selectivity, and adverse or off-pathway effects of pharmacologically active agents. The present invention provides a general strategy for carrying out drug analysis and pharmacological profiling based on cell-based assays. A preferred embodiment of the present invention comprises high-content assays in intact cells. The novel methodology of this invention enables: (1) Direct visualization of the molecular architecture of specific cellular responses at the level of the discrete molecules that enable such cellular architecture; (2) Direct and quantitative analysis of drug effects on cellular signaling networks in a manner never before possible; and (3) The creation of quantitative and predictive pharmacological profiles of lead compounds and drugs regardless of their mechanisms of action.

Cellular responses are mediated by complex networks of proteins that are resident within subcellular compartments. Cell proliferation, cell-death (apoptosis), chemotaxis, metastases etc. are all controlled at the level of the proteins that act in concert to regulate cell behavior. This invention allows the quantitative analysis of the effects of chemical compounds on biochemical networks on a large scale. Importantly, the present invention is directed to a wide spectrum of chemical structures and drug targets, providing an advantage over previous methods that are limited to kinases. The invention enables an analysis of the spectrum of activity of any chemical

WO 2006/023576

PCT/US2005/029278

compound, for any known or novel drug class or target class, and for chemical compounds with completely unknown mechanisms of action. We teach that any class of drug or target can be profiled using cell-based assays for post-translational modifications of macromolecules (proteins). Drug target classes that can be studied with the present invention include G-protein  
5 coupled receptors, growth factor receptors, protease inhibitors, nuclear hormone receptors, membrane hormone receptors, kinases, phosphatases, hydrolases, proteasome inhibitors, and any other known target class. If the target or mechanism of action of the compound of interest is not known, the present methodology will enable identification of the mechanism of action.

The principle of the invention relies on the connectivity of cellular networks, such that  
10 action of a drug at a particular point in a pathway can be measured by a measurable alteration in the post-translational modification status of macromolecules downstream – but physically linked to - the drug target. For example, stimulation of a canonical signal transduction pathway by a pathway agonist often leads to the phosphorylation of key proteins that participate in that pathway. The effect of a drug could therefore be assessed by quantifying the amount and/or  
15 location of two or more phospho-proteins in the absence and presence of the pathway agonist. Thus the phospho-proteins serve as sentinels of pathway activity. For example, a drug acting upstream of a sentinel would block or inhibit the phosphorylation of the sentinel in response to a cellular stimulus (see Fig 2). Thus, the phosphorylation status of the phosphoprotein in the absence or presence of a chemical compound can reveal whether or not the test compound acts  
20 on that pathway, thereby providing information on drug selectivity. This principle enables a single assay to potentially report on dozens of events in the intact cell. This also means that it is not necessary to construct an assay for every protein that may be affected by the drug of interest. By combining multiple assays (sentinels) in a panel, the full spectrum of activity can be

WO 2006/023576

PCT/US2005/029278

identified; the profile of activity can be compared with that of known drugs; and lead compounds can be attrited based on undesirable profiles.

The invention requires a direct method for quantifying and/or localizing a modified protein in an intact cell. The present invention requires that compounds of interest are tested  
5 against a panel of cellular assays in order to obtain profiles of their activities. A wide variety of antibodies, probes, and stains can be employed in conjunction with the invention. Examples of suitable antibodies are shown in Table 1. These and other antibodies or targeted probes can be used in conjunction with a wide variety of biological dyes or stains, including stains of subcellular compartments (nucleus, membrane, cytosol, mitochondria, golgi, etc.); ion-sensitive  
10 dyes such as calcium-sensitive dyes; dyes that measure apoptosis or changes in cell cycle state; DNA intercalating dyes; and other commonly used biochemical and cell biological reagents. For example, co-staining of subcellular compartments would allow the fine details of the effects of drugs to be assessed. Such biochemical reagents and methods for their use are well known to those skilled in the art.

15 In addition to phospho-specific antibodies, other modification-state-specific antibodies can, in principle, be generated for any macromolecule that undergoes a post-translational modification in the cell. Such novel reagents can be used in conjunction with this invention. Such post-translational modifications include methylation, acetylation, farnesylation, glycosylation, myristylation, ubiquitination, sumoylation, and other modifications. Such  
20 alterations may be detected using antibodies in conjunction with immunofluorescence, as described herein; however, the method is not limited to the use of antibodies. It is important to note that the invention is not limited to specific reagents or classes or reagents, or protocols for their use. Alternative (non-antibody) probes of target or pathway activity can be used, so long as

WO 2006/023576

PCT/US2005/029278

they (a) bind differentially upon a change in a macromolecule in a cell, such that they reflect a change in pathway activity, cell signaling, or cell state related to the effect of a drug; (b) can be washed out of the cell in the unbound state, so that bound probe can be detected over the unbound probe background; and (c) can be detected either directly or indirectly, e.g. with a  
5 fluorescent or luminescent method. A variety of organic molecules, peptides, ligands, natural products, nucleosides and other probes can be detected directly, for example by labeling with a fluorescent or luminescent dye or a quantum dot; or can be detected indirectly, for example, by immunofluorescence with the aid of an antibody that recognizes the probe when it is bound to its target. Such probes could include ligands, native or non-native substrates, competitive binding  
10 molecules, peptides, nucleosides, and a variety of other probes that bind differentially to their targets based on post-translational modification states of the targets. It will be appreciated by one skilled in the art that some methods and reporters will be better suited to different situations. Particular reagents, fixing and staining methods may be more or less optimal for different cell types and for different pathways or targets.

15

WO 2006/023576

PCT/US2005/029278

**TABLE 1. Examples of targeted reagents that may be used in conjunction with the present invention**

	Akt (pS472/pS473), Phospho-Specific (PKBa) Antibodies
	Caveolin (pY14), Phospho-Specific Antibodies
5	Cdk1/Cdc2 (pY15), Phospho-Specific Antibodies
	eNOS (pS1177), Phospho-Specific Antibodies
	eNOS (pT495), Phospho-Specific Antibodies
	ERK1/2 (pT202/pY204), Phospho-Specific Antibodies (p44/42 MAPK)
	FAK (pY397), Phospho-Specific Antibodies
10	IkBa (pS32/pS36), Phospho-Specific Antibodies
	Integrin b3 (pY759), Phospho-Specific Antibodies
	JNK (pT183/pY185), Phospho-Specific Antibodies
	Lck (pY505), Phospho-Specific Antibodies
	p38 MAPK (pT180/pY182), Phospho-Specific Antibodies
15	p120 Catenin (pY228), Phospho-Specific Antibodies
	p120 Catenin (pY280), Phospho-Specific Antibodies
	p120 Catenin (pY96), Phospho-Specific Antibodies
	Paxillin (pY118), Phospho-Specific Antibodies
	Phospholipase Cg (pY783), Phospho-Specific Antibodies
20	PKAR1b (pS114), Phospho-Specific Antibodies
	14-3-3 Binding Motif Phospho-specific Antibodies
	4E-BP1 Phospho-specific Antibodies
	AcCoA Carboxylase (Acetyl CoA) Phospho-specific Antibodies
	Adducin Phospho-specific Antibodies
25	AFX Phospho-specific Antibodies
	AIK (Aurora 2) Phospho-specific Antibodies
	Akt (PKB) Phospho-specific Antibodies
	Akt (PKB) Substrate Phospho-specific Antibodies
	ALK Phospho-specific Antibodies
30	AMPK alpha Phospho-specific Antibodies
	AMPK beta1 Phospho-specific Antibodies
	APP Phospho-specific Antibodies
	Arg-X-Tyr / Phe-X-pSer Motif Phospho-specific Antibodies
	Arrestin 1, beta Phospho-specific Antibodies
35	ASK1 Phospho-specific Antibodies
	ATF-2 Phospho-specific Antibodies
	ATM / ATR Substrate Phospho-specific Antibodies
	Aurora 2 (AIK) Phospho-specific Antibodies
	Bad Phospho-specific Antibodies
40	Bcl-2 Phospho-specific Antibodies
	Bcr Phospho-specific Antibodies
	Bim EL Phospho-specific Antibodies
	BLNK Phospho-specific Antibodies
	BMK1 (ERK5) Phospho-specific Antibodies
45	BRCA1 Phospho-specific Antibodies
	Btk Phospho-specific Antibodies
	C/EBP alpha Phospho-specific Antibodies
	C/EBP beta Phospho-specific Antibodies
	c-Abl Phospho-specific Antibodies
50	CAKb Phospho-specific Antibodies
	Caldesmon Phospho-specific Antibodies
	CaM Kinase II Phospho-specific Antibodies
	Cas, p130 Phospho-specific Antibodies
	Catenin, beta Phospho-specific Antibodies
55	Catenin, p120 Phospho-specific Antibodies
	Caveolin 1 Phospho-specific Antibodies

WO 2006/023576

PCT/US2005/029278

Caveolin 2 Phospho-specific Antibodies  
 Caveolin Phospho-specific Antibodies  
 c-Cbl Phospho-specific Antibodies  
 CD117 (c-Kit) Phospho-specific Antibodies  
 5 CD19 Phospho-specific Antibodies  
 cdc2 p34 Phospho-specific Antibodies  
 cdc2 Phospho-specific Antibodies  
 cdc25 C Phospho-specific Antibodies  
 cdk1 Phospho-specific Antibodies  
 10 cdk2 Phospho-specific Antibodies  
 CDKs Substrate Phospho-specific Antibodies  
 CENP-A Phospho-specific Antibodies  
 c-erbB-2 Phospho-specific Antibodies  
 Chk1 Phospho-specific Antibodies  
 15 Chk2 Phospho-specific Antibodies  
 c-Jun Phospho-specific Antibodies  
 c-Kit (CD117) Phospho-specific Antibodies  
 c-Met Phospho-specific Antibodies  
 c-Myc Phospho-specific Antibodies  
 20 Cofilin 2 Phospho-specific Antibodies  
 Cofilin Phospho-specific Antibodies  
 Connexin 43 Phospho-specific Antibodies  
 Cortactin Phospho-specific Antibodies  
 CPI-17 Phospho-specific Antibodies  
 25 cPLA2 Phospho-specific Antibodies  
 c-Raf (Raf1) Phospho-specific Antibodies  
 CREB Phospho-specific Antibodies  
 c-Ret Phospho-specific Antibodies  
 CrkII Phospho-specific Antibodies  
 30 CrkL Phospho-specific Antibodies  
 Cyclin B1 Phospho-specific Antibodies  
 DARPP-32 Phospho-specific Antibodies  
 DNA-topoisomerase II alpha Phospho-specific Antibodies  
 Dok-2, p56 Phospho-specific Antibodies  
 35 eEF2 Phospho-specific Antibodies  
 eEF2k Phospho-specific Antibodies  
 EGF Receptor (EGFR) Phospho-specific Antibodies  
 eIF2 alpha Phospho-specific Antibodies  
 eIF2B epsilon Phospho-specific Antibodies  
 40 eIF4 epsilon Phospho-specific Antibodies  
 eIF4 gamma Phospho-specific Antibodies  
 Elk-1 Phospho-specific Antibodies  
 eNOS Phospho-specific Antibodies  
 EphA3 Phospho-specific Antibodies  
 45 Ephrin B Phospho-specific Antibodies  
 erbB-2 Phospho-specific Antibodies  
 ERK1 / ERK2 Phospho-specific Antibodies  
 ERK5 (BMK1) Phospho-specific Antibodies  
 Estrogen Receptor alpha (ER-a) Phospho-specific Antibodies  
 50 Etk Phospho-specific Antibodies  
 Ezrin Phospho-specific Antibodies  
 FADD Phospho-specific Antibodies  
 FAK Phospho-specific Antibodies  
 FAK2 Phospho-specific Antibodies  
 55 Fc gamma RIIB Phospho-specific Antibodies  
 FGF Receptor (FGFR) Phospho-specific Antibodies

WO 2006/023576

PCT/US2005/029278

- FKHR Phospho-specific Antibodies
- FKHRL1 Phospho-specific Antibodies
- FLT3 Phospho-specific Antibodies
- FRS2-alpha Phospho-specific Antibodies
- 5 Gab1 Phospho-specific Antibodies
- Gab2 Phospho-specific Antibodies
- GABA B Receptor Phospho-specific Antibodies
- GAP-43 Phospho-specific Antibodies
- GATA4 Phospho-specific Antibodies
- 10 GFAP Phospho-specific Antibodies
- Glucocorticoid Receptor Phospho-specific Antibodies
- GluR1 (Glutamate Receptor 1) Phospho-specific Antibodies
- GluR2 (Glutamate Receptor 2) Phospho-specific Antibodies
- Glycogen Synthase Phospho-specific Antibodies
- 15 GRB10 Phospho-specific Antibodies
- GRK2 Phospho-specific Antibodies
- GSK-3 alpha / beta Phospho-specific Antibodies
- GSK-3 alpha Phospho-specific Antibodies
- GSK-3 beta (Glycogen Synthase Kinase) Phospho-specific Antibodies
- 20 GSK-3 beta Phospho-specific Antibodies
- GSK-3 Phospho-specific Antibodies
- H2A.X Phospho-specific Antibodies
- Hck Phospho-specific Antibodies
- HER-2 (ErbB2) Phospho-specific Antibodies
- 25 Histone H1 Phospho-specific Antibodies
- Histone H2A.X Phospho-specific Antibodies
- Histone H2B Phospho-specific Antibodies
- Histone H3 Phospho-specific Antibodies
- HMGN1 (HMG-14) Phospho-specific Antibodies
- 30 Hsp27 (Heat Shock Protein 27) Phospho-specific Antibodies
- IkBa (I kappa B-alpha) Phospho-specific Antibodies
- Integrin alpha-4 Phospho-specific Antibodies
- Integrin beta-1 Phospho-specific Antibodies
- Integrin beta-3 Phospho-specific Antibodies
- 35 IR (Insulin Receptor) Phospho-specific Antibodies
- IR / IGF1R (Insulin/Insulin-Like Growth Factor-1 Receptor) Phospho-specific Antibodies
- IRS-1 Phospho-specific Antibodies
- IRS-2 Phospho-specific Antibodies
- 40 Jak1 Phospho-specific Antibodies
- Jak2 Phospho-specific Antibodies
- JNK (SAPK) Phospho-specific Antibodies
- Jun Phospho-specific Antibodies
- KDR Phospho-specific Antibodies
- Keratin 18 Phospho-specific Antibodies
- 45 Keratin 8 Phospho-specific Antibodies
- Kinase Substrate Phospho-specific Antibodies
- Kip1, p27 Phospho-specific Antibodies
- LAT Phospho-specific Antibodies
- Lck Phospho-specific Antibodies
- 50 Leptin Receptor Phospho-specific Antibodies
- LKB1 Phospho-specific Antibodies
- Lyn Phospho-specific Antibodies
- MAP Kinase / CDK Substrate Phospho-specific Antibodies
- MAP Kinase, p38 Phospho-specific Antibodies
- 55 MAP Kinase, p44 / 42 Phospho-specific Antibodies
- MAPKAP Kinase 1a (Rsk1) Phospho-specific Antibodies

WO 2006/023576

PCT/US2005/029278

- MAPKAP Kinase 2 Phospho-specific Antibodies  
 MARCKS Phospho-specific Antibodies  
 Maturation Promoting Factor (MPF) Phospho-specific Antibodies  
 M-CSF Receptor Phospho-specific Antibodies  
 5 MDM2 Phospho-specific Antibodies  
 MEK1 / MEK2 Phospho-specific Antibodies  
 MEK1 Phospho-specific Antibodies  
 MEK2 Phospho-specific Antibodies  
 MEK4 Phospho-specific Antibodies  
 10 MEK7 Phospho-specific Antibodies  
 Met Phospho-specific Antibodies  
 MKK3 / MKK6 Phospho-specific Antibodies  
 MKK4 (SEK1) Phospho-specific Antibodies  
 MKK7 Phospho-specific Antibodies  
 15 MLC Phospho-specific Antibodies  
 MLK3 Phospho-specific Antibodies  
 Mnk1 Phospho-specific Antibodies  
 MPM2 Phospho-specific Antibodies  
 MSK1 Phospho-specific Antibodies  
 20 mTOR Phospho-specific Antibodies  
 Myelin Basic Protein (MBP) Phospho-specific Antibodies  
 Myosin Light Chain 2 Phospho-specific Antibodies  
 MYPT1 Phospho-specific Antibodies  
 neu (Her2) Phospho-specific Antibodies  
 25 Neurofilament Phospho-specific Antibodies  
 NFAT1 Phospho-specific Antibodies  
 NF-kappa B p65 Phospho-specific Antibodies  
 Nibrin (p95 / NBS1) Phospho-specific Antibodies  
 Nitric Oxide Synthase, Endothelial (eNOS) Phospho-specific Antibodies  
 30 Nitric Oxide Synthase, Neuronal (nNOS) Phospho-specific Antibodies  
 NMDA Receptor 1 (NMDAR1) Phospho-specific Antibodies  
 NMDA Receptor 2B (NMDA NR2B) Phospho-specific Antibodies  
 nNOS Phospho-specific Antibodies  
 NPM Phospho-specific Antibodies  
 35 Opioid Receptor, delta Phospho-specific Antibodies  
 Opioid Receptor, mu Phospho-specific Antibodies  
 p53 Phospho-specific Antibodies  
 PAK1 / 2 / 3 Phospho-specific Antibodies  
 PAK2 Phospho-specific Antibodies  
 40 Paxilin Phospho-specific Antibodies  
 Paxillin Phospho-specific Antibodies  
 PDGF Receptor alpha / beta Phospho-specific Antibodies  
 PDGF Receptor alpha Phospho-specific Antibodies  
 PDGF Receptor beta Phospho-specific Antibodies  
 45 PDGFRb (Platelet Derived Growth Factor Receptor beta) Phospho-specific Antibodies  
 PDK1 Docking Motif Phospho-specific Antibodies  
 PDK1 Phospho-specific Antibodies  
 PDK1 Substrate Phospho-specific Antibodies  
 PERK Phospho-specific Antibodies  
 50 PFK-2 Phospho-specific Antibodies  
 Phe Phospho-specific Antibodies  
 Phospholamban Phospho-specific Antibodies  
 Phospholipase C gamma-1 Phospho-specific Antibodies  
 Phosphotyrosine IgG Phospho-specific Antibodies  
 55 phox, p40 Phospho-specific Antibodies  
 PI3K Binding Motif, p85 Phospho-specific Antibodies

WO 2006/023576

PCT/US2005/029278

- Pin1 Phospho-specific Antibodies
- PKA Substrate Phospho-specific Antibodies
- PKB (Akt) Phospho-specific Antibodies
- PKB (Akt) Substrate Phospho-specific Antibodies
- 5 PKC alpha / beta II Phospho-specific Antibodies
- PKC alpha Phospho-specific Antibodies
- PKC delta / theta Phospho-specific Antibodies
- PKC delta Phospho-specific Antibodies
- PKC epsilon Phospho-specific Antibodies
- 10 PKC eta Phospho-specific Antibodies
- PKC gamma Phospho-specific Antibodies
- PKC Phospho-specific Antibodies
- PKC Substrate Phospho-specific Antibodies
- PKC theta Phospho-specific Antibodies
- 15 PKC zeta / lambda Phospho-specific Antibodies
- PKD (PKC mu) Phospho-specific Antibodies
- PKD2 Phospho-specific Antibodies
- PKR Phospho-specific Antibodies
- PLC beta 3 Phospho-specific Antibodies
- 20 PLC gamma 1 Phospho-specific Antibodies
- PLC gamma 2 Phospho-specific Antibodies
- PLD1 Phospho-specific Antibodies
- PP1 alpha Phospho-specific Antibodies
- PP2A Phospho-specific Antibodies
- 25 PPAR Alpha Phospho-specific Antibodies
- PRAS40 Phospho-specific Antibodies
- Presenilin-2 Phospho-specific Antibodies
- PRK2 (pan-PDK1 phosphorylation site) Phospho-specific Antibodies
- Progesterone Receptor Phospho-specific Antibodies
- 30 Protein Kinase A, RII (PKARII) Phospho-specific Antibodies
- Protein Kinase B Phospho-specific Antibodies
- Protein Kinase B Substrate Phospho-specific Antibodies
- Protein Kinase C, alpha (PKCa) Phospho-specific Antibodies
- Protein Kinase C, epsilon (PKCe) Phospho-specific Antibodies
- 35 PTEN Phospho-specific Antibodies
- Pyk2 Phospho-specific Antibodies
- Rac1 / cdc42 Phospho-specific Antibodies
- Rac-Pk Phospho-specific Antibodies
- Rac-Pk Substrate Phospho-specific Antibodies
- 40 Rad 17 Phospho-specific Antibodies
- Rad17 Phospho-specific Antibodies
- Raf-1 Phospho-specific Antibodies
- Ras-GRF1 Phospho-specific Antibodies
- Rb (Retinoblastoma Protein) Phospho-specific Antibodies
- 45 Ret Phospho-specific Antibodies
- Ribosomal Protein S6 Phospho-specific Antibodies
- RNA polymerase II Phospho-specific Antibodies
- Rsk, p90 Phospho-specific Antibodies
- Rsk1 (MAPKAP K1a) Phospho-specific Antibodies
- 50 Rsk3 Phospho-specific Antibodies
- S6 Kinase Phospho-specific Antibodies
- S6 Kinase, p70 Phospho-specific Antibodies
- S6 peptide Substrate Phospho-specific Antibodies
- SAPK (JNK) Phospho-specific Antibodies
- 55 SAPK2 (Stress-activated Protein Kinase, SKK3, MKK3) Phospho-specific Antibodies
- SEK1 (MKK4) Phospho-specific Antibodies

WO 2006/023576

PCT/US2005/029278

Serotonin N-AT Phospho-specific Antibodies  
 Serotonin-N-AT Phospho-specific Antibodies  
 SGK Phospho-specific Antibodies  
 Shc Phospho-specific Antibodies  
 5 SHIP1 Phospho-specific Antibodies  
 SHP-2 Phospho-specific Antibodies  
 SLP-76 Phospho-specific Antibodies  
 Smad1 Phospho-specific Antibodies  
 Smad2 Phospho-specific Antibodies  
 10 SMC1 Phospho-specific Antibodies  
 SMC3 Phospho-specific Antibodies  
 SOX-9 Phospho-specific Antibodies  
 Src Family Negative Regulatory Site Phospho-specific Antibodies  
 Src Family Phospho-specific Antibodies  
 15 Src Phospho-specific Antibodies  
 Stat1 Phospho-specific Antibodies  
 Stat2 Phospho-specific Antibodies  
 Stat3 Phospho-specific Antibodies  
 Stat4 Phospho-specific Antibodies  
 20 Stat5 Phospho-specific Antibodies  
 Stat5A / Stat5B Phospho-specific Antibodies  
 Stat5ab Phospho-specific Antibodies  
 Stat6 Phospho-specific Antibodies  
 Syk Phospho-specific Antibodies  
 25 Synapsin Phospho-specific Antibodies  
 Synapsin site 1 Phospho-specific Antibodies  
 Tau Phospho-specific Antibodies  
 Tie 2 Phospho-specific Antibodies  
 Trk A Phospho-specific Antibodies  
 30 Troponin I, Cardiac Phospho-specific Antibodies  
 Tuberin Phospho-specific Antibodies  
 Tyk 2 Phospho-specific Antibodies  
 Tyrosine Hydroxylase Phospho-specific Antibodies  
 Tyrosine Phospho-specific Antibodies  
 35 VASP Phospho-specific Antibodies  
 Vav1 Phospho-specific Antibodies  
 Vav3 Phospho-specific Antibodies  
 VEGF Receptor 2 Phospho-specific Antibodies  
 Zap-70 Phospho-specific Antibodies  
 40

The present invention is not limited to the type of cell or tissue chosen for the analysis. The cell type can be a human cell, a mammalian cell (mouse, monkey, hamster, rat, rabbit or other species), a plant protoplast, yeast, fungus, or any other cell type of interest. The cell can also be a cell line or a primary cell. Human cells are preferred for the purposes of drug

45 discovery, but mammalian cells can also be used. The cell can be a component of an intact tissue or animal, or in the whole body; or can be isolated from a biological sample or organ. For

WO 2006/023576

PCT/US2005/029278

example, the present invention can be used in fungal cells to identify antifungal agents that block key pathways; or in plant cells to identify chemical agents that stimulate growth-related pathways or that block disease pathways. Importantly, the present invention can be used in mammalian or human cells to identify agents that block disease-related pathways and do not  
5 have off-pathway or adverse effects, thereby allowing early predictions of selectivity and allowing the development of predictive models of clinical safety. The present invention can be used in conjunction with drug discovery for any disease of interest including cancer, diabetes, cardiovascular disease, inflammation, neurodegenerative diseases, and other chronic or acute diseases afflicting mankind.

10 The present invention can be used in intact cells or tissues in any milieu, context or system. This includes cells in culture, organs in culture, and in live organisms. For example, this invention can be used in model organisms such as *Drosophila* or zebrafish. This invention can be used in preclinical studies, for example in mice. Mice can be treated with a drug and then a variety of cells or tissues can be harvested and used to construct immunofluorescence assays.  
15 This invention can also be used in nude mice, for example, human cells can be implanted as xenografts in nude mice, and a drug or other compound administered to the mouse. Cells can then be re-extracted from the implant and used for pharmacological profiling.

Any type of drug lead or other chemical compound of interest can be profiled with the methods provided herein. Such compounds include synthetic molecules, natural products,  
20 combinatorial libraries, known or putative drugs, ligands, antibodies, peptides, small interfering RNAs (siRNAs), or any other chemical agent whose activity is desired to be tested. Screening hits from combinatorial library screening or other high-throughput screening campaigns can be used in conjunction with the present invention. The invention can be used to identify those

WO 2006/023576

PCT/US2005/029278

compounds with more desirable properties as compared with those compounds with less desirable properties. Therefore the present invention is suitable for use in optimization and/or attrition of lead compounds with unexpected, undesirable, or toxic properties.

In the case of an increase or decrease in the amount of a signal in response to a chemical agent, the bulk fluorescent or luminescent signal can be quantified. In the event of a change in the subcellular location of a signal in response to drug, cells are imaged by automated microscopy or image analysis and the sub-cellular location of the signal is detected and quantified. Proprietary and non-proprietary algorithms suitable for conversion of pixel intensity to subcellular location have been described; such software is often sold in conjunction with commercially available instrumentation systems. Any such algorithms, software and hardware can be used in conjunction with this invention.

Some proteins are not modified post-translationally, or, are modified constitutively – that is, their modifications do not change in response to external stimuli, environmental conditions, or other perturbants. By ‘respond’ we mean that a particular protein undergoes a change in modification status and/or subcellular distribution in response to a perturbation. Other post-translational modifications do respond and are induced by binding of an agonist, hormone or growth factor to a receptor which induces a signaling cascade or by a small molecule that activates an intracellular protein or enzyme. Other modifications can be inhibited, for example by binding of an antagonist or an antibody to a receptor thereby blocking a signaling cascade; by an siRNA, which silences a gene coding for a protein that is critical for a pathway; or by a drug that inhibits a particular protein within a pathway. These examples and the methods provided herein are meant to illustrate the breadth of the invention and are not limiting for the practice of the invention.

WO 2006/023576

PCT/US2005/029278

The methods and assays provided herein may be performed in multiwell formats, in microtiter plates, in multispot formats, or in arrays, allowing flexibility in assay formatting and miniaturization. The choices of assay formats and detection modes are determined by the biology of the process and the functions of the proteins within the complex being analyzed. It should be noted that in either case the assays that are the subject of the present invention can be read with any instrument that is suitable for detection of the signal that is generated by the chosen reporter. Luminescent, fluorescent or bioluminescent signals are easily detected and quantified with any one of a variety of automated and/or high-throughput instrumentation systems including fluorescence multi-well plate readers, fluorescence activated cell sorters (FACS) and automated cell-based imaging systems. The latter systems allow for spatial resolution of the signal. A variety of instrumentation systems have been developed to automate high-content assays including the automated fluorescence imaging and automated microscopy systems developed by Cellomics, Amersham (GE Medical Systems), Q3DM (Beckman Coulter), Evotec GmbH, Universal Imaging (Molecular Devices), Atto (Becton Dickinson) and Zeiss. Fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) and time lapse fluorescence microscopy have also been used to study protein mobility in living cells.

#### **BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS**

Figure 1 illustrates the objective of the present invention. The biochemical networks that control cellular behavior are represented as a circuit diagram. Drugs and chemical compounds have both known (intended) and unknown (unintended) effects within cells. Post-translational modifications of proteins and other molecules represent dynamic events that can be probed to identify known and unknown effects of drugs and lead compounds.

WO 2006/023576

PCT/US2005/029278

Figure 2 depicts the principle underlying the invention. The connectivity of cellular networks allows detection of the activity of a drug on a pathway, by measuring the effects of the drug on events 'downstream' of the drug target. Assays, representing post-translational modifications of proteins or other molecules, are shown in red. Drugs may either decrease or  
5 increase the post-translational modification status of a downstream protein or may alter its subcellular distribution. These changes can be measured in intact cells using immunofluorescence or other methods. Cross-talk between pathways can also be determined using this approach, for example, a drug acting on a first pathway may result in a change in modification status of a protein that participates in a second pathway.

10 Figure 3 depicts five key steps in pharmacological profiling according to the present invention. The results can be depicted in a variety of ways, for example, using a histogram; a matrix; a contour plot; or other suitable display method. In the matrix shown in Fig 3, green represents an increase in signal for a particular sentinel and red represents a decrease in signal. Such profiles are useful in comparisons, for example, in comparing a lead compound with a  
15 known drug or known toxicant or attrited compound.

Figure 4 shows the design of the proof-of-principle study for pharmacological profiling according to the present invention. Five different drugs were tested against three different pathways, resulting in pharmacological profiles consistent with their mechanisms of action.

Figure 5 shows representative photomicrographs, showing differential effects of  
20 forskolin, isoproterenol, anisomycin, or anisomycin + SB203580 on the subcellular localization and fluorescence intensity of phospho-CREB as assessed by immunofluorescence. A negative control well (secondary antibody only) is also shown.

Figure 6 shows representative photomicrographs, showing differential effects of EGF,

WO 2006/023576

PCT/US2005/029278

EGF+PD98059, EGF+SB203580, and EGF+17AAG on the subcellular localization and fluorescence intensity of phospho-CREB as assessed by immunofluorescence.

Figure 7 shows differential effects of agents on the amount of phospho-CREB in the nucleus of human cells. Values are presented as a ratio relative to the untreated control

5 Figure 8 shows representative photomicrographs, showing differential effects of forskolin, isoproterenol, anisomycin, or anisomycin + SB203580 on the subcellular localization and fluorescence intensity of phospho-Hsp27 as assessed by immunofluorescence.

Figure 9 shows representative photomicrographs, showing differential effects of EGF, EGF+PD98059, EGF+SB203580, and EGF+17AAG on the subcellular localization and  
10 fluorescence intensity of phospho-Hsp27 as assessed by immunofluorescence.

Figure 10 shows differential effects of agents on the amount of phospho-Hsp27 in human cells. Results are presented as a ratio relative to the untreated control.

Figure 11 shows representative photomicrographs, showing differential effects of forskolin, isoproterenol, anisomycin, or anisomycin + SB203580 on the subcellular localization  
15 and fluorescence intensity of phospho-ERK as assessed by immunofluorescence.

Figure 12 shows representative photomicrographs, showing differential effects of EGF, EGF+PD98059, EGF+SB203580, and EGF+17AAG on the subcellular localization and fluorescence intensity of phospho-ERK as assessed by immunofluorescence.

Figure 13 shows differential effects of agents on the amount of phospho-ERK in human  
20 cells. Values are presented as a ratio relative to the untreated control.

Figure 14 shows pharmacological profiles for the indicated drugs and biologic agents based on their activities on three pathways. Agents that act on the same pathway (e.g. isoproterenol and forskolin) produce similar profiles. Agents that act on different pathways

WO 2006/023576

PCT/US2005/029278

produce different profiles (compare EGF vs. anisomycin; SB203580 vs. PD98059). Differences in potency (at the doses used) between agents acting on the same pathway (e.g. 17-AAG and PD98059) can also be seen.

5

### DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

#### **Identifying on-pathway and off-pathway effects of drugs (pharmacological profiling)**

We sought to provide a method for drug discovery, that would be suitable for use on a large scale, and in particular to effect attrition of lead compounds with undesirable properties. In the process of making the present invention we tested three hypotheses. The first hypothesis was that quantitative, dynamic measurements of post-translational modifications of proteins within specific pathways would enable an assessment of the activation or inhibition of those pathways by a chemical compound or agent. The second hypothesis was that several types of dynamic events could occur in response to pathway activation: an increase or decrease in the amount of a modified protein, and/or the translocation of a modified protein from one subcellular compartment to another. The third hypothesis was that quantification and localization of the effects of drugs on a variety of individual, modified proteins within living cells would enable the development of profiles of drug activity. Pharmacological profiles could be used to identify compounds with desired profiles and to eliminate compounds with undesired profiles in the context of human biology.

20

Signal transduction networks are characterized by a high level of connectivity, and signals are transmitted in the context of extensive, dynamic protein complexes. To exploit this facet of cell biology to better understand drug action, we constructed assays for post-translationally-modified proteins. The assays enable probing the activity of specific signaling

WO 2006/023576

PCT/US2005/029278

nodes under different conditions – time, drug concentration, pretreatment stimulus, etc. With this approach drug activity can be monitored at temporal and spatial levels within a network of pathways. By analyzing the response of diverse signaling nodes representing multiple target classes and pathways, we can define context-dependent drug activity and drug relationships.

5 By applying antibodies to fixed cells, one can measure the absolute levels of a particular protein or class of proteins, as well as specific post-translational modifications (e.g. phosphorylation, acetylation, ubiquitination) of a protein or class of proteins or other macromolecules. In making the present invention, cell-based assays using modification state-specific antibodies were used to monitor the dynamic association and dissociation of proteins in  
10 the absence or presence of chemical compounds. We created panels of quantitative, fluorescence assays for different phospho-proteins in live cells, and tested the activities of known drugs against the assay panels using automated microscopy. The intact, fixed cells can be analyzed by flow cytometry or by microscopy. Such methods can be automated, allowing assays to be performed in 96-well or 384-well plates. If automated microscopy is used, in combination  
15 with image analysis, the sub-cellular localization of a protein or modified protein (or class or proteins) can be assessed in this manner, enabling automated, "high-content" analyses. Flow cytometry and fluorescence spectroscopy can also be used for this purpose, where spatial resolution of the signal is not required. We demonstrate that the pattern of responses or "pharmacological profiles" detected by changes in intensity and/or physical location of the  
20 sentinel pair is related to the mechanism of action, specificity, and off-pathway effects of the drugs being tested; and that differences between drugs can readily be detected using this approach.

An overview of the invention is shown in Figure 3. Step 1 involves selecting the chemical

WO 2006/023576

PCT/US2005/029278

compounds, drug candidates or drugs to be profiled. Step 2 involves selecting the proteins or other macromolecules to be included in the assay panel. The proteins can be identified, or selected, either rationally – for example, by prior knowledge of a pathway or a protein - or empirically. Moreover, an unlimited number of assays can simply be constructed at random and

5 tested empirically for their responsiveness to any number of drugs or chemical compounds and the results combined into a pharmacological profile. Step 3 involves constructing the assays for post-translational modifications of macromolecules (proteins, DNA, etc). Such methods are well documented in the literature and can simply be adapted to the present invention if the proteins are appropriately selected, the antibody or probe is sufficiently specific, and the method is

10 sensitive enough to detect and quantify changes in signal intensity or location due to the chemical compounds or drugs of interest. In step 4, each chemical compound or drug is tested against each assay at specific times and drug concentrations. Positive and negative controls are run for each assay, at each time point and stimulus condition. Each drug result is compared to a control (no treatment, or secondary antibody only) value. In step 5, the results of the assays are

15 combined to establish a pharmacological profile for each compound. The resulting profiles can be displayed in a variety of ways. A simple histogram can be used to depict a pharmacological profile. Alternatively, the results of each screen are depicted in a color-coded matrix in which red denotes a decrease in signal intensity or location whereas green denotes an increase as shown here. Different shades of red and green can be used to depict the intensity of the change. A

20 variety of visualization tools and third-party software can be used to display and analyze the profiles.

WO 2006/023576

PCT/US2005/029278

**EXPERIMENTAL PROTOCOL**

To demonstrate the general strategy and its application we studied multiple pathways that have been well-characterized in human cells. The experimental design is shown in Fig 4. For the proof of principle we used three canonical signal transduction pathways: the cyclic AMP-  
5 dependent pathway; the ERK mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway; and the p38/MAPKAPK2 pathway. Each pathway has many other steps that have been documented in the biochemical literature; the diagram shows only a select few of the many proteins that participate in each pathway.

Pathway 1: The beta-adrenergic receptor has been well characterized as a result of its  
10 pharmacological importance. This G-protein-coupled receptor (GPCR) is coupled to adenylyl cyclase via the small GTP-binding protein, G<sub>s</sub>. Binding of isoproterenol or other beta-adrenergic agonists to this receptor leads to activation of adenylyl cyclase. When adenylyl cyclase is activated, it catalyses the conversion of ATP to cyclic AMP, which leads to an increase in intracellular levels of cyclic AMP. Cyclic AMP (cAMP) is a second messenger that activates the  
15 cyclic AMP-dependent protein kinase known as protein kinase A (PKA). Levels of cAMP are controlled through the regulation of the production of cAMP by adenylyl cyclase, and the destruction of cAMP by phosphodiesterases. Adenylyl cyclase can also be activated directly by agents such as forskolin, a diterpene that is widely used in studies aimed at dissecting intracellular signalling pathways. One of the best characterized substrates for PKA is the  
20 transcription factor CREB which is phosphorylated on serine133 (S133) in response to adrenergic agonists or other activators of PKA. Phosphorylation of CREB has been shown to increase its transcriptional activity for its target genes (Montminy et al). Therefore both forskolin and isoproterenol would be expected to activate steps that are downstream of PKA in

WO 2006/023576

PCT/US2005/029278

living cells, including the phosphorylation of CREB. They should have similar pharmacological profiles based on their known activities.

Pathway 2: ERK/MAPKs are key relay points in the transmission of growth factor-generated signals. This canonical growth factor receptor-stimulated pathway is initiated by a cell surface receptor, such as the epidermal growth factor (EGF) receptor tyrosine kinase. Activated EGF receptors bind to adaptor proteins and guanine nucleotide exchange factors, such as the protein SOS. SOS, in turn, activates small GTPases such as Ras, which then lead to phosphorylation and activation of a cascade of kinases including B-Raf and ERKs. By measuring the activity of a distal step in the pathway, such as phosphorylation of ERKs, the activity of upstream steps can be inferred. We profiled two different agents, PD98059 and 17-AAG, against this pathway. PD98059, a known inhibitor of the protein kinase known as MEK (MKK1/2), blocks events downstream of its target including the transcription factors ERK (shown in Fig. 4) and ELK. 17-AAG (17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin) is an ansamycin antibiotic that is currently in clinical trials for the treatment of cancer. 17-AAG binds to a highly conserved pocket in the Hsp90 chaperone protein and inhibits its function. Hsp90 is required for the refolding of proteins during cellular stress, and for the conformational maturation of a subset of signaling proteins. Treatment of cells with 17-AAG causes the proteasomal degradation of Hsp90 client proteins, which include RAF, AKT and HER2. Given (a) a sufficiently specific anti-phospho-ERK antibody; (b) a cell type that is responsive to EGF; and (c) a sufficient quantity of PD98058; and (d) an immunofluorescence method that is capable of detecting phospho-ERK in intact cells, it should be possible to determine the effects of PD98059 and 17-AAG on the amount and/or location of phospho-ERK in living cells. PD98058 is a relatively selective kinase inhibitor whereas 17-AAG affects a broad spectrum of Hsp90

WO 2006/023576

PCT/US2005/029278

client proteins. Therefore both agents would be expected to reduce the effect of EGF on phospho-ERK but would have disparate effects on other pathway sentinels, for example Pathway 3.

5 Pathway 3: The p38 serine/threonine protein kinase is the most well-characterized member of the MAP kinase family. It is activated in response to inflammatory cytokines, endotoxins, and osmotic stress. It shares about 50% homology with the ERKs. The upstream steps in activation of the cascade are not well defined. However, downstream activation of p38 occurs following its phosphorylation (at the TGY motif) by MKK3, a dual specificity kinase.

10 Following its activation, p38 phosphorylates MAPKAPK2, which in turn phosphorylates and activates heat-shock proteins including HSP27. Anisomycin is a natural product that has been shown to activate stress related pathways in cells, including the p38 pathway shown in Fig 4. SB203580 [4-(4-fluorophenyl)-2-(4-methylsulfinylphenyl)-5-(4-pyridyl)1*H*-imidazole] is a very specific inhibitor of p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) and is widely used as a tool to

15 probe p38 MAPK function in vitro and in vivo. If anisomycin is specific for the p38 pathway in these cells, anisomycin would increase phospho-Hsp27 but would have no effect on phospho-CREB or phospho-ERK. The p38-specific inhibitor, SB203580, would be expected to block the effects of anisomycin on Hsp27. Therefore, given a suitable anti-phospho-Hsp27 antibody, we would expect to see an increase in phosphorylation of Hsp27 in response to pathway activation

20 by anisomycin in living cells. This effect should be blocked by SB203580.

We assessed the effects of the above-mentioned compounds on the three pathways and used the results to construct pharmacological profiles for the agents. Specifically we assessed

WO 2006/023576

PCT/US2005/029278

changes in the phosphorylation status of the pathway 'sentinels' by constructing high-content, immunofluorescence assays using phospho-specific antibodies targeted to the downstream proteins in the pathways of interest. Human cells (HEK293) were treated with drugs and the phosphorylation status of the three downstream proteins was assessed in the absence or presence of epidermal growth factor (EGF). Cells were then fixed and probed with antisera generated against the phosphorylated forms of CREB (S133), ERK1/2 (phospho T\*EY\*), or phospho Hsp27 (S78/S82). The ERK1/2 antibodies specifically recognize the MAPK/ERK1 and MAPK/ERK2 protein kinases only when they are phosphorylated on Threonine 202 and Tyrosine 204 in the activation loop. Phosphorylation of these amino acids has been shown to be necessary and sufficient for kinase activation, and therefore is a surrogate marker for activation of the kinases. Changes in the level and sub-cellular localization of a phosphorylated protein following treatment with a drug would indicate a functional connection between the drug and the pathway of interest.

Details of the methods used are as follows. HEK293T cells were seeded in black-walled, poly-lysine coated 96-well plates (Greiner) at a density of 30,000/well. After 24 hours, cells in duplicate wells were treated with combinations of different drugs and stimulus as follows: (a) 2 micromolar isoproterenol or 1 micromolar forskolin for 15 min.; (b) 25 micromolar SB203580 or vehicle (DMSO) for 90 minutes and 10 micrograms/ml anisomycin added to the cells during the last 10 min.; (c) 20 microolar PD98059, 25 micromolar SB203580, 5 microM 17-AAG or vehicle alone for 90 min. (d) as for (c), but with 100ng/ml hEGF added to the cells during the last 5 min of drug treatment. The drugs were purchased from Calbiochem and hEGF was from Roche. Four sets of cells treated as described were prepared. The cells were rinsed once with PBS and fixed with 4% formaldehyde for 10 min. The cells were subsequently

WO 2006/023576

PCT/US2005/029278

permeabilized with 0.25% Triton X-100 in PBS and incubated with 3% BSA for 30 min to block non-specific antibody binding. Each of the 4 sets of identically treated cells were then incubated with rabbit antibodies against phosphorylated CREB (Ser133), Hsp27 (Ser82), or pERK (T202/Y204) (Cell Signaling Technology, Inc.). Control wells were incubated with bovine serum albumin (BSA) in PBS. The cells were rinsed with PBS and incubated with Alexa488 conjugated goat anti-rabbit secondary antibody (Molecular Probes). Cell nuclei were stained with Hoechst33342 (Molecular Probes).

Images were acquired using Discovery-1 High Content Imaging System (Molecular Devices). Background fluorescence due to nonspecific binding by the secondary antibody was established with the use of cells that were incubated with BSA/PBS and without primary antibodies.

Raw images in 16-bit grayscale TIFF format were analyzed using ImageJ API/library (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>, NIH, MD). First, images from the fluorescence channels (Hoechst and Alexa 488) were normalized using the ImageJ built-in rolling-ball algorithm [S.R. Sternberg, Biomedical image processing. Computer, 16(1), January 1983]. Next a threshold was established to separate the foreground from background. An iterative algorithm based on Particle Analyzer from ImageJ is applied to the thresholded Hoechst channel image (HI) to obtain the total cell count. The nuclear region of a cell (nuclear mask) is also derived from the thresholded HI. The positive particle mask is generated from the thresholded Alexa 488 image (YI). To calculate the global background (gBG), a histogram was obtained from the unthresholded Alexa signal and the pixel intensity of the lowest intensity peak was identified as gBG. The Hoechst mask and Alexa mask are overlapped to define the correlated sub-regions of the cell. All means were corrected for the corresponding gBG. For each set of experiments (assay + drug treatment + treatment time), fluorescent particles from eight images were pooled.

WO 2006/023576

PCT/US2005/029278

For each parameter, an outlier filter was applied to filter out those particles falling outside the range (mean  $\pm$  3SD) of the group. Finally the sample mean or control mean for each parameter was obtained from each filtered group. Results for drug treatments were normalized to the control for each experiment.

5

## RESULTS

Results of the experiments are shown in Figs 5-14, starting with the cyclic AMP-dependent (CREB) pathway (Fig 5). The negative control wells (lower left) showed little or no signal with secondary antibody alone, demonstrating that the detection of phospho-CREB was accomplished with the phospho-specific antibody. In the presence of CREB phospho-specific antibody there was a clear fluorescence signal (control, upper left) that was localized predominantly at in a membrane/perinuclear pattern. As assessed by immunofluorescence, forskolin and isoproterenol both increased the phosphorylation of CREB and changed its subcellular distribution to a predominantly nuclear pattern, relative to the control (untreated) cells. These effects could be seen clearly in the fluorescence micrographs (Fig 5, upper panels). In contrast, anisomycin had little or no effect on the intensity or the subcellular location of phospho-CREB, demonstrating a lack of connectivity between the anisomycin-dependent pathway and the CREB pathway.

As shown in Fig 6, EGF also induced the formation of phospho-CREB. The effects of EGF on phospho-CREB are consistent with cross-talk between the EGF-dependent and cyclic AMP-dependent pathways as depicted in Fig 4. The effect of EGF was reduced by PD98059, suggesting either that the PD compound has an off-pathway effect on the CREB pathway, or that the cross-talk between the EGF and CREB pathways occurs at a level below MEK (the target of

WO 2006/023576

PCT/US2005/029278

PD98059). These results indicate that both direct and indirect effects of agonists and drugs on pathways can be assessed by assays of events downstream of the point of action of the agonist or drug, substantiating the premise that the connectivity of cellular networks can be exploited for use in identifying the spectrum of drug activities. The results also demonstrate the ability of the methodology to differentiate between agents that activate or inhibit pathways and those that have no effects on those pathways.

Differential activities of drugs on their expected targets/pathways were also observed. For example, EGF strongly stimulated the MAP kinase pathway, as expected, resulting in highly induced levels of ERK/MAP kinase phosphorylation (Fig 12-13). Forskolin, isoproterenol, and anisomycin had no effects on this pathway (Fig 11). The compound PD98059, a known inhibitor of the kinase MEK, significantly blocked the phosphorylation of ERK in response to EGF, as expected. 17-AAG was also effective at reducing the effects of EGF on ERK. On the other hand, treatment of these cells with the p38-specific inhibitor SB203580 has no effect on EGF-stimulated ERK phosphorylation since SB203580 selectively acts on a pathway that is not connected to ERK. The results demonstrate the ability of the methodology to pinpoint on-pathway effects of drugs and to assess drug selectivity against pathways in human cells.

This strategy also reveals cross-talk between pathways. Anisomycin induced the p38 pathway as assessed by increases in phospho-Hsp27 in anisomycin-treated cells. Since anisomycin had no effect on the CREB or ERK pathways, it was quite selective for the p38 pathway. SB203580 completely blocked the effects of anisomycin on Hsp27, consistent with the known mechanism of action of the SB inhibitor. EGF also elicited p38 pathway activation (resulting in HSP27 phosphorylation), and this response was blocked by the p38 inhibitor SB203580, demonstrating cross-talk between the EGF and p38 pathways at a level upstream of

WO 2006/023576

PCT/US2005/029278

the site of action of SB203580. In contrast the MEK inhibitor PD98059 had no effect on EGF-induced Hsp27 phosphorylation, showing that PD98059 was selective for the MEK/ERK pathway.

The pharmacological profiles depicted in Fig 14 demonstrate the similarities and differences between the agents. These pharmacological profiles can be used as fingerprints for drugs with certain mechanisms of action and selectivity. The fingerprints can be used to identify novel compounds with desired cellular effects and to eliminate compounds with undesired cellular effects. For example, using these methods, novel agents can be identified with cellular effects similar to EGF, to anisomycin, or to one of the kinase inhibitors. Establishing profiles for agents with known toxic or adverse effects will allow for attrition of novel compounds with similar (toxic or adverse) profiles. As the assay panels expand they will become ever more predictive. Profiling of known drugs, failed compounds and toxic agents will enable the development of fingerprints of drugs with established clinical outcomes. As the panels expand they will enable the development of drugs with very specific safety and efficacy profiles.

15

### Scope of the invention

It will be understood by one skilled in the art that the present invention is not limited to the exact pathway, assay sentinel, assay protocol, detection method, or to particular instrumentation or software. The present invention teaches that cell-based fluorescence or luminescence assay panels, and in particular immunofluorescence assays, can be used for pharmacological profiling of drugs, biologic agents, natural products, and other compounds of interest.

20

There is virtually no limit on the types, numbers, or identities of the proteins or assay reagents that can be used in conjunction with this invention. There are likely to be thousands of

WO 2006/023576

PCT/US2005/029278

post-translational modifications of proteins that occur in mammalian cells. These will be either constitutive or dynamic; and either redundant or non-redundant. Dynamic (responsive), non-redundant assays will be the most useful for pharmacological profiling as they will respond to pathway perturbations. Fortunately, one can determine empirically whether a specific protein or  
5 other macromolecule is useful in profiling, by simply constructing an assay for the modification and testing it for responsiveness against a range of drugs, gene annotation reagents –such as siRNA - or other compounds. A non-redundant assay is one that provides distinct information, beyond the information provided by any other assay. As the pathways regulating cellular function are gradually elucidated it will eventually be possible to construct a completely  
10 predictive assay panel based on the methods provided herein. It will be possible to determine whether the panel is predictive by comparing the profiles of well-characterized agents that cause particular adverse effects in animals or in man, with the profiles of agents that do not cause the same effects. Such a panel would enable testing of any compound to determine its spectrum of activities and to determine any off-pathway activities suggestive of adverse consequences. The  
15 advantage of the approach is that it can be performed in high throughput such that thousands of lead compounds can be tested, prior to clinical studies, allowing early attrition of compounds with undesirable profiles.

The informativeness of the approach is based not on the number of proteins assayed but on the breadth of pathways covered. Adding more sentinels into the same pathways will help in  
20 defining novel mechanisms of action and in identifying potential new drug targets; but will not necessarily provide additional predictive power. Ultimately, a single informative sentinel for each cellular pathway is needed. A completely predictive platform might be achieved with 200-500 assays. These calculations are speculative, but may help to explain our predictions. The

WO 2006/023576

PCT/US2005/029278

biochemical literature, and our own experience, suggests that biochemical networks are highly ramified. For example, in the process of mapping interactions among human proteins, we identified an average of 5 interactions per protein; a number that is consistent with protein interaction maps of model organisms such as yeast. If one assumes 30,000 proteins in the human proteome (excluding splice variants, that is) then there may be around 6000 human protein-protein interactions that are physically separated by one or more degrees of separation (30,000/5). Finally, if we assume that each of 6000 non-redundant sentinels serves to report on the activity of 15 upstream events, then a collection of 400 sentinels would report out the activity of every pathway in the cell.

10 The present invention is not limited to the measurement of modifications of individual proteins. Cellular assays that can be used to quantify or localize protein-protein interactions can be included in such panels. Suitable methodology for such measurements includes fluorescence resonance energy transfer (FRET), bioluminescence resonance energy transfer (BRET), protein-fragment complementation assays (PCA) and enzyme-fragment complementation assays (beta-galactosidase complementation).

15 Cellular assays that can be used to construct assay panels for pharmacological profiling can include pan-cellular measurements as well as measurements of individual proteins. For example, the overall level of tyrosine phosphorylation of cellular proteins (as assessed with pan-phosphotyrosine antibodies) can be used to assess on-pathway and off-pathway effects of known and novel compounds and to build pharmacological profiles.

20 Measurements of particular motifs (ubiquitin etc.) will also be useful for the construction of the assay panel as they provide an overall assessment of cellular metabolic and phenotypic status. Overall and specific cellular protease activity can be assessed by loss of an epitope upon proteolysis, resulting in a reduction in signal as assessed with an epitope-specific antibody.

WO 2006/023576

PCT/US2005/029278

Antibodies that discriminate GTP vs GDP-bound proteins such as G proteins coupled to GPCRs could be developed and used to assess G protein status as a component of cell signaling. Splice variants or isoforms of a particular protein could also be measured – e.g. with the aid of an antibody that only recognizes cleaved form of a sentinel protein. Such assays would indicate the state of apoptosis in the cell. In addition we will use antibodies that discriminate between splice variants of particular kinases – MKK3 vs. MKK1/2. These agents can also be combined in the same assay; for example a phospho-specific anti-BAD antibody could be combined with a pan-AKT antibody to simultaneously assess the two key regulators of apoptotic pathways. Measurements of histone acetylation (with acetyl-specific anti-histone antibodies) would enable an assessment of the overall balance between acetylation and deacetylation, a key regulator of gene transcription. As mentioned above, any such pathway measures or cellular indicators can be combined with cellular stains to increase the informativeness of the assay panels. Dyes capable of measuring membrane potential can also be useful in such an assay panel. For example, stains for mitochondrial membrane potential can be used to distinguish between drugs with different cellular effects and to construct pharmacological profiles in conjunction with this invention.

In addition to proteins, a variety of macromolecules are modified post-translationally, including DNA and lipids. Methylation of DNA is important in the sequence-specific and gene-specific regulation of transcription. Phosphorylation of lipids is important in the control of cell signaling; for example, the balance between inositol polyphosphates is crucial in regulating the level of the second messenger, inositol trisphosphate (IP3); and the fatty acid composition of phospholipids such as phosphatidylcholine, phosphatidylinositol and phosphatidylserine regulates membrane fluidity and permeability. As the toolbox of modification-state-specific reagent expands, such assays will be added into the panels we are constructing for pharmacological

WO 2006/023576

PCT/US2005/029278

profiling.

The entire contents including the references cited therein of the following patents and publications are incorporated by reference in their entirety for all purposes to the same extent as

5 if each individual patent, patent application or publication were so individually denoted.

US 6,372,431 Cunningham, et al.

US 6,801,859 Friend, et al.

US 6,673,554 Kauvar, et al.

US 6,270,964 Michnick, et al.

10 US 6,294,330 Michnick, et al.

US 6,428,951 Michnick, et al.

US Patent Application 20030108869 Michnick, et al.

US Patent Application 20020064769 Michnick, et al.

Nielsen et al., PNAS 100: 9330-9335 (2003)

15

Although the present invention has been described with reference to specific details of certain embodiments thereof, it is not intended that such detail should be regarded as limitations upon the scope of the invention, except as and to the extent that they are included in the accompanying claims.

20

WO 2006/023576

PCT/US2005/029278

What we claim is:

1. A method for analysis of a chemical compound or compounds, said method comprising: (A) constructing an assay panel, wherein said panel comprises assays for the amount  
5 and/or or post-translational modifications of two or more macromolecules in intact cells; (B) testing the effects of a chemical compound or compounds on the activities of said assays in said panel; and (C) using the results of said assay(s) to identify compounds with desired activities.
2. A method for establishing safety profiles for chemical compounds, said method  
10 comprising (A) testing the effects of said chemical compounds on the amount and/or post-translational modifications of two or more macromolecules in intact cells; (B) constructing a pharmacological profile based on the results of said tests; and (C) comparing said profile to the profile(s) of drugs with established safety characteristics.
- 15 3. A method for establishing toxicity profiles for chemical compounds, said method comprising (A) testing the effects of said chemical compounds on the amount and/or post-translational modifications of two or more macromolecules in intact cells; (B) constructing a pharmacological profile based on the results of said tests; (C) comparing said profile to the profile(s) of drugs with known adverse or toxic characteristics.  
20
4. A method according to claim 1, 2 or 3 wherein said method is carried out in a microtiter plate format or an array format.

WO 2006/023576

PCT/US2005/029278

5. A method according to claim 1, 2 or 3 wherein said method is carried out by flow cytometry, automated microscopy, and/or automated image analysis.

6. A method for identifying the cellular pathways underlying drug toxicity, said method  
5 comprising (A) testing the effects of toxic compounds on the amount and/or the post-translational modifications of two or more macromolecules in intact cells; and (B) using the results of said tests to identify patterns of modifications associated with toxicity.

7. A method for performing pharmacological profiling of a chemical compound, said  
10 method comprising (a) constructing a panel of cell-based assays, wherein said assays comprise the amount and/or post-translational modifications of two or more macromolecules; (b) contacting said cells with said chemical compound; (c) measuring the amount and/or the subcellular location of the signals in said cells with said cell-based assays; (d) using the result of (c) to construct a pharmacological profile for said compound.

15

8. A method for performing pharmacological profiling of a chemical compound, said  
method comprising (a) constructing a panel of immunofluorescence assays in intact cells; (b) contacting said cells with said chemical compound; (c) quantifying the fluorescence signals in the members of said panel; (d) using the result of (c) to construct a pharmacological profile for  
20 said compound.

9. An assay panel, said panel comprising immunofluorescence assays for the amount and/or post-translational modifications of two or more macromolecules, wherein said assays are

**WO 2006/023576****PCT/US2005/029278**

performed by automated microscopy or automated image analysis.

10. A composition comprising an assay panel, said panel comprising high-content assays for the amount and/or post-translational modifications of two or more proteins.

5

11. A composition comprising an assay panel, said panel comprising at least one high-content assay for the amount and/or post-translational modification of a protein and at least one high-content assay for the amount and/or subcellular location of a protein-protein interaction.

10

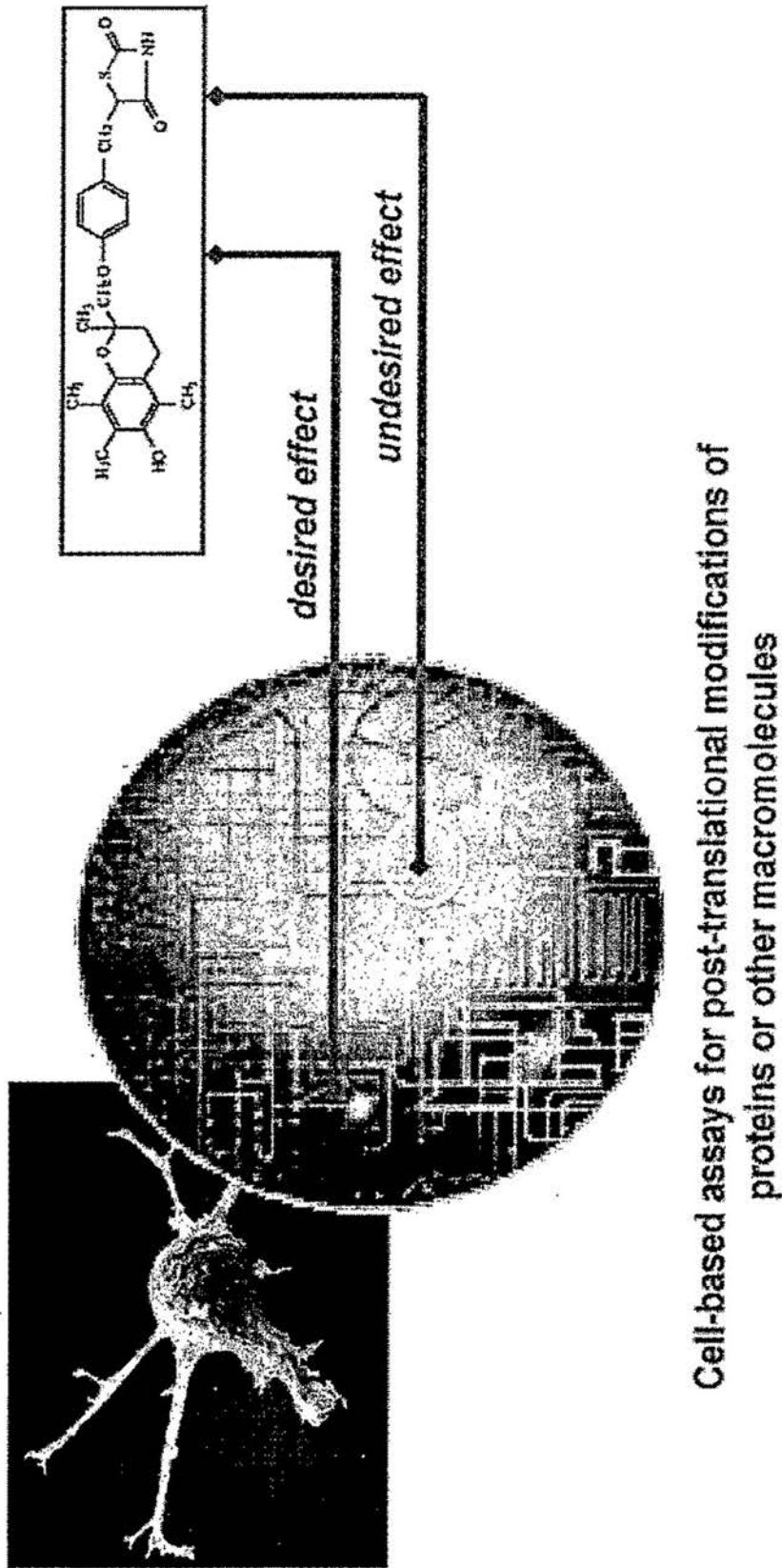
12. A composition comprising an assay panel, said panel comprising at least one assay that is an immunofluorescence assay and at least one assay that is a non-immunofluorescence assay.

15

13. A panel of high-content cell-based assays, said panel comprising two or more antibodies, wherein at least one antibody is selected from the list shown in Table 1.

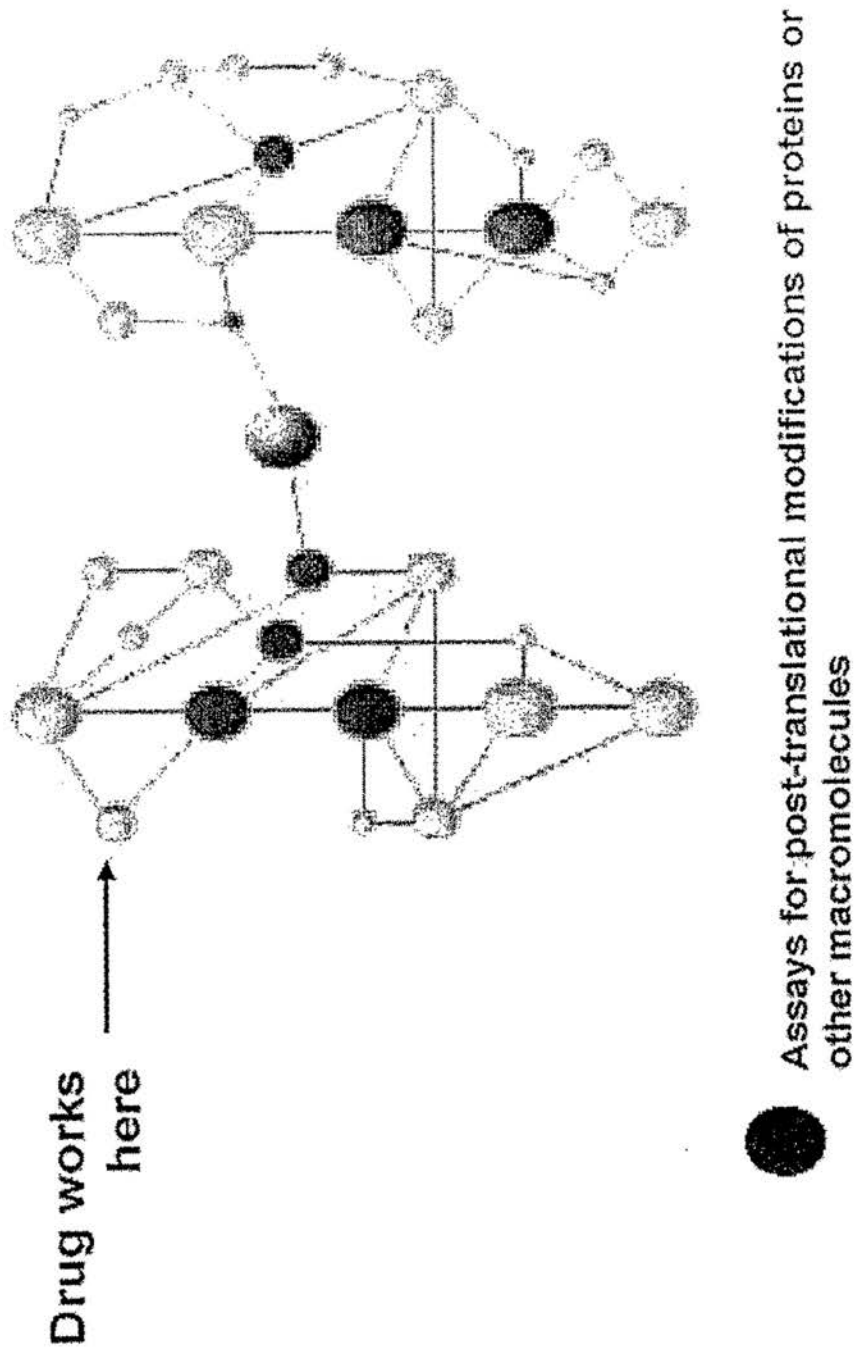
**Abstract:** The instant invention provides a method for establishing safety profiles for chemical compounds, as well as pharmacological profiling said method comprising (A) testing the effects of said chemical compounds on the amount and/or post-translational modifications of two or more macromolecules in intact cells; (B) constructing a pharmacological profile based on the results of said tests; and (C) comparing said profile to the profile(s) of drugs with established safety characteristics. Additionally, the invention is also directed to a composition comprising an assay panel, said panel comprising at least one high-content assay for the amount and/or post-translational modification of a protein and at least one high-content assay for the amount and/or subcellular location of a protein-protein interaction.

Fig. 1 Identifying on-pathway and off-pathway effects of chemical compounds and drugs in living cells



Cell-based assays for post-translational modifications of proteins or other macromolecules

Fig. 2 The connectivity of cellular networks allows detection of on-pathway and off-pathway effects of drugs and other small molecules



**Fig. 3 Steps in pharmacological profiling**

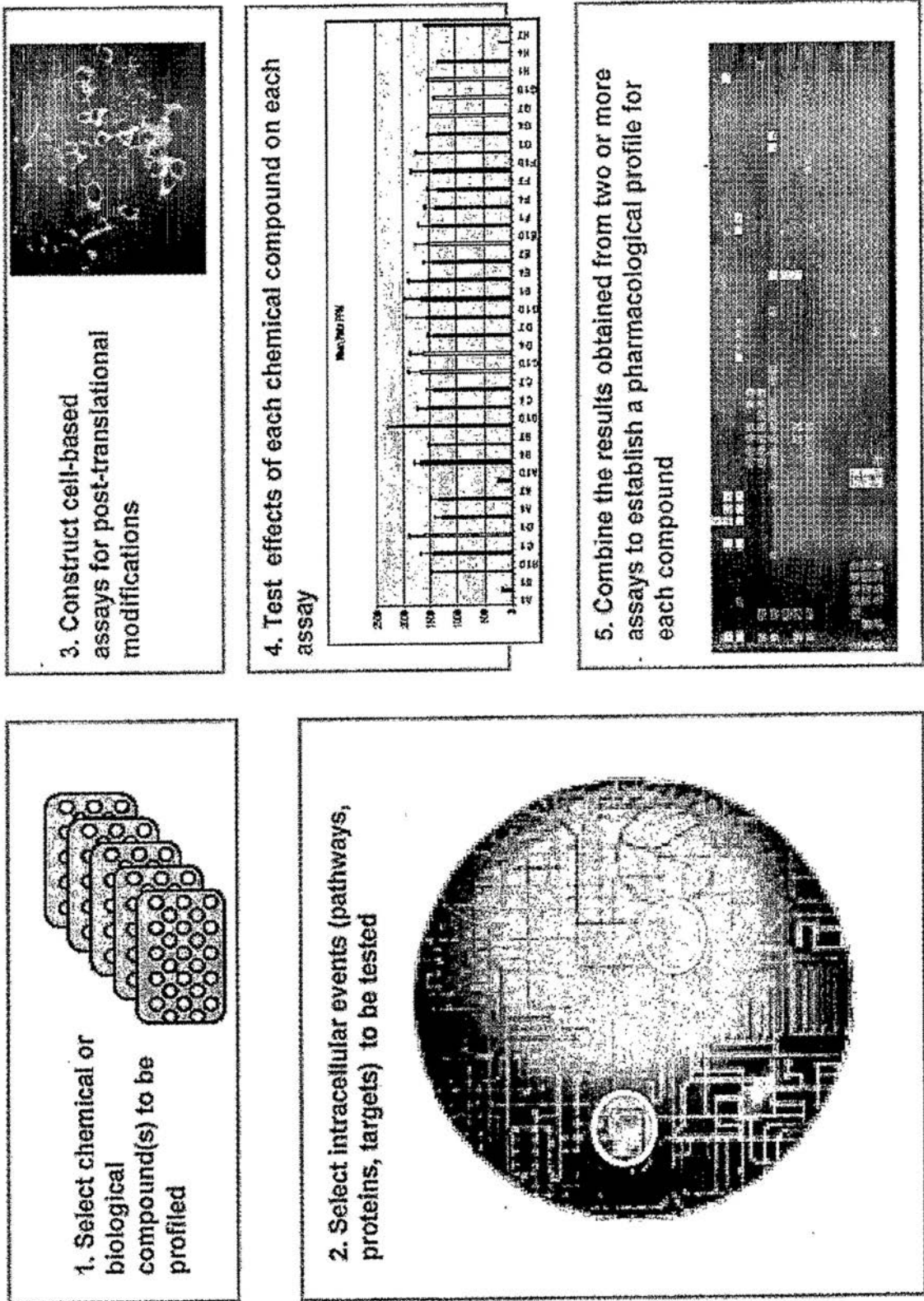


Fig. 4 Design of proof-of-principle study for pharmacological profiling

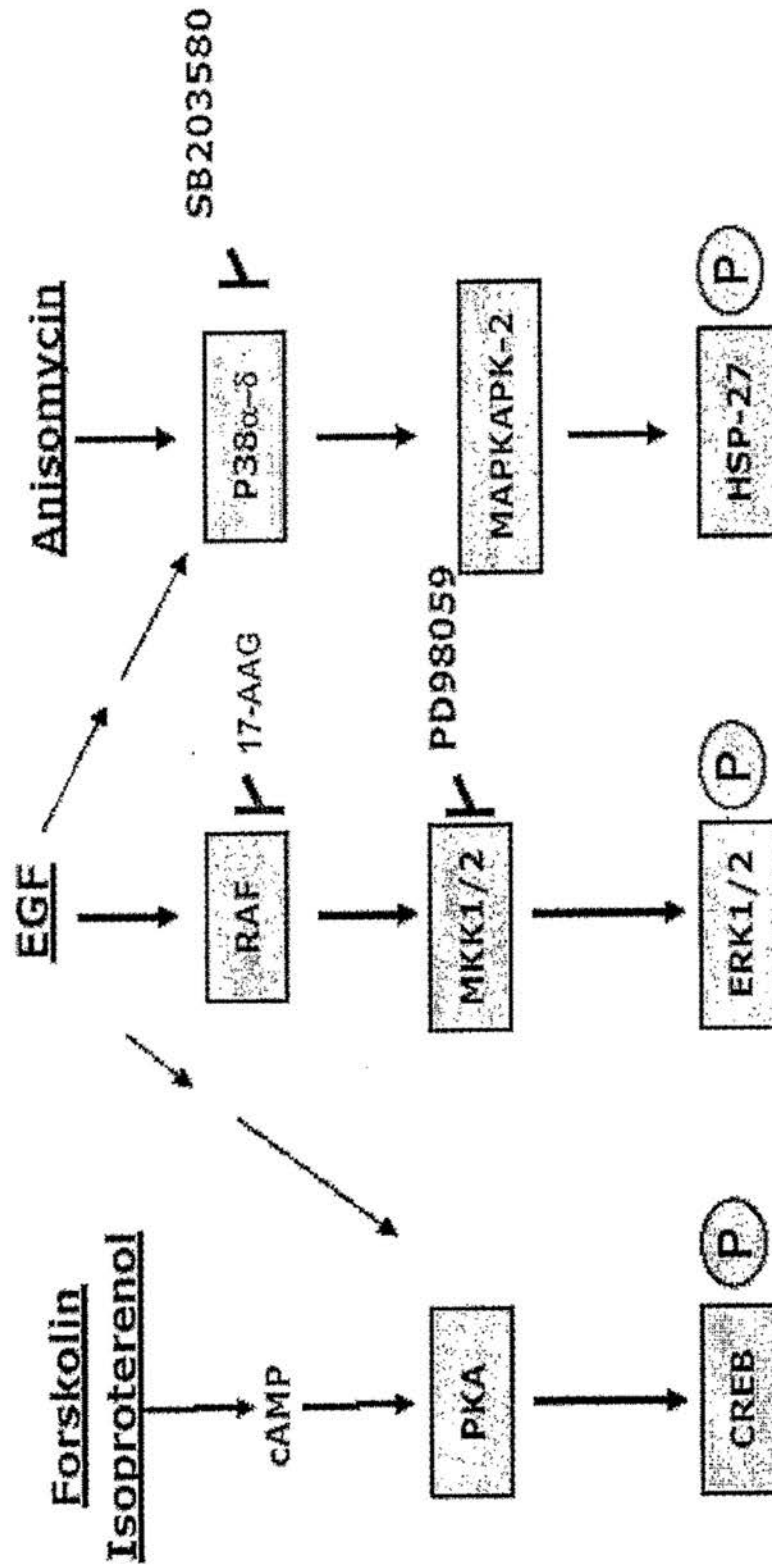


Fig. 5 Differential effects of drugs and anisomycin on phospho-CREB in HEK293 cells

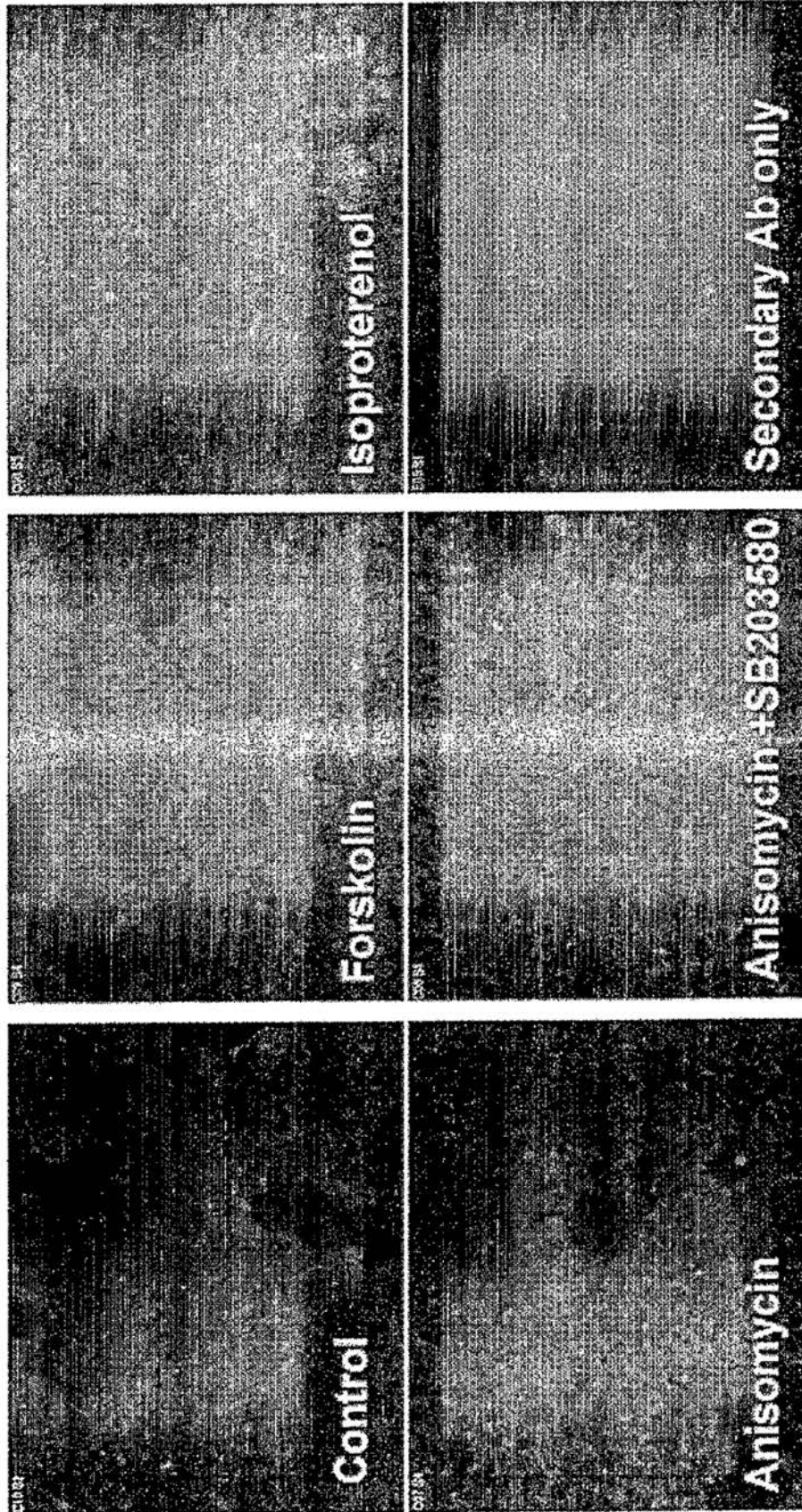


Fig. 6 Differential effects of EGF and drugs on phospho-CREB in human cells

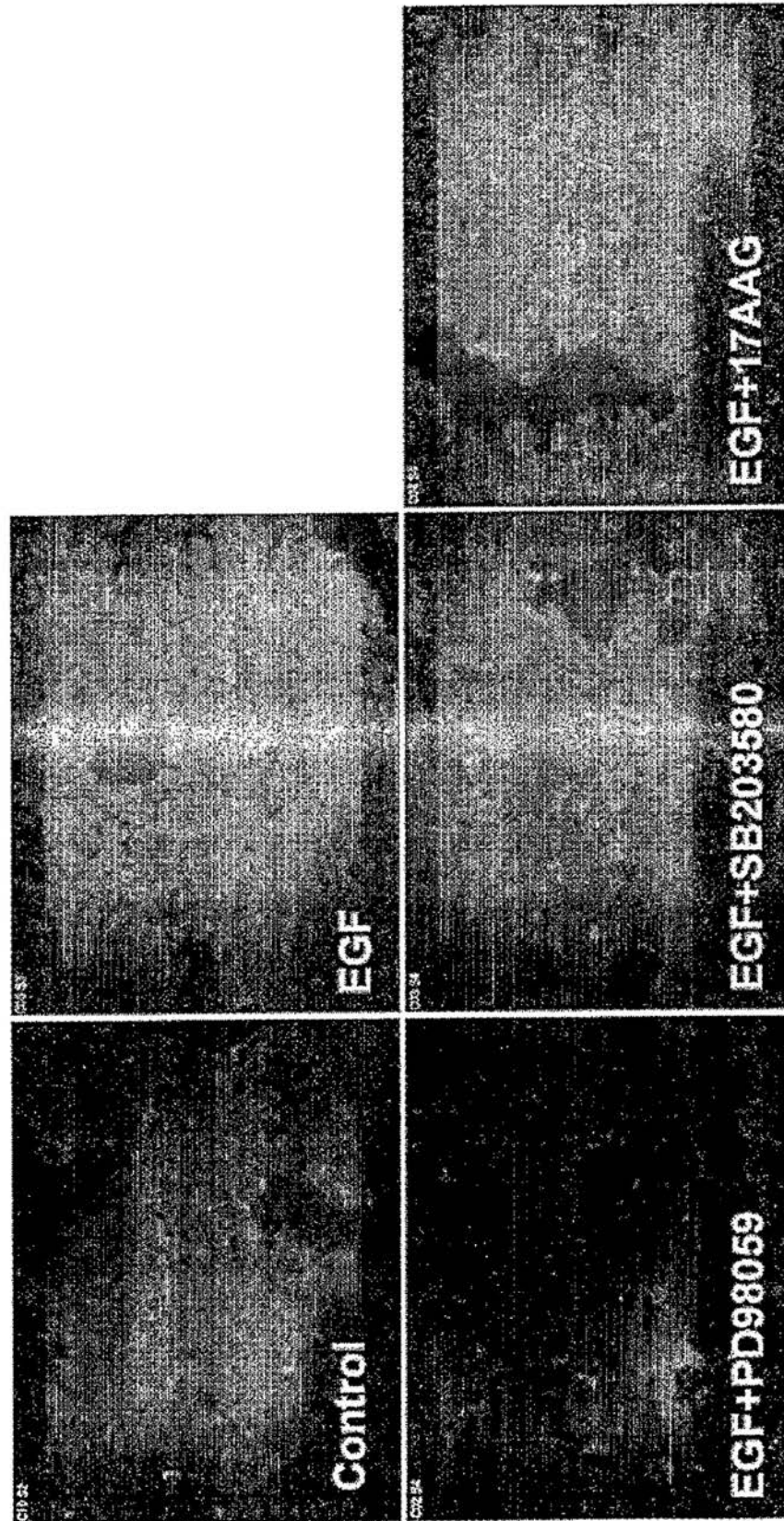


Fig. 7 Differential effects of drugs and other agents on the amount of phospho-CREB in the cell nucleus

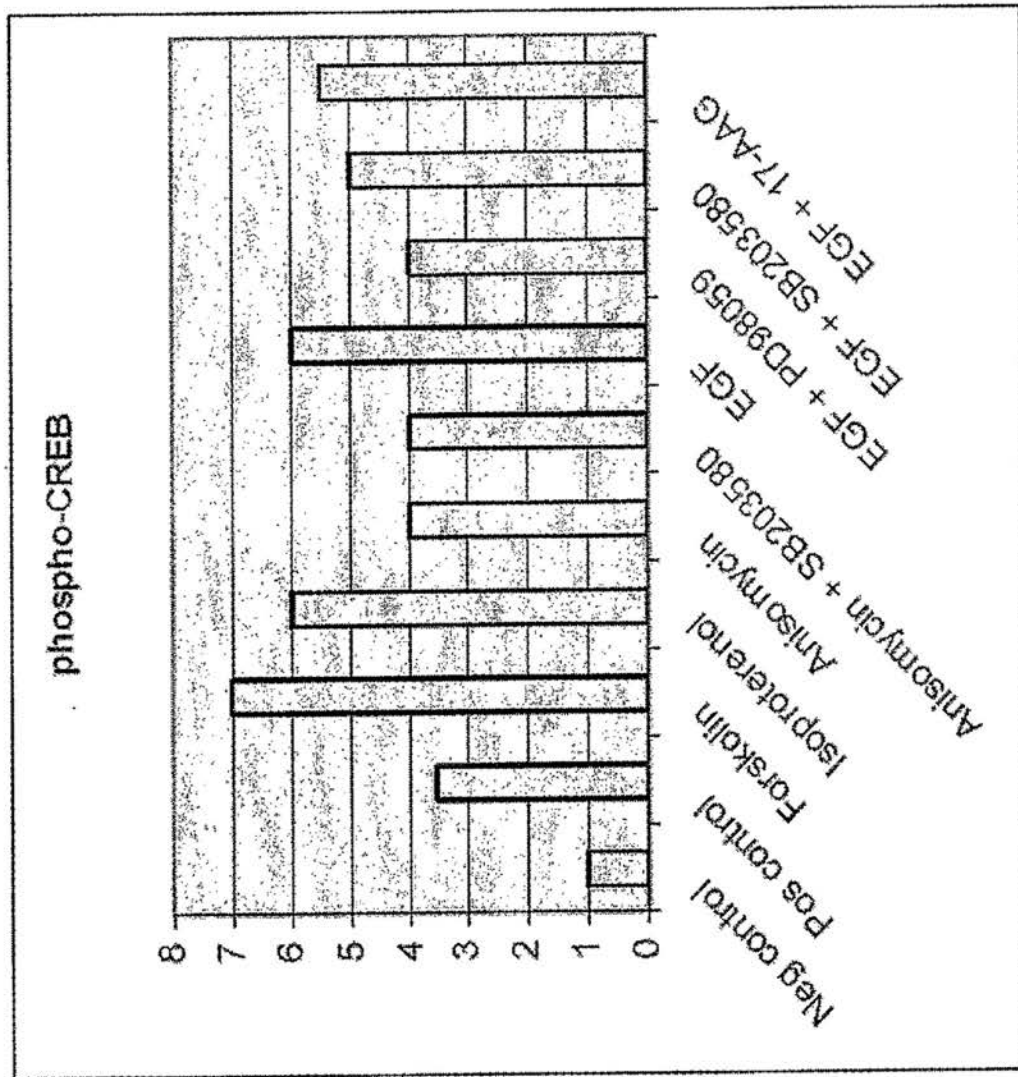


Fig. 8 Differential effects of drugs on phospho-Hsp27

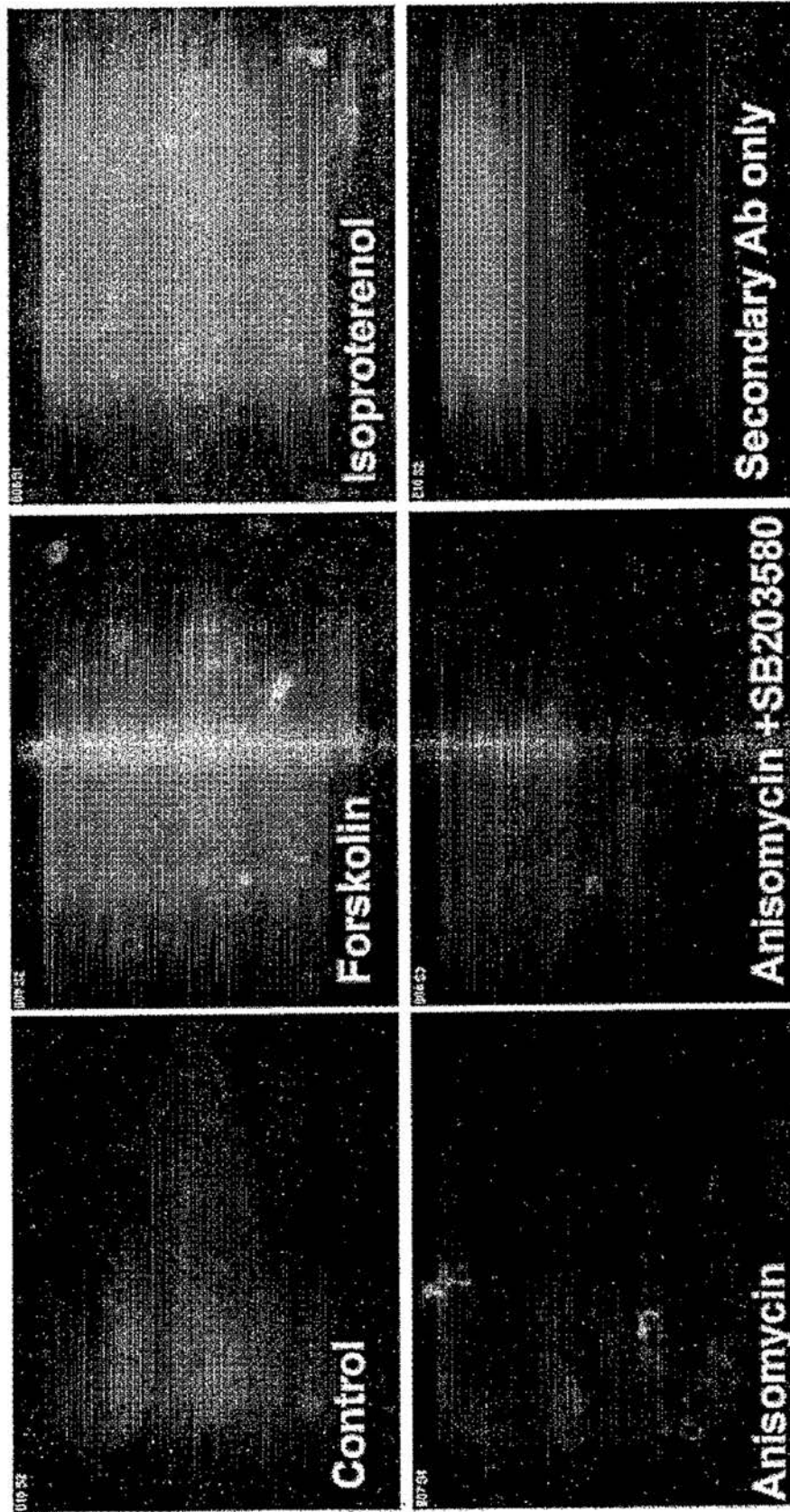


Fig 9. Differential effects of EGF and drugs on Phospho-Hsp27 in human cells

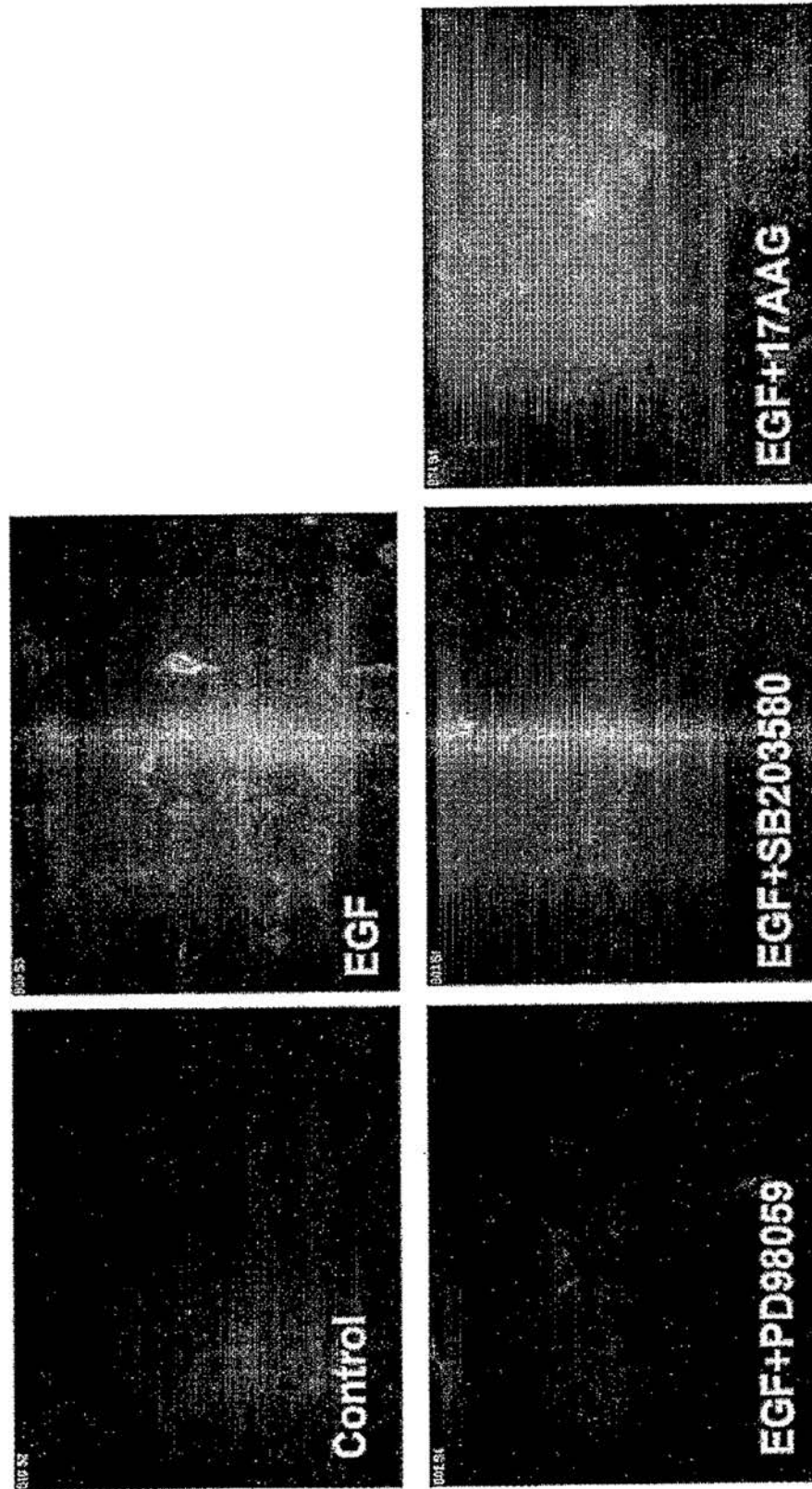


Fig 10. Differential effects of EGF and drugs on the amount of phospho-Hsp27 in human cells

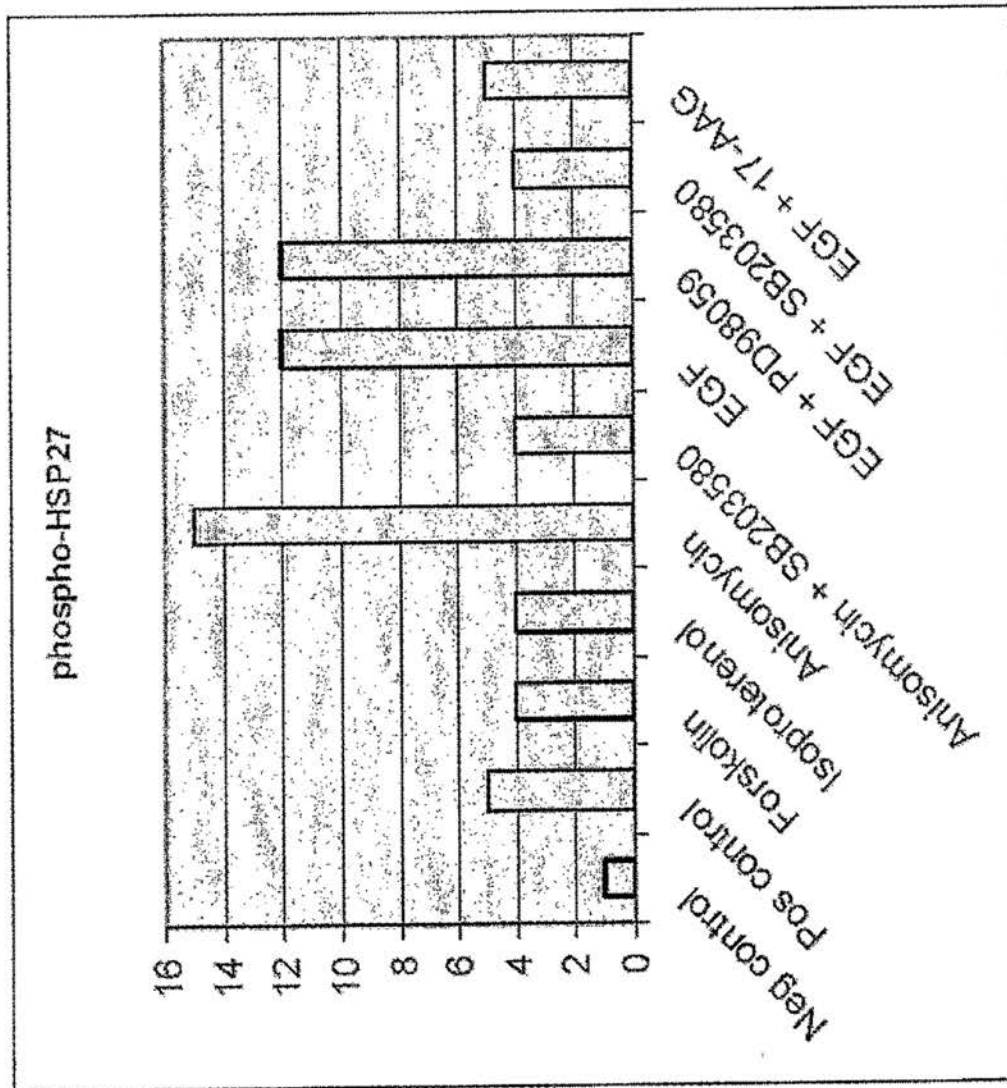


Fig. 11 Differential effects of drugs on phospho-ERK in human cells

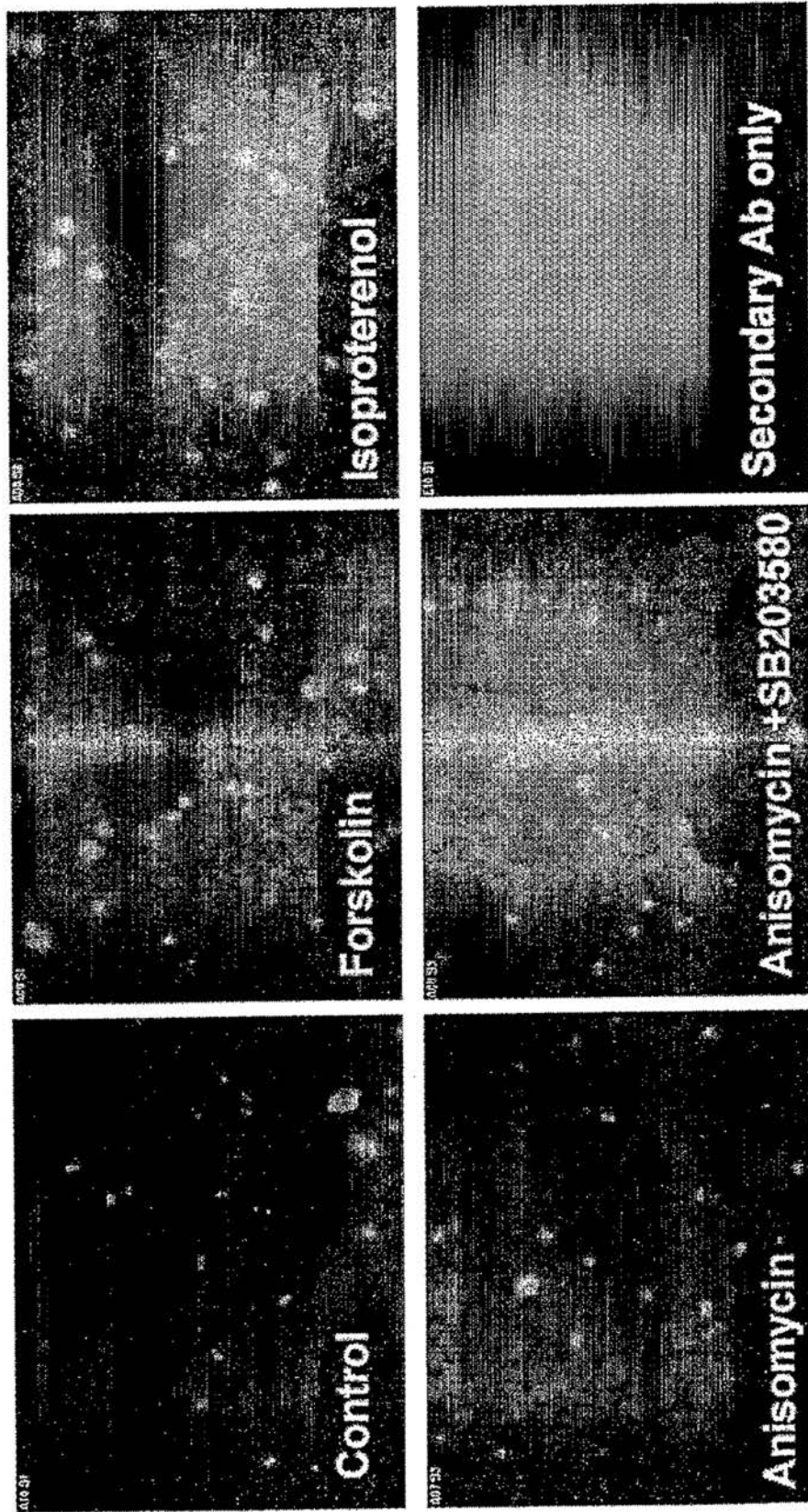


Fig. 12 Differential effects of EGF and drugs on phospho-ERK

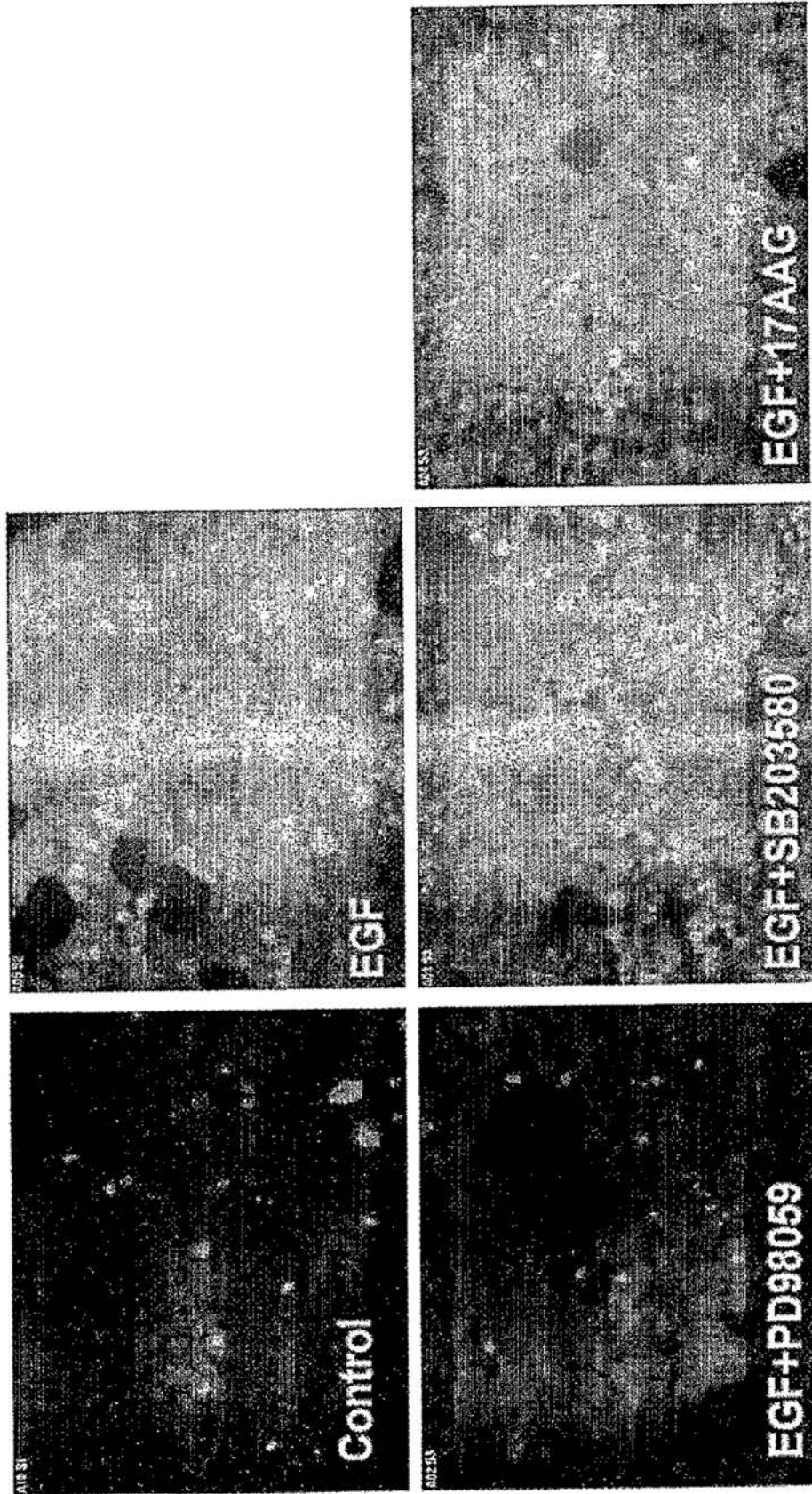


Fig. 13 Differential effects of EGF and drugs on the amount of phospho-ERK

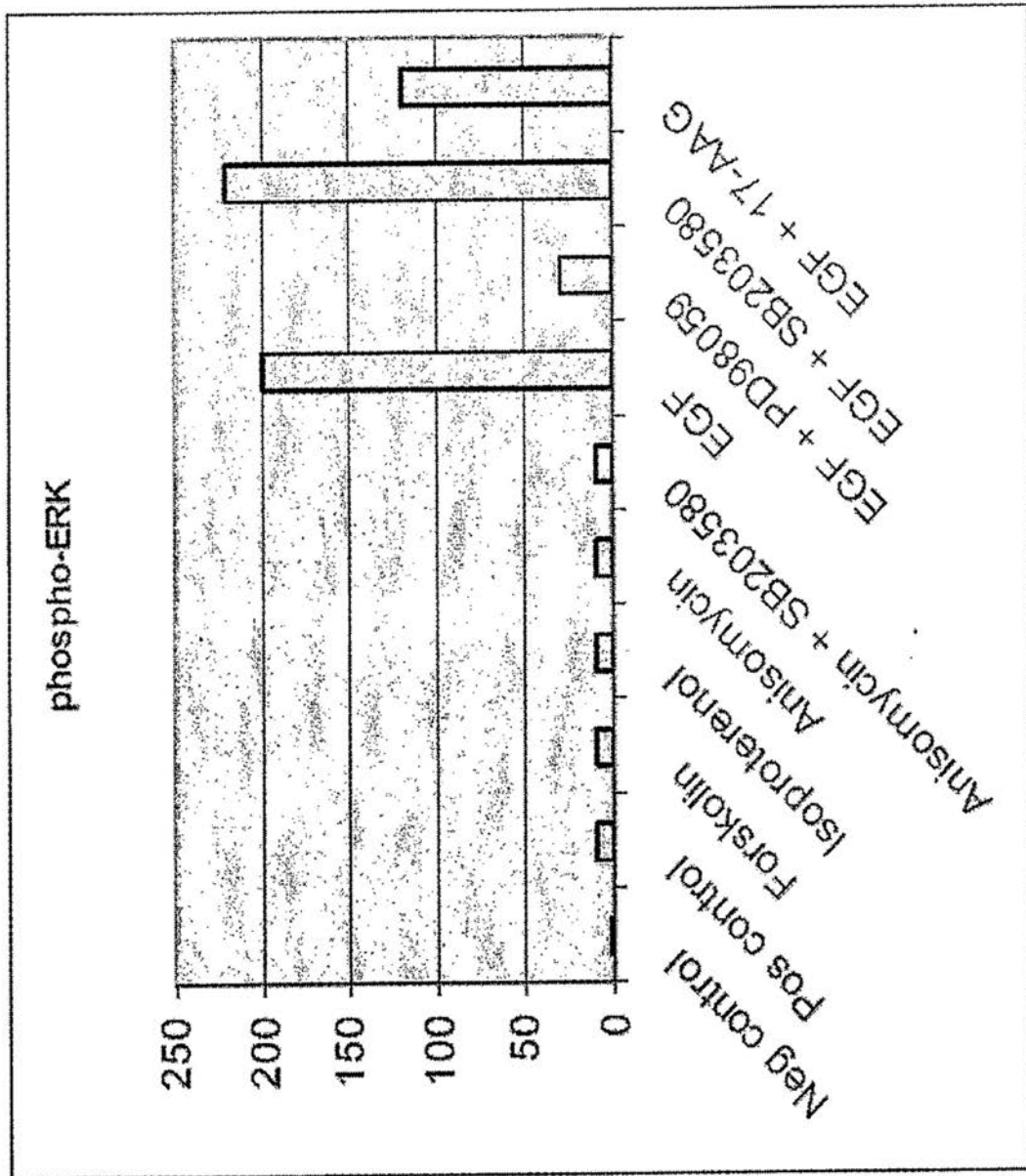
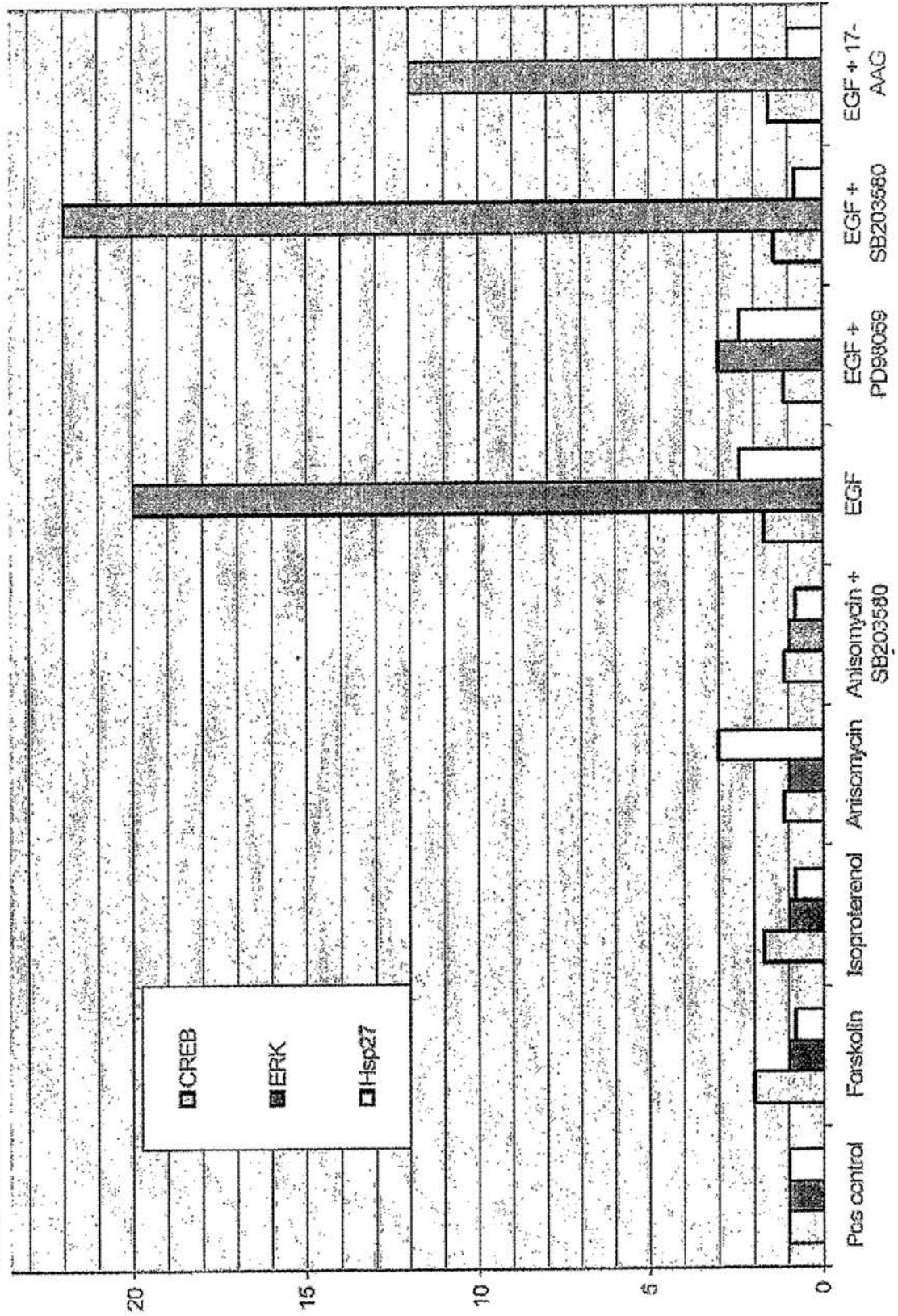


Fig. 14 Pharmacological profiles produced by forskolin, isoproterenol, anisomycin, EGF, SB203580, PD98059 and 17-AAG

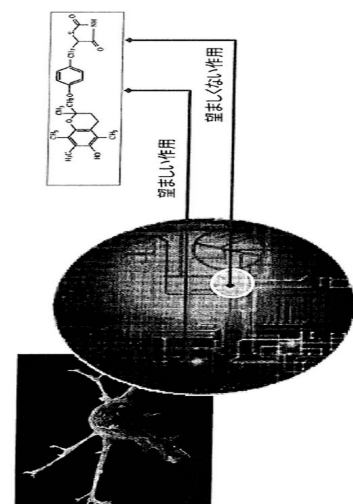


专利名称(译)	使用基于细胞的测定法对药物进行药理学分析		
公开(公告)号	<a href="#">JP2014016337A</a>	公开(公告)日	2014-01-30
申请号	JP2013043630	申请日	2013-03-06
[标]申请(专利权)人(译)	オデュッセイセラインコーポレイテッド		
申请(专利权)人(译)	Odeyusseiseira公司		
[标]发明人	ウェストウィックジョンケイ ユヘレン マクドナルドマーニーエル		
发明人	ウェストウィック ジョン ケイ ユヘレン マクドナルド マーニー エル		
IPC分类号	G01N33/50 G01N33/15 G01N33/49 G01N33/536 C12Q1/02		
CPC分类号	C12Q1/025 G01N33/5023 G01N33/5035 G01N33/5041 G01N33/5097 G01N2440/00 G01N2440/10 G01N2440/12 G01N2440/36 G01N2440/38 G01N2500/10		
FI分类号	G01N33/50.Z G01N33/15.Z G01N33/49.K G01N33/536.D C12Q1/02		
F-TERM分类号	2G045/AA40 2G045/CB01 2G045/DA36 2G045/FA11 2G045/FB03 2G045/FB12 2G045/GC15 4B063 /QA01 4B063/QA18 4B063/QQ08 4B063/QR48 4B063/QR66 4B063/QS36 4B063/QS39 4B063/QX02		
优先权	60/602317 2004-08-18 US 11/205021 2005-08-17 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种建立安全性概况以及对化合物进行药理分析的方法。分析化合物的方法，该方法包括：(A) 测试化合物对完整细胞中两种或多种大分子的量和/或翻译后修饰的影响；(B) 根据测试结果构建药理学资料，以及(C) 将其与已建立安全性资料的药物资料进行比较。此外，本发明还涉及包含测定组的组合物，所述组包含用于蛋白质的量和/或翻译后修饰以及蛋白质-蛋白质相互作用的量和/或细胞内量的至少一种高含量测定。包括至少一项针对位置的高含量检测。[选择图]无

图1. 生細胞中における化合物及び薬物のオンターゲット及びオフターゲット作用の同定



蛋白又は他の巨大分子の翻訳後修飾についての細胞ベースアッセイ