(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2004-503249
(P2004-503249A)
(43)公表日　平成16年2月5日(2004.2.5)

(51)Int.Cl.[7]	FI		テーマコード（参考）
C12Q 1/02	C12Q 1/02		2G045
G01N 33/15	G01N 33/15	Z	4B063
G01N 33/50	G01N 33/50	Z	
G01N 33/566	G01N 33/566		

審査請求 未請求　予備審査請求 有　（全 130 頁）

(21)出願番号　特願2002-510710(P2002-510710)
(86)(22)出願日　平成13年6月13日(2001.6.13)
(85)翻訳文提出日　平成14年12月10日(2002.12.10)
(86)国際出願番号　PCT/US2001/019033
(87)国際公開番号　WO2001/096597
(87)国際公開日　平成13年12月20日(2001.12.20)
(31)優先権主張番号　60/211,268
(32)優先日　平成12年6月13日(2000.6.13)
(33)優先権主張国　米国(US)
(31)優先権主張番号　60/294,531
(32)優先日　平成13年5月30日(2001.5.30)
(33)優先権主張国　米国(US)

(71)出願人　397009934
グラクソ　グループ　リミテッド
ＧＬＡＸＯ　ＧＲＯＵＰ　ＬＩＭＩＴＥＤ
イギリス　ミドルセックス　ユービー６　０エヌエヌ　グリーンフォード　バークレー　アベニュー　グラクソ　ウェルカム　ハウス　（番地なし）
Ｇｌａｘｏ　Ｗｅｌｌｃｏｍｅ　Ｈｏｕｓｅ，Ｂｅｒｋｅｌｅｙ　Ａｖｅｎｕｅ　Ｇｒｅｅｎｆｏｒｄ，Ｍｉｄｄｌｅｓｅｘ　ＵＢ６　ＯＮＮ，Ｇｒｅａｔ　Ｂｒｉｔａｉｎ
(74)代理人　100091096
弁理士　平木　祐輔

最終頁に続く

(54)【発明の名称】候補化合物を生物学的活性についてスクリーニングするためのハイスループット方法

(57)【要約】
標的の生物学的活性をモジュレートする能力について候補化合物をスクリーニングする方法に関する。該方法は、標的および指示薬を含み、複数の候補化合物を収容できるように適合された基板を得ること；各候補化合物が識別でき、かつ候補化合物サンプル中の候補化合物が該基板中の標的と相互作用するように該基板と該複数の候補化合物サンプルとを接触させること；該標的と候補化合物との相互作用の際に該指示薬により生成されたシグナルを検出すること；および、生成シグナルの量に基づいて該標的の生物学的活性のモジュレーターとして候補化合物を同定すること；を含む。

【特許請求の範囲】
【請求項１】
標的の生物学的活性をモジュレートする能力について候補化合物をスクリーニングする方法であって、
（ａ）　標的および指示薬を含み、複数の候補化合物を収容できるように適合された基板を得ること；
（ｂ）　各候補化合物が識別でき、かつ候補化合物サンプル中の候補化合物が該基板中の標的と相互作用するように該基板と該複数の候補化合物サンプルとを接触させること；
（ｃ）　該標的と候補化合物との相互作用の際に該指示薬により生成されたシグナルを検出すること；および
（ｄ）　生成シグナルの量に基づいて該標的の生物学的活性のモジュレーターとして候補化合物を同定すること；
を含む、上記方法。
【請求項２】
基板が、生物学的マトリックス培地、合成マトリックス培地、およびこれらの組み合わせからなる群より選択されるマトリックスをさらに含む、請求項１記載の方法。
【請求項３】
生物学的マトリックス培地が、アガロース、コラーゲン、ラミニン、基底膜に由来する複合体、これらの誘導体、およびこれらの組み合わせからなる群より選択される物質をさらに含む、請求項２記載の方法。
【請求項４】
アガロースが低融点アガロースである、請求項３記載の方法。
【請求項５】
指示薬が、発光性化合物、蛍光性化合物、化学発光性化合物、発色性化合物、放射性標識化合物およびその組み合わせからなる群より選択される、請求項１記載の方法。
【請求項６】
基板が細胞をさらに含む、請求項１記載の方法。
【請求項７】
細胞が標的もしくは指示薬または標的と指示薬の両方を発現する、請求項６記載の方法。
【請求項８】
細胞が２種以上の標的を発現する、請求項７記載の方法。
【請求項９】
細胞が、アフリカツメガエルメラニン細胞、哺乳動物細胞、細菌細胞、真菌細胞およびこれらの組み合わせからなる群より選択される、請求項６記載の方法。
【請求項１０】
それぞれが１種以上の標的を発現する細胞の組合せをさらに含む、請求項９記載の方法。
【請求項１１】
以下の：
（ａ）　候補化合物を装填した後、標的に対するリガンドに基板を接触させることにより、候補化合物をリガンドの存在下で所定のパターン内の標的と相互作用させること；
（ｂ）　標的とリガンドとの相互作用を遮断する際に指示薬により生成されるシグナルを、所定のパターン内で検出すること；および
（ｃ）　対照のサンプルと比較した生成シグナルの量に基づいて標的の生物学的活性のモジュレーターとしての候補化合物を同定すること；
をさらに含む、請求項７記載の方法。
【請求項１２】
基板全体に混合された複数の細胞をさらに含む、請求項６記載の方法。
【請求項１３】
基板内で層を形成する複数の細胞をさらに含む、請求項６記載の方法。
【請求項１４】

基板が、基板内の細胞の層の上に形成されたマトリックス層をさらに含み、該マトリックス層が複数の候補化合物サンプルを収容するように位置する、請求項１３記載の方法。
【請求項１５】
マトリックス層が、生物学的マトリックス培地、合成マトリックス培地、およびこれらの組み合わせからなる群より選択されるマトリックスを含む、請求項１４記載の方法。
【請求項１６】
生物学的マトリックス培地が、アガロース、コラーゲン、ラミニン、基底膜に由来する複合体、これらの誘導体、およびこれらの組み合わせからなる群より選択される物質をさらに含む、請求項１５記載の方法。
【請求項１７】
アガロースが低融点アガロースである、請求項１６記載の方法。
【請求項１８】
基板が細胞を含まない基板である、請求項１記載の方法。
【請求項１９】
候補化合物がビーズに結合しており、ビーズから候補化合物が切り離されることをさらに含む、請求項１記載の方法。
【請求項２０】
ビーズが紫外光に曝露されることにより、候補化合物がビーズから切断される、請求項１９記載の方法。
【請求項２１】
ビーズを細胞とマトリックスとに混合し、該ビーズとマトリックスと細胞との混合物を支持体上に流し込んで基板にビーズを接触させることにより、支持体上に基板を形成することを特徴とする、請求項２０記載の方法。
【請求項２２】
複数の候補化合物サンプルが液体候補化合物サンプルを含む、請求項１記載の方法。
【請求項２３】
複数の液体候補化合物サンプルが、ソースから得られる液体候補化合物サンプルの数の乗数に等しい数を含んでいる、請求項１記載の方法。
【請求項２４】
乗数が１～２５の範囲内の数である、請求項２３記載の方法。
【請求項２５】
ソースから得られる液体候補化合物サンプルが、９６、３８４または１５３６個である、請求項２４記載の方法。
【請求項２６】
複数の液体候補化合物サンプルが少なくとも約３８４個の液体候補化合物サンプルを含む、請求項１記載の方法。
【請求項２７】
複数の液体候補化合物サンプルが少なくとも約１２８０個の液体候補化合物サンプルを含む、請求項１記載の方法。
【請求項２８】
複数の液体候補化合物サンプルが少なくとも約１５３６個の液体候補化合物サンプルを含む、請求項１記載の方法。
【請求項２９】
基板を複数の液体候補化合物サンプルに接触させた後、複数の時点でシグナルを検出する、請求項１記載の方法。
【請求項３０】
標的の生物学的活性のモジュレーターとして候補化合物を同定するステップが、最終時点での候補化合物により生成されたシグナルから開始時点での候補化合物により生成されたシグナルを差し引くことを含む、請求項２９記載の方法。
【請求項３１】

シグナルの直径、シグナルの体積、シグナルの範囲、シグナルの凹凸性、シグナルの真円度またはこれらの組み合わせを分析することにより、候補化合物により生成されたシグナルの量を評価する、請求項１記載の方法。
【請求項３２】
複数の液体候補化合物サンプルに基板を接触させて、液体候補化合物サンプルが基板の表面に接触し、かつ液体候補化合物サンプルを基板に接近させるために用いる手段が基板に接触しないことを特徴とする、請求項１記載の方法。
【請求項３３】
複数の液体候補化合物サンプルに基板を接触させて、液体候補化合物サンプルと、該液体候補化合物サンプルを基板に送達するために用いる手段とがそれぞれに基板に接触することを特徴とする、請求項１記載の方法。
【請求項３４】
標的の生物学的活性をモジュレートする能力について候補化合物をスクリーニングする方法であって：
（ａ）　標的を発現する細胞および指示薬を含み、少なくとも約３８４個の候補化合物を収容できるように適合された基板を得ること；
（ｂ）　該基板と複数の液体候補化合物サンプルとを接触させて、該候補化合物サンプルの所定のパターンを基板上に形成することで、該候補化合物サンプル中の候補化合物を該基板中の該所定のパターン内の標的と相互作用させること；
（ｃ）　該標的と候補化合物との相互作用の際に該指示薬により該所定のパターン内で生成されるシグナルを検出すること；および
（ｄ）　対照サンプルと比較した生成シグナル量に基づいて、該標的の生物学的活性のモジュレーターとして候補化合物を同定すること；
を含む、上記方法。
【請求項３５】
基板が、生物学的マトリックス培地、合成マトリックス培地、およびこれらの組み合わせからなる群より選択されるマトリックスをさらに含む、請求項３４記載の方法。
【請求項３６】
生物学的マトリックス培地が、アガロース、コラーゲン、ラミニン、基底膜に由来する複合体、これらの誘導体、およびこれらの組み合わせからなる群より選択される物質をさらに含む、請求項３５記載の方法。
【請求項３７】
アガロースが低融点アガロースである、請求項３６記載の方法。
【請求項３８】
指示薬が、発光性化合物、蛍光性化合物、化学発光性化合物、発色性化合物、放射性標識化合物およびその組み合わせからなる群より選択される、請求項３４記載の方法。
【請求項３９】
細胞が標的もしくは指示薬または標的と指示薬の両方を発現する、請求項３４記載の方法。
【請求項４０】
細胞が２種以上の標的を発現する、請求項３９記載の方法。
【請求項４１】
細胞が、アフリカツメガエルメラニン細胞、哺乳動物細胞、細菌細胞、真菌細胞およびこれらの組み合わせからなる群より選択される、請求項３４記載の方法。
【請求項４２】
それぞれが１種以上の標的を発現する細胞の組合せをさらに含む、請求項３４記載の方法。
【請求項４３】
以下の：
（ａ）　候補化合物を装填した後、標的に対するリガンドに基板を接触させることにより

、候補化合物をリガンドの存在下で所定のパターン内の標的と相互作用させること；
（ｂ）　標的とリガンドとの相互作用を遮断する際に指示薬により生成されるシグナルを、所定のパターン内で検出すること；および
（ｃ）　対照サンプルに比較した生成シグナルの量に基づいて標的の生物学的活性のモジュレーターとしての候補化合物を同定すること；
を含む、請求項３４記載の方法。
【請求項４４】
基板全体に渡って混合された複数の細胞をさらに含む、請求項３４記載の方法。
【請求項４５】
基板内で層を形成する複数の細胞をさらに含む、請求項３４記載の方法。
【請求項４６】
基板が、基板内の細胞の層の上に形成されたマトリックス層をさらに含み、該マトリックス層が複数の候補化合物サンプルを収容するように位置する、請求項４５記載の方法。
【請求項４７】
マトリックス層が、生物学的マトリックス培地、合成マトリックス培地、およびこれらの組み合わせからなる群より選択されるマトリックスを含む、請求項４６記載の方法。
【請求項４８】
生物学的マトリックス培地が、アガロース、コラーゲン、ラミニン、基底膜に由来する複合体、これらの誘導体、およびこれらの組み合わせからなる群より選択される物質をさらに含む、請求項４７記載の方法。
【請求項４９】
アガロースが低融点アガロースである、請求項４８記載の方法。
【請求項５０】
複数の液体候補化合物サンプルが、ソースから得られる液体候補化合物サンプルの数の乗数に等しい数である、請求項３４記載の方法。
【請求項５１】
乗数が１～２５の範囲内の数である、請求項５０記載の方法。
【請求項５２】
ソースから得られる液体候補化合物サンプルの数が、９６、３８４または１５３６個である、請求項５０記載の方法。
【請求項５３】
複数の液体候補化合物サンプルが少なくとも約３８４個の液体化合物サンプルを含む、請求項３４記載の方法。
【請求項５４】
複数の液体候補化合物サンプルが少なくとも約１２８０個の液体化合物サンプルを含む、請求項３４記載の方法。
【請求項５５】
複数の液体候補化合物サンプルが少なくとも約１５３６個の液体化合物サンプルを含む、請求項３４記載の方法。
【請求項５６】
基板を複数の液体化合物サンプルに接触させた後、複数の時点でシグナルを検出する、請求項３４記載の方法。
【請求項５７】
標的の生物学的活性のモジュレーターとして候補化合物を同定するステップが、最終時点での候補化合物により生成されたシグナルから開始時点での候補化合物により生成されたシグナルを差し引くことを含む、請求項５６記載の方法。
【請求項５８】
シグナルの直径、シグナルの体積、シグナルの範囲、シグナルの凹凸性、シグナルの真円度またはこれらの組み合わせを分析することにより、候補化合物により生成されたシグナルの量を評価する、請求項３４記載の方法。

【請求項５９】
複数の液体候補化合物に基板を接触させて、液体候補化合物サンプルが基板の表面に接触し、かつ液体候補化合物サンプルを基板に接近させるために用いる手段が基板に接触しないことを特徴とする、請求項３４記載の方法。
【請求項６０】
複数の液体候補化合物サンプルに基板を接触させて、液体候補化合物サンプルと、該液体候補化合物サンプルを基板に送達するために用いる手段とがそれぞれに基板に接触することを特徴とする、請求項３４記載の方法。
【請求項６１】
標的の生物学的活性をモジュレートする能力について候補化合物をスクリーニングする方法であって：
（ａ）　基板内に層を形成する、標的を発現する複数の細胞と指示薬とを含み、少なくとも約１５３６個の候補化合物を収容できるように適合された基板を得ること；
（ｂ）　該基板と複数の液体候補化合物サンプルとを接触させて、該候補化合物サンプルの所定のパターンを基板上に形成することで、該候補化合物サンプル中の候補化合物を該所定のパターン内の標的と相互作用させること；
（ｃ）　該標的と候補化合物との相互作用の際に該指示薬により該所定のパターン内で生成されるシグナルを検出すること；および
（ｄ）　対照サンプルと比較した生成シグナル量に基づいて、該標的の生物学的活性のモジュレーターとして候補化合物を同定すること；
を含む、上記方法。
【請求項６２】
マトリックス層が、基板内の細胞の層の上に形成されたマトリックス層をさらに含み、該マトリックス層が複数の候補化合物サンプルを収容するように位置する、請求項６１記載の方法。
【請求項６３】
基板が、生物学的マトリックス培地、合成マトリックス培地、およびこれらの組み合わせからなる群より選択されるマトリックスをさらに含む、請求項６２記載の方法。
【請求項６４】
生物学的マトリックス培地が、アガロース、コラーゲン、ラミニン、基底膜に由来する複合体、これらの誘導体、およびこれらの組み合わせからなる群より選択される物質をさらに含む、請求項６３記載の方法。
【請求項６５】
アガロースが低融点アガロースである、請求項６４記載の方法。
【請求項６６】
指示薬が、発光性化合物、蛍光性化合物、化学発光性化合物、発色性化合物、放射性標識化合物およびその組み合わせからなる群より選択される、請求項６１記載の方法。
【請求項６７】
細胞が標的と指示薬の両方を発現する、請求項６１記載の方法。
【請求項６８】
細胞が２種以上の標的を発現する、請求項６３記載の方法。
【請求項６９】
細胞が、アフリカツメガエルメラニン細胞、哺乳動物細胞、細菌細胞、真菌細胞およびこれらの組み合わせからなる群より選択される、請求項６１記載の方法。
【請求項７０】
それぞれが１種以上の標的を発現する細胞の組合せをさらに含む、請求項６９記載の方法。
【請求項７１】
以下の：
（ａ）　候補化合物を装填した後、標的に対するリガンドに基板を接触させ、これにより

、候補化合物がリガンドの存在下で所定のパターン内の標的と相互作用し；
（ｂ）　標的とリガンドとの相互作用を遮断する際に指示薬により生成されるシグナルを、所定のパターン内で検出し；および
（ｃ）　対照のサンプルに比較した生成シグナルの量に基づいて標的の生物学的活性のモジュレーターとしての候補化合物を同定すること；
を含む、請求項６１記載の方法。
【請求項７２】
複数の液体化合物サンプルが、ソースから得られる液体化合物サンプルの数の乗数に等しい数である、請求項６１記載の方法。
【請求項７３】
乗数が１～２５の範囲内の数である、請求項７２記載の方法。
【請求項７４】
ソースから得られる液体候補化合物サンプルの数が、９６、３８４または１５３６個である、請求項７２記載の方法。
【請求項７５】
複数の液体候補化合物サンプルが少なくとも約３８４個の液体化合物サンプルを含む、請求項６１記載の方法。
【請求項７６】
複数の液体候補化合物サンプルが少なくとも約１２８０個の液体化合物サンプルを含む、請求項６１記載の方法。
【請求項７７】
複数の液体候補化合物サンプルが少なくとも約１５３６個の液体化合物サンプルを含む、請求項６１記載の方法。
【請求項７８】
基板を複数の液体化合物サンプルに接触させた後、複数の時点でシグナルを検出する、請求項６１記載の方法。
【請求項７９】
標的の生物学的活性のモジュレーターとして候補化合物を同定するステップが、最終時点での候補化合物により生成されたシグナルから開始時点での候補化合物により生成されたシグナルを差し引くことを含む、請求項７８記載の方法。
【請求項８０】
シグナルの直径、シグナルの体積、シグナルの範囲、シグナルの凹凸性、シグナルの真円度またはこれらの組み合わせを分析することにより、候補化合物により生成されたシグナルの量を評価する、請求項６１記載の方法。
【請求項８１】
複数の液体候補化合物に基板を接触させて、液体候補化合物サンプルが基板の表面に接触し、かつ液体候補化合物サンプルを基板に接近させるために用いる手段が基板に接触しないことを特徴とする、請求項６１記載の方法。
【請求項８２】
複数の液体候補化合物サンプルに基板を接触させて、液体候補化合物サンプルと、該液体候補化合物サンプルを基板に送達するために用いる手段とがそれぞれに基板に接触することを特徴とする、請求項６１記載の方法。
【請求項８３】
標的の生物学的活性をモジュレートする能力について候補化合物をスクリーニングする方法であって：
（ａ）　マトリックス、指示薬、および基板中に懸濁された、標的を発現する複数の細胞を含む、複数の候補化合物を収容できるように適合された基板を得ること；
（ｂ）　それぞれの候補化合物が識別でき、かつ候補化合物サンプル中の候補化合物が該基板中の該標的と相互作用するように、該基板を該複数の候補化合物サンプルと接触させること；

（ｃ）　該標的と候補化合物との相互作用の際に該指示薬により生成されるシグナルを検出すること；および
（ｄ）　生成シグナルの量に基づいて、該標的の生物学的活性のモジュレーターとして候補化合物を同定すること；
を含む、上記方法。
【請求項８４】
マトリックスが、アガロース、コラーゲン、ラミニン、基底膜に由来する複合体、これらの誘導体、およびこれらの組み合わせからなる群より選択される物質をさらに含む、請求項８３記載の方法。
【請求項８５】
指示薬が、発光性化合物、蛍光性化合物、化学発光性化合物、発色性化合物、放射性標識化合物およびその組み合わせからなる群より選択される、請求項８３記載の方法。
【請求項８６】
指示薬が、細胞内で発現される、検出可能な遺伝子産物を発現するレポーター遺伝子である、請求項８３記載の方法。
【請求項８７】
指示薬が、レポーター遺伝子の発現およびマトリックスにおけるレポーター遺伝子産物のシグナル展開剤との反応により生成される、請求項８６記載の方法。
【請求項８８】
細胞が哺乳動物細胞である、請求項８３記載の方法。
【請求項８９】
細胞が２種以上の標的を発現する、請求項８３記載の方法。
【請求項９０】
それぞれが１種以上の標的を発現する細胞の組合せをさらに含む、請求項８３記載の方法。
【請求項９１】
それぞれが１種以上の標的を発現する、同種または異種の細胞の組合せをさらに含む、請求項９０記載の方法。
【請求項９２】
シグナルの検出を容易にするために、基板が色の着いた固相支持体を含む、請求項９１記載の方法。
【請求項９３】
固相支持体の色が白色である、請求項９２記載の方法。
【請求項９４】
候補化合物がビーズに結合しており、ビーズから候補化合物が切り離されることをさらに含む、請求項８３記載の方法。
【請求項９５】
ビーズが紫外光に曝露されることにより、候補化合物がビーズから切断される、請求項９４記載の方法。
【請求項９６】
ビーズを細胞とマトリックスとに混合し、該ビーズとマトリックスと細胞との混合物を支持体上に流し込んで基板にビーズを接触させることにより支持体上に基板を形成することを特徴とする、請求項９５記載の方法。
【請求項９７】
以下の：
（ａ）　所定の温度で所定の時間に渡って基板をインキュベートすること；および
（ｂ）　ステップ（ａ）のインキュベーションの後にシグナル展開剤に基板を接触させることにより、指示薬がレポーター遺伝子の発現およびシグナル展開剤とのレポーター遺伝子産物の反応により生成されること、
を含む、請求項９６記載の方法。

【請求項９８】
複数の候補化合物サンプルが液体候補化合物サンプルを含む、請求項８３記載の方法。
【請求項９９】
基板の画像を得ることによりシグナルを検出する、請求項８３記載の方法。
【請求項１００】
テレセントリックレンズを介してＣＣＤカメラにより基板に由来するシグナルに焦点を当てることによりシグナルの画像を得る、請求項９９記載の方法。
【請求項１０１】
シグナルの検出が：
（ａ）　画像をデジタル化すること；
（ｂ）　複数のグリッド単位からなるグリッドに画像を重ねること；
（ｃ）　シグナルの周囲の所定の数のグリッド単位をそれぞれスキャンし、所定の数のグリッド単位中の各グリッド単位のグレイ強度値の平均を求めることにより、平均グレイ強度値を決定すること；
を含む、請求項９９記載の方法。
【発明の詳細な説明】
【０００１】
発明の分野
本発明は、候補化合物を生物学的活性についてスクリーニングするためのハイスループット方法に概ね関する。特に、本発明は、目的の標的を含む基板を採用する、候補化合物を生物学的活性についてスクリーニングするためのハイスループット方法に関する。
【０００２】
略記表
λ　－　波長
７ＴＭ　－　７回膜貫通
ＡＣ　－アデニリルシクラーゼ
ＢＳＡ　－　ウシ血清アルブミン
ｃＡＭＰ　－　環状ＡＭＰ
ＣＦＭ　－　繊維芽細胞（またはカエル）ならし培地
ＣＨＯ　－　チャイニーズハムスター卵巣
ＣＲＥ　－　ｃＡＭＰ応答エレメント
ＣＲＨ　－　副腎皮質刺激ホルモン放出因子
ＣＲＨＲ１　－　副腎皮質刺激ホルモン放出因子受容体
ＤＭＥＭ／Ｆ１２　－　ダルベッコ改変型イーグル培地
ＤＭＳＯ　－　ジメチルスルホキシド
ＥＤＴＡ　－　エチレンジアミン四酢酸
ＥＬＩＳＡ　－　酵素結合免疫吸着アッセイ
ＦＢＳ　－　ウシ胎仔血清
ＧＦＰ　－　緑色蛍光タンパク質
ＧＰＣＲ　－　Ｇタンパク質共役型受容体
ＧＬＰ－１　－　グルカゴン様ペプチド－１
ＦＬＩＰＲ　－　蛍光画像化プレートリーダー
ＨＤＲ　－　高密度レプリケーター
ＨＥＫ　－　ヒト胎児腎臓（ｈｕｍａｎ　ｅｍｂｒｙｏｎｉｃ　ｋｉｄｎｅｙ）
ＨＴＳ　－　ハイスループットスクリーニング
Ｌ－１５　－　リーボビッツ（ｌｅｉｂｏｖｉｔｚ）－１５培地
ＬＭＰ　－　低融点
ＭＣ１Ｒ　－　メラノコルチン－１受容体
ＭＤＳ　－　方法開発ソフトウェア
Ｍｉｎ．　－　分

ｍｌ　－　ミリリットル
ｍＲＮＡ　－　メッセンジャーＲＮＡ
αＭＳＨ　－　αメラニン細胞刺激ホルモン
［ＮＤＰ］－αＭＳＨ　－　４－Ｌ－ノルロイシン－７－Ｄ－フェニルアラニン－αメラニン細胞刺激ホルモン
ｎｌ　－　ナノリットル
ＰＢＳ　－　リン酸緩衝生理食塩水
ＰＤ　－　色素分散
ＰＬＣ　－　ホスホリパーゼＣ
ＲＴ－ＰＣＲ　－　逆転写ポリメラーゼ連鎖反応
ＳＯＰ　－　標準的動作手順
Ｔｃｌ　－　ツールコマンド言語
ＴＰＡ　－　ホルボール１２－ミリステート１３－アセテート
ＵＶ　－　紫外線
ＷＴ　－　野生型

背景技術

コンビナトリアル化学技術の出現により、治療薬として可能性のある多数の化合物の合成が可能になった。しかし、薬理学的活性を有する候補化合物を迅速かつ正確に同定できるアッセイは、合成のペースに遅れをとっている。その結果、多くの製薬会社は、薬理学的活性についてスクリーニングされていない候補化合物の膨大なライブラリーを所有している。

【０００３】

ＰＩＮツールシステムは、９６または３８４のサンプルをレザーバーから容器に移すために典型的に使用される市販のシステムである。現在、ＰＩＮツール技術は、膜上へのＤＮＡ／ＲＮＡスポッティングに適用されている。代表的なＰＩＮツールシステムは、３８４ウェルプレートにサンプルを移す装置の使用の記載と共に、Ｂｅｃｋｍａｎ Ｉｎｄｕｓｔｒｉｅｓ，Ｉｎｃ．，Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ Ｄｅｖｅｌｏｐｍｅｎｔ Ｃｅｎｔｅｒ，Ｆｕｌｌｅｒｔｏｎ，Ｃａｌｉｆｏｒｎｉａから出版されているＢｒａｎｔ，”Ｍｕｌｔｉｐｌｅｘｅｄ Ｎａｎｏｌｉｔｅｒ Ｔｒａｎｓｆｅｒ ｆｏｒ ｈｉｇｈ Ｔｈｒｏｕｇｈｐｕｔ Ｄｒｕｇ Ｓｃｒｅｅｎｉｎｇ Ｕｓｉｎｇ ｔｈｅ ＢＩＯＭＥＫ（登録商標） ２０００ ａｎｄ ｔｈｅ Ｈｉｇｈ Ｄｅｎｓｉｔｙ Ｒｅｐｌｉｃａｔｉｎｇ Ｔｏｏｌ”，Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｂｉｏｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｓｃｒｅｅｎｉｎｇ，Ｖｏｌ．２（２），（１９９７）に開示されている。

【０００４】

１９９７年２月１１日にＬｅｒｎｅｒらに発行された米国特許第５，６０１，９２２号（Ｂｕｎｓｅｎ ＲｕｓｈＬａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ，Ｉｎｃ．（Ｎｅｗｔｏｎ，Ｍａｓｓａｃｈｕｓｅｔｔｓ））は、ペプチドライブライリーフォーマットおよびそれに関連する方法を開示している。機能的応答を検出するために、細胞を覆うアガロース層へ合成ペプチドライブラリービーズを適用することが開示されている。

【０００５】

１９９９年１１月２日にＢｅｕｔｅｌら（譲受人：Ａｂｂｏｔｔ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ（Ａｂｂｏｔ Ｐａｒｋ，Ｉｌｌｉｎｏｉｓ））に発行された米国特許第５，９７６，８１３号は、連続形式ハイスループットスクリーニングアッセイを開示する。開示されているアッセイは、アッセイにおいて異なる物質サンプルからなる９６のサンプルを上回るサンプルがそれぞれ堆積される少なくとも１つの多孔性マトリックスを採用する。アッセイの細胞利用型実施形態では、目的の受容体を発現する細胞を、細胞マトリックス上で成長させるか、またはプレーティングする。受容体に対する標識化リガンドがマトリックス上または中に分注されるように多孔性マトリックスを作製する。次いで、テスト化合物またはサンプルを、リガンドまたは細胞マトリックス上に直接分注するか、あるいはまたは別のマトリックス上または中に分注する。この場合、サンプルマトリックスを、リガン

ドマトリックスと接触させて、サンプルをリガンドマトリックス中に拡散させる。適切なインキュベーション時間後、リガンドマトリックスを、細胞マトリックスと接触させて（好ましくはマトリックスの非細胞側）、リガンドおよびサンプルは、拡散により受容体と接触および反応する。従って、細胞利用型実施形態は、個別の細胞マトリックスの作成を必要とする。

【０００６】

上記文献の開示にも関わらず、薬理学的に活性な候補化合物についての改善されたハイスループットスクリーニング方法（特に液体サンプルを用いた使用および／または細胞利用型アッセイにおける使用のため）の開発の余地がかなりある。従って、様々な標的に対して薬理学的活性について候補化合物をスクリーニングする方法は、当該技術分野において長い間痛切に要望され続けてきた。

【０００７】

発明の要約

標的の生物学的活性をモジュレートする能力について候補化合物をスクリーニングする方法を開示する。本方法は、標的および指示薬を含み、複数の候補化合物を収容できるように適合された基板を得ること；各候補化合物が識別でき、かつ候補化合物サンプル中の候補化合物と該基板中の標的とが相互作用するように該基板と該複数の候補化合物サンプルとを接触させること；該標的と候補化合物との相互作用の際に該指示薬により生成されたシグナルを検出すること；ならびに生成されるシグナル量に基づいて該標的の生物学的活性のモジュレーターとして候補化合物を同定することを、包含する。

【０００８】

代替的な実施形態では、標的の生物学的活性をモジュレートする能力について候補化合物をスクリーニングする方法を開示する。本方法は、標的および指示薬を含み、複数の候補化合物を収容できるように適合された基板を得ること；該基板と複数の液体候補化合物サンプルとを接触させて、該候補化合物サンプルの所定のパターンを基板上に形成させることで、該候補化合物サンプル中の候補化合物を該基板中の該所定のパターン内の標的と相互作用させること；該標的と候補化合物との相互作用の際に該指示薬により該所定のパターン内で生成されるシグナルを検出すること；ならびに対照サンプルと比較した生成シグナルの量に基づいて、該標的の生物学的活性のモジュレーターとして候補化合物を同定することを、包含する。

【０００９】

代替的な実施形態では、本方法は：マトリックス、指示薬、および基板中に懸濁された、標的を発現する複数の細胞を含む、複数の候補化合物を収容できるように適合された基板を得ること；それぞれの候補化合物が識別でき、かつ候補化合物サンプル中の候補化合物が該基板中の該標的と相互作用するように、該基板を該複数の候補化合物サンプルと接触させること；該標的と候補化合物との相互作用の際に該指示薬により生成されるシグナルを検出すること；ならびに対照サンプルと比較した生成シグナルの量に基づいて、該標的の生物学的活性のモジュレーターとして候補化合物を同定することを、包含する。この実施形態では、細胞は哺乳動物細胞を含むことが好ましい。

【００１０】

従って、本発明の目的は、標的の生物学的活性をモジュレートする能力について候補化合物をスクリーニングするための新規アッセイ方法を提供することである。この目的は、その全体または一部が、本発明により達成される。

【００１１】

本発明の目的を上述したが、他の目的は、添付の図面、および以下本明細書に最も良く説明する実験例を合わせて考慮して記載が進むにつれて明らかになる。

【００１２】

発明の詳細な説明

標的の生物学的活性をモジュレートする能力について候補化合物をスクリーニングする方法を開示する。本方法は、標的および指示薬を含み、複数の候補化合物を収容できるよう

に適合された基板を得ること；各候補化合物が識別でき、かつ候補化合物サンプル中の候補化合物と該基板中の標的とが相互作用するように、該基板と該複数の候補化合物サンプルとを接触させること；該標的と候補化合物との相互作用の際に該指示薬により生成されたシグナルを検出すること；ならびに対照サンプルと比較した生成シグナルの量に基づいて、該標的の生物学的活性のモジュレーターとして候補化合物を同定することを、包含する。

【００１３】

１つの代替的な実施形態では、本方法は、標的および指示薬を含み、複数の候補化合物を収容できるように適合された基板を得ること；該基板と複数の液体候補化合物サンプルとを接触させて、該候補化合物サンプルの所定のパターンを基板上に形成することで、該候補化合物サンプル中の候補化合物を該基板中の該所定のパターン内の標的と相互作用させること；該標的と候補化合物との相互作用の際に該指示薬により該所定のパターン内で生成されるシグナルを検出すること；ならびに対照サンプルと比較した生成シグナルの量に基づいて、該標的の生物学的活性のモジュレーターとして候補化合物を同定することを、包含する。

【００１４】

別の代替的な実施形態では、本方法は：マトリックス、指示薬、および基板中に懸濁された、標的を発現する複数の細胞を含む、複数の候補化合物を収容できるように適合された基板を得ること；各候補化合物が識別でき、かつ候補化合物サンプル中の候補化合物が該基板中の該標的と相互作用するように、該基板を該複数の候補化合物サンプルと接触させること；該標的と候補化合物との相互作用の際に該指示薬により生成されるシグナルを検出すること；ならびに対照サンプルと比較した生成シグナルの量に基づいて、該標的の生物学的活性のモジュレーターとして候補化合物を同定することを、包含する。

【００１５】

長年にわたる特許法の慣例に従い、請求の範囲を含む本出願において使用される単数表現の用語は「１または複数」を意味する。

【００１６】

Ｉ．概論

リポーター遺伝子構築物は、典型的に、測定し易い酵素活性または他のタンパク質（リポーター遺伝子）の発現を制御する誘導可能なプロモーターエレメントを含むプラスミドを含む。リポーター遺伝子自体は、典型的に、存在する他のタンパク質とは区別可能なようにユニークな活性または構造を有している。リポーター遺伝子産物またはリポーター遺伝子のメッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）の活性は、プロモーター配列の転写活性の間接的な測定を提供できる。誘導可能プロモーターエレメントは、プロモーターに結合して活性化させる転写因子自体が受容体仲介型シグナル形質導入の影響により活性化されるまでは、転写に関して不活性であるか、または活性が弱い。活性化プロモーターは、リポーター遺伝子の転写を駆動し、これはその後、ｍＲＮＡ、蛍光もしくは他の特性（最も多くの場合、タンパク質生成物の酵素活性）によりタンパク質産物自体、またはほとんどの場合はタンパク質産物の酵素活性をアッセイすることにより定量される。リポーター遺伝子の例としては、ホタルルシフェラーゼ、レニラ（Ｒｅｎｉｌｌａ）ルシフェラーゼＳＥＡＰ、βガラクトシダーゼ、エクオリンおよび緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）が挙げられるがこれらに限定されない。リポーター遺伝子系および薬理学におけるそれらの使用のレビューに関しては、Ｋｅｎａｋｉｎ，Ｔ．，Ａｎｇｕｓ，Ｊ．Ａ．（編），Ｔｈｅ Ｐｈａｒｍａｃｏｌｏｇｙ ｏｆ Ｆｕｎｃｔｉｏｎａｌ，Ｂｉｏｃｈｅｍｉｃａｌ，ａｎｄ Ｒｅｃｏｍｂｉｎａｎｔ Ｒｅｃｅｐｔｏｒ Ｓｙｓｔｅｍｓ，Ｈａｎｄｂｏｏｋ ｏｆ Ｅｘｐｅｒｉｍｅｎｔａｌ Ｐｈａｒｍａｃｏｌｏｇｙ，Ｓｐｒｉｎｇｅｒ－Ｖｅｒｌａｇ，Ｈｅｉｄｅｌｂｅｒｇ，Ｖｏｌ．１４８：３９１－４１２に掲載のＩｇｎａｒおよびＲｅｅｓ，（２０００）を参照のこと。

【００１７】

リポーター遺伝子アッセイは、ハイスループットスクリーニング（ＨＴＳ）作戦（ｃａｍ

ｐａｉｇｎ）における目的の標的に対するリガンドを同定するため、および化合物の二次薬理学的プロファイリングのために使用される。標的タンパク質としては、Ｇタンパク質共役型受容体（ＧＰＣＲ）、核受容体、キナーゼ、プロテアーゼ、イオンチャンネル、１回膜貫通型タンパク質、およびシグナル形質導入経路をモジュレートする他の任意のタンパク質が挙げられるがこれらに限定されない。標的タンパク質により調節される本質的にどのようなシグナリング事象も、リポーター遺伝子系を用いて評価できる。例えば、リポーター遺伝子は、$G\alpha_s$、$G\alpha_q$または$G\alpha_i$に共役するＧＰＣＲの薬理学を評価するために使用されてきた（Ｓｔｒａｔｏｗａら，（１９９５ａ）Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．６：５７４－５８１；Ｋｅｎａｋｉｎ，Ｔ．，Ａｎｇｕｓ，Ｊ．Ａ．（編），Ｔｈｅ Ｐｈａｒｍａｃｏｌｏｇｙ ｏｆ Ｆｕｎｃｔｉｏｎａｌ，Ｂｉｏｃｈｅｍｉｃａｌ，ａｎｄ Ｒｅｃｏｍｂｉｎａｎｔ Ｒｅｃｅｐｔｏｒ Ｓｙｓｔｅｍｓ，Ｈａｎｄｂｏｏｋ ｏｆ Ｅｘｐｅｒｉｍｅｎｔａｌ Ｐｈａｒｍａｃｏｌｏｇｙ，Ｓｐｒｉｎｇｅｒ－Ｖｅｒｌａｇ，Ｈｅｉｄｅｌｂｅｒｇ，Ｖｏｌ．１４８：３９１－４１２に掲載のＩｇｎａｒおよびＲｅｅｓ，（２０００））。$G\alpha_s$連結受容体による細胞内環状ＡＭＰ（ｃＡＭＰ）のモジュレーションは、ｃＡＭＰ応答エレメント（ＣＲＥ）を用いて評価できる（Ｈｉｍｍｌｅｒら，（１９９３）Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．６：５７３－５８１）。プロテインキナーゼＣ依存型シグナリング事象の$G\alpha_q$連結受容体仲介型調節は、ホルボール１２－ミリステート１３－アセテート（ＴＰＡ）応答エレメントを用いて測定できる（Ｗｅｙｅｒら，（１９９３）Ｒｅｃｅｐｔｏｒｓ Ｃｈａｎｎｅｌｓ １：１９３－２００；Ｓｔｒａｔｏｗａら（１９９５ｂ）Ｊ．Ｒｅｃｅｐｔ．Ｓｉｇｎａｌ Ｔｒａｎｓｄｕｃｔ．Ｒｅｓ．１５：６１７－６３０）。マイトジェン活性化プロテインキナーゼ調節の$G\alpha_q$または$G\alpha_1$連結受容体モジュレーションは、Ｇａｌ４／ｅｌｋ－１またはＧａｌ４／ｓａｐ１ａリポーター系を用いて評価できる。Ｂｅｖａｎら（１９９８）Ｎｅｕｒｏｒｅｐｏｒｔ ９：２７０３－２７０８。

【００１８】

一実施形態では、本発明は、初めて、マトリックス、ならびに標的およびリポーター遺伝子を発現する複数の細胞を含む基板を提供する方法を開示する。複数の細胞を基板に懸濁し、該基板を複数の候補化合物を受けるように適合させる。基板を、各候補化合物を識別できるように、複数の候補化合物サンプルと接触させる。候補化合物サンプル中の候補化合物は、基板中の標的と相互作用し、標的と候補化合物との相互作用の際に、リポーター遺伝子により生成されるシグナルを検出する。候補化合物は、生成されたシグナルの量に基づき標的の生物学的活性のモジュレーターとして同定される。シグナルの量は、対照サンプルと比較されることが好ましい。

【００１９】

ＩＩ．アッセイ方法

好適な実施形態では、本発明のアッセイ法は、標的のモジュレーションにおける活性についての多数の候補化合物の高速スクリーニングに対する「ウェル無し（ｗｅｌｌ－ｌｅｓｓ）」アプローチに関する。「ウェル無し」という用語は、スクリーニングされる候補化合物を受けるための、標的もしくは指示薬またはその両方を含む基板の作成および使用を指すことを意図する。本明細書に開示するように、基板は、大きさ、形状および組成が多様であり得る。好ましくはＰＩＮツールシステムなどの自動化システムを使用することにより、基板上に所定のパターンを構築できる。ＰＩＮツールの使用は、所定のパターンを構築し易くし、そして所定のパターンは、候補化合物と標的との相互作用に対する応答を検出し易くする。

【００２０】

「候補化合物」という用語は、標的の生物学的活性をモジュレートする化合物の能力の特徴決定が望ましい任意の化合物を指すことを意図する。「モジュレート」とは、標的の任意または全ての生物学的活性または性質の増加、減少、または他の変化を意味することを意図する。

【００２１】
代表的な候補化合物としては、薬剤および他の治療剤、発癌性物質および環境汚染物質、天然産物、ペプチドおよび抽出物などの生体異物、ならびにステロイド、脂肪酸およびプロスタグランジンなどの生体内物質が挙げられる。本発明のアッセイ法により調査され得る候補化合物の他の例としては、細胞膜受容体および核受容体のためのアゴニストおよびアンタゴニスト、毒素および毒、ウイルスエピトープ、ホルモン（例えば、オピオイドペプチド、ステロイドなど）、ホルモン受容体、ペプチド、酵素、酵素基質、補因子、レクチン、糖、オリゴヌクレオチドまたは核酸、オリゴ糖、タンパク質、ならびにモノクローナル抗体が挙げられるがこれらに限定されない。

【００２２】
液体候補化合物サンプルを、本発明のアッセイ法への使用に好ましい。注目に値すべきなのは、本アッセイ方法での使用には、標準的ウェル利用型技術と比較して、各候補化合物の液体が小容量のみ必要なことである。例えば、ウェル利用型システムにおいて典型的に必要とされる１０マイクロリットル（μＬ）サンプルに対して、本発明によれば１０ナノリットル（ｎＬ）サンプルで使用できる。さらに、より多数の候補化合物が、液体形態で現在入手可能である。従って、ウェル形式スクリーニングに基づくものなど従来技術のシステムと比べて、本発明のアッセイ法を用いてより多くの化合物をスクリーニングできる。

【００２３】
別の実施形態では、候補化合物に結合したビーズと基板および細胞とを混合することで、候補化合物を基板上に堆積させる。また、ビーズ形式を使用してペプチドと受容体との相互作用もスクリーニングできるように、ペプチドライブラリーを構築することも可能である。

【００２４】
候補化合物は、従来の手法でビーズにコード（ｃｏｄｅ）する。アッセイを開始するために、ビーズを光源（好ましくは紫外線（ＵＶ）光源）に露光させ、ビーズから化合物を光切断（ｐｈｏｔｏｃｌｅａｖｅ）して、基板中に化合物を拡散させることが好ましい。ビーズを、溶融基質（例えばアガロース）に入った細胞との混合物として、空のトレイに装填し、ビーズが単一の位置に維持されるようにすることが好ましい。従って、ビーズに関連するシグナルが検出された場合にビーズを選定して化合物をデコードできる。ビーズ／mm^2 アプローチでビーズを基板上に装填する。従って、典型的に、単一の１，５３６フォーマットトレイに約１００，０００ビーズを含むことが可能である。

【００２５】
本発明のアッセイ法により提供される基板は、その上またはその中に候補化合物を堆積できるマトリックスコンポーネントを含む。マトリックスコンポーネントは、任意の適切な物質を含み得る。好適な実施形態では、アガロースを基板中のマトリックスコンポーネントとして採用する。任意に、ＧｉｂｃｏＢＲＬ（Ｇａｉｔｈｅｒｓｂｕｒｇ，Ｍａｒｙｌａｎｄ）から入手可能な低融点アガロースを使用して基板を作成する。低融点アガロースは、室温にて凝固し、生存に有害な影響を与えることなく細胞をアガロース中に混合できる。また、低融点アガロースは、乾燥を容易にするために本発明の一部の実施形態に採用される。

【００２６】
本発明の開示を検討した当業者には明らかであろうが、アガロースが基板の好ましいマトリックスコンポーネントである一方、他の適切なマトリックスコンポーネントも、天然、合成またはそれらの組合せなどが、基板を作成するために使用できる。例えば、他の生物学的マトリックス物質（コラーゲン、ラミニン、およびＣｏｌｌａｂｏｒａｔｉｖｅ Ｂｉｏｍｅｄｉｃａｌ Ｐｒｏｄｕｃｔｓ，Ｉｎｃ．（Ｂｅｄｆｏｒｄ，Ｍａｓｓａｃｈｕｓｅｔｔｓ）からＭＡＴＲＩＧＥＬの登録商標の下で販売されている基底膜に由来する生物学的細胞培養基質が挙げられるがこれらに限定されない）を使用して、基板を作成できる。合成ポリマー基板物質も基板を作成するために使用できる。

【００２７】
好適な実施形態では、基板の作製に関連する変数を綿密にモニターした。例えば、基板を作製および維持する際に、大きさ、凝固時間、乾燥時間および湿度をモニターした。代表的なモニターステップは、以下に示す実施例に開示する。また、基板は、標準的な大きさまたはカスタムオープンフォーマット（ｃｕｓｔｏｍ ｏｐｅｎ ｆｏｒｍａｔ）のアッセイトレイなどの固相支持体上または固相支持体中（例えば、標準的１，５３６ウェルアッセイトレイの蓋の上または内部）に形成または作製されて、基板の表面積が所望の１，５３６サンプルを収容する所定のパターンを許容するのに十分であることが好ましい。カスタム化トレイまたは他の支持体も使用でき、トレイのフットプリント（ｆｏｏｔｐｒｉｎｔ）は１，５３６のサンプルを収容するのに十分な大きさであることが好ましい。カスタム化トレイのフットプリントの好ましい外部寸法は、３．３６５センチメートル（ｃｍ）×５．０２５ ｃｍである。カスタム化トレイの培養面積は９４ｃｍ^{2}である。カスタム化トレイは、Ｎａｌｇｅ Ｎｕｎｃ Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ（Ｒｏｃｈｅｓｔｅｒ，Ｎｅｗ ＹｏｒｋおよびＮａｐｅｒｖｉｌｌｅ，Ｉｌｌｉｎｏｉｓ）からＯＭＮＩ ＰＬＡＴＥの登録商標下で購入できる。固相支持体（例えば、ＯＭＮＩ ＰＬＡＴＥ（登録商標）トレイ）を着色して、シグナルを検出し易くすることが好ましい。固相支持体の色は白色であることがより好ましい。

【００２８】
代替的な実施形態では、候補化合物および対照を含む９，６００の液体スポットを、本明細書に記載する自動化システムを用いて基板上で所定のパターンに構築する。従って、本発明の方法の態様は、候補化合物をソースプレートもしくはレザーバーから移すのに使用可能なピンの数の任意の所望の乗数、またはソースプレートもしくはレザーバーから移すのに使用可能な候補化合物の数の任意の所望の乗数を、基板上の所定のパターン内に収容するのに十分な大きさの基板を提供することである。乗数は、例えば、１～２５（好ましくは２、４、８、１６、２０および２５を含む）にわたることができ、例えば、４×９６＝３８４、４×３８４＝１，５３６；４×１，５３６＝６，１４４；および２５×３８４＝９，６００である。

【００２９】
好適な実施形態では、基板は、長方形または正方形を含む。しかし、本明細書に示す開示のレビュー後の当業者には明らかであろうが、特定のアッセイに適した任意の基板の形状も使用できる。従って、例えば、基板は、三角形、円形、台形、楕円形、または任意の他の適切な幾何学的形状から構成され得る。円形または丸い基板の場合、ペトリ皿を使用して基板を形成できる。

【００３０】
基板中で細胞を採用する本発明の一実施形態では、細胞をアッセイプレートの蓋または他の支持体に流し込む。任意に、蓋または支持体を、Ｃｏｌｌａｂｏｒａｔｉｖｅ Ｂｉｏｍｅｄｉｃａｌ Ｐｒｏｄｕｃｔｓ，Ｉｎｃ．（Ｂｅｄｆｏｒｄ，Ｍａｓｓａｃｈｕｓｅｔｔｓ）からＣＥＬＬ－ＴＡＫの登録商標の下で販売されているものなど、付着力を改善する組成物で処理してもよい。細胞は、蓋または支持体の表面全体を完全に覆って、蓋上に細胞の平板または層を形成することが好ましい。細胞平板を平らな表面上に置き、好ましくは細胞が表面に付着した後に、上記開示したアガロースなどのマトリックスコンポーネントを細胞平板の上に流し込む。マトリックスが凝固および乾燥するのに十分な時間、基板を静置して、候補化合物を装填できるようにする。一実施形態では、基板を４５分間静置する。従って、マトリックスコンポーネントは細胞平板上に層を形成し、本発明の一実施形態によれば、基板は細胞層およびマトリックス層の２層を含む。しかし、代替的な実施形態では、細胞はマトリックスコンポーネント中に混合でき、この場合、基板は細胞とマトリックスとの単層を含む。

【００３１】
別の実施形態では、細胞はマトリックスコンポーネント中に混合でき、この場合、基板は細胞とマトリックスとの単層を含む。マトリックスに入った細胞の懸濁液の場合、懸濁液

を支持体（Ｎａｌｇｅ Ｎｕｎｃ Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ からＯＭＮＩ ＰＬＡＴＥの登録商標の下で販売されているトレイなど）上に流し込むことができる。支持体またはトレイは、シグナルを検出する能力を向上させるために白色プラスチックで構成されることが好ましい。

【００３２】

細胞を基板全体に懸濁させる本発明の実施形態では、アガロースが３７℃で固形のままであることが好ましい。基板において、０．７５％～１．５％（１．０％および１．２５％を含む）のアガロース濃度範囲が採用されることが好ましい。例えば、細胞を培地に希釈して、その後所望の最終濃度の２×濃度のマトリックス培地を培地中の細胞と混合できる。従って、１０ミリリットルサンプルの懸濁細胞を得る場合、１０ミリリットル（ｍＬ）の２％アガロースを細胞に添加し、細胞を含む２０ミリリットルの１％アガロースが作製される。アガロースの容量は、５ ｍＬ～５０ ｍＬの範囲であることが好ましく、約５ｍＬ～約２０ ｍＬの範囲であることがより好ましい。より好ましい容量は、１０ ｍＬ、１５ ｍＬまたは２０ ｍＬであり、１２ ｍＬが最も好ましい容量である。細胞は、１ ｍＬのマトリックス（例えばアガロース）につき約０．５～約10×10^{6}の合計数で存在し得る。細胞は、１ ｍＬのマトリックス（例えばアガロース）につき約１．５～約3.5×10^{6}の数で存在することが好ましい。シグナルおよび細胞培養の労力の点から、１ ｍＬのマトリックス（例えばアガロース）につき約2.5×10^{6}の細胞、すなわち１０ ｍＬのマトリックスにつき25×10^{6}の細胞がより好ましい。

【００３３】

基板は標的も含む。「標的」という用語は、生物学的活性を有する任意の化学的または生物学的な物体であって、その生物学的活性をモジュレートする薬剤の同定が望ましいものを指すことを意図する。複数の標的が基板に含まれ得る。標的は、天然のものでも人工的な分子でもよい。また、それらは、未改変状態でも、または他の種との集塊としても採用され得る。標的は、結合メンバーに、直接または特異的な結合物質を介して共有的または非共有的に結合できる。本発明の細胞利用実施形態では、標的は細胞により発現され得、細胞はトランスフェクトされて標的を発現することが好ましい。実際、細胞は、複数の標的でトランスフェクトでき、一回の労力で１、２、３、４以上の標的をスクリーニングすることは、本発明の１つの態様である。さらに、異なる標的を発現する異なる細胞が、本発明により採用できる。本発明のアッセイ方法においてスクリーニングされ得る標的の例としては、抗体、細胞膜受容体、核受容体、特異的な抗原決定基（ウイルス、細胞または他の物質など）に反応するモノクローナル抗体および抗血清、薬剤、オリゴヌクレオチドまたは核酸、ペプチド、補因子、レクチン、糖、多糖類、細胞、細胞膜、および細胞小器官が挙げられるがこれらに限定されない。

【００３４】

基板は、候補化合物による標的の生物学的活性のモジュレーションを識別する指示薬をさらに含む。「指示薬」という用語は、明暗（ｄａｒｋ ｖｅｒｓｕｓ ｌｉｇｈｔ）検出、蛍光または化学発光分光測定法、シンチレーション分光法、クロマトグラフィー、液体クロマトグラフィー／質量分析法（ＬＣ／ＭＳ）、比色分析法などの標準的検出技術を使用して検出し易い化学分子種または化合物を指すことを意図する。従って、代表的な指示薬化合物としては、発光性または蛍光性化合物、化学発光性化合物、発色性化合物、ＵＶ／ＶＩＳ吸収化合物、放射性核種、およびそれらの組み合わせが挙げられるがこれらに限定されない。基板内に供給される細胞が（例えば、リポーター遺伝子を介して）指示薬を発現してもよいし、または指示薬を基板内に供給もしくは添加してもよい。代表的なリポーター遺伝子系としては、ルシフェラーゼ－ＣＲＥ系；ＮＦＡＴ－ルシフェラーゼ系；および／またはＧＡＬ４－ＥＬＫ１ルシフェラーゼ系が挙げられる。

【００３５】

場合によっては、指示薬は、リポーター遺伝子の発現、およびリポーター遺伝子産物とマトリックス中のシグナル展開剤（例えば、Ｐｒｏｍｅｇａ Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ（Ｍａｄｉｓｏｎ，Ｗｉｓｃｏｎｓｉｎ）から入手可能なＳＴＥＡＤＹ－ＧＬＯ（登録商標

）試薬、または以下の実験例に記載するＬＵＣＩＬＩＴＥ ＰＬＵＳ^{TM}試薬）との反応により作成される。この場合、本方法は、基板を所定温度にて所定時間インキュベートするステップと；インキュベートステップ後に基板をシグナル展開剤と接触させるステップとを含んで、リポーター遺伝子の発現およびリポーター遺伝子産物とシグナル展開剤との反応により指示薬を生成する。代表的な「所定時間」および「所定温度」は、以下に示す実施例に開示する。概要的に言うと、代表的な所定時間は、基板中に存在してシグナル展開剤と反応するために十分な濃度のリポーター遺伝子産物を存在させるためのリポーター遺伝子の発現に十分な時間量である。一般的に、所定時間は、好ましくは２時間～６時間、より好ましくは約４～約６時間にわたる。好ましい所定温度は、基板中の細胞がよく成長し、細胞プロセスが通常どおりに実施される温度を含み得る（例えば、哺乳動物細胞を含むほとんどの細胞については３７℃）。好ましい所定環境としては、加湿環境中９５％酸素（O_2）および５％二酸化炭素（CO_2）が挙げられる。任意に、リポーター遺伝子産物とシグナル展開剤との相互作用を可能かつ／または容易にする必要性に応じて、細胞を溶解する。

【００３６】

本発明の細胞利用型アッセイにおいては、任意の適切な細胞が使用できる。代表的な細胞としては、チャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）細胞およびヒト胎児腎臓（ＨＥＫ）２９３細胞などの哺乳動物細胞；アルリカツメガエル（Ｘｅｎｏｐｕｓ ｌａｅｖｉｓ）由来のメラニン細胞などの他の脊椎動物細胞；昆虫細胞；植物細胞；細菌細胞；酵母細胞；真菌類細胞が挙げられるがこれらに限定されない。上記細胞のいずれの組合せも、本発明の細胞利用型アッセイに使用でき、哺乳動物細胞の組合せが挙げられるがこれに限定されない。任意に、異なる細胞の組み合わせを採用する場合、本発明に従って異なる細胞は異なる標的を発現できる。細胞系は互いと混合することができ、用量応答曲線は単独でプレート化された単一の細胞系に類似することが見とめられた。

【００３７】

ビーズにコンジュゲートした候補化合物を採用する本発明方法の一実施形態では、メラニン細胞よりもＣＨＯ細胞が好ましい。なぜならＣＨＯ細胞は、化合物をビーズから切断するのに典型的に使用されるＵＶ光に対する感受性がメラニン細胞よりも低いと考えられているからである。従って、より多くのＵＶ光を適用して、より効率的な切断が得られる。実験例で議論するように、ＵＶ露光は、約１６分間の露光まではシグナルに影響を与えないと思われる。最大シグナルは、アゴニスト添加から約４時間後（すなわち、これが好ましい「所定時間」である）に得られる。ＶＩＥＷＬＵＸ（登録商標）カメラシステムにおいて１８時間にわたり読み取られたシグナルは、少なくとも３時間は完全に安定したままであり、その後時間をかけて減少する。

【００３８】

本発明の本実施形態について続けると、トランスフェクトされたＣＨＯ細胞を培地に希釈し、その後所望の最終濃度の２×濃度のマトリックス培地を培地中の細胞と混合する。例えば、懸濁細胞の１０ミリリットルサンプルを用意した場合、１０ミリリットルの２％アガロースを細胞に添加する。つまり、細胞を含む２０ミリリットルの１％アガロースを作製する。その後、この懸濁液を、Ｎａｌｇｅ Ｎｕｎｃ Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ Ｉｎｃ．から販売されているＯＭＮＩ ＰＬＡＴＥ（登録商標）トレイなどの支持体上に流し込んだ。シグナルを検出する能力を向上させるために、ＯＭＮＩ ＰＬＡＴＥ（登録商標）トレイは白色プラスチックで構成されることが好ましい。

【００３９】

アガロースをマトリックス培地として使用する場合、アガロースは３７℃において固体のままであることが好ましい。アガロースが冷却して固化した後、目的の受容体のモジュレーター化合物についてのアッセイを以下により開始する：

１）９６もしくは３８４ウェルネイルツールを用いて化合物を添加する；または

２）ビーズに光連結（ｐｈｏｔｏｌｉｎｋ）した化合物を、トレイ（細胞と混合された溶融基板中）に添加し、平板をＵＶ光に露光させて化合物をビーズから切断する。

【００４０】
化合物の添加によりアッセイを開始した後、細胞をアガロース中で所定時間（好ましくは約４～６時間）インキュベートすることが好ましい。所定時間（同じく好ましくは約４～６時間）後、Ｐａｃｋａｒｄ（Ｍｅｒｉｄｉａｎ，　Ｃｏｎｎｅｃｔｉｃｕｔ）から入手可能なＬＵＣＬＩＴＥ　ＰＬＵＳ™試薬（ルシフェラーゼ活性の検出のためにルシフェリンを含有する安定化発光系）を、平板の上に流し込み、アガロース中で細胞を溶解させ、アガロースにルシフェリン基質を浸透させる。従って、リポーター遺伝子の発現、およびリポーター遺伝子産物とマトリックス中のシグナル展開剤（例えば、ＬＵＣＩＬＩＴＥ　ＰＬＵＳ™試薬）との反応により、指示薬を生成する。シグナルは、基板溶液の添加後少なくとも１８時間安定したままであることが認められた。シグナルは、Ｗａｌｌａｃ　Ｏｙ　Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ（Ｔｕｒｋｕ，　Ｆｉｎｌａｎｄ）から入手可能なＶＩＥＷＬＵＸ（登録商標）カメラシステム、または約－２０℃をちょうど上回る温度まで冷却されたまたは冷却可能な任意のＣＣＤカメラを用いて検出する。

【００４１】
従って、シグナルは、基板の画像を獲得することにより検出できる。任意に、基板の画像は、基板からのシグナルをテレセントリックレンズを介してＣＣＤカメラチップ上に焦点を合わせることによっても獲得できる。シグナルの検出は、画像の数値化、画像に複数のグリッド単位を含むグリッドを重ねあわせ、およびシグナルの周囲の所定数のグリッド単位をそれぞれ走査して、所定数のグリッド単位内の各グリッド単位のグレイ強度値を平均化して平均グレイ強度値を決定することをさらに含み得る。グリッド単位に関して使用する「所定の数」という用語は、妥当な信頼性をもって平均グレイ強度値が決定できるグリッド単位（例えば、グリッド内の個々の箱または長方形）の任意の適切な数を指す。平均グレイ強度値は、所与のシグナルのｚ値を表す。任意に、方法は、基板上のシグナルのｘおよびｙ座標を記録することをさらに含むことができる。発光または他の光利用シグナルを画像化するのに適したソフトウェアパッケージが利用可能であり、ＲＯＢＯＩＭＡＧＥ™ソフトウェアパッケージ（Ｇｌａｘｏ　ＳｍｉｔｈＫｌｉｎｅ，　Ｉｎｃ．，　Ｒｅｓｅａｒｃｈ　Ｔｒｉａｎｇｌｅ　Ｐａｒｋ，　Ｎｏｒｔｈ　Ｃａｒｏｌｉｎａ，　ＵＳＡ）、ＦＯＶＩＡ　ＰＲＯ™アドインを含むＡＤＯＢＥ（登録商標）ＰＨＯＴＯＳＨＯＰ（登録商標）パッケージ（Ａｄｏｂｅ　Ｓｙｓｔｅｍｓ　Ｉｎｃｏｒｐｏｒａｔｅｄ，　Ｓａｎ　Ｊｏｓｅ，　Ｃａｌｉｆｏｒｎｉａ，　ＵＳＡ）、およびＩＭＡＧＥ　ＰＲＯ（登録商標）ＰＬＵＳパッケージ（Ｍｅｄｉａ　Ｃｙｂｅｒｎｅｔｉｃｓ，　Ｌ．Ｐ．，　Ｓｉｌｖｅｒ　Ｓｐｒｉｎｇ，　Ｍａｒｙｌａｎｄ，　ＵＳＡ）が挙げられる。

【００４２】
バックグラウンドノイズを無くし、シグナルの同定および定量を容易にするために、シグナル特性に他の限定を任意に課してしてもよい。シグナル特性としては、直径、強度、真円度（ｃｉｒｃｕｌａｒｉｔｙ）、凹凸性および体積が挙げられ、これらは以下に記載するように決定される。また、シグナルの体積および直径を増加または減少させて、グリッド中で利用可能な長方形の数と、個別のシグナルの数との対応付けを容易にしてもよい。例えば、ノイズ等を最小限にするために最小体積および直径を設定できる。オペレータはまた、トレイの可視的見分の際およびピクセルで直径を定義する際に、他のシグナルをマニュアルで加えることができる。

【００４３】
追加の例として、各シグナルを１ピクセル離れた一連の平行弦（ｐａｒａｌｌｅｌ　ｃｈｏｒｄ）にスライスすることにより体積を決定できる。体積は、各弦の下の面積の合計である。直径は、（４＊面積／π）の平方根として計算できる。強度は、体積を面積で割ったものとして計算できる。真円度は、４π／（直径×直径）として計算できる。凹凸性は、囲まれた小さい凸領域の最大凹み（ｉｎｄｅｎｔｉｏｎ）として定義できる。

【００４４】
細胞を採用した場合、様々な指示薬系も使用できる。例えば、ルシフェラーゼタンパク質をコードするベクターで大腸菌をトランスフェクトできる。この場合、所定のパターンに

おける明暗を比較することにより、生物学的活性モジュレーションを検出する。さらに、ＦＬＩＰＲ（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｄｅｖｉｃｅｓ（Ｓｕｎｎｙｖａｌｅ，Ｃａｌｉｆｏｒｎｉａ）から入手可能な蛍光画像化プレートリーダー）システムを使用して、カルシウム移動を蛍光色素を介して検出できる。カルシウム蛍光系において、細胞により放出されるカルシウムは検出可能な蛍光に変化を与える。色素凝集／分散、細胞増殖（ｏｕｔｇｒｏｗｔｈ）、細胞複製、細胞死、およびそれらの組合せの検出が採用できる点で、細胞自体も指示薬として採用できる。

【００４５】

本発明のアッセイ法の細胞利用実施形態では、細胞を複数の標的でトランスフェクトできる。可能な範囲で、標的間の相互作用が避けられるように標的を選択する。さらに、非トランスフェクト対照細胞がアッセイに含まれて、細胞により発現される内因性分子に実際には関連する見かけ上の正の「ヒット」が排除できるようにする。

【００４６】

従って、一実施形態では、基板中に細胞を懸濁し、ＰＩＮツールアプローチを用いるか、または候補化合物とコンジュゲートしたビーズを細胞および基板と混合して、平板を形成できるトレイまたは他の適切な物に混合物を流し込むかして候補化合物を平板に配置する。細胞は、標的受容体を発現するのに加えて、リポーター遺伝子系も含んで、リポーター遺伝子の転写が候補化合物と標的受容体との相互作用に機能的に（ｏｐｅｒａｂｌｙ）に関連することが好ましい。異なる受容体が関連する異なるリポーター系を使用することも可能である。これは、一回の労力で複数の受容体のスクリーニングを可能にする。好ましい受容体としては、Ｇタンパク質共役型受容体が挙げられ、従って、異なる受容体と異なるリポーター遺伝子とを共役させることにより、異なる受容体との相互作用を同定することが可能である。より好適な実施形態では、一回の労力で全ての７ＴＭ受容体をスクリーニングする。

【００４７】

本発明のビーズ利用実施形態では、アンタゴニスト化合物がスクリーニングされることが好ましい。アンタゴニスト化合物をスクリーニングする際、アンタゴニスト化合物を含むビーズと混合した細胞をプレート化し、平板を固化させる。平板をＵＶ光に露光させて、所望または所定時間（例えば、１５、３０、４５または６０分）後、例えばアゴニストの溶液を平板上に流し込むことにより（ただしこれに限定されない）、受容体アゴニストを平板の表面に添加する。例えば上記記載したｚ値計算を用いて決定できる実質的にシグナルの無い領域は、候補化合物がアンタゴニスト活性を有する場合に認められる。

【００４８】

本発明のアッセイ法は、適切な受容体遺伝子構築物と組み合わせられた、任意の標的（イオンチャンネル、核受容体、キナーゼ、プロテアーゼなど）に対して適用できる。リポーター遺伝子産物の生成を駆動する転写応答エレメントの変動は、異なる種類の標的に応答を与える。上記したように、Ｇｓ、Ｇｉ／ＧｑまたはＧｑ連結ＧＰＣＲにそれぞれ応答するＣＲＥ－ルシフェラーゼ、ＧＡＬ４／Ｅｌｋ－１－ルシフェラーゼ、およびＮＦ－ＡＴルシフェラーゼ系は代表的なリポーター遺伝子系である。

【００４９】

ここで図１を参照すると、アフリカツメガエル（Ｘｅｎｏｐｕｓ ｌａｅｖｉｓ）由来のメラニン細胞は、色素応答特性を維持したまま様々な標的分子（例えば、膜貫通７ＴＭ標的分子（７ＴＭ））でトランスフェクトできる点で好ましい細胞である。アフリカツメガエル（Ｘｅｎｏｐｕｓ）メラニン細胞は、細胞内で顆粒化されたメラニンを転位させることで外部刺激に応答する。例えば、色素分散（ＰＤ）はアデニリルシクラーゼ（ＡＣ）またはホスホリパーゼＣ（ＰＬＣ）の活性化を介して影響され得る一方で、色素凝集（図１に示さず）はアデニリルシクラーゼ（ＡＣ）の阻害により生じる。メラニン細胞は、リガンド（Ｌ）を介したモジュレーションのために外来７ＴＭ受容体（７ＴＭ）と共役できる幅広い範囲のＧα－およびＧ$_{\beta\gamma}$タンパク質（例えば、Ｇ$_{s}$およびＧ$_{q}$（図１に示す）ならびにＧ$_{i}$およびＧ$_{o}$（図１に示さず））を含む。

【００５０】
本発明の一実施形態では、アフリカツメガエル（Ｘｅｎｏｐｕｓ）メラニン細胞をアッセイプレートの蓋上に流し込む。細胞は、蓋の表面全体を好ましくは完全に覆って、蓋上に細胞の平板または層を形成する。その後、メラトニンを細胞平板に添加することにより細胞中の色素を凝集させる。細胞平板を平らな表面上に置き、その後細胞平板上にアガロースを流し込み、プレートを４５分間据える。従って、アガロースは細胞平板上に層を形成し、本発明の一実施形態によれば、基板は、細胞層およびアガロース層の２層を含む。
【００５１】
その後、ＰＩＮツールもしくは他のツールを用いるか、または本明細書に記載するようにビーズを用いて候補化合物をアガロース層に装填し、プレートの画像を時間＝０に撮る。その後、特定の時間（すなわち以下に開示する評価のための所定または予め選択した時間）にわたって予め選択した間隔で画像を再記録する。
【００５２】
本発明のアッセイ法は、色素の変化（すなわち、色素分散または色素凝集）を誘導させることを図って、基板中のメラニン細胞により発現される標的に対する公知のリガンドに基板を浸することをさらに含み得る。実際、メラニン細胞アッセイでは、アンタゴニスト候補化合物およびアゴニスト候補化合物の両方が、スクリーニングする標的に応じて色素分散または色素凝集のいずれかを生じ得る。次いで、画像を記録する。これらのステップは、候補化合物の１つが公知リガンドと標的との相互作用をモジュレート（すなわち阻害または促進、作用または拮抗）するか否かを評価するために採用される。
【００５３】
細胞内色素分布（分散または凝集）の両方の状態とも検出し易いため、リガンド仲介型色素転位をモニターすることにより、７ＴＭ受容体を含む多数の受容体を調査できる。従って、組換えメラニン細胞は、薬剤発見調査のための有力なツールを提供し、本発明のアッセイにおける使用のために好ましい。好適な標的は、メラニン細胞中の同じシグナリング系（メラノソーム分散または凝集）と共役し、従って、組み合わせられた場合には、任意の一方の受容体の活性は、同じまたは異なる化合物による他方の受容体の活性化を妨害しない。
【００５４】
他の細胞系では、メラニン細胞に関して上述した手法と同じように、アンタゴニストをスクリーニングする。例えば、候補化合物を装填した後に、基板を、標的に対するリガンドと接触させてもよい。候補化合物はリガンドの存在下で標的と相互作用し、シグナルが検出される。シグナルは、標的とリガンドとの相互作用を候補化合物でブロックする際に指示薬により生成されるかまたは生成されない。従って、対照サンプルと比較したシグナル量に基づき、標的の生物学的活性のアンタゴニストとしての候補化合物により候補化合物が同定される。例えば、発光指示薬を含む基板における暗い領域は、発光遺伝子産物を発現するリポーター遺伝子が発現されていないことを示し得る。
【００５５】
ここで図４を参照すると、哺乳動物細胞（ＭＣ）においてルシフェラーゼの転写を駆動するＣＲＥ応答エレメントのＧＰＣＲ活性の模式図が示されている。図４に示すように、哺乳動物細胞（ＭＣ）は、形質膜（ＰＭ）、形質膜（ＰＭ）内に結合したＧタンパク質共役型タンパク質受容体（ＧＰＣＲ）、形質膜（ＰＭ）内で結合したアデニリルシクラーゼ（ＡＣ）、ｃＡＭＰ応答エレメント（ＣＲＥＢ）、プロテインキナーゼＡ（ＰＫ－Ａ）、およびベクター構築物（ＶＣ）を含む。ベクター構築物（ＶＣ）は、ＣＲＥモチーフＣＲＥｍ（ＴＧＡＣＧＴＣＡ－配列番号３）、最小プロモーター（ＭＰ）、およびルシフェラーゼリポーター遺伝子（ＬＲＧ）を含む。本発明のアッセイ方法の代表的な実施形態では、候補化合物アゴニスト（ＡＧＴ）は、哺乳動物細胞（ＭＣ）と接触し、形質膜（ＰＭ）結合Ｇタンパク質共役型タンパク質受容体（ＧＰＣＲ）と相互作用し、次にこれがＧタンパク質サブユニット$G\alpha_s$を介してアデニリルシクラーゼ（ＡＣ）を活性化する。アデニリルシクラーゼ（ＡＣ）は、環状ＡＭＰ（ｃＡＭＰ）と相互作用し、次にこれがその調節／

触媒カスケード（ＲＥＧ－ＣＡＴ）を介してプロテインキナーゼＡ（ＰＫ－Ａ）および環状ＡＭＰ応答エレメント（ＣＲＥＢ）と相互作用して、ベクター構築物（ＶＣ）の転写（ＴＳ）を活性化する。つまり、ベクター構築物（ＶＣ）中のルシフェラーゼリポーター遺伝子（ＬＲＧ）の転写（ＴＳ）および翻訳（ＴＬ）により、ルシフェラーゼ（ＬＵＣ）が生成される。本発明の好適な実施形態に関して本明細書に開示する細胞溶解およびシグナル展開剤の投与（図４において集合的にＣＬＡと称する）の後、光シグナル（ＬＳ）を検出する。

【００５６】

続けて図４を参照すると、$G\alpha_i$タンパク質の活性化により、アデニリルシクラーゼ（ＡＣ）の阻害が生じる。従って、本発明によれば、フォルスコリン（ＦＫ）によるアデニリルシクラーゼ（ＡＣ）の刺激の阻害を見ることで$G\alpha_i$共役型受容体のアゴニストについてアッセイできる。本実施形態では、受容体を含む基板を、所望の時間（例えば、３０分間）１つまたは複数の候補化合物とインキュベートし、その後フォルスコリン（ＦＫ）を添加する。

【００５７】

無細胞アッセイ方法も本発明により提供される。「無細胞」という用語は、基板が細胞を含まず、標的、指示薬および候補化合物が基板内の反応培地中に提供されるか、または所定のパターンで基板上に装填されて、標的、候補化合物、指示薬またはその他の提供される試薬の間の相互作用が検出可能になることを意味する。無細胞アッセイの好ましい例としては、酵素結合免疫吸着アッセイ（ＥＬＩＳＡ）が挙げられる。

【００５８】

「所定のパターン」という用語は、本明細書において、候補化合物と標的分子との相互作用により生成されるシグナルを位置決定して、候補化合物が標的を調節する能力を解析し易くする任意のパターンを便宜的に指すために使用される。

【００５９】

好適な実施形態では、所定のパターンは、基板上に長方形パターンの「スポット」または「接触」を含む。長方形パターンは、このようなパターンを構築するために市販されているツール（例えばＰＩＮツール）が使い易いために都合が良く、好ましい。しかし、本明細書に示す開示をレビューした後の当業者には明らかであろうが、特定のアッセイに適したいかなる所定のパターンも使用できる。従って、例えば、所定のパターンは、三角形、円形、台形、正方形、楕円形、または他の適切な幾何学的パターンを含み得る。さらに、以下に記載するように、「スポット」または「接触」のために利用可能な位置の全てを、本発明の所定のパターンにおいて採用する必要はない。候補化合物にコンジュゲートしたビーズも、所定のパターンに装填できる。

【００６０】

所定のパターンは、基板上の候補化合物「接触」または「スポット」を位置決定し易くし、特定の「接触」または「スポット」における候補化合物の同定を達成できる。好ましくは以下に開示する画像化ステップを使用して、所定のパターンを有する基板の画像を記録し、標的および指示薬におけるわずかな変化を検出する。長方形パターンの場合、本明細書に記載する画像化ステップにおいて、長方形グリッドパターンを基板上に重ねることが好ましい。長方形グリッドパターンは、候補化合物および関連する対照サンプルを基板上に堆積させるためのスポット位置に対応しかつそれらを提供し、その後それらの画像化を提供する、１，５３６の長方形をさらに含むことがより好ましい。応答を時間的に検出して、基板におけるサンプルの分散によるあらゆる影響を回避する。

【００６１】

好適な実施形態では、本明細書に記載するように自動化システムを用いて、候補化合物および対照を含む１，５３６の液体スポットを、基板上に所定のパターンで構築する。代替的な実施形態では、本明細書に記載するように自動化システムを用いて、候補化合物および対照を含む９，６００の液体スポットを、基板上に所定のパターンで構築する。従って、本発明の方法の一態様は、候補化合物をソースプレートもしくはレザーバーから移すた

めに利用可能なピンの数の任意の所望の乗数、またはソースプレートもしくはレザーバーから移すために利用可能な候補化合物の数の任意の所望の乗数を所定のパターン内へ収容することである。乗数は、例えば、１～２５（好ましくは２、４、８、１６、２０および２５を含む）の範囲でよく、例えば、４×９６＝３８４、４×３８４＝１，５３６；４×１，５３６＝６，１４４；および２５×３８４＝９，６００である。

【００６２】

別の代替的な実施形態では、１，２８０の候補化合物および３２の標準試料を基板にスポットする。本実施形態では、基板の右端または左端付近の８列を、参照標準として取っておき、参照標準と候補化合物とを比較し易くする。各列は、３２の可能性のあるスポット位置を含む。従って、１，５３６スポットの開始数から、８列（各列は３２スポット位置を含む）を引くと、候補化合物のために１，２８０のスポット位置の収容量が残る。少なくとも１つの空のスポット位置が各参照標準に垂直および平行の両方向で隣接するように参照標準も基板上に装填されて、同じく参照標準と候補化合物とを比較し易くすることが好ましい。従って、本明細書で使用する「所定のパターン」という用語は、候補化合物を装填するためのこのアプローチを含むことも意図する。

【００６３】

マニュアルシステムも採用できる。好ましいマニュアルシステムは、候補化合物および対照を含む３８４のサンプルと共に使用され得る。これらのサンプル数を考慮し、かつ複数の標的を一度にスクリーニングする選択肢を考慮すれば、本アッセイ方法のハイスループット態様が明らかになろう。実際、所望であれば、本発明の方法を用いて１日当たり３００，０００を超える化合物（対照を含む）がスクリーニングできると想定される。

【００６４】

本発明のアッセイは、治療的価値があると同定されたが、リードも（また存在すれば）多くの可能性のあるモジュレーターも同定されることなくに１００，０００を超える分子に対してスクリーニングされた生物学的標的をスクリーニングするためにも好ましい。

【００６５】

ＩＩＩ．アッセイシステム

ここで図２Ａ、２Ｂおよび３を参照すると（これらの図中、同じ参照符号は同じ構成要素を指す）、本発明のアッセイにおいて使用するのに好ましいシステム、および本発明のシステムにおいて採用する好ましい画像化技術に関連するフローチャートを図示している。

【００６６】

特に図２Ａを参照すると、本発明のシステムは参照符号１０で示されている。好適な実施形態では、システム１０は、中央処理装置（ＣＰＵ）１２、目的地プレート１４、プレートホルダ１６、プレート輸送器１８、走査ステージ２０、カメラ２２、アーム２４、ＰＩＮツール２６、ＰＩＮツール格納領域２８、洗浄ステーション３０、ファン３２およびソースプレート３４を備えている。アーム２４は、本明細書に記載する本発明の方法に従って候補化合物を基板上に堆積するために使用される複数のピンを有するＰＩＮツール２６を含む。場合によっては、システム１０は、インキュベーターをさらに備えていてもよく、洗浄ステーション３０はブロットステーション（図２Ａに示さず）をさらに備えていてもよい。

【００６７】

本発明の方法における使用に適したシステム１０の完全バージョンは、Ｂｅｃｋｍａｎ Ｃｏｕｌｔｅｒ，Ｉｎｃ．（Ｆｕｌｌｅｒｔｏｎ，Ｃａｌｉｆｏｒｎｉａ）から市販されており、ＳＡＧＩＡＮ™の商標の下で販売されている。適切なＰＩＮツールシステムは、Ｂｅｃｋｍａｎ Ｃｏｕｌｔｅｒ，Ｉｎｃ．（Ｆｕｌｌｅｒｔｏｎ，Ｃａｌｉｆｏｒｎｉａ）から市販されており、ＢＩＯＭＥＫ ２０００の登録商標の下で販売されている。ＰＩＮツールシステムは、３８４ウェルソースプレートから１，５３６スポット収容目的地プレートへ候補化合物を移すために使用することが好ましい。ＭＵＬＴＩＭＥＫ™ ９６自動化９６チャンネルピペッタ（同じくＢｅｃｋｍａｎ Ｃｏｕｌｔｅｒ，Ｉｎｃ．（Ｆｕｌｌｅｒｔｏｎ，Ｃａｌｉｆｏｒｎｉａ）から入手可能）を、９６ウェルソー

スプレートから３８４スポット収容目的地プレートへ候補化合物を移すために使用できる。

【００６８】

続けて図２Ａを参照すると、ＣＰＵ１２は、ＰＩＮツールシステム１０の全てのコンポーネントに対して適切な制御信号を計算および伝達する。制御プロトコールは、例えば、Ｔｃｌ言語で書き込まれたコンピュータプログラムファイルを使用して構築し、その後、市販されているＰＩＮツールシステムにより採用される制御ソフトウェア（例えば、本明細書で言及するＢＩＯＭＥＫ（登録商標）２０００システムに採用されるＢＩＯＭＥＫ（登録商標）、ＢＩＯＷＯＲＫＳ™およびＢＩＯＳＣＲＩＰＴ™ソフトウェア）により実行する。Ｔｃｌプログラムファイルは、ｘ、ｙおよびｚ座標を、機械語フォーマットでのシステム動作のための他の値と共に含む。従って、以下に記載するように、Ｔｃｌプログラムファイルは、ＣＰＵ１２に入力され、制御ソフトウェアに使用されて、ＣＰＵ１２により実行される命令を生成するための変数を提供する。従って、ＣＰＵ１２により受け取られる入力、構築される値および手順、ならびに制御される動作に対する言及は、ＣＰＵ１２が備える１つまたは複数の制御ソフトウェアプログラムによりおよびそれらを介して実行されるＴｃｌプログラムファイルを指すことが理解される。好適な実施形態では、本発明のアッセイにおいて使用するための２枚のアッセイプレートに堆積される候補化合物の４枚のソースプレートについて制御信号を処理する。

【００６９】

続けて図２Ａを参照すると、アーム２４およびＰＩＮツール２６のｘ、ｙおよびｚ座標での位置を、（ＰＩＮツール２６により分注および吸引される液体の量の包括値（ｉｎｃｌｕｓｉｖｅ　ｖａｌｕｅ）と共に）ＣＰＵ１２に入力する。ソースプレート３４の数を、各ソースプレート３４のｘおよびｙ面における位置と共にＣＰＵ１２に入力する。アーム２４およびＰＩＮツール２６の安全な移動高さ（すなわち、システム１０内の構造のクリアランスを促す高さ）は、ソースプレート３４の上部高さおよびソースプレートから化合物溶液を得るための吸引深さと共に、ＣＰＵ１２により実行されるＴｃｌプログラムファイルにより設定される。標準的な３８４ウェルソースプレート３４のための典型的な吸引深さは、約２６６ミリメートル（ｍｍ）である。

【００７０】

続けて図２Ａを参照すると、基板を支持し、プレートホルダ１６に担持される目的地プレート１４の位置は、目的地プレート１４の上部高さおよび堆積深さと共に、ｘおよびｙ面で設定される。目的地プレート１４は、本明細書に記載するように作成される目的地プレートでも対照プレートでもよい。３８４のピンを受けることができるプレート用の堆積深さは、９６のピンを受けることができるプレートと比べて、異なり得る。さらに、基板の足場としてアッセイプレートの蓋を採用する実施形態については、約２６７ ｍｍの深さを設定する。

【００７１】

続けて図２Ａを参照すると、洗浄ステーション３０のｘおよびｙ面における位置をＣＰＵ１２に入力する。各洗浄ステーション３０の深さは、同じであると想定し、従って洗浄ステーション３０のｚ値もＣＰＵ１２に入力される。ＰＩＮツール２６をアーム２４およびＣＰＵ１２からの制御信号を介して洗浄ステーション３０に移動するように洗浄手順を構築する。洗浄ステーション３０の位置を定義し、個々の洗浄ステーション３０の上部および下部位置ならびに洗浄浸漬の回数と共にＰＩＮツール２６の高さを得ることで、洗浄手順がＣＰＵ１２において構築される。採用する洗浄ステーション３０の数、および洗浄ステーション３０への上下サイクル（すなわち浸漬）の回数もＣＰＵ１２に入力する。ＰＩＮツール２６のピンが洗浄される回数に応じて、洗浄手順はループされる。例えば、３回の洗浄上下サイクルを使用する場合、洗浄手順は３回ループされる。次いで、ＰＩＮツール２６を、ＣＰＵ１２によりファン３２へ移動し、ファン３２のｘおよびｙ座標、ならびにＰＩＮツール２６が沿って移動する安全なｚ座標経路を用いて乾燥させる。

【００７２】

図２Ａを続けて参照すると、ソースプレート３４および目的地プレート１４のｘおよびｙ位置を、目的地プレート１４上に化合物を堆積するための深さと共に識別することで、化合物をソースプレート３４から目的地プレート１４に移すための手順をＣＰＵ１２において構築する。ソースプレート３４および目的地プレート１４の間の移動は、適切な座標を用いてＣＰＵ１２により制御される。特に、ソースプレート３４のｘおよびｙ座標を、ＰＩＮツール２６の安全なｚ座標と共に使用する。さらに、目的地プレート１４のｘおよびｙ座標を、ソースプレート３４から目的地プレート１４へ化合物を分注するのに適したＰＩＮツール２６の深さと共に得る。好適な実施形態では、液体候補化合物サンプルは、目的地プレート１４上の基板の表面に接触するが、ＰＩＮツール２６は基板に接触しない。

【００７３】

ここで図２Ａおよび２Ｂを参照すると、好適な実施形態では、化合物移動プロトコールを、目的地プレート１４の四分区間Ｑ１～Ｑ４に対して繰り返す。四分区間Ｑ１～Ｑ４は、本質的に正方形または長方形であり、実質的に同じ大きさである。アーム２４は、ＣＰＵ１２により制御されて、四分区間Ｑ１において第１のセットのピン接触が生じ；四分区間Ｑ２において第２のセットのピン接触が生じ；四分区間Ｑ３において第３のセットのピン接触が生じ；四分区間Ｑ４において第４のセットのピン接触が生じるようにする。本実施形態では、各セットのピン接触は３８４の別々のピン接触から構成され、つまり１，５３６の接触が四分区間Ｑ１～Ｑ４において得られる。従って、個々のピンの接触により所定のパターンが得られる。アーム２４もＣＰＵ１２により制御され、四分区間Ｑ１～Ｑ４の接触の合間に、ＰＩＮツール２６のピンが洗浄ステーション３０で洗浄され、ファン３２で乾燥され、洗浄後かつ目的地プレート１４のそれぞれの接触の前にＰＩＮツール２６のピンがソースプレート３４と連絡するようにする。化合物移動および洗浄手順は、全ての所望の化合物がソースプレート３４から目的地プレート１４に移動されるまで必要に応じて繰り返される。

【００７４】

図２Ａのみを続けて参照すると、化合物移動および最終洗浄を終了した後、ＰＩＮツール格納領域２８のｘおよびｙ座標をＰＩＮツール２６の安全なｚ座標と共に用いて、ＣＰＵ１２によりＰＩＮツール２６が格納領域２８に戻される。ソースプレート３４、目的地プレート１４、格納位置２８、洗浄ステーション３０、ファン３２のｘ、ｙおよびｚ位置のために設定された変数は、ＣＰＵ１２において設定を外されるため、システム１０をその後の適用において使用できる。

【００７５】

図２Ａを続けて参照すると、化合物移動後に、目的地プレート１４を輸送器１８を介してまたはマニュアルで走査ステージ２０にすぐに移動させる。開口Ｆ２２に対して約６０ｍｍの焦点長さに設定されたか、またはそれ以外に適切に設定されたレンズを有するＣＣＤカメラ２２（例えば、Ｋｏｄａｋ（Ｒｏｃｈｅｓｔｅｒ，　Ｎｅｗ　Ｙｏｒｋ）から入手可能なＭｏｄｅｌ　１４）を用いて、予め選択された間隔（例えば５分）で画像を回収する。同じく使用できる代表的なカメラとして、ＳＤＲ　Ｃｌｉｎｉｃａｌ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ－Ｐｒｉｎｃｅｔｏｎ　Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔｓ（Ｍｉｄｄｌｅ　Ｃｏｖｅ，　Ｎｅｗ　Ｓｏｕｔｈ　Ｗａｌｅｓ，　Ａｕｓｔｒａｌｉａ）のＭＩＣＲＯＭＡＸ^{TM}の商標の下で販売されているデジタルＣＣＤカメラがある。別の代表的なカメラシステムは、Ｗａｌｌａｃ　Ｏｙ　Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ（Ｔｕｒｋｕ，　Ｆｉｎｌａｎｄ）から入手可能なＶＩＥＷＬＵＸ（登録商標）カメラシステムである。

【００７６】

図２Ａを続けて参照すると、複数の獲得（例えば５フレーム）の平均として画像を記録する。画像回収の間、追加セットのプレート１４を走査ステージ２０に加えることができる。テストおよび対照目的地プレート１４は、任意の順番により走査され得るが、走査ステージ２０において交互に走査されることが好ましい。一旦画像を最終セットのテストプレートについて最終（例えば３０分）時点まで記録したら、走査過程を停止し、Ｍｉｃｒｏｓｏｆｔ　Ｗｉｎｄｏｗｓ（登録商標）オペレーティング・システムにおける「全てを閉

じる」機能を用いるなどして全ての画像を閉じる。記録された画像は、以下に記載するようにＣＰＵ１２により処理される。

【００７７】

ここで図３を参照すると、本発明のシステム１０において使用する画像化プロトコールを、概して１１０として参照する。ボックス１１２では時間＝０にてテストおよび対照プレートについて画像を回収し、続いてボックス１１４では予め選択した第１の間隔（例えば５分）でテストおよび対照プレートについて画像を回収する。図３のボックス１１６は、２００／ミリ秒（ｍｓ）を開始点として使用し、１枚のテストプレートおよび１枚の対照プレートを用いて、最大グレイスケール（本明細書において８ビット画像のグレイ強度またはグレイ強度スケールとも称する）の約８０％のｚ値を得ることによる、露光時間の最適化を描く。ｚ値は、０～２５５にわたる８ビット画像のグレイスケールを指す。暗いスポットについて８ビット画像の最大グレイスケールの約８０％のｚ値を設定することで、画像を「ホワイトアウト」となるまで露光させ過ぎることを回避でき、より簡単に検出可能な差が得られる。従って、グレイスケール値が０～２５５にわたる場合、約２００のｚ値が得られるように露光を設定する。光スポットについては、ｚを最小グレイスケールの約２０％上に設定する。

【００７８】

従って、基板の画像を獲得することにより、シグナルを検出できる。任意に、基板の画像は、基板からのシグナルをテレセントリックレンズを介してＣＣＤカメラチップに焦点を合わせることによっても獲得できる。この場合、シグナルの検出は、画像を二値化すること、画像上に複数のグリッド単位を含むグリッドを重ねること、およびシグナルの周囲にある所定数のグリッド単位をそれぞれ走査し、所定数のグリッド単位にある各グリッド単位のグレイ強度値を平均化することにより平均グレイ強度値を決定することをさらに含み得る。グリッド単位に関して使用する「所定数」という用語は、妥当な信頼性をもって平均グレイ強度値を決定できる任意の適切な数のグリッド単位（例えば、グリッド内の個々の箱または長方形）を指す。任意に、本方法は、基板上のシグナルのｘおよびｙ座標を記録することをさらに含むことができる。

【００７９】

図３を続けて参照すると、ボックス１１８は、所定の合計時間（例えば３０分間）にわたり追加の予め選択された間隔（例えば５分）で画像を回収することを提供し、ボックス１２０は、画像を適切な見出し（「未加工画像」など）をつけて保存して経路およびファイル名を構築することで全ての画像を保存することを提供する。ファイル名形式は、以下のように設定できる：Ｍｒｘ＿ｄａｔｅ（月／日／年）Ａ（その日の最初の実験）。ここで、ｘはその日にスクリーニングされる標的の数と等しいか、またはｘは標的の名前に等しい。

【００８０】

図３を続けて参照すると、ボックス１２２では、走査されたテストプレート上のスポットの０分時画像を、３０分時画像から差引いてコントラストを高める。ボックス１２４では、１，５３６の長方形グリッドを加えてピン接触を識別し、ボックス１２６では、オペレータコマンド（好ましくは「スポット検索」コマンド）を可能にすることでピン接触または「スポット」を識別する。ボックス１２８では、スポット特性に対して限定を課して、バックグラウンドノイズを無くし、スポットの同定および定量を容易にする。スポット特性としては、直径、強度、真円度、凹凸性および体積が挙げられ、これらは以下に記載するように決定される。また、スポットの体積および直径も増加または減少させて、グリッド中で利用可能な長方形の数と、スポットの数との対応付けを容易にしてもよい。例えば、ノイズ等を最小限にするために最小体積および直径を設定できる。ボックス１３０は、「スポット検索」コマンドによりいずれかのスポットが抜かされた場合（すなわち、図３においてＹとして示されている「Ｙｅｓ、スポットが抜かされた」）、ボックス１３２において、プレートの可視的見分およびピクセルでの直径を定義して円を加える際に、オペレータはマニュアルでスポットを加えることができる。抜かされたスポットが無い場合（

図３においてＮと称する）、画像化は直接ボックス１３４に進む。
【００８１】
図３を続けて参照すると、ボックス１３４ではテストおよび対照プレートから得た画像を比較し、ボックス１３６では１，５３６の長方形を含むグリッドをプレートの画像の上にかけ、必要に応じて画像を回転させ、グリッドを用いてピン接触を整列させ、グレイスケールを設定してコントラストを改善することで、正の「ヒット」を識別する。プレートを画像化し、グレイスケールを調節し、テストプレート内の標的のモジュレーター化合物についての正のヒットの閾値レベルを設定する。テストプレート上の正のスポットは分析し、テストおよび対照プレートの両方で見とめられたスポットは内因性ヒットと見なされそれ以上分析しない。ボックス１３８では、１，５３６の長方形を含むグリッド中でのヒットの位置を、その位置に堆積された候補化合物と相関させることで、正の「ヒット」を同定する。ボックス１４０では、画像を、適切なファイルに保存するか、または任意に光ディスクもしくはＣＤにアーカイブとして保存する。ボックス１４２では、画像情報を、適切なワードプロセッシング、スプレッドシート、または他のソフトウェアにエクスポートして、編成および提示する。
【００８２】
好適な実施形態では、各スポットを１ピクセル離れた一連の平行弦にスライスすることにより体積を決定できる。体積は、各弦下の面積の合計である。スポットの直径は、（４＊面積／π）の平方根として計算できる。強度は、体積を面積で割ったものとして計算できる。真円度は、４π／（直径×直径）として計算できる。凹凸性は、囲まれた小凸領域の最大凹みとして定義できる。
【００８３】
全ての未使用の画像を、３０分よりも長くメモリ内にある画像と同様に削除する。次いで、カメラ／プレート制御および画像化手順を上述したように作動させる。ＷＩＮＤＯＷＳ（登録商標）オペレーティング・システムで駆動される適切なコマンドを備えることができる（「ファイル」、「開く」および「画像化」など）。「参照」という用語は、メモリから参照画像を選択することを可能にする。
【００８４】
ＩＶ．　実験例
以下の実験例は、本発明の好適なモードを例示するために含まれる。以下の実験例の特定の態様は、本発明を実施する上で上手く作用すると本発明者らが考えるまたは意味する技術および手順に関して記載する。これらの実験例は、本発明者らの標準的な実験実践を用いて例証されている。本開示および当該分野の一般的技術レベルを考慮して、当業者は、以下の実験例が例示だけのものであり、本発明の精神および範囲から逸脱することなく、多数の変化、改変および変更が採用され得ることを理解するであろう。
【００８５】
実験例１～６で使用する材料および方法
標的をコードするベクター
トランスフェクトする各標的について、Ｇｒａｍｉｎｓｋｉ，Ｇ．Ｆ．ら，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．（１９９３）２６８：５９５７－５９６４に記載されるｐＪＧ３．６ベクター（または他の適切なベクター）に入ったｃＤＮＡを得る。いくつかの受容体を同時にトランスフェクトする場合、ストック溶液の最適濃度は通常５～１０ｍｇ／ｍＬの範囲とする。また、化合物セットに対してスクリーニングを開始する前に、化合物セット全体を完了するのに十分な標的コードｃＤＮＡを手元に有することが推奨される（３００Ｋ化合物セットには、受容体に応じて典型的には１０～２０ｍｇとする）。
【００８６】
他の材料および試薬
ＣＦＭ：繊維芽細胞（またはカエル）ならし培地。
【００８７】
０．７×トリプシン／ＥＤＴＡ：Ｇｉｂｃｏ ＢＲＬカタログ番号２５３００－０５４（

１×ストックとして購入）。
【００８８】
０．７×ＰＢＳ（ｐＨ ７．３）：１０×ストック（８０ ｇ／Ｌ ＮａＣｌ、２ ｇ／Ｌ KH_2PO_4、１１．５ ｇ／Ｌ Na_2HPO_4、２．０ ｇ／Ｌ ＫＣｌ）として調製。
【００８９】
０．７×エレクトロポレーション用等級のＰＢＳ（ｐＨ ７．０）：ｐＨがｐＨ ７．０に調節されること以外は、上記ＰＢＳと同様。
【００９０】
０．７×Ｌ１５／０．１％ ＢＳＡ：カタログ番号Ｂ２７９９、Ｓｉｇｍａ／Ａｌｄｒｉｃｈ Ｃｈｅｍｉｃａｌ Ｃｏ．（Ｓｔ． Ｌｏｕｉｓ, Ｍｉｓｓｏｕｒｉ）。
【００９１】
ＤＭＳＯ：カタログ番号Ｄ８７７９、Ｓｉｇｍａ／Ａｌｄｒｉｃｈ Ｃｈｅｍｉｃａｌ Ｃｏ．（Ｓｔ． Ｌｏｕｉｓ, Ｍｉｓｓｏｕｒｉ）。
【００９２】
メラトニン：カタログ番号Ｍ５２５０、Ｓｉｇｍａ／Ａｌｄｒｉｃｈ Ｃｈｅｍｉｃａｌ Ｃｏ．（Ｓｔ． Ｌｏｕｉｓ, Ｍｉｓｓｏｕｒｉ）。
【００９３】
８００ ｍＬエレクトロポレーションキュベット：モデル番号５８０１７－９００、ＶＷＲ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ Ｐｒｏｄｕｃｔｓ（Ｗｅｓｔ Ｃｈｅｓｔｅｒ, Ｐｅｎｎｓｙｌｖａｎｉａ）。
【００９４】
２２５－cm^3 組織培養フラスコ：モデル番号３０００、Ｃｏｓｔａｒ（Ｏｎｅｏｎｔａ, Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ）。
【００９５】
１５ ｍＬおよび５０ ｍＬ円錐形遠心管。
【００９６】
エレクトロポレーター：ＥＬＥＣＴＲＯ ＣＥＬＬ ＭＡＮＩＰＵＬＡＴＯＲ™、モデルＢＴ ６００、ＢＴＸ（Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ, Ｃａｌｉｆｏｒｎｉａ）。
【００９７】
遠心分離機：ＳＯＲＶＡＬＬ ＲＴ６０００Ｄ™、Ｋｅｎｄｒｏ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｏｄｕｃｔｓ（Ｎｅｗｔｏｎ, Ｃｏｎｎｅｃｔｉｃｕｔ）。
【００９８】
ＳＥＡＰＬＡＱＵＥ（登録商標）アガロース：カタログ番号５０１０１、ＦＭＣ Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ（Ｐｈｉｌａｄｅｌｐｈｉａ, Ｐｅｎｎｓｙｌｖａｎｉａ）。
【００９９】
蓋（ＯＭＮＩ ＰＬＡＴＥの登録商標の下で販売されているアッセイプレート用）：参照番号ＳＰＯ－１６１１８１、Ｎａｌｇｅ Ｎｕｎｃ Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ（Ｒｏｃｈｅｓｔｅｒ, Ｎｅｗ ＹｏｒｋおよびＮａｐｅｒｖｉｌｌｅ, Ｉｌｌｉｎｏｉｓ）。
【０１００】
ＢＳＡ（Ｌ１５無し）：カタログ番号Ｌ－５５２０、Ｓｉｇｍａ Ｃｈｅｍｉｃａｌ Ｃｏ．（Ｓｔ． Ｌｏｕｉｓ, Ｍｉｓｓｏｕｒｉ）。
【０１０１】
実施例１
一過性受容体発現のためのメラニン細胞のエレクトロポレーション
トリプシン処理の１～２時間前に、４０ ｍＬの新鮮な繊維芽細胞（またはカエル（ｆｒｏｇ））ならし培地（ＣＦＭ）を、トランスフェクトするメラニン細胞の２２５ cm^3 フラスコに入れる。各フラスコを、５ ｍＬ ０．７×ＰＢＳ（ｐＨ ７．４）で洗浄し、吸引する。５ ｍＬ ０．７×トリプシン／ＥＤＴＡを各フラスコに添加し、３～５分間放置する。フラスコを振って細胞を動かし、１０ ｍＬ ＣＦＭを各フラスコに添加する。
【０１０２】

各フラスコの内容物を５０ ｍＬ円錐形遠心管に移す。９００ ｒｐｍで５分間室温にてスピンさせる。培地を吸引し、ＣＦＭを用いてペレットを１本の５０ ｍＬ円錐形遠心管にプールする。細胞を数えて、所与の濃度を得る。該管を９００ ｒｐｍにて５分間スピンさせる。ＣＦＭを吸引し、４０ ｍＬ ０．７×ＰＢＳ（ｐＨ ７．４）に再懸濁させる。９００ ｒｐｍにて５分間スピンさせる。ＰＢＳを吸引し、ペレットを冷たいエレクトロポレーション勾配０．７×ＰＢＳ（ｐＨ ７．０）に最終濃度１５×１０^{6} 細胞／ｍＬまで再懸濁させる。８００μＬ再懸濁細胞を、ｃＤＮＡの混合物を含む冷たい遠心管に加える。氷上で２０分間インキュベートし、インキュベーションの間にゆるやかに２回混合する。

【０１０３】

ｃＤＮＡ／細胞溶液を、冷たい８００μＬエレクトロポレーションキュベットに移す（泡が入らないように）。５００Ｖ、６２５ ｍＦ、７２０Ωでエレクトロポレートする。パスツールピペットを用いて、エレクトロポレートされた細胞をすぐに３０～４０ ｍＬのＣＦＭに移す。最終濃度を４５ ｍＬ ＣＦＭとして、細胞を２２５ ｃｍ^{3} フラスコに入れる（１つのフラスコにつき２つのキュベット）。細胞を、平らな作業台に約３時間置く。培地を吸引し、新鮮なＣＦＭに置き換える。細胞をインキュベーターに約２４時間置く。

【０１０４】

実施例２

細胞プレートの作成（２日目）

各フラスコを５ ｍＬ ０．７×ＰＢＳ（ｐＨ ７．４）で洗浄し、吸引する。５ ｍＬ ０．７×トリプシン／ＥＤＴＡを各フラスコに添加し、２～３分間放置する。フラスコを振って細胞を動かし、１０ ｍＬ ＣＦＭを各フラスコに添加する。各フラスコの内容物を５０ ｍＬ円錐形遠心管に移す。９００ ｒｐｍで５分間室温にてスピンさせる。培地を吸引し、ＣＦＭを用いてペレットを１本の５０ ｍＬ円錐形遠心管にプールする。細胞を数える。３０，０００細胞／１００μＬ／ウェルで１枚の９６ウェルプレート（品質管理用）を作成するために十分な細胞を採取する。以下に記載するようにスクリーンプレートを作成する。

【０１０５】

残った細胞を、１本の管につき２７ ｍＬ ＣＦＭ中に約１～１０×１０^{6} の細胞が含有されるように５０ ｍＬ円錐形管に分ける。逆さにして管を混合する（ただし、可能であれば泡を作らないようにすること）。１つの管からアッセイプレートの蓋に細胞をゆるやかに流し込む（細胞は蓋の表面全体を完全に覆うことが好ましい）。今しがた装填した蓋の上に次に装填される蓋を置く。

【０１０６】

全ての管が空になるまで上記手順を繰り返す。最後に装填された蓋の上に空の蓋を置く。対照細胞（例えば、ＰＴＨ１－３－３０細胞）を用いて上記ステップを繰り返し、同じ枚数のアッセイプレートの蓋および１枚の９６ウェルプレート（品質管理用）を作成する。蓋およびプレートを平らな作業台に周囲温度（例えば２５℃）にて約２時間放置する。蓋および９６ウェルプレートを気密容器に入れ、インキュベーターに一晩（約１５～２４時間）入れる。

【０１０７】

実施例３

品質管理プレート（３日目）

５ ｎＭメラトニンを含有する５０ ｍＬのメラニン細胞アッセイ緩衝液を調製する。ペプチド（スクリーニングする受容体に対する天然リガンド）を以下のように連続希釈する：各ペプチドの１００μＭストックの２μＬアリコートを、別々の１．５ ｍＬ遠心管に移す。９９８μＬメラニン細胞アッセイ緩衝液／５ ｎＭメラトニンを各管に添加し、渦流させる。それぞれ２０μＬを、９６ウェル丸底プレートの別々のウェルに移す（第１のペプチドを９６ウェルのウェルＡ１に、第２のペプチドをウェルＡ２に．．．）。１８０μ

Ｌメラニン細胞アッセイ緩衝液／５ ｎＭメラトニンを、これら同ウェルに添加する。１３７μＬを、上で２０μＬを移したのと同じだけ９６ウェルプレート上のウェルＢ１～Ｂ８、Ｂ２～Ｂ８．．．に添加する。行Ａを混合する。６３μＬを、行Ａから行Ｂに移して混合する。６３μＬを、行Ｂから行Ｃに移して混合する。この連続希釈をプレート全体にわたり続ける。

【０１０８】

上記希釈を終了した場合の作業用濃度（２×）は以下の通りである：

行Ａ	２０ ｎＭ	行Ｅ	２００ ｐＭ
行Ｂ	６３２ ｎＭ	行Ｆ	６３．２ ｐＭ
行Ｃ	２ ｎＭ	行Ｇ	２０ ｐＭ
行Ｄ	６３２ ｎＭ	行Ｈ	６．３２ ｐＭ

対照９６ウェルプレートからＣＦＭを吸引する。５ ｎＭメラトニンを含有する５０μＬ０．７ Ｌ１５／０．１％ ＢＳＡ緩衝液を添加する。プレートを１～２時間室温にて放置する。ＳＬＴ ＳＰＥＣＴＲＡ（登録商標）プレートリーダー（Ｋｏｌｌｍｏｒｇｅｎ Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ（Ｗａｌｔｈａｍ, Ｍａｓｓａｃｈｕｓｅｔｔｓ）から入手可能）上でプレートを読み取る。連続希釈プレートから５０μＬを各ウェルに添加する。１時間インキュベートする。ＳＬＴ ＳＰＥＣＴＲＡ（登録商標）プレートリーダー上でプレートを読み取る。

【０１０９】

実施例４

化合物を受ける細胞プレートの作成（３日目）

１．２５ ｇのＳＥＡＰＬＡＱＵＥ（登録商標）アガロースを、重い１２５ ｍＬ囲い付き瓶（１２５ ｍＬ ｈｅａｖｙ ｗａｌｌｅｄ ｂｏｔｔｌｅ）に計り分ける。１００ ｍＬのＬ１５（リーボビッツ）培地（ＢＳＡ無し）を添加し、ＬＯＷ設定で約１５～１８分間キャップを外して電子レンジで加熱する。最終溶液は、アガロースの完全な溶解を透明な溶液として示す。これを４２℃に予め加熱した水浴に入れる。２または４ ｍＬのアガロースを５０ ｍＬポリプロピレン管に入れ、それらを４２℃の水浴で保つ。管の数は、作成するプレートの数に等しいはずである。

【０１１０】

１８ ｎＭメラトニンを含有する２００ ｍＬの室温０．７×Ｌ１５／０．１％ ＢＳＡを調製する。上で作成した蓋上の培地を（１つずつ）注意深く流し、過剰量の培地を除去し、蓋を平らな表面に置く。ピペットで、１０ ｍＬの０．７×Ｌ１５／０．１％ ＢＳＡ／１８ ｎＭメラトニンを、２ ｍＬアガロースを含有する５０ ｍＬ管の１つに移すか（好ましい方法）、または８ ｍＬの０．７×Ｌ１５／０．１％ ＢＳＡ／１８ ｎＭメラトニンを、４ ｍＬアガロースを含有する５０ ｍＬ管の１つに移す。ピペットを攪拌棒として使用しながら、０．７×Ｌ１５／０．１％ ＢＳＡ／１８ ｎＭメラトニンを分注する。

【０１１１】

その直後に、１２ ｍＬ混合物をアッセイプレート蓋に、蓋の底全体が確実に覆われるように注意深く流し込む。全ての泡を乾燥した針でつぶす。上記ステップを各プレートについて繰り返す。アッセイプレート蓋を室温にて４５分間放置する。４５分後、アッセイプレート蓋を、化合物添加時まで保存するために、９５％加湿インキュベーター（２４℃）に入れる。これらのプレートは１２時間までは有効であるはずである。

【０１１２】

実施例５

候補化合物ソースプレートの作成

トランスフェクト細胞を含有する作成された蓋のそれぞれについて、液体候補化合物サンプルを含む４枚の３８４ウェルソースプレートを冷凍庫から出す。プレート上に蓋およびシールがあれば取る。プレートを４枚のスタックにして置く（プレートは、例えば実行する順番およびプレート番号の順番など、順番通りに保たれなければならない）。メラニン細胞アッセイ緩衝液に入った十分な１μＭαＭＳＨを調製して、４枚目の薬剤プレート毎

に１０μＬ／ウェルで２列に入れる。これらの列は、テストプレートに対する対照サンプルを提供する。

【０１１３】

１０μＬの上記参照１μＭαＭＳＨ溶液を、各スタックの上にある全ての３８４ウェルプレートの列２２および２４にピペットすることで、プレートをマーキングする。１μＭαＭＳＨを入れられた各プレートの端をＳ（標準）でマーキングする。１０μＬの上記１μＭαＭＳＨ溶液を、各スタックの底にある全ての３８４ウェルプレートの列２１および２３にピペットして、１μＭαＭＳＨを入れられた各プレートの端をＳでマーキングすることによってもプレートをマーキングできる。つまり、４枚のスタック毎に１枚のプレートがαＭＳＨを含んでいるはずである。いかなる時もプレートの順番が確かに変わらないようにする。

【０１１４】

実施例６

化合物移動およびアッセイ

Ｂｅｃｋｍａｎ ＢＩＯＭＥＫ（登録商標）２０００システムを使用し、４枚の異なる３８４ウェルソースプレートからのテスト化合物を、ＢＩＯＭＥＣＫ（登録商標）高密度複製（ＨＤＲ）ＰＩＮツール（Ｂｅｃｋｍａｎ部品番号２６７６１８－３８４ ＨＤＲ）を用いて２枚のメラニン細胞含有基板に移す。ＨＤＲ ＰＩＮツールは、３８４の浮動性ピン（柱（ｐｏｓｔ）またはネイルのいずれか）を含む。柱は、各化合物を約５０～７０ｎＬ移す；ネイルは１０～３０ ｎＬ移す。化合物移動のためのプログラムはツールコマンド言語（Ｔｃｌ）で書き込まれており、これは、Ｂｅｃｋｍａｎ ＢＩＯＭＥＫ（登録商標）システムのアームのｘ、ｙおよびｚ動作のためのｘ、ｙおよびｚ座標を提供する。全てのプレートをプレートホルダの右後ろに配置する。

【０１１５】

洗浄ステーションに５０ ｍＬ ＤＭＳＯ、５０ ｍＬ水および６０ ｍＬエタノールを装填して、ピンを十分に濯いだ。洗浄ステーションは、レザーバーの内部に二倍の厚さのペーパータオルを有するブロッティングステーションも含んでいる。全てのプレートを、プレートホルダの後ろかつ右側に配置する。テストプレートへの移動は順番通りである（図２Ｂも参照）：

１　　３

２　　４

メラニン細胞により発現される７ＴＭ受容体のＧｓ／Ｇｑアゴニストについては、時間経過と共に、ＨＤＲピン接触の直下で、暗いスポットがグレイ細胞平板上で発達した。上述したようにＣＣＤカメラ走査ステージ設定（画像ステーション）を用いて画像を５分間隔で回収した。画像回収および分析は、表１の走査ステージレイアウトに従って実施する。

【０１１６】

【表１】

表１

走査ステージレイアウト

Ａ１テストプレート１	Ａ２対照プレート１	Ａ３テストプレート２
Ｂ１対照プレート２	Ｂ２テストプレート３	Ｂ３対照プレート３
Ｃ１テストプレート４	Ｃ２対照プレート４	Ｃ３テストプレート５
Ｄ１対照プレート５	Ｄ２テストプレート６	Ｄ３対照プレート６

一旦最終セットのテストプレートについて３０分時点まで画像を記録したら、過程を停止し、画像化システムの「全て閉じる」コマンドを用いて全ての画像を閉じる。

【０１１７】

実施例７～１０
哺乳動物平板リポーターアッセイ
チャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）細胞を、６×ＣＲＥ－ルシフェラーゼ$^{+}$リポーター遺伝子でトランスフェクトさせた。安定した宿主細胞系を選択し、その中にクローニングされたヒト受容体を入れてトランスフェクトさせた。これらの受容体を発現する安定した細胞系を、スクリーニング目的のために選択した。
【０１１８】
実施例７～１０で採用する材料
Ｔ－２２５組織培養フラスコ（＃３００１）は、Ｃｏｒｎｉｎｇ Ｃｏｓｔａｒ（Ｃａｍｂｒｉｄｇｅ，Ｍａｓｓａｃｈｓｅｔｔｓ）から得た。ＤＭＥＭ／Ｆ１２（＃３１１０３９－０２１）、ウシ胎仔血清（ＦＢＳ）（＃１６１４０－０７１）、Ｌ－グルタミン（＃２５０３０－０８１）、０．０５％トリプシン（＃２５３００－０５４）、ダルベッコリン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ）（＃４１９０－１４４）、およびＬＭＰアガロース（＃５５１７ＵＢ）は、Ｇｉｂｃｏ ＢＲＬ（Ｇａｉｔｈｅｒｓｂｕｒｇ，Ｍａｒｙｌａｎｄ）から購入した。ＥＸ－ＣＥＬＬ^{TM}３０１培地（＃１４３３１－７９Ｐ）は、ＪＲＨ ＢｉｏＳｃｉｅｎｃｅｓ（Ｌｅｎｅｘａ，Ｋａｎｓａｓ）から得た。ＬＵＣＬＩＴＥ ＰＬＵＳ^{TM}ルシフェラーゼリポーター遺伝子アッセイキット（＃６０１６９６５）は、Ｐａｃｋａｒｄ Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔ Ｃｏｍｐａｎｙ（Ｍｅｒｉｄｅｎ，Ｃｏｎｎｅｃｔｉｃｕｔ）から購入した。チャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ－Ｋ１）細胞は、Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｔｙｐｅ Ｃｕｌｔｕｒｅ Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ（Ｍａｎａｓｓａｓ，Ｖｉｒｇｉｎｉａ）から得た。ヒトＧＬＰ－１（７－３６）（＃６７９５）およびヒトＣＲＦペプチド（１－１４）（＃２４３５）は、Ｂａｃｈｅｍ（Ｋｉｎｇ ｏｆ Ｐｒｕｓｓｉａ，Ｐｅｎｎｓｙｌｖａｎｉａ）から得た。４－Ｌ－ノルロイシン－７－Ｄ－フェニルアラニン－アルファメラニン細胞刺激ホルモン（［ＮＤＰ］－αＭＳＨ、＃８７６４）は、Ｓｉｇｍａ Ｃｈｅｍｉｃａｌ Ｃｏ．（Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ，Ｍｉｓｓｏｕｒｉ）から得た。透明および乳白色のＯＭＮＩ ＰＬＡＴＥ（登録商標）トレイ（上記開示したようにＨＤＲピンツールを収容するためにフットプリントを変えた）は、Ｎａｌｇｅ Ｎｕｎｃ Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ Ｉｎｃ．から購入した。９６の０．０１５インチ直径移動ピン（＃６０９０８９）を有する高密度複製（ＨＤＲ）ツールは、Ｂｅｃｋｍａｎ（Ｆｕｌｌｅｒｔｏｎ，Ｃａｌｉｆｏｒｎｉａ）から購入した。ＡＢ－Ｍ Ｈ－１０００電源ボックスおよびＡＢ－Ｍ露光制御により制御されるＵＶ灯は、ＡＢＭ Ｉｎｃ．（Ｓａｎ Ｊｏｓｅ，Ｃａｌｉｆｏｒｎｉａ）から購入した。ＶＩＥＷＬＵＸ（登録商標）カメラは、Ｗａｌｌａｃ Ｏｙ Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ（Ｔｕｒｋｕ，Ｆｉｎｌａｎｄ）から得た。
【０１１９】
実施例７
複数受容体アッセイ
リポーター遺伝子およびＧタンパク質共役型受容体（ＧＰＣＲ）の両方を発現する細胞系を、アガロース平板フォーマットでのアゴニストに対する応答についてアッセイした。ＧＰＣＲを発現する細胞を単独でプレート化し、異なるＧＰＣＲを発現するいくつかの細胞系を混合して、いくつかの受容体に対するアゴニストが同時にアッセイできるか否かを評価した。
【０１２０】
ルシフェラーゼの発現を駆動する６つの環状ＡＭＰ応答エレメント（ＣＲＥ）（６×ＣＲＥ－ルシフェラーゼ$^{+}$）を含むリポーター構築物を安定して発現するリポーター遺伝子宿主細胞系を、Ｇｏｅｔｚら（２０００）Ｊ．Ｂｉｏｍｏｌｅｃ．Ｓｃｒｅｅｎｉｎｇ ５：３７７－３８４に記載されるように作製した。メラノコルチン－１受容体（ＭＣ１Ｒ）（ＧｅｎＢａｎｋ受託番号Ｘ６５６３４）および副腎皮質刺激ホルモン放出因子受容体（ＣＲＨＲ１）（ＧｅｎＢａｎｋ受託番号Ｘ７２３０４）の完全長ｃＤＮＡを、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応（ＲＴ－ＰＣＲ）により得て、発現ベクターｐＣＤＮＡ３（Ｉｎｖ

ｉｔｒｏｇｅｎ，Ｃａｒｌｓｂａｄ，Ｃａｌｉｆｏｒｎｉａ）にサブクローニングした。ヒトグルカゴン様ペプチド－１（ＧＬＰ－１）受容体（ＧｅｎＢａｎｋ受託番号Ｕ１００３７）の完全長ｃＤＮＡを、Ｄｒ．Ｊｏｓｅｐｈ Ｄｉｌｌｏｎ（Ｔｕｆｔｓ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ）から提供してもらい、ｐＣＤＮＡ３にサブクローニングした。ＭＣ１Ｒ、ＣＲＨＲ１またはＧＬＰ－１受容体を発現する安定したＣＨＯ－６×ＣＲＥ－ｌｕｃ$^{+}$細胞系を、Ｇｏｅｔｚら，（２０００）Ｊ．Ｂｉｏｍｏｌｅｃ．Ｓｃｒｅｅｎｉｎｇ ５：３７７－３８４に記載されるエレクトロポレーションにより作製した。安定発現細胞系を、Ｔ－２２５組織培養フラスコに入った完全培地（５％ＦＢＳおよび２ ｍＭ Ｌ－グルタミンを含有するＤＭＥＭ／Ｆ１２）中で増殖させた。

【０１２１】

アッセイの３日前に、０．０５％トリプシンを用いて細胞を回収し、１～３×１０^{5}細胞／ｍｌの濃度で５％ＦＢＳおよび２ ｍＭ Ｌ－グルタミンを含有するＥＸ－ＣＥＬＬ^{TM}３０１培地中で洗浄および再懸濁した。細胞懸濁液を、スピンフラスコに入れ、組織培養インキュベーターにおいて３７℃、５％CO_2にて懸濁液中で増殖させた。アッセイの１８時間前に、細胞を、遠心分離により懸濁液から取り出し、５×１０^{5}～１．５×１０^{5}細胞／ｍｌの濃度で２ ｍＭ グルタミンを含有する無血清含有ＥＸ－ＣＥＬＬ^{TM} ３０１培地中に再懸濁させた。

【０１２２】

１．５グラムのＬＭＰアガロースを、電子レンジで１００ ｍｌのアッセイ培地（２％グルタミンを含有するＤＭＥＭ／Ｆ１２培地）に溶解した。アガロースは、使用時まで４７℃の水浴に入れた。細胞を懸濁培養液から回収し、６０ ｍｌのアッセイ培地に再懸濁させて、細胞量を決定した。次いで、細胞懸濁液を、２．５×１０^{7}細胞／６ ｍｌの最終濃度までさらに希釈した。６ｍｌの細胞懸濁液および溶融アガロースを、１：１ｖ／ｖで混合し、その直後に混合物を白色ＯＭＮＩ ＰＬＡＴＥ（登録商標）トレイに流し込んだ。平板において３つの細胞系を混合した実験において、各細胞系について濃度は２．５×１０^{7}細胞／２ ｍｌであり、細胞系を合わせた際には合計６ ｍｌの細胞懸濁液を得た。次いで、細胞のアガロース平板を、室温にて凝固させた。

【０１２３】

その後、約１０ナノリットル（ｎｌ）の溶液を送達するＨＤＲ ９６ピンツールを用いて、ペプチド溶液を平板に送達した。ペプチドの添加後、平板を、３７℃、５％ CO_2にて組織培養インキュベーター中で４時間インキュベートする。１０ ｍｌのＬＵＣＬＩＴＥ ＰＬＵＳ^{TM}試薬および１ ｍＭ $CaCl_2$／１ ｍＭ $MgCl_2$含有ＰＢＳの１：１混合物を各ＯＭＮＩ ＰＬＡＴＥ（登録商標）トレイに室温にて抑制的光条件下で添加した。１０分後、アガロース平板の上部にある過剰量の液体を除去した。ＶＩＥＷＬＵＸ（登録商標）カメラを用いて発光を検出した。

【０１２４】

ＯＭＮＩ ＰＬＡＴＥ（登録商標）トレイからの発光を、テレセントリックレンズを介してＣＣＤカメラチップに９０秒間焦点を合わせることで画像を獲得した。二値化画像を、コンピュータにダウンロードして、ＲＯＢＯＩＭＡＧＥ^{TM}画像分析ソフトウェアパッケージを用いて画像分析した。簡単に言うと、５０×７５細胞グリッドを、画像の上に重ねて、平均グレイ強度値グリッド単位をＭｉｃｒｏｓｏｆｔ ＥＸＣＥＬ（登録商標）スプレッドシートに転送した。グレイ強度は、各グリッド単位を走査して、領域における最も高い点がどこに位置するかを決定することにより決定した。周囲の９つのグリッド単位を平均化し、これが所与の発光シグナルのｚ値を表す。ｘおよびｙ座標を記録して、データのグラフ図を作成し易くした。

【０１２５】

［ＮＤＰ］－αＭＳＨ（１－１３）、ＧＬＰ－１（７－３６）およびＣＲＨ（１－４１）に対する、ＭＣ１、ＧＬＰ－１またはＣＲＨ１受容体を発現するＣＨＯ－６×ＣＲＥ－ｌｕｃ$^{+}$細胞の応答を、図５Ａ～７Ｂに示す。図５Ａ、６Ａおよび７Ａは、溶液含有ペプチドが送達された平板の表面の位置から発せられる発光の画像を示す。行１、２および３（

プレートの上から下）はそれぞれ、［ＮＤＰ］－αＭＳＨ、ＧＬＰ－１およびＣＲＨについての濃度曲線を含む。（左から右に）５×１０$^{-4}$ Ｍ、１．５×１０$^{-4}$ Ｍ、５×１０$^{-5}$ Ｍ、１．５×１０$^{-5}$ Ｍ、５×１０$^{-6}$ Ｍおよび１．５×１０$^{-6}$ Ｍペプチドを含有する約１０ナノリットル（ｎｌ）の溶液を、ＨＤＲピンツールを用いて、アガロース平板の表面に分注した。発光活性の濃度－応答曲線は、適切な受容体を発現する細胞系にペプチド（例えば、ＧＬＰ－１受容体を発現する細胞系に対してはＧＬＰ－１ペプチド）を適用した場合にのみ認められた。ペプチドの大きさが大きくなると発光面積は小さくなり、これは、より大きいペプチドの拡散が低いことによるものかもしれない。

【０１２６】

図５Ｂ、６Ｂおよび７Ｂは、各ペプチドの濃度曲線の線グラフである。ペプチドを送達した領域のｚ値から平板のバックグラウンドｚ値を引くことで応答値を計算した。これらのデータは、ＧＰＣＲアゴニストについてのアッセイにおけるＧＰＣＲおよびリポーター遺伝子構築物の両方を安定して発現する細胞系の平板フォーマットの使用を裏付ける。

【０１２７】

図８Ａおよび８Ｂは、ＭＣ１、ＧＬＰ－１またはＣＲＨ受容体を発現する３つの安定した細胞系を共に混合することで得られるデータを示す。細胞混合物で得られた濃度－応答曲線データは、図５Ａ～７Ｂに示すデータに非常に類似していた。従って、ＧＰＣＲアゴニストについての同時アッセイのために、リポーター遺伝子およびＧＰＣＲを発現する安定した細胞系を平板フォーマットにおいて混合できる。

【０１２８】

実施例８

ビーズ利用型アッセイ

光リンカー（ｐｈｏｔｏｌｉｎｋｅｒ）によりペプチドまたは化合物を付着させたビーズを用いて、ＧＰＣＲのアゴニストをアッセイした。ビーズを、アガロースと混合させるか、平板の表面に適用した。付着した化合物またはペプチドをＵＶ光に露光させて切断した。

【０１２９】

細胞培養およびアッセイ方法は、実施例１に記載した通りであった。光切断可能リンカーにより、六量体ペプチドを、２００マイクロメートルＴＥＮＴＡＧＥＬ^{TM}微小球ビーズ（Ｒａｐｐ Ｐｏｌｙｍｅｒｅ ＧｍｂＨ（Ｔｕｂｉｎｇｅｎ, Ｇｅｒｍａｎｙ）から入手可能な、ＴＥＮＴＡＧＥＬ^{TM} ｐｅｇを有するポリスチレンコア）に連結させた。２つのペプチドを、検証目的のためにテストした：ペプチド１－Ａｃ－ＮＨ－Ｓｅｒ－Ｖａｌ－ｄＨｉｓ－ｄＰｈｅ－Ａｒｇ－Ｔｒｐ（配列番号１）、およびペプチド２－Ａｃ－ＮＨ－Ｖａｌ－Ａｌａ－ｄＨｉｓ－ｄＰｈｅ－Ａｒｇ－Ｔｙｒ（配列番号２）。ピンセットでビーズをアガロースに押し込むか、またはビーズを溶融アガロース／細胞混合物に懸濁させることにより、ビーズをアガロース平板に添加した。３６５ ｎｍの波長（λ）に設定されたＵＶ灯を用いて紫外線光に露光させることにより、ペプチドをビーズから切断した。

【０１３０】

［ＮＤＰ］－α－ＭＳＨの濃度増加へのリポーター遺伝子構築物およびＭＣ１受容体を発現する細胞系の応答に対する紫外線露光（λ＝３６５ ｎｍ）の影響の時間的経過を図９に示す。ペプチド濃度および送達は、実施例１に記載したものと同様であった。３２分までのＵＶ露光は、ペプチドに対する応答に有意に影響しなかった。

【０１３１】

ビーズに連結された（方法に記載）ＭＣ１Ｒアゴニストペプチド１および２の、ＣＨＯ－６ＣＲＥ－ｌｕｃ$^{+}$－ＭＣ１Ｒ細胞平板への送達の時間的経過を図１０Ａ～１０Ｅに示す。ＵＶ露光の時間を増やすことで、ペプチドをビーズから切断した。図１０Ａ～１０Ｅは、０、０．５、１、３および１０分間のＵＶ露光をそれぞれ示す。［ＮＤＰ］－α－ＭＳＨの濃度－応答曲線を、図９と同じ濃度にて、各平板上の行１において実行（ｒｕｎ）した。ペプチド１および２のそれぞれ５つのビーズを、ピンセットでアガロース層に押し込

んだ。ペプチド１および２はそれぞれ、平板の左側および右側に存在した。

【０１３２】

図１１Ａは、各時点における５つのビーズの平均発光の線グラフ図である。ビーズを適用した各領域のｚ値から平板のバックグラウンドｚ値を引くことで、応答を計算した。応答の大きさは、リポーター細胞系の応答、およびビーズから放出され得るペプチドの量の両方により決定される。ウェル利用型リポーターアッセイにおいてテストした場合にペプチド１および２の両方ともＭＣ１Ｒの完全アゴニストであり、従って両方のペプチドが［ＮＤＰ］－α－ＭＳＨに類似した応答を引き出すことができる。

【０１３３】

図１１Ａは、図１０Ｅの［ＮＤＰ］－α－ＭＳＨ濃度曲線の線グラフ図である。最大応答値は約２５であった。ペプチド１および２の両方に対する応答は、３分の時点で横ばいになり始め（図１１Ｂ）、応答値は［ＮＤＰ］－α－ＭＳＨに対する最大応答をはるかに下回っていた（図１１Ａ）。従って、応答の大きさの横ばい状態は、これらの特定のビーズから放出され得るペプチドの量に大いに依存する。ペプチド１の場合、最大応答は、リポーター遺伝子系の最大応答にも依存していたかもしれない；ただし、これはペプチド２には明らかに当てはまらない。図１２は、１０分時点のデータの３次元図である。各円錐の上から下までの斜線バンドは、送達開始点からペプチドが拡散するのに伴うシグナルの弱化を表す。

【０１３４】

図１３Ａは、平板を流し込む前にペプチド１および２ビーズをアガロースおよび細胞と混合する実験を示す。その後、細胞およびビーズを含有する固化平板をＵＶ光に１０分間露光させる。発光の領域は、ビーズを含有する領域であった。図１３Ｂは、このデータの等高線グラフを示す。この種の図を使用することで、発光領域の中心の位置決定、従って活性ペプチドを含有するビーズの位置決定が容易になり、これらは再テストおよび確認のために採取できる。これらのデータは、ビーズからの放出により送達される化合物またはペプチドのアッセイを裏付ける。さらに、ビーズは、平板に適用されても、平板に流し込む前にアガロースおよび細胞と混合されてもよい。

【０１３５】

実施例９

白色ＯＭＮＩ　ＰＬＡＴＥ（登録商標）トレイの評価

「方法」に記載する平板アッセイのために特別に設計された乳白色ＯＭＮＩ　ＰＬＡＴＥ（登録商標）トレイを、市販の透明なＯＭＮＩ　ＰＬＡＴＥ（登録商標）トレイと比較した。白色トレイは、二酸化チタンを未加工のポリスチレン樹脂に添加して作成した。図１４に示すように、白色トレイを用いた場合に、透明トレイを用いたのに対してシグナル対ノイズ比が大幅に改善されたことが見とめられた。従って、上記実施例７および８では白色トレイを使用した。

【０１３６】

実施例１０

ＬＵＣＬＩＴＥ^{TM}試薬の評価

ＬＵＣＬＩＴＥ^{TM}試薬が、ビーズに連結した化合物またはコードのいくらかの破壊を生じ得るか否かという問題が提起された。この問題を扱うために、以下の実験を行った。

【０１３７】

コード部分（ユニークな比率の同位体標識化アミノ酸）および化合物部分を含むフェニル酢酸キャップド（ｃａｐｐｅｄ）分析構築物を含むビーズをテストした。構築物が連結したビーズを、希釈ＬＵＣＬＩＴＥ^{TM}試薬（１：１　ＬＵＣＬＩＴＥ^{TM}試薬：ＰＢＳ）で、０分間、１０分間、１時間、２時間、および一晩インキュベートした。次いで、ビーズをＤＭＦで５分間処理した。その後、トリフルオロ酢酸およびトリエチルシランでビーズから構築物を放出させた。質量分析法により、ＬＵＣＬＩＴＥ^{TM}試薬溶液が、構築物のコード部分または化合物部分のいずれの完全性にも影響を及ぼさないことを決定した。

【０１３８】

本実施例は、ＬＵＣＬＩＴＥ^{TM}試薬を添加した場合と、トレイを画像化した後にビーズを平板から取り出す必要がある場合とで長い時間の枠があることを示す。

【０１３９】

参考文献

以下に一覧する参考文献、ならびに本明細書で引用する全ての参考文献は、本明細書で採用する方法、技術および／または組成物を、補充、説明、背景を提供、または教示する範囲で、参照により本明細書に援用される。

【０１４０】

Ｂｅｖａｎ，Ｎ．，Ｓｃｏｔｔ，Ｓ．，Ｓｈａｗ，Ｐ．Ｅ．，Ｌｅｅ，Ｍ．Ｇ．，Ｍａｒｓｈａｌｌ，Ｆ．Ｈ．，Ｒｅｅｓ，Ｓ．（１９９８）Ｎｏｃｉｃｅｐｔｉｏｎ ａｃｔｉｖａｔｅｓ Ｅｌｋ－１ ａｎｄ Ｓａｐ１ａ ｆｏｌｌｏｗｉｎｇ ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ ｏｆ ｔｈｅ ＯＲＬ１ ｒｅｃｅｐｔｏｒ ｉｎ Ｃｈｉｎｅｓｅ ｈａｍｓｔｅｒ ｏｖａｒｙ ｃｅｌｌｓ．Ｎｅｕｒｏｒｅｐｏｒｔ ９：２７０３－２７０８．

Ｇｏｅｔｚ Ａ．Ｓ．，Ａｎｄｒｅｗｓ，Ｊ．Ｌ．，Ｌｉｔｔｌｅｔｏｎ，Ｔ．Ｒ．，Ｉｇｎａｒ，Ｄ．Ｍ．（２０００）Ｄｅｖｅｌｏｐｍｅｎｔ ｏｆ ａ ｆａｃｉｌｅ ｍｅｔｈｏｄ ｆｏｒ ｈｉｇｈ ｔｈｒｏｕｇｈｐｕｔ ｓｃｒｅｅｎｉｎｇ ｗｉｔｈ ｒｅｐｏｒｔｅｒ ｇｅｎｅ ａｓｓａｙｓ．Ｊ．Ｂｉｏｍｏｌｅｃ．Ｓｃｒｅｅｎｉｎｇ ５：３７７－３８４．

Ｈｉｍｍｌｅｒ，Ａ．，Ｓｔｒａｔｏｗａ，Ｃ．，Ｃｚｅｒｎｉｌｏｆｓｋｙ，Ａ．Ｐ．（１９９５）Ｕｓｅ ｏｆ ａ ｌｕｃｉｆｅｒａｓｅ ｒｅｐｏｒｔｅｒ ｓｙｓｔｅｍ ｆｏｒ ｃｈａｒａｃｔｅｒｉｚｉｎｇ Ｇ－ｐｒｏｔｅｉｎ ｌｉｎｋｅｄ ｒｅｃｅｐｔｏｒｓ．Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．６：５７４－５８１．

Ｉｇｎａｒ，Ｄ．Ｍ．，Ｒｅｅｓ，Ｓ．（２０００）Ｔｈｅ ｓｔｕｄｙ ｏｆ ｄｒｕｇ－ｒｅｃｅｐｔｏｒ ｉｎｔｅｒａｃｔｉｏｎｓ ｕｓｉｎｇ ｒｅｐｏｒｔｅｒ ｇｅｎｅ ｓｙｓｔｅｍｓ ｉｎ ｍａｍｍａｌｉａｎ ｃｅｌｌｓ．（Ｋｅｎａｋｉｎ，Ｔ．，Ａｎｇｕｓ，Ｊ．Ａ．（編），Ｔｈｅ Ｐｈａｒｍａｃｏｌｏｇｙ ｏｆ Ｆｕｎｃｔｉｏｎａｌ，Ｂｉｏｃｈｅｍｉｃａｌ，ａｎｄ Ｒｅｃｏｍｂｉｎａｎｔ Ｒｅｃｅｐｔｏｒ Ｓｙｓｔｅｍｓ，Ｈａｎｄｂｏｏｋ ｏｆ Ｅｘｐｅｒｉｍｅｎｔａｌ Ｐｈａｒｍａｃｏｌｏｇｙ．Ｓｐｒｉｎｇｅｒ－Ｖｅｒｌａｇ，Ｈｅｉｄｅｌｂｅｒｇ，Ｖｏｌ．１４８：３９１－４１２に掲載）．

Ｓｔｒａｔｏｗａ，Ｃ．，Ｈｉｍｍｌｅｒ，Ａ．，Ｃｚｅｒｎｉｌｏｆｓｋｙ，Ａ．Ｐ．（１９９５ａ）Ｕｓｅ ｏｆ ａ ｌｕｃｉｆｅｒａｓｅ ｒｅｐｏｒｔｅｒ ｓｙｓｔｅｍ ｆｏｒ ｃｈａｒａｃｔｅｒｉｚｉｎｇ Ｇ－ｐｒｏｔｅｉｎ ｌｉｎｋｅｄ ｒｅｃｅｐｔｏｒｓ．Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．６：５７４－５８１．

Ｓｔｒａｔｏｗａ，Ｃ．Ｍａｃｈａｔ，Ｈ．，Ｂｕｒｇｅｒ，Ｅ．，Ｈｉｍｍｌｅｒ，Ａ．，Ｓｃｈａｆｅｒ，Ｒ．，Ｓｐｅｖａｋ，Ｗ．，Ｗｅｙｅｒ，Ｕ．，Ｗｉｃｈｅ－Ｃａｓａｔａｎｏｎ，Ｍ．，Ｃｚｅｒｎｉｌｏｆｓｋｙ，Ａ．Ｐ．（１９９５ｂ）Ｆｕｎｃｔｉｏｎａｌ ｃｈａｒａｃｔｅｒｉｚａｔｉｏｎ ｏｆ ｔｈｅ ｈｕｍａｎ ｎｅｕｒｏｋｉｎｉｎ ｒｅｃｅｐｔｏｒｓ ＮＫ１，ＮＫ３，ａｎｄ ＮＫ３ ｂａｓｅｄ ｏｎ ｃｅｌｌｕｌａｒ ａｓｓａｙ ｓｙｓｔｅｍ．Ｊ．Ｒｅｃｅｐｔ．Ｓｉｇｎａｌ Ｔｒａｎｓｄｕｃｔ．Ｒｅｓ．１５：６１７－６３０．

Ｗｅｙｅｒ，Ｕ．，Ｓｃｈａｆｅｒ，Ｒ．，Ｈｉｍｍｌｅｒ，Ａ．，Ｍａｙｅｒ，Ｓ．Ｋ．，Ｂｕｒｇｅｒ，Ｅ．，Ｃｚｅｒｎｉｌｏｆｓｋｙ，Ａ．Ｐ．Ｓｔｒａｔｏｗａ Ｃ．（１９９３）Ｅｓｔａｂｌｉｓｈｍｅｎｔ ｏｆ ａ ｃｅｌｌｕｌａｒ ａｓｓａｙ ｓｙｓｔｅｍ ｆｏｒ Ｇ ｐｒｏｔｅｉｎ－ｌｉｎｋｅｄ ｒｅｃｅｐｔｏｒｓ：Ｃｏｕｐｌｉｎｇ ｏｆ ｈｕｍａｎ ＮＫ２ ａｎｄ $5-HT_2$ ｒｅｃｅｐｔｏｒｓ ｔｏ ｐｈｏｓｐｈｏｌｉｐａｓｅ Ｃ ａｃｔｉｖａｔｅｓ ａ ｌｕｃｉｆｅｒａｓｅ ｒｅｐｏｒｔｅｒ ｇｅｎｅ．Ｒｅｃｅｐｔｏｒｓ Ｃｈａｎｎｅｌｓ １：１９３－２００

.
本明細書および請求の範囲がその一部を構成する本出願は、任意の後続出願に関して優先権の基礎として使用され得る。このような後続出願の請求の範囲は、本明細書に記載した任意の特徴または特徴の組合せに関連し得る。これらは、製品、組成物、プロセスまたは使用クレームのいずれの形態を取ってもよく、例として限定するものではないが、本出願の請求項を１つまたは複数含み得る。

【０１４１】

本発明の様々な詳細部分が本発明の範囲から逸脱することなく変更できることが理解されよう。さらに、上記記載は、単に例示するものであり、限定を目的とするものではなく、本発明は請求の範囲により定義される。

【図面の簡単な説明】

【図１】図１は、アフリカツメガエル（Ｘｅｎｏｐｕｓ）メラニン細胞における７ＴＭ受容体シグナル形質導入の模式図である。

【図２】図２Ａは、本発明のアッセイ方法において使用するのに適したシステムのブロック図である。図２Ｂは、本発明のアッセイ方法で使用する、候補化合物を目的地プレートに適用する順番を示す模式図である。

【図３】図３は、本発明のアッセイ方法により生成された画像を分析するステップを示すフローチャートである。

【図４】図４は、ルシフェラーゼの転写を駆動するＣＲＥ応答エレメントのＧＰＣＲ活性化の模式図である。

【図５】図５は、実施例７～１０に記載するように、様々な濃度の４－Ｌ－ノルロイシン－７－Ｄ－フェニルアラニン－αメラニン細胞刺激ホルモン［ＮＤＰ］－αＭＳＨ（図５Ａの上段；図５Ｂにおいて◆）、グルカゴン様ペプチド－１（ＧＬＰ－１）（７－３６）（図５Ａの中段；図５Ｂにおいて■）、または副腎皮質刺激ホルモン放出因子（ＣＲＨ）（図５Ａの下段；図５Ｂにおいて▲）で処理された、ＭＣ１受容体を発現するＣＨＯ－６×ＣＲＥ－ｌｕｃ$^{+}$細胞を含むアガロース平板を示す。図５Ａは画像、および図５Ｂはそれぞれのペプチドについての濃度応答曲線のグラフ図である。ＬＵＣＬＩＴＥ ＰＬＵＳ^{TM}試薬を添加してその後ＶＩＥＷＬＵＸ（登録商標）カメラ上で画像化する前にトレイを４時間３７℃にてインキュベートした。ペプチドを送達した領域についてのｚ値からバックグランドｚ値を引いて応答を計算した。

【図６】図６は、実施例７～１０に記載するように、様々な濃度の［ＮＤＰ］－αＭＳＨ（図６Ａの上段；図６Ｂにおいて◆）、ＧＬＰ－１（７－３６）（図６Ａの中段；図６Ｂにおいて■）、またはＣＲＨ（図６Ａの下段；図６Ｂにおいて▲）で処理された、グルカゴン様ペプチド－１（ＧＬＰ－１）受容体を発現するＣＨＯ－６×ＣＲＥ－ｌｕｃ$^{+}$細胞を含むアガロース平板を示す。図６Ａは画像、および図６Ｂはそれぞれのペプチドについての濃度応答曲線のグラフ図である。ＬＵＣＬＩＴＥ ＰＬＵＳ^{TM}試薬を添加してその後ＶＩＥＷＬＵＸ（登録商標）カメラ上で画像化する前にトレイを４時間３７℃にてインキュベートした。ペプチドを送達した領域についてのｚ値からバックグランドｚ値を引いて応答を計算した。

【図７】図７は、実施例７～１０に記載するように、表記する濃度の［ＮＤＰ］－αＭＳＨ（図７Ａの上段；図７Ｂにおいて◆）、ＧＬＰ－１（７－３６）（図７Ａの中段；図７Ｂにおいて■）、またはＣＲＨ（図７Ａの下段；図７Ｂにおいて▲）で処理された、副腎皮質刺激ホルモン放出因子受容体（ＣＲＨ１Ｒ）を発現するＣＨＯ－６×ＣＲＥ－ｌｕｃ$^{+}$細胞を含むアガロース平板を示す。図７Ａは画像、および図７Ｂはそれぞれのペプチドについての濃度応答曲線のグラフ図である。ＬＵＣＬＩＴＥ ＰＬＵＳ^{TM}試薬を添加してその後ＶＩＥＷＬＵＸ（登録商標）カメラ上で画像化する前にトレイを４時間３７℃にてインキュベートした。ペプチドを送達した領域についてのｚ値からバックグランドｚ値を引いて応答を計算した。

【図８】図８は、互いと混合され単一の平板としてプレーティングされた、ＭＣ１受容体、ＧＬＰ－１受容体およびＣＲＨ１Ｒを発現するＣＨＯ－６×ＣＲＥ－ｌｕｃ$^{+}$細胞を含

むアガロース平板を示す。これらの細胞は、実施例７～１０に記載するように、様々な濃度の［ＮＤＰ］－αＭＳＨ（図８Ａの上段；図８Ｂにおいて◆）、ＧＬＰ－１（７－３６）（図８Ａの中段；図８Ｂにおいて■）、またはＣＲＨ（図８Ａの下段；図８Ｂにおいて▲）で処理した。図８Ａは画像、および図８Ｂはそれぞれのペプチドについての濃度応答曲線のグラフ図である。ＬＵＣＬＩＴＥ ＰＬＵＳ^{TM}試薬を添加してその後ＶＩＥＷＬＵＸ（登録商標）カメラ上で画像化する前にトレイを４時間３７℃にてインキュベートした。ペプチドを送達した領域についてのｚ値からバックグランドｚ値を引いて応答を計算した。

【図９】図９は、表記された時間（すなわち、◆＝０分（Ｍｉｎ．）、■＝４ Ｍｉｎ．、▲＝８ Ｍｉｎ．、×＝１６ Ｍｉｎ．、＋＝２４ Ｍｉｎ．および・＝３２ Ｍｉｎ．）で紫外光（λ＝３６５ ｎｍ）に露光されたＭＣ１受容体を発現するＣＨＯ－６×ＣＲＥ－ｌｕｃ$^{+}$細胞を含有するアガロース平板についての濃度応答曲線のグラフ図である。その後、図５Ａおよび５Ｂと同じように平板を［ＮＤＰ］－αＭＳＨで処理した。ＬＵＣＬＩＴＥ ＰＬＵＳ^{TM}試薬の添加およびその後のＶＩＥＷＬＵＸ（登録商標）カメラ上での画像化の前に、トレイを４時間３７℃にてインキュベートした。ペプチドを送達した領域についてのｚ値からバックグランドｚ値を引いて応答を計算した。

【図１０】図１０は、ＭＣ１Ｒを発現するＣＨＯ－６×ＣＲＥ－ｌｕｃ$^{+}$細胞を含むアガロース平板に挿入された、メラノコルチン－１受容体（ＭＣ１Ｒ）アゴニストペプチド１（左下にある５つのビーズ）またはペプチド２（右下にある５つのビーズ）を含有するビーズの画像を示す。次いで、トレイをＵＶ光（λ＝３６５ ｎｍ）に０、０．５、１、３または１０分間露光させた（ぞれぞれＡ～１０Ｅ）。平板を、図５Ａ（上段）と同じ濃度の［ＮＤＰ］－αＭＳＨで処理した。ＬＵＣＬＩＴＥ ＰＬＵＳ^{TM}試薬の添加およびその後のＶＩＥＷＬＵＸ（登録商標）カメラ上での画像化の前に、トレイを４時間３７℃にてインキュベートした。

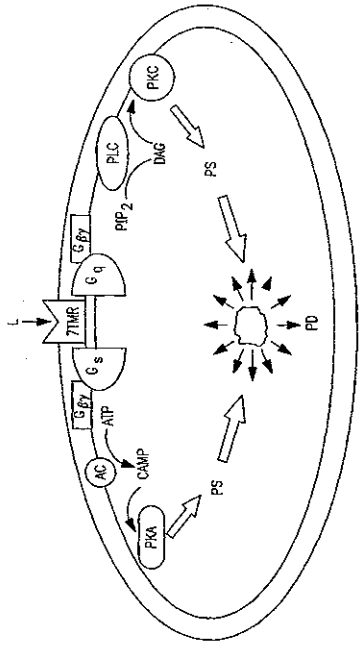
【図１１】図１１Ａは、図１０Ｅの［ＮＤＰ］－αＭＳＨ濃度曲線の線グラフ図である。図１１Ｂは、図１０Ａ～１０Ｅについて上述した５つのビーズの平均発光のグラフ図である。各時点（◆＝ペプチド１、■＝ペプチド２）を示す。ビーズをアプライした各領域のｚ値から平板のバックグランドｚ値を引いて応答を計算した。

【図１２】図１０Ｅに示す１０分時点から得たデータの３次元図である。ｚ値は、本明細書に記載するように計算した。

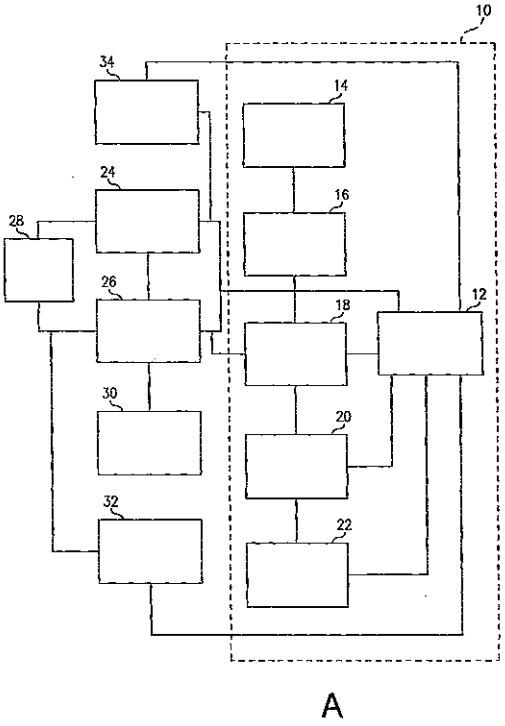
【図１３】図１３は、平板を流し込む前にアガロースおよび細胞と混合された、ペプチド１および２を含むビーズを示す。次いで、細胞およびビーズを含有する固化した平板を、ＵＶ光（λ＝３６５ ｎｍ）に１０分間露光させた。ＬＵＣＬＩＴＥ ＰＬＵＳ^{TM}試薬の添加およびその後のＶＩＥＷＬＵＸ（登録商標）カメラ上での画像化の前に、トレイを４時間３７℃にてインキュベートした。画像を図１３Ａに、等高線グラフを図１３Ｂに示す。

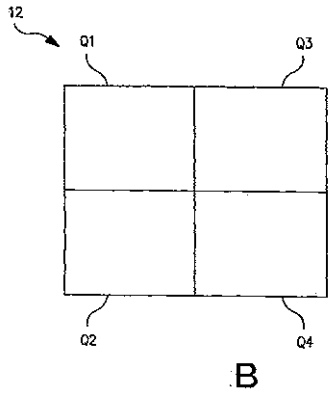
【図１４】図１４は、白色（◆）または透明（■）ＯＭＮＩ ＰＬＡＴＥ（登録商標）トレイにプレート化され、様々な濃度の［ＮＤＰ］－αＭＳＨで処理された、ＭＣ１受容体を発現するＣＨＯ－６×ＣＲＥ－ｌｕｃ$^{+}$細胞を含有するアガロース平板についての濃度応答曲線のグラフ図である。ＬＵＣＬＩＴＥ ＰＬＵＳ^{TM}試薬の添加およびその後のＶＩＥＷＬＵＸ（登録商標）カメラ上での画像化の前に、トレイを４時間３７℃にてインキュベートした。ペプチドを送達した領域についてのｚ値からバックグランドｚ値を引いて応答を計算した。

【図１】

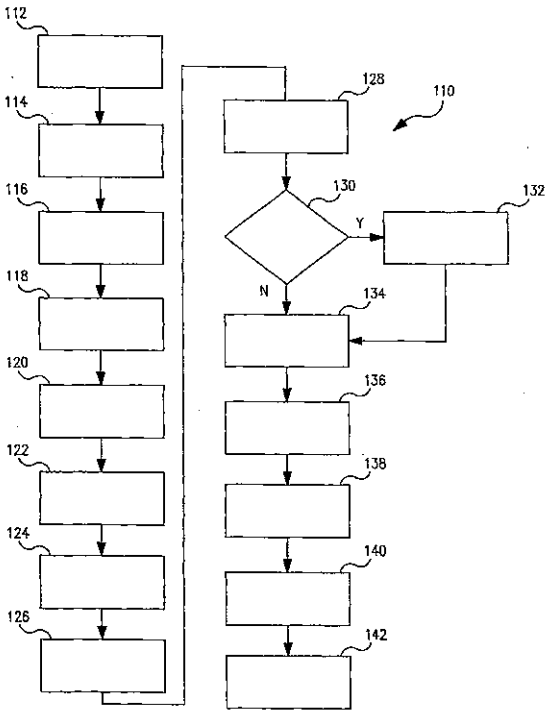

PKC
PLC
DAG
PIP2
PS
Gβγ
Gq
L
7TMR
Gs
PD
Gβγ
ATP
AC
CAMP
PS
PKA

【図２】

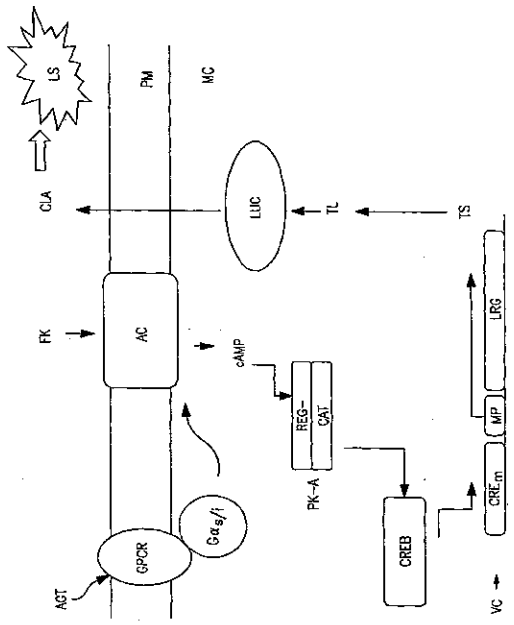

10
34
14
24
16
28
26
18
12
30
20
32
22
A


12
Q1
Q3
Q2
Q4
B

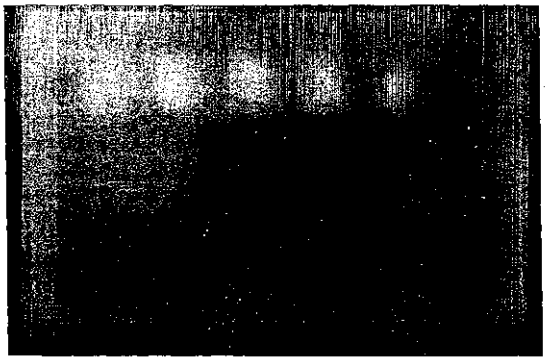
【図３】


112
114
116
118
120
122
124
126
128
110
130
Y
N
132
134
136
138
140
142

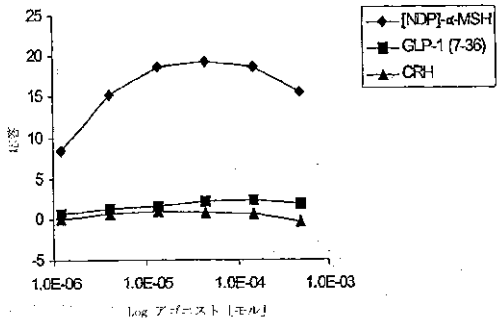
【図４】



【図５】

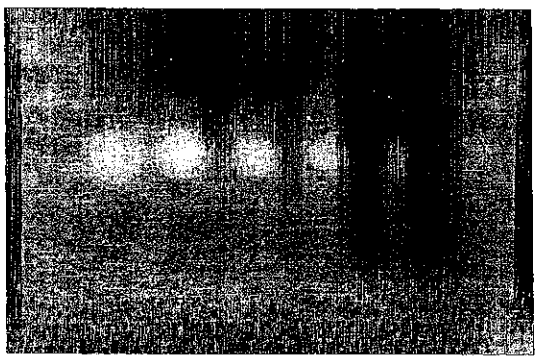


A

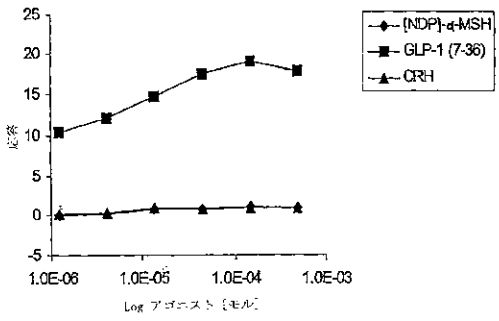


B

【図６】

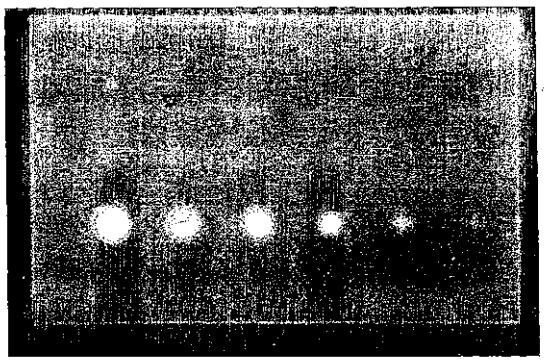


A

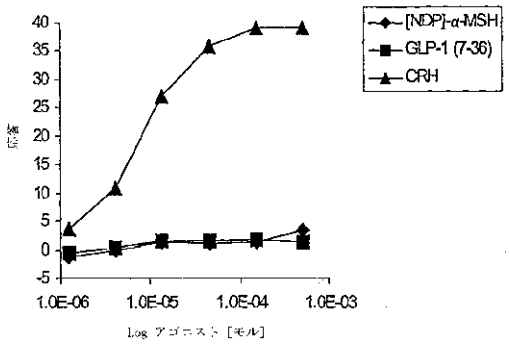


B

【図７】

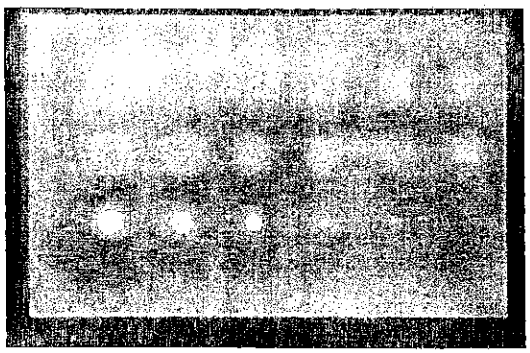


A

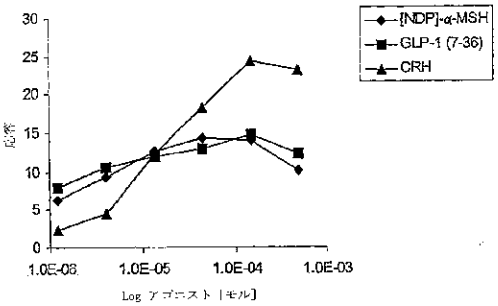


B

【図８】

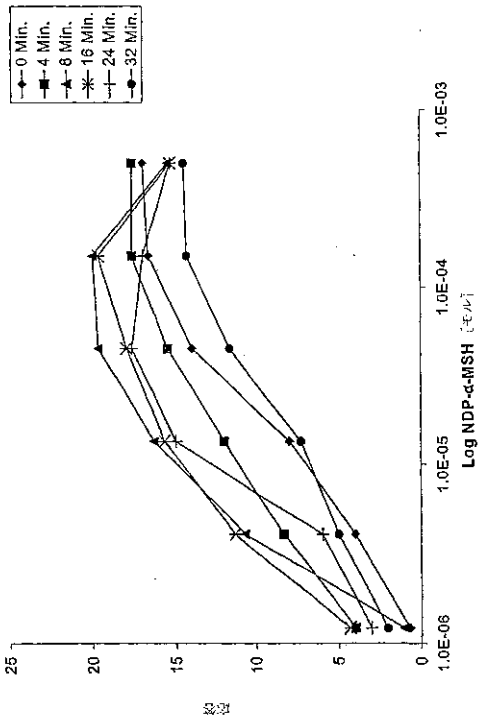


A

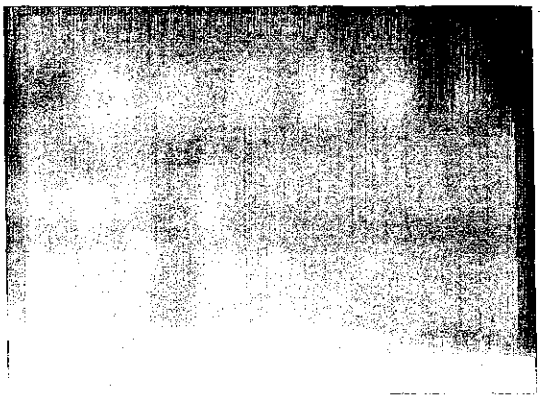


B

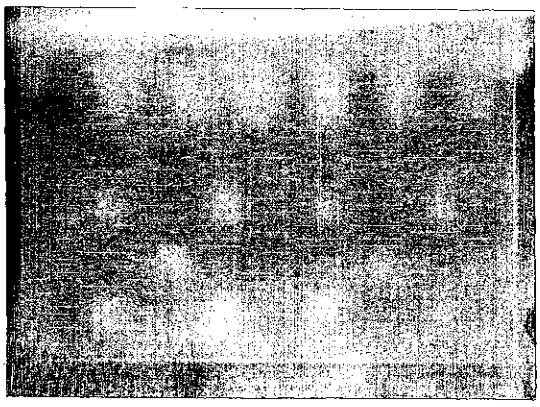
【図９】



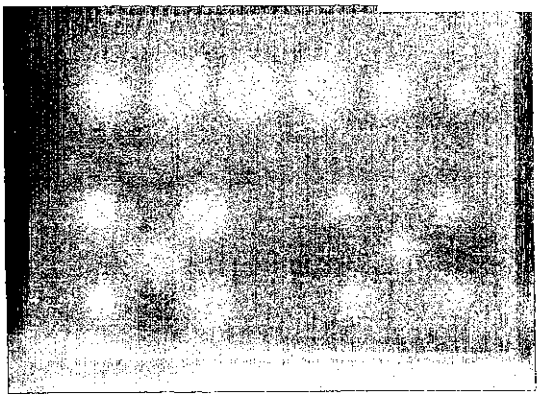
【図１０】



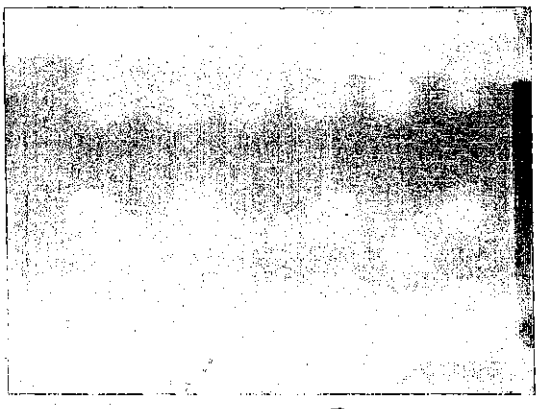
A



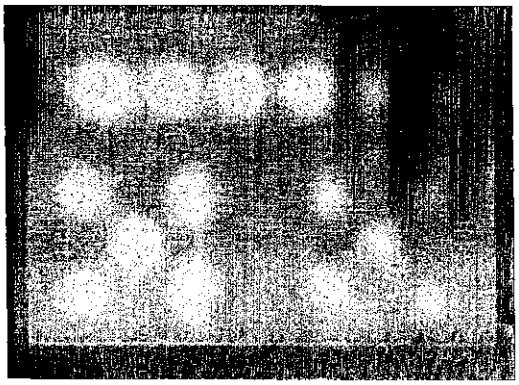
B



C

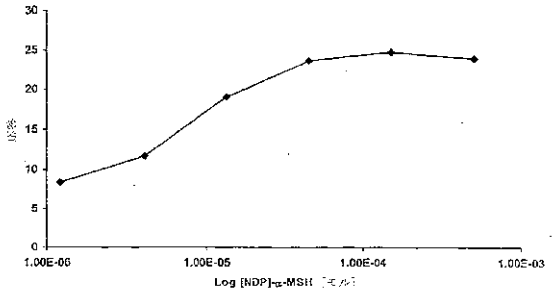


D

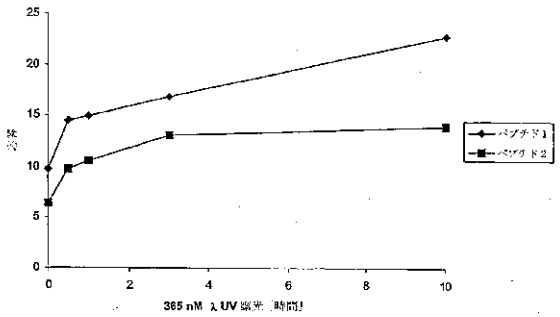


E

【図１１】

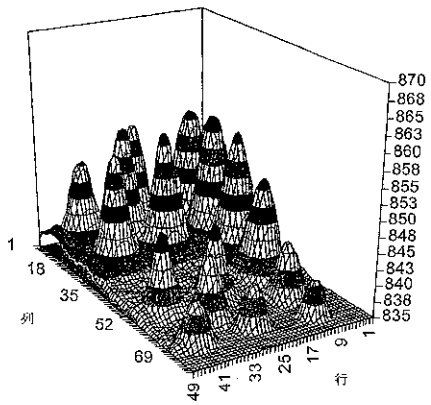


A

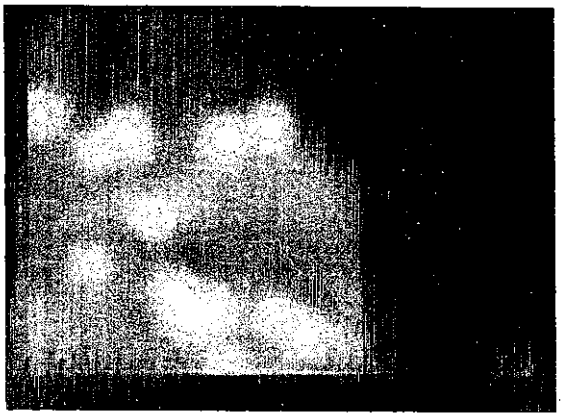


B

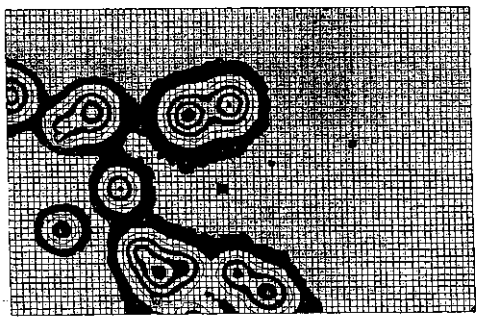
【図１２】



【図１３】

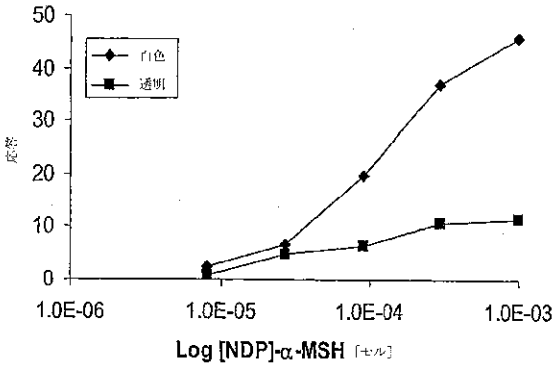


A



B

【図１４】



【国際公開パンフレット】

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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

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

PCT

(10) International Publication Number
WO 01/96597 A2

(51) International Patent Classification⁷: C12Q 1/00

(21) International Application Number: PCT/US01/19033

(22) International Filing Date: 13 June 2001 (13.06.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/211,268 13 June 2000 (13.06.2000) US
60/294,530 30 May 2001 (30.05.2001) US

(71) Applicant (*for all designated States except US*): **GLAXO GROUP LIMITED** [GB/GB]; Glaxo Wellcome House, Berkeley Avenue, Greenford, Middlesex UB6 0NN (GB).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (*for US only*): **HAIZLIP, Jill, Elaine** [US/US]; GlaxoSmithKline, Five Moore Drive, P.O. Box 13398, Research Triangle Park, NC 27709 (US). **IGNAR, Diane, Michele** [US/US]; GlaxoSmithKline, Five Moore Drive, P.O. Box 13398, Research Triangle Park, NC 27709 (US). **JAYAWICKREME, Channa, K.** [US/US]; GlaxoSmithKline, Five Moore Drive, P.O. Box 13398, Research Triangle Park, NC 27709 (US). **KING, Holly, Kay** [US/US]; GlaxoSmithKline, Five Moore Drive, P.O. Box 13398, Research Triangle Park, NC 27708 (US). **LIACOS, James, Arthur** [US/US]; GlaxoSmithKline, Five Moore Drive, P.O. Box 13398, Research Triangle Park, NC 27709 (US). **MILLS, Kirsten** [US/US]; GlaxoSmithKline, Five Moore Drive, P.O. Box 13398, Research Triangle Park, NC 27709 (US). **RUAN, Jason, J.** [US/US]; GlaxoSmithKline, Five Moore Drive, P.O. Box 13398, Research Triangle Park, NC 27709 (US). **SAULS, Howard, Ray, Jr.** [US/US]; GlaxoSmithKline, Five Moore Drive, P.O. Box 13398, Research Triangle Park, NC 27709 (US). **SHAFFER, Joel, Edward** [US/US]; GlaxoSmithKline, Five Moore Drive, P.O. Box 13398, Research Triangle Park, NC 27709 (US).

(74) Agents: **LEVY, David, J.** et al.; GlaxoSmithKline, Five Moore Drive, P.O. Box 13398, Research Triangle Park, NC 27709 (US).

(81) Designated States (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) Designated States (*regional*): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:
— *without international search report and to be republished upon receipt of that report*
entirely in electronic form (except for this front page) and available upon request from the International Bureau
with sequence listing part of description published separately in electronic form and available upon request from the International Bureau

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 01/96597 A2

(54) Title: HIGH THROUGHPUT METHOD FOR SCREENING CANDIDATE COMPOUNDS FOR BIOLOGICAL ACTIVITY

(57) Abstract: A method for screening candidate compounds for an ability to modulate the biological activity of a target. The method includes the steps of providing a substrate comprising a target and an indicator, the substrate adapted for receiving a plurality of candidate compounds; contacting the substrate with a plurality of candidate compound samples in a manner wherein an identity of each candidate compound can be determined and wherein the candidate compounds in the candidate compound samples interact with the target in the substrate; detecting a signal, the signal produced by the indicator upon interaction between the target and a candidate compound; and identifying a candidate compound as a modulator of the biological activity of the target based upon an amount of signal produced

Description

HIGH THROUGHPUT METHOD FOR SCREENING CANDIDATE COMPOUNDS FOR BIOLOGICAL ACTIVITY

Technical Field

The present invention pertains generally to a high throughput method for screening candidate compounds for biological activity. More particularly, the present invention pertains to a high throughput method for screening candidate compounds for biological activity that employs a substrate comprising the target of interest.

Table of Abbreviations

λ	-	wavelength
7TM	-	7 transmembrane
AC	-	adenylyl cyclase
BSA	-	bovine serum albumin
cAMP	-	cyclic AMP
CFM	-	conditioned fibroblast (or frog) media
CHO	-	Chinese hamster ovary
CRE(s)	-	cAMP response element(s)
CRH	-	corticotrophin releasing factor
CRHR1	-	corticotrophin releasing factor receptor
DMEM/F12	-	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	-	dimethyl sulfoxide
EDTA	-	ethylenediaminetetraacetic acid
ELISA	-	enzyme-linked immunosorbent assay
FBS	-	fetal bovine serum
GFP	-	green fluorescent protein
GPCR	-	G protein coupled receptor
GLP-1	-	glucagon-like peptide-1
FLIPR	-	fluorescence imaging plate reader
HDR	-	high density replicator

HEK	-	human embryonic kidney
HTS	-	high throughput screening
L-15	-	Leibovitz-15 medium
LMP	-	low melting point
MC1R	-	melanocortin-1 receptor
MDS	-	methods development software
Min.	-	minute(s)
ml	-	milliliter(s)
mRNA	-	messenger RNA
αMSH	-	alpha melanocyte stimulating hormone
[NDP]-αMSH	-	4-L-norleucine-7-D-phenylalanine-alpha melanocyte stimulating hormone
nl	-	nanoliter(s)
PBS	-	phosphate buffered saline
PD	-	pigment dispersion
PLC	-	phospholipase C
RT-PCR	-	reverse transcription polymerase chain reaction
SOP	-	standard operating procedure
Tcl	-	tool command language
TPA	-	phorbol 12-myristate 13-acetate
UV	-	ultraviolet
WT	-	wild type

Background Art

The advent of combinatorial chemistry techniques has enabled the synthesis of large numbers of compounds that have potential as therapeutic agents. However, assays that can rapidly and accurately identify those candidate compounds having pharmacological activity have lagged behind the pace of synthesis. As a result, many pharmaceutical companies possess vast libraries of candidate compounds that have not been screened for pharmacological activity.

A PIN tool system is a commercially available system that is typically used to transfer 96 or 384 samples from a reservoir to a receptacle. Currently, PIN tool technology is applied in DNA/RNA spotting on membranes. A representative PIN tool system, along with a description of the use of the device to transfer samples to a 384-well plate, is disclosed by Brant, "Multiplexed Nanoliter Transfer for High Throughput Drug Screening Using the BIOMEK® 2000 and the High Density Replicating Tool", *Journal of Biomolecular Screening*, Vol. 2(2), (1997), published by Beckman Industries, Inc., Biotechnologies Development Center, Fullerton, California.

U.S. Patent No. 5,601,922 issued to Lemer et al. on February 11, 1997 (Bunsen Rush Laboratories, Inc. of Newton, Massachusetts) discloses peptide library formats and method relating thereto. The application of synthetic peptide library beads onto an agarose layer overlayed on cells to detect functional responses is disclosed.

U.S. Patent No. 5,976,813 issued November 2, 1999 to Beutel et al. (assignee Abbott Laboratories of Abbot Park, Illinois) discloses a continuous format high throughput screening assay. The disclosed assay employs at least one porous matrix upon which each of more than 96 samples of distinct samples of substances is deposited in the assay. In a cell-based embodiment of the assay, cells expressing a receptor of interest are grown or plated on a cell matrix. A porous matrix is prepared such that a labeled ligand for the receptor is dispensed onto or into the matrix. Test compounds or samples are then dispensed directly onto the ligand or cell matrix, or alternatively on or into another matrix. In this case, the sample matrix is brought in contact with the ligand matrix thereby allowing the sample to diffuse into the ligand matrix. After a suitable incubation period the ligand matrix is brought into contact with the cell matrix, preferably on the non-cell side of the matrix and the ligand and sample contact and react with the receptor by diffusion. Thus, the cell-based embodiment requires the preparation of a separate cell matrix.

Despite the disclosure of the foregoing documents, there remains substantial room for the development of improved high throughput screening methods for pharmacologically active candidate compounds, particularly for

use with liquid samples and/or for use in a cell-based assay. A method for screening candidate compounds for pharmacological activity against a variety of targets thus represents a long felt and continuing need in the art.

Summary of the Invention

A method for screening candidate compounds for an ability to modulate the biological activity of a target is disclosed. The method comprises providing a substrate comprising a target and an indicator, the substrate adapted for receiving a plurality of candidate compounds; contacting the substrate with a plurality of candidate compound samples in a manner wherein an identity of each candidate compound can be determined and wherein the candidate compounds in the candidate compound samples interact with the target in the substrate; detecting a signal, the signal produced by the indicator upon interaction between the target and a candidate compound; and identifying a candidate compound as a modulator of the biological activity of the target based upon an amount of signal produced.

In an alternative embodiment, a method for screening candidate compounds for an ability to modulate the biological activity of a target is disclosed. The method comprises providing a substrate comprising a target and an indicator, the substrate adapted for receiving a plurality of candidate compounds; contacting the substrate with a plurality of liquid candidate compound samples to form a predetermined pattern of candidate compound samples on the substrate, whereby the candidate compounds in the candidate compound samples interact with the target in the substrate within the predetermined pattern; detecting a signal within the predetermined pattern, the signal produced by the indicator upon interaction between the target and a candidate compound; and identifying a candidate compound as a modulator of the biological activity of the target based upon an amount of signal produced as compared to a control sample.

In an alternative embodiment, the method comprises: providing a substrate comprising a matrix, an indicator and a plurality of cells expressing the target, wherein the plurality of cells are suspended in the substrate, and

wherein the substrate is adapted for receiving a plurality of candidate compounds; contacting the substrate with a plurality of candidate compound samples in a manner wherein an identity of each candidate compound can be determined, and wherein the candidate compounds within the candidate compound samples interact with the target within the substrate; detecting a signal produced by the indicator upon interaction between the target and a candidate compound, and identifying a candidate compound as a modulator of the biological activity of the target based upon an amount of signal produced as compared to a control sample. In this embodiment, the cells preferably comprise mammalian cells.

Accordingly, it is an object of the present invention to provide a novel assay method for screening candidate compounds for an ability to modulate the biological activity of a target. The object is achieved in whole or in part by the present invention.

An object of the invention having been stated hereinabove, other objects will become evident as the description proceeds when taken in connection with the accompanying Drawings and Laboratory Examples as best described herein below.

Brief Description of the Drawings

Figure 1 is a schematic drawing of 7TM receptor signal transduction in *Xenopus* melanophores.

Figure 2A is a block diagram of a system suitable for use in the assay method of the present invention.

Figure 2B is a schematic drawing depicting an order for applying candidate compounds to a destination plate for use in the assay method of the present invention.

Figure 3 is a flow chart depicting steps for analyzing images generated in accordance with the assay method of the present invention.

Figure 4 a schematic diagram of GPCR activation of CRE response elements driving transcription of luciferase.

Figures 5A and 5B depict agarose lawns containing CHO-6xCRE-luc$^+$ cells expressing MC1 receptor, which were treated with the concentrations of 4-L-norleucine-7-D-phenylalanine-alpha melanocyte stimulating hormone [NDP]-αMSH (top row in Figure 5A; ♦ in Figure 5B), glucagon-like peptide-1 (GLP-1) (7-36) (middle row in Figure 5A; ■ in Figure 5B), or corticotrophin releasing factor (CRH) (bottom row in Figure 5A; ▲ in Figure 5B) as described in Examples 7-10. Figure 5A shows the image and Figure 5B is a graphical representation of the concentration response curves for each peptide. The trays were incubated for 4 hours at 37°C before addition of LUCLITE PLUS™ reagent and subsequent imaging on the VIEWLUX® camera. The response was calculated by subtracting the background z values from the z values for the area where peptide was delivered.

Figures 6A and 6B depict agarose lawns containing CHO-6xCRE-luc$^+$ cells expressing glucagon-like peptide-1 (GLP-1) receptor, which were treated with the concentrations of [NDP]-αMSH top row in Figure 6A; ♦ in Figure 6B), GLP-1 (7-36) (middle row in Figure 6A; ■ in Figure 6B), or CRH (bottom row in Figure 6A; ▲ in Figure 6B) as described in Examples 7-10. Figure 6A shows the image and Figure 6B is a graphical representation of the concentration response curves for each peptide. The trays were incubated for 4 hours at 37°C before addition LUCLITE PLUS™ reagent and subsequent imaging on the VIEWLUX® camera. The response was calculated by subtracting the background z values from the z values for the area where peptide was delivered.

Figures 7A and 7B depict agarose lawns containing CHO-6xCRE-luc$^+$ cells expressing corticotrophin releasing factor receptor (CRH1R), which were treated with the indicated concentrations of [NDP]-αMSH (top row in Figure 7A; ♦ in Figure 7B), GLP-1 (7-36) (middle row in Figure 7A; ■ in Figure 7B), or CRH (bottom row in Figure 7A; ▲ in Figure 7B) as described in Examples 7-10. Figure 7A shows the image and Figure 7B is a graphical representation of the concentration response curves for each peptide. The trays were incubated for 4 hours at 37°C before addition of LUCLITE PLUS™ reagent

and subsequent imaging on the VIEWLUX® camera. The response was calculated by subtracting the background z values from the z values for the area where peptide was delivered.

Figures 8A and 8B depict agarose lawns containing CHO-6xCRE-luc$^+$ cells expressing MC1 receptor, GLP-1 receptor and CRH1R, which were mixed together and plated in a single lawn. The cells were treated with the concentrations of [NDP]-αMSH (top row in Figure. 8A; ♦ in Figure 8B), GLP-1 (7-36) (middle row in Figure 8A; ■ in Figure 8B), or CRH (bottom row in Figure 8A; ▲ in Figure 8B) as described in Examples 7-10. Figure 8A shows the image and Figure 8B is a graphical representation of the concentration response curves for each peptide. The trays were incubated for 4 hours at 37°C before addition of LUCLITE PLUS™ reagent and subsequent imaging on the VIEWLUX® camera. The response was calculated by subtracting the background z values from the z values for the area where peptide was delivered.

Figure 9 is a graphical representation of the concentration response curves for agarose lawns containing CHO-6xCRE-luc$^+$ cells expressing MC1 receptor, which were exposed to ultraviolet light (λ = 365 nm) for the indicated times, i.e. ♦ = 0 Minutes (Min.), ■ = 4 Min., ▲= 8Min., X =16 Min., + = 24 Min., and • = 32 Min. The lawns were then treated with the [NDP]-αMSH as in Figures 5A and 5B. The trays were incubated for 4 hours at 37°C before addition of LUCLITE PLUS™ reagent and subsequent imaging on the VIEWLUX® camera. The response was calculated by subtracting the background z values from the z values for the area where peptide was delivered.

Figures 10A through 10E depict images of beads containing melanocortin-1 receptor (MC1R) agonist peptide 1 (5 beads on bottom left) or peptide 2 (5 beads on bottom right), which were inserted into agarose lawns containing CHO-6xCRE-luc$^+$ cells expressing MC1R. The trays were then exposed to UV light (λ = 365 nm) for 0, 0.5, 1, 3, or 10 minutes (Figures 10A-10E, respectively). The lawn was treated with [NDP]-αMSH at the same

concentrations as in Figure 5A (*top row*). The trays were incubated for 4 hours at 37°C before addition of LUCLITE PLUS™ reagent and subsequent imaging on the VIEWLUX® camera.

Figure 11A is a line graph representation of the [NDP]-α-MSH concentration curve from Figure 10E.

Figure 11B is a graphical representation of the average luminescence of the 5 beads described above for Figures 10A-10E. Each time point (♦ = peptide 1; ■ = peptide 2)) is shown. The response was calculated by subtracting the background z value for the lawn from the z value for each area to which the bead was applied.

Figure 12 is a three-dimensional representation of the data from the 10-minute time point shown in Figure 10E. Z values are calculated as described herein below.

Figures 13A and 13B depict beads containing peptide 1 and 2, which were mixed with the agarose and cells before the lawn was poured. The hardened lawn containing the cells and beads was then exposed to UV light (λ = 365 nm) for 10 minutes. The trays were incubated for 4 hours at 37°C before addition of LUCLITE PLUS™ reagent and subsequent imaging on the VIEWLUX® camera. The image is shown in Figure 13A and a contour graph is shown in Figure 13B.

Figure 14 is a graphical representation of the concentration response curves for agarose lawns containing CHO-6xCRE-luc$^+$ cells expressing MC1 receptor, which were plated in white (♦) or clear (■) OMNI PLATE® trays and were treated with the concentrations of [NDP]-αMSH. The trays were incubated for 4 hours at 37°C before addition of LUCLITE PLUS™ reagent and subsequent imaging on the VIEWLUX® camera. The response was calculated by subtracting the background z values from the z values for the area where peptide was delivered.

Detailed Description of the Invention

A method for screening candidate compounds for an ability to modulate the biological activity of a target is disclosed. The method comprises providing a substrate comprising a target and an indicator, the substrate adapted for receiving a plurality of candidate compounds; contacting the substrate with a plurality of candidate compound samples in a manner wherein an identity of each candidate compound can be determined and wherein the candidate compounds in the candidate compound samples interact with the target in the substrate; detecting a signal, the signal produced by the indicator upon interaction between the target and a candidate compound; and identifying a candidate compound as a modulator of the biological activity of the target based upon an amount of signal produced as compared to a control sample.

In one alternative embodiment, the method comprises providing a substrate comprising a target and an indicator, the substrate adapted for receiving a plurality of candidate compounds; contacting the substrate with a plurality of liquid candidate compound samples to form a predetermined pattern of candidate compound samples on the substrate, whereby the candidate compounds in the candidate compound samples interact with the target in the substrate within the predetermined pattern; detecting a signal within the predetermined pattern, the signal produced by the indicator upon interaction between the target and a candidate compound; and identifying a candidate compound as a modulator of the biological activity of the target based upon an amount of signal produced as compared to a control sample.

In another alternative embodiment, the method comprises: providing a substrate comprising a matrix, an indicator and a plurality of cells expressing the target, wherein the plurality of cells are suspended in the substrate, and wherein the substrate is adapted for receiving a plurality of candidate compounds; contacting the substrate with a plurality of candidate compound samples in a manner wherein an identity of each candidate compound can be determined, and wherein the candidate compounds within the candidate compound samples interact with the target within the substrate; detecting a

signal produced by the indicator upon interaction between the target and a candidate compound; and identifying a candidate compound as a modulator of the biological activity of the target based upon an amount of signal produced as compared to a control sample.

Following long-standing patent law convention, the terms "a" and "an" mean "one or more" when used in this application, including the claims.

I. General Considerations

A reporter gene construct typically comprises a plasmid containing an inducible promoter element that controls the expression of a readily measurable enzyme activity or other protein (the reporter gene). The reporter gene itself typically has a unique activity or structure to enable it to be distinguished from other proteins that are present. The activity of the reporter gene product or the messenger RNA (mRNA) for the reporter gene can provide an indirect measurement of the transcriptional activity of the promoter sequence. The inducible promotor element is inactive or weakly active with respect to transcription until the transcription factor(s) that bind to and activate the promoter are themselves activated as a consequence of receptor-mediated signal transduction. The activated promoter drives the transcription of the reporter gene, which is then quantified by assaying the mRNA, the protein product itself through fluorescence or other properties, or most commonly, the enzymatic activity of the protein product. Examples of reporter genes include but are not limited to firefly luciferase, *Renilla* luciferase SEAP, β-galactosidase, aequorin, and green fluorescent protein (GFP). See Ignar and Rees, (2000) In Kenakin, T., Angus, J.A. (eds.), *The Pharmacology of Functional, Biochemical, and Recombinant Receptor Systems, Handbook of Experimental Pharmacology*, Springer-Verlag, Heidelberg, Vol. 148:391-412, for a review of reporter gene systems and their use in pharmacology.

Reporter gene assays are used for identification of ligands for targets of interest in high throughput screening (HTS) campaigns and for secondary pharmacological profiling of compounds. Target proteins include but are not limited to G protein-coupled receptors (GPCRs), nuclear receptors, kinases,

proteases, ion channels, 1-transmembrane proteins and any other protein that modulates signal transduction pathways. Virtually any signaling event regulated by a target protein can be assessed using reporter gene systems. For instance, reporter genes have been used to assess the pharmacology of GPCRs that couple to $G\alpha_s$, $G\alpha_q$ or $G\alpha_i$ (Stratowa et al., (1995a) *Curr. Opin. Biotechnol.* 6:574-581; Ignar and Rees, (2000) In Kenakin, T., Angus, J.A. (eds.), *The Pharmacology of Functional, Biochemical, and Recombinant Receptor Systems, Handbook of Experimental Pharmacology*, Springer-Verlag, Heidelberg, Vol. 148:391-412). Modulation of intracellular cyclic AMP (cAMP) by $G\alpha_s$-linked receptors can be assessed using cAMP response elements (CREs) (Himmler et al., (1993) *Curr. Opin. Biotechnol.* 6:574-581). $G\alpha_q$-linked receptor-mediated regulation of protein kinase C-dependent signaling events can be measured using phorbol 12-myristate 13-acetate (TPA) response elements (Weyer et al., (1993) *Receptors Channels* 1:193-200; Stratowa et al. (1995b) *J. Recept. Signal Transduct. Res.* 15:617-630) and $G\alpha_q$ or $G\alpha_i$-linked receptor modulation of mitogen-activated protein kinase regulation can be assessed through use of Gal4/elk-1 or Gal4/sap1a reporter systems. Bevan et al., (1998) *Neuroreport* 9:2703-2708.

In one embodiment, the present invention discloses for the first time a method that provides a substrate comprising a matrix and a plurality of cells expressing a target and a reporter gene. The plurality of cells is suspended in the substrate, and the substrate is adapted for receiving a plurality of candidate compounds. The substrate is contacted with a plurality of candidate compound samples in a manner wherein an identity of each candidate compound can be determined. The candidate compounds within the candidate compound samples interact with the target within the substrate, and upon interaction between the target and a candidate compound, a signal produced by the reporter gene is detected. A candidate compound is identified as a modulator of the biological activity of the target based upon an amount of signal produced, and the amount of signal is preferably compared to a control sample.

II. Assay Methods

In a preferred embodiment, the assay method of the present invention pertains to a "well-less" approach to the rapid screening of a large number of candidate compounds for activity in the modulation of a target. The term "well-less" is meant to refer to the preparation and use of a substrate comprising the target or the indicator, or both, for receiving the candidate compounds to be screened. The substrate can vary in size, shape and composition, as disclosed herein. A predetermined pattern can be established on the substrate preferably through the use of an automated system, such as a PIN tool system. The use of a PIN tool facilitates the establishment of the predetermined pattern and, in turn, the predetermined pattern facilitates the detection of a response to an interaction between a candidate compound and a target.

The term "candidate compound" is meant to refer to any compound wherein the characterization of the compound's ability to modulate the biological activity of a target is desired. "Modulate" is intended to mean an increase, decrease, or other alteration of any or all biological activities or properties of a target.

Representative candidate compounds include xenobiotics such as drugs and other therapeutic agents, carcinogens and environmental pollutants, natural products, peptides and extracts, as well as endobiotics such as steroids, fatty acids and prostaglandins. Other examples of candidate compounds that can be investigated by the assay method of the present invention include, but are not restricted to, agonists and antagonists for cell membrane receptors and nuclear receptors, toxins and venoms, viral epitopes, hormones (e.g., opioid peptides, steroids, etc.), hormone receptors, peptides, enzymes, enzyme substrates, co-factors, lectins, sugars, oligonucleotides or nucleic acids, oligosaccharides, proteins, and monoclonal antibodies.

Liquid candidate compound samples are preferred for use in the assay method of the present invention. Significantly, as compared to standard well-based techniques, only a small volume of the liquid for each candidate

compound is required for use in the present assay method. For example, a 10 nanoliter (nL) sample, as opposed to a 10 microliter (μL) sample as typically required in a well-based system, can be used in accordance with the present invention. Moreover, there are more candidate compounds currently available in liquid form. Thus, the assay method of the present invention can be used to screen many more compounds as compared to prior art systems, such as those based on well-format screens.

In another embodiment, candidate compounds are disposed on the substrate by mixing beads conjugated to candidate compounds with the substrate and cells. It is also possible to establish a peptide library using the bead format so that interaction of a peptide with a receptor can also be screened.

Candidate compounds are coded to beads in a conventional manner. To initiate the assay the beads are preferably exposed to a light source, preferably an ultraviolet (UV) light source, so as to photocleave the compounds from the beads and cause diffusion of the compounds into substrate. Preferably, the beads are loaded into an empty tray as a mixture with the cells in molten substrate (e.g., agarose) so that the beads are maintained at a single location. It is then possible to pick the bead and decode the compound if a signal associated with the bead is detected. Beads are loaded onto the substrate in a beads-per-square millimeter approach. It is thus typically possible to include approximately 100,000 beads in a single 1,536-format tray.

The substrate provided in accordance with the assay method of the present invention comprises a matrix component upon or within which candidate compounds can be deposited. The matrix component can comprise any suitable material. In a preferred embodiment, agarose is employed as a matrix component in the substrate. Optionally, a low melting agarose available from GibcoBRL of Gaithersburg, Maryland is used to prepare the substrate. Low melting point agarose solidifies at room temperature such that cells can be mixed into the agarose without a

detrimental effect on viability. Low melting point agarose is also employed in some embodiments of the present invention to facilitate drying.

While agarose is a preferred matrix component of the substrate, other suitable matrix components, whether natural, synthetic or combinations thereof, as would be apparent to one of ordinary skill in the art after reviewing the disclosure of the present invention, can be used to make the substrate. For example, other biological matrix materials, including but not limited to collagen, laminin and the basement membrane derived biological cell culture substrate sold under the registered trademark MATRIGEL® by Collaborative Biomedical Products, Inc. of Bedford, Massachusetts, can be used to make the substrate. Synthetic polymer substrate materials also can be used to make the substrate.

In a preferred embodiment variables associated with the preparation of the substrate are closely monitored. For example, size, solidification time, drying time and humidity are monitored in preparing and maintaining the substrate. Representative monitoring steps are disclosed in the Examples presented below. The substrate is also preferably formed or prepared on or in a solid support, such as a standard size or custom open format assay tray (for example, the top of or inside of a lid of a standard 1,536-well assay tray) to assure that the surface area of the substrate is sufficient to accept a predetermined pattern that accommodates the preferred 1,536 samples. A customized tray or other support can also be used, wherein the footprint of the tray is preferably large enough to accommodate 1,536 samples. Preferred outer dimensions for the footprint of a customized tray are 3.365 centimeters (cm) by 5.025 cm. The growth area for the customized tray is 94 square cm. The customized tray can be purchased from Nalge Nunc International of Rochester, New York and Naperville, Illinois under the registered trademark OMNI PLATE®. Preferably, the solid support, e.g. OMNI *PLATE*® tray, is colored to facilitate detection of the signal. More preferably, the color of the solid support is white.

In an alternative embodiment, 9,600 spots of liquid, including candidate compounds and controls, are established in the predetermined pattern on the

substrate using an automated system as described herein. Thus, an aspect of the method of the present invention is to provide a substrate of a size sufficient to accommodate within the predetermined pattern on the substrate any desired multiplier of the number of pins available for use in transferring candidate compounds from a source plate or reservoir or of any desired multiplier of the number of candidates compounds available for transfer from a source plate or reservoir. The multiplier can range, for example, from 1 to 25, including preferably 2, 4, 8, 16, 20 and 25, e.g. 4 X 96 = 384, 4 X 384 =1,536; 4 x 1,536 = 6,144; and 25 X 384 = 9,600.

In a preferred embodiment, the substrate comprises a rectangle or square. However, any substrate shape suitable for a particular assay and as would be apparent to one of ordinary skill in the art after reviewing the disclosure presented herein can be implemented. Thus, for example, the substrate can comprise a triangular, circular, trapezoidal, oval or any other suitable geometrical shape. In the case of a circular or round substrate, a petri dish can be used to form the substrate.

In one embodiment of the present invention wherein cells are employed in the substrate, cells are poured onto an assay plate lid or other support. Optionally, the lid or support can be treated with a composition that improves adhesion, such as that sold under the trademark CELL-TAK® by Collaborative Biomedical Products, Inc. of Bedford, Massachusetts. Cells should preferably completely cover the entire surface of the lid or support to form a lawn or layer of cells on the lid. The cell lawn is placed on a leveled surface and a matrix component, such as agarose as disclosed above, is then poured over the cell lawn, preferably after the cells have adhered to the surface. The substrate is allowed to set up for a time sufficient to solidify and dry the matrix so that candidate compounds can be loaded. In one embodiment, the substrate is allowed to set up for 45 minutes. Thus, the matrix component forms a layer over the cell lawn and, in accordance with one embodiment of the present invention, the substrate comprises two layers, a cell layer and a matrix layer. However, in an alternative embodiment, the cells can be mixed through the

matrix component and in this case, the substrate comprises a single layer of cells and matrix.

In another embodiment, the cells can be mixed through the matrix component and in this case, the substrate comprises a single layer of cells and matrix. In the case of a suspension of cells in matrix, the suspension can be poured onto a support, such as a tray sold under the registered trademark OMNI PLATE® by Nalge Nunc International. Preferably, the support or tray comprises a white plastic to enhance the ability to detect a signal.

In an embodiment of the present invention wherein cells are suspended throughout the substrate, it is preferred that the agarose remain solid at 37°C. Agarose concentrations ranging from 0.75% to 1.5%, including 1.0% and 1.25%, are preferably employed in the substrate. For example, cells can be diluted in a medium and then a 2X concentration of the desired end concentration of matrix medium is mixed with the cells in the medium. Thus, if a 10-milliliter sample of suspended cells is provided, 10 milliliters (mL) of 2% agarose is added to the cells, and 20 milliliters of 1% agarose comprising the cells is produced. Volumes of agarose preferably range from 5 mL to 50 mL, more preferably from about 5 mL to about 20 mL. More preferred volumes are 10 mL, 15 mL or 20 mL, with 12 mL comprising a most preferred volume. Cells can be present in total numbers ranging from about 0.5 to about 10 million per 1 mL of matrix (e.g. agarose). Preferably, cells are present in numbers ranging from about 1.5 to about 3.5 million per 1 mL of matrix (e.g. agarose). About 2.5 million cells per 1 mL of matrix (e.g. agarose), i.e. 25 million cells per 10 mL of matrix, are more preferred in terms of signal and cell culture effort.

The substrate also comprises a target. The term "target" is meant to refer to any chemical or biological entity having a biological activity for which the identification of an agent that modulates the biological activity is desirable. Multiple targets can be included in a substrate. Targets can be naturally occurring or manmade molecules. Also, they can be employed in their unaltered state or as aggregates with other species. Targets can be attached, covalently or non-covalently, to a binding member, either directly or via a

specific binding substance. In a cell-based embodiment of the present invention, the target can be expressed by the cells and preferably, the cells are transfected to express the target. Indeed, cells can be transfected with multiple targets, and the screening of 1, 2, 3, 4 or more targets in a single effort is an aspect of the present invention. Additionally, different cells that express different targets can be employed in accordance with the present invention. Examples of targets which can be screened in the assay method of the present invention include, but are not restricted to, antibodies, cell membrane receptors, nuclear receptors, monoclonal antibodies and antisera reactive with specific antigenic determinants (such as on viruses, cells or other materials), drugs, oligonucleotides or nucleic acids, peptides, cofactors, lectins, sugars, polysaccharides, cells, cellular membranes, and organelles.

The substrate further comprises an indicator that identifies modulation of the biological activity of a target by a candidate compound. The term "indicator" is meant to refer to a chemical species or compound that is readily detectable using a standard detection technique, such as dark versus light detection, fluorescence or chemiluminescence spectrophotometry, scintillation spectroscopy, chromatography, liquid chromatography/mass spectroscopy (LC/MS), colorimetry, and the like. Representative indicator compounds thus include, but are not limited to, fluorogenic or fluorescent compounds, chemiluminescent compounds, colorimetric compounds, UV/VIS absorbing compounds, radionuclides and combinations thereof. A cell provided within the substrate can express the indicator, such as via a reporter gene, or the indicator can be provided in or added to the substrate. Representative reporter gene systems include a luciferase-CRE system; an NFAT-luciferase system; and/or a GAL4-ELK1 luciferase system.

Optionally, the indicator is produced by expression of the reporter gene and reaction of the reporter gene product with a signal development reagent (e.g. STEADY-GLO® reagent available from Promega Corporation of Madison, Wisconsin or LUCLITE PLUS™ reagent described in the Laboratory Examples presented below) in the matrix. In this case, the method can comprise the steps of incubating the substrate for a predetermined time at a

predetermined temperature; and contacting the substrate with a signal development reagent after the incubating step, whereby the indicator is produced by expression of the reporter gene and reaction of the reporter gene product with the signal development reagent. Representative "predetermined times" and "predetermined temperatures" are disclosed in the Examples presented below. By way of general summary, a representative predetermined time is that amount of time sufficient for expression of the reporter gene so that a sufficient concentration of reporter gene product is present in the substrate to react with the signal development reagent. Generally, a preferred predetermined time ranges from 2 hours to 6 hours, more preferably from about 4 to about 6 hours. A preferred predetermined temperature can comprise a temperature at which the cells in the substrate grow well and carry out cellular processes in a normal manner, e.g. 37°C for most cells, including mammalian cells. A preferred predetermined environment can comprise 95% oxygen (O_2) and 5% carbon dioxide (CO_2) in a humidified environment. Optionally, cells are lysed as necessary to permit and/or facilitate interact between the reporter gene product and the signal development reagent.

Any suitable cell can be used in a cell-based assay of the present invention. Representative cells include but are not limited to mammalian cells, such as Chinese hamster ovary (CHO) cells and human embryonic kidney (HEK) 293 cells; other vertebrate cells, such as melanophores from *Xenopus laevis*; insect cells; plant cells; bacterial cells; and fungal cells, such as yeast cells. Combinations of any of the foregoing cells can be used in a cell-based assay of the present invention, including but not limited to combinations of mammalian cells. Optionally, when combinations of different cells are employed, the different cells can express different targets in accordance with the present invention. Cell lines can be mixed together and dose response curves have been observed to be similar to one cell line plated alone.

In an embodiment of the present inventive method that employs candidate compounds conjugated to beads, CHO cells are preferred over melanophores in that CHO cells are believed to be less sensitive than

melanophores to UV light, which is typically used to cleave the compounds from the beads. More UV light can thus be applied to provide more efficient cleavage. As discussed in the Laboratory Examples, UV light exposure does not seem to affect signal until approximately 16 minutes of exposure. Maximal signal is obtained by about 4 hours after agonist addition, (i.e. a preferred "predetermined time"). Signal read over a period of 18 hours in the VIEWLUX® camera system remains completely stable for at least 3 hours and decreases over time after that.

Continuing with this embodiment of the present invention, the transfected CHO cells were diluted in a medium and then a 2X concentration of the desired end concentration of matrix medium is mixed with the cells in the medium. For example, if a 10-milliliter sample of suspended cells is provided, 10 milliliters of 2% agarose is added to the cells. Thus, 20 milliliters of 1% agarose comprising the cells is produced. This suspension was then poured onto a support, such as OMNI PLATE® tray sold by Naige Nunc International Inc. Preferably, the OMNI PLATE® tray comprises a white plastic to enhance the ability to detect a signal.

When agarose is used as a matrix medium, it is preferred that the agarose remain solid at 37°C. After the agarose cools and hardens, the assay for modulator compounds of receptors of interest is initiated by:

1) adding compounds using a 96 or 384 well nail tool; or
2) adding compounds photolinked to beads to a tray in molten substrate mixed with cells and exposing the lawn to UV light to cleave compound from the bead.

Preferably, the cells are incubated in agarose for a predetermined time (preferably about four (4) – six (6) hours) after initiating the assay by addition of the compounds. After a predetermined time, again preferably about 4-6 hours, LUCLITE PLUS™ reagent (a stabilized glow system containing luciferin for detection of luciferase activity – available from Packard of Meridian, Connecticut) is poured on top of the lawn, allowing lysis of the cells in the agarose and penetration of luciferin substrate into the agarose. Thus, the indicator is produced by expression of the reporter gene and reaction of the

reporter gene product with a signal development reagent (e.g. LUCLITE PLUS™ reagent) in the matrix. The signal has been observed to remain steady for at least 18 hours after addition of the substrate solution. Signal is detected using a VIEWLUX® camera system available from Wallac Oy Corporation, Turku, Finland, or any CCD camera that is or can be cooled to just greater than about -20°C.

Thus, the signal can be detected by acquiring an image of the substrate. Optionally, the image of the substrate can also be acquired by focusing the signal from the substrate on a CCD camera chip via a telecentric lens. The detecting of the signal can further comprise digitizing the image, overlaying the image with a grid comprising a plurality of grid units and determining an average gray intensity value by scanning each of a predetermined number of grid units around the signal and averaging a gray intensity value of each grid unit in the predetermined number of grid units. The term "predetermined number" as used with respect to grid units refers to any suitable number of grid units (e.g. individual boxes or rectangles within the grid) upon which an average gray intensity value can be determined with a reasonable level of confidence. The average gray intensity value represents the z value for a given signal. Optionally, the method can further comprises recording x and y co-ordinates for the signal on the substrate. Suitable software packages for imaging luminescent or other light-based signals are available, and include the ROBOIMAGE™ software package (Glaxo SmithKline, Inc., Research Triangle Park, North Carolina, USA), as well as ADOBE® PHOTOSHOP® package with FOVIA PRO™ add in (Adobe Systems Incorporated, San Jose, California, USA) and IMAGE PRO® PLUS package (Media Cybernetics, L.P., Silver Spring, Maryland, USA).

Other limits can optionally be imposed on signal characteristics to eliminate background noise and to facilitate identification and quantification of signal. Signal characteristics include diameter, intensity, circularity, concavity and volume, which are determined as described below. Volume and diameter of a signal can also be increased or decreased to facilitate correspondence between the number of rectangles available in the grid and the number of

separate signals. For example, minimum volume and diameter can be established to minimize noise and the like. An operator can also manually add other signals upon visual inspection of the tray and upon defining a diameter in pixels.

By way of additional example, volume can be determined by slicing each signal in a serial of parallel chords one pixel apart. Volume is the summation of area under each chord. Diameter can be calculated as the square root of (4*area/π). Intensity can be calculated as volume divided by area. Circularity can be calculated as 4π/(diameter X diameter). Concavity can be defined as maximum indention for the small, enclosed convex region.

When cells are employed, a variety of indicator systems can also be used. For example, *E. coli* can be transfected with a vector that encodes the luciferase protein. In this case, biological activity modulation is detected by a comparison of dark versus light in the predetermined pattern. Additionally, a FLIPR (fluorescence imaging plate reader, available from Molecular Devices of Sunnyvale, California) system can be used to detect calcium transfer via fluorescent dyes. In the calcium fluorescence system calcium that is released by a cell imparts change in fluorescence that can be detected. The cells themselves can also act as indicators, in that the detection of pigment aggregation/dispersion, cell outgrowth, cell replication, cell death and combinations thereof can be employed.

In a cell-based embodiment of the assay method of the present invention, cells can be transfected with multiple targets. The targets are chosen so that, to the extent possible, interactions between the targets are avoided. Additionally, untransfected control cells are included within the assay methods, so that apparently positive "hits" that are actually associated with endogenous molecules expressed by the cells can be excluded.

Thus, in a one embodiment, cells are suspended in the substrate and candidate compounds are disposed on the lawn using a PIN tool approach or by mixing beads conjugated to candidate compounds with cells and substrate and pouring the mixture into a tray or other suitable article in which a lawn can be formed. Preferably the cells, in addition to expressing a target receptor,

also include a reporter gene system such that transcription of the reporter gene is operably associated with interaction of a candidate compound with the target receptor. It is possible to use different reporter systems that are associated with different receptors. This enables the screening of multiple receptors in a single effort. Preferred receptors include G protein-coupled receptors and it is thus possible to identify interactions with different receptors by coupling the different receptors with different reporter genes. In a more preferred embodiment, all 7TM receptors are screened in a single effort.

Preferably, antagonist compounds are screening in a bead-based embodiment of the present invention. In screening antagonist compounds, one plates the cells mixed with beads comprising antagonist compounds, and allows the lawn to harden. The lawn is exposed to UV light and after a desired or predetermined time (e.g. 15, 30, 45 or 60 minutes), a receptor agonist added to the surface of the lawn, such as (but not limited to) by pouring a solution of agonist on the lawn. Areas of substantially no signal, as can be determined, for example, using the z value calculations disclosed herein above, are observed if the candidate compound possesses antagonist activity.

The assay method of the present invention is applicable to any target (ion channel, nuclear receptor, kinase, protease, etc) in combination with a suitable reporter gene construct. Variance of the transcriptional response element driving the production of the report gene product will confer response to different types of targets. As noted above, the CRE-luciferase, GAL4/Elk-1-luciferase, and NF-AT luciferase systems, which respond to Gs, Gi/Gq or Gq-linked GPCRs, respectively, are representative reporter gene systems.

Referring now to Figure 1, melanophores from *Xenopus laevis* are preferred cells in that they can be transfected with a variety of target molecules (for example, a transmembrane 7TM target molecule **7TM**) while maintaining their pigment response characteristics. *Xenopus* melanophores respond to external stimuli by translocating melanin granules within the cells. For example, pigment dispersion **PD** can be affected via activation of adenylyl cyclase **AC** or phospholipase C **PLC**, while pigment aggregation (not shown

in Figure 1) results from the inhibition of adenylyl cyclase AC. Melanophores contain a wide range of Gα- and $G_{\beta\gamma}$-proteins, e.g., G_s and G_q (shown in Figure 1), and G_i and G_o (not shown in Figure 1) which can couple with a foreign 7TM receptor 7TM for modulation via a ligand L.

In one embodiment of the present invention, *Xenopus* melanophores are poured onto an assay plate lid. Cells should preferably completely cover the entire surface of the lid to form a lawn or layer of cells on the lid. Then, the pigment in the cells is aggregated by adding melatonin to the cell lawn. The cell lawn is placed on a leveled surface, and agarose is then poured over the cell lawn and the plate is allowed to set for 45 minutes. Thus, the agarose forms a layer over the cell lawn and in accordance with one embodiment of the present invention, the substrate comprises two layers, a cell layer and an agarose layer.

Candidate compounds can then loaded onto the agarose layer using a PIN tool or other tool or using beads as described herein and an image of the plate is taken at time=0. Images are then recorded again at preselected interval over a specified time period, i.e. a predetermined or preselected time period for evaluation as disclosed herein below.

The assay method of the present invention can then further comprise flooding the substrate with a known ligand for a target expressed by the melanophores in the substrate in an effort to induce a change in pigment, i.e. pigment dispersion or pigment aggregation. Indeed, in a melanophore assay, both antagonist candidate compounds and agonist candidate compounds can cause either pigment dispersion or pigment aggregation, depending on the target being screened. Images are then recorded. These steps are taken to evaluate whether one of the candidate compounds modulates (i.e., inhibits or promotes, agonizes or antagonizes) the interaction between the known ligand and the target.

Since both states of intracellular pigment distribution (dispersion or aggregation) are easily detectable, numerous receptors, including 7TM receptors, can be studied by monitoring ligand-mediated pigment translocation. Therefore, a recombinant melanophore provides a powerful

tool for drug discovery research and is preferred for use in the assay of the present invention. Preferred targets also couple to the same signaling system (melanosome dispersion or aggregation) in melanophores and therefore, if combined, activation of any one receptor will not interfere with the activation of another receptor by the same or different compound.

In other cell lines, antagonists are screened in a manner analogous to that set forth above with respect to melanophores. For example, the substrate can be contacted with a ligand for the target after loading the candidate compounds. The candidate compounds interact with the target in the presence of the ligand and a signal is detected. The signal is produced, or not produced, by the indicator upon blocking an interaction between the target and the ligand by the candidate compound. The candidate compound is thus identified by a candidate compound as an antagonist of the biological activity of the target based upon an amount of signal as compared to a control sample. For example, a darker area in a substrate comprising a luminescent indicator can indicate that a reporter gene that is expresses a luminescent gene product is not being expressed.

Referring now to Figure 4, a schematic diagram of GPCR activation of CRE response elements driving transcription of luciferase in a mammalian cell **MC** is presented. As shown in Figure 4, mammalian cell **MC** comprises plasma membrane **PM**, a G-coupled protein receptor **GPCR** bound within plasma membrane **PM**, adenylyl cyclase **AC** bound within plasma membrane **PM**, cAMP response element **CREB**, protein kinase A **PK-A**, and a vector construct **VC**. Vector construct **VC** comprises CRE motif $\mathbf{CRE_m}$ (TGACGTCA – SEQ ID NO:3), a minimal promoter **MP**, and a luciferase reporter gene **LRG**. In representative embodiment of an assay method of the present invention, a candidate compound agonist **AGT** contacts mammalian cell **MC** and interacts with a plasma membrane **PM**-bound G-coupled protein receptor **GPCR**, which in turn activates adenylyl cyclase **AC** via G protein subunit $G\alpha_s$. Adenylyl cyclase **AC** interacts with cyclic AMP **cAMP**, which then interacts with protein kinase A **PK-A** and cyclic AMP response element **CREB** through its regulatory/catalytic cascade **REG-CAT** to activate transcription **TS** of vector

construct **VC**. Luciferase **LUC** is thus produced by transcription **TS** and translation **TL** of luciferase reporter gene **LRG** in vector construct **VC**. After cell lysis and adminstration of signal development reagent (collectively referenced as **CLA** in Figure 4) as disclosed herein with respect to a preferred embodiment of the present invention, a light signal **LS** is detected.

Continuing with Figure 4, activation of $G\alpha_i$ proteins causes inhibtion of adenylyl cyclase **AC**. Thus, in accordance with the present invention, one can assay for agonists of $G\alpha_i$-coupled receptors by looking at an inhibition of the stimulation of adenylyl cyclase **AC** by forskolin **FK**. In this embodiment, the substrate comprising the receptors is incubated with a candidate compound or compounds for a desired time (e.g. 30 minutes) and then forskolin **FK** is added.

A cell-free assay method is also provided in accordance with the present invention. By the term "cell free" it is meant that the substrate does not include cells and that the target, the indicator and the candidate compound are provided in a reaction medium within the substrate or are loaded onto the substrate in the predetermined pattern so that an interaction between the target, the candidate compound, the indicator or other provided reagent can be detected. A preferred example of a cell-free assay comprises an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

The term "predetermined pattern" is used herein for convenience to refer to any pattern that facilitates the localization of a signal produced by the interaction of a candidate compound with a target molecule to thereby characterize the candidate compound's ability to modulate the target.

In a preferred embodiment, the predetermined pattern comprises a rectangular pattern of "spots" or "touches" on the substrate. Rectangular patterns are preferred for convenience in that commercially available tools, such as a PIN tool, are amenable for use in establishing such a pattern. However, any predetermined pattern suitable for a particular assay and as would be apparent to one of ordinary skill in the art after reviewing the disclosure presented herein can be implemented. Thus, for example, the predetermined pattern can comprise a triangular, circular, trapezoidal, square,

oval, or any other suitable geometrical pattern. Moreover, as described in detail below, all of the available locations for a "spot" or a "touch" need not be employed in a predetermined pattern of the present invention. Beads conjugated to candidate compounds can also be loaded in a predetermined pattern.

The predetermined pattern facilitates the localization of candidate compound "touches" or "spots" on the substrate so that the identity of a candidate compound at a particular "touch" or "spot" can be established. An image of the substrate having the predetermined pattern is recorded, and subtle changes in the target and the indicator are detected, preferably using the imaging steps disclosed hereinbelow. Preferably, in the case of a rectangular pattern, a rectangular grid pattern is imposed on the substrate in the imaging steps described herein. More preferably, the rectangular grid pattern further comprises 1,536 rectangles that correspond to and provide spot locations for depositing candidate compounds and pertinent control samples on the substrate, and provide the subsequent imaging of the same. Responses are detected in a timely manner so that any consequences of diffusion of the sample in the substrate is avoided.

In a preferred embodiment, 1,536 spots of liquid, including candidate compounds and controls, are established in the predetermined pattern on the substrate using an automated system as described herein. In an alternative embodiment, 9,600 spots of liquid, including candidate compounds and controls, are established in the predetermined pattern on the substrate using an automated system as described herein. Thus, an aspect of the method of the present invention is the accommodation within the predetermined pattern of any desired multiplier of the number of pins available for use in transferring candidate compounds from a source plate or reservoir or of any desired multiplier of the number of candidates compounds available for transfer from a source plate or reservoir. The multiplier can range, for example, from 1 to 25, including preferably 2, 4, 8, 16, 20 and 25, e.g. 4 X 96 = 384, 4 X 384 =1,536; 4 x 1,536 = 6,144; and 25 X 384 = 9,600.

In another alternative embodiment, 1,280 candidate compounds and 32 standards are spotted on the substrate. In this embodiment, eight (8) columns near the right or left edge of the substrate are reserved for the reference standards to facilitate comparison of the reference standards to the candidate compounds. Each column includes 32 possible spot locations. Hence, from a starting number of 1,536 spots, a reduction of 8 columns, each column comprising 32 spot locations, results in a capacity of 1,280 spot locations for candidate compounds. The reference standards are also preferably loaded onto the substrate so that at least one empty spot location is adjacent to each reference standard both vertically and horizontally to again facilitate comparison of the reference standards to the candidate compounds. The term "predetermined pattern" as used herein is thus also meant to encompass this approach for loading candidate compounds.

Manual systems can also be employed. A preferred manual system can be used with 384 samples, including candidate compounds and controls. In view of these numbers of samples and in view of the option of screening multiple targets at once, the high throughput aspects of the present assay method are believed to be apparent. Indeed, it is envisioned that over 300,000 compounds (with controls) per day can be screened using the method of the present invention, if desired.

The assay of the present invention is also preferred for screening biological targets that have been identified to be of therapeutic value, but have been screened against >100,000 molecules without identifying any leads nor many, if any, potential modulators.

III. Assay System

Referring now to Figures 2A, 2B and 3, wherein like reference numerals refer to like parts throughout, a preferred system for use in the assay of the present invention is depicted, as is a flow chart associated with a preferred imaging technique employed in the system of the present invention.

Referring particularly to Figure 2A, the system of the present invention is referred to generally at 10. In a preferred embodiment, system 10

comprises central processing unit (CPU) **12**, destination plates **14**, plate holders **16**, plate conveyor **18**, scanning stage **20**, camera **22**, arm **24**, PIN tool **26**, PIN tool storage area **28**, wash station **30**, fan **32**, and source plate **34**. Arm **24** comprises a PIN tool **26** having a plurality of pins, which is used to deposit candidate compounds onto the substrate in accordance with the methods of the present invention as described herein. Optionally, system **10** can further comprise an incubator and wash station **30** can further comprise a blotting station (not shown in Figure 2A).

Complete versions of system **10** that are suitable for use in the methods of the present invention are commercially available from Beckman Coulter, Inc. of Fullerton, California and are sold under the trademark SAGIAN™. A suitable PIN tool system is commercially available from Beckman Coulter, Inc. of Fullerton, California, and is sold under the registered trademark BIOMEK® 2000. PIN tool systems are preferred for use in the transfer of candidate compounds from 384-well source plates to a 1,536 spot capacity destination plate. A MULTIMEK™ 96 automated 96-channel pipettor (also available from Beckman Coulter, Inc. of Fullerton, California) can be used in the transfer of candidate compounds from 96-well source plates to a 384 spot capacity destination plate.

Continuing with reference to *Figure* 2A, CPU **12** calculates and transmits appropriate control signals for all components of PIN tool system **10**. A control protocol is established, for example, using a computer program file written in Tcl language and subsequently executed by control software employed by commercially available PIN tool systems, such as the BIOMEK® BIOWORKS™ and BIOSCRIPT™ software employed in the BIOMEK® 2000 system referenced herein. The Tcl program file contains the x, y and z coordinates along with other values for system movements in a machine language format. Thus, the Tcl program file provides variables that are input into CPU **12** and that are used by the control software to generate instructions that are executed by CPU **12** as discussed in the following description. Accordingly, references to inputs received, values and procedures established, and movements controlled by CPU **12** will be understood to refer

to the Tcl program file as executed by and through the control software program or programs provided in CPU **12**. In a preferred embodiment, control signals are processed for four source plates of candidate compounds that are deposited into two assay plates for use in the assay of the present invention.

Continuing with reference to Figure 2A, locations in terms of x, y and z coordinates for arm **24** and PIN tool **26** are input into CPU **12** (as is an inclusive value for the amount of liquid dispensed and aspirated by PIN tool **26**). The number of source plates **34** is input into CPU **12**, as is the location of each source plate **34** in an x and y plane. A safe moving height (i.e., a height that facilitates clearance of structures within system **10**) for arms **24** and PIN tool **26** is established by the Tcl program file that is executed by CPU **12**, as is the height of the top of the source plates **34** and the aspiration depth for obtaining compound solution from a source plate. A typical aspiration depth for a standard 384-well source plate **34** is about 266 millimeters (mm).

Continuing with reference to Figure 2A, a location for a destination plate **14**, which supports the substrate and is carried on plate holder **16**, is established in the x and y plane, as is the top height and dispense depth for destination plate **14**. Destination plate **14** can be a destination plate or a control plate prepared as described herein. The dispensing depth for a plate that can accept 384 pins as compared to a plate that can accept 96 pins can vary. Further, for an embodiment that employs a lid of an assay plate as scaffolding for the substrate, a depth of about 267 mm is established.

Continuing with reference to Figure 2A, the location of wash stations **30** in the x and y plane are input into CPU **12**. The depth of each wash station **30** is assumed to be the same, and a z value for wash station **30** is thus also input into CPU **12**. A wash procedure is established, wherein PIN tool **26** is moved to wash stations **30** via arm **24** and control signals from CPU **12**. The wash procedure is established in CPU **12** by defining the location of a wash station **30** and providing the height of PIN tool **26** along with the location of the top and bottom of individual wash stations **30** and number of wash dips. The number of wash stations **30** to be employed and the number of up-and-down cycles (or dips) into a wash station **30** are also input into CPU **12**. The wash

procedure is looped according to the number of times the pins of PIN tool **26** are to be washed. For example, three wash up-and-down cycles can be used and thus, the wash procedure is looped three times. PIN tool **26** is then moved by CPU **12** to fan **32** for drying using the x and y coordinates for fan **32** and a safe z coordinate path along which to move PIN tool **26**.

Continuing with reference to Figure 2A, the procedure for transferring compounds from source plates **34** to destination plates **14** is established in CPU **12** by identifying the x and y locations of source plates **34** and of destination plates **14**, along with the depth for depositing compounds onto destination plates **14**. Transfers between source plates **34** and destination plates **14** are controlled by CPU **12** using the appropriate coordinates. Particularly, x and y coordinates for source plates **34** are used, along with a z safe coordinate for PIN tool **26**. Additionally, the x and y coordinates are provided for destination plates **14**, along with the appropriate depth of PIN tool **26** for dispensing compounds from source plates **34** onto destination plates **14**. In a preferred embodiment, the liquid candidate compound samples touch the surface of the substrate on destination plates **14**, but PIN tool **26** does not contact the substrate.

Referring now to Figures 2A and 2B, in a preferred embodiment, the compound transfer protocol is repeated for quadrants **Q1 - Q4** of a destination plate **14**. Quadrants **Q1 - Q4** are essentially square or rectangular and are of substantially the same size. Arm **24** is controlled by CPU **12** so that a first set of pin touches occurs in quadrant **Q1**; a second set of pin touches occurs in quadrant **Q2**, a third set of pin touches occurs in quadrant **Q3**; and a fourth set of pin touches occurs in quadrant **Q4**. In this embodiment, each set of pin touches comprises 384 individual pin touches so that 1,536 touches are provided within quadrants **Q1-Q4**. The touches of the individual pins thus provide the predetermined pattern. Arm **24** is also controlled by CPU **12** so that the pins of PIN tool **26** are washed at wash stations **30** then dried at fan **32** as described above between touches of quadrants **Q1 - Q4** and so that the pins of PIN tool **26** communicate with source plates **34** after the washes but before each touch of destination plate **14**. The compound transfer and

washing procedures are repeated as necessary until all desired compounds are transferred from source plates **34** to destination plates **14**.

Continuing with reference to Figure 2A only, after completing compound transfers and final washes, PIN tool **26** is then returned by CPU **12** to a storage area **28** using x and y coordinates for PIN tool storage area **28**, along with a z safe coordinate for PIN tool **26**. Variables established for the x, y and z locations of source plates **34**, destination plates **14**, storage location **28**, wash stations **30**, fans **32** are unset in CPU **12** so that the system **10** can be used in a subsequent application.

Continuing with reference to Figure 2A, following compound transfer, destination plates **14** are immediately transferred to the scanning stage **20** via conveyor **18** or manually. Images are collected at pre-selected intervals (e.g., 5 minutes) using a CCD camera **22** (e.g., Model 14 available from Kodak of Rochester, New York) with the lens of approximately 60 mm focal length set on aperture F22 or other suitable setting. A representative camera that can also be used is a digital CCD camera sold under the trademark MICROMAX™ by SDR Clinical Technology - Princeton Instruments of Middle Cove, New South Wales, Australia. Another representative camera system is the VIEWLUX® camera system available from Wallac Oy Corporation, Turku, Finland.

Continuing with reference to Figure 2A, images are recorded as an average of multiple acquisitions (e.g., five frames). Additional sets of plates **14** can be added to scanning stage **20** during image collection. Test and control destination plates **14** can be scanned in any order but are preferably alternately scanned in scanning stage **20**. Once images have been recorded up to a final (e.g., 30 minute) time point for the final set of test plates, the scanning schedule is stopped and all images are closed, such as by using a "close all" feature in a Microsoft Windows® operating system. The recorded images are processed by CPU **12** as described hereinbelow.

Referring now to Figure 3, an imaging protocol for use in the system **10** of the present invention is referred to generally as **110**. In box **112**, images are collected for test and control plates at time=0, and then in box **114**,

images are collected for test and control plates at a first pre-selected intervals (e.g., 5 minutes). Box **116** in Figure 3 depicts optimization of exposure time using 200/milliseconds (ms) as a starting point and using one test plate and one control plate to give z values of approximately 80% of max gray scale, also referred to herein as gray intensity or gray intensity scale for an 8 bit image. A z value refers to gray scale for an 8-bit image, which ranges from 0 to 255. Establishing a z value of approximately 80% of max gray scale for an 8 bit image for dark spots avoids overexposing the image to a "white out" and provides for a more readily detectable difference. Thus, where gray scale values can range from 0 to 255, the exposure is set to give z values of approximately 200. For light spots, z is established at approximately 20% above minimum gray scale.

Thus, the signal can be detected by acquiring an image of the substrate. Optionally, the image of the substrate can also be acquired by focusing the signal from the substrate a CCD camera chip via a telecentric lens. In this case the detecting of the signal further comprises digitizing the image, overlaying the image with a grid comprising a plurality of grid units and determining an average gray intensity value by scanning each of a predetermined number of grid units around the signal and averaging a gray intensity value of each grid unit in the predetermined number of grid units. The term "predetermined number" as used with respect to grid units refers to any suitable number of grid units (e.g. individual boxes or rectangles within the grid) upon which an average gray intensity value can be determined with a reasonable level of confidence. Optionally, the method can further comprises recording x and y co-ordinates for the signal on the substrate.

Continuing with Figure 3, box **118** provides for collecting images at additional pre-selected intervals (e.g., 5 minutes) over a pre-determined total time period (e.g., 30 minutes) and box **120** provides for saving all images by establishing a path and file name where the images are saved under an appropriate heading, such as "raw images". A file name format can be set up as follows: Mrx_date(mo/da/yr)A(first experiment that date) wherein x equals

the number of targets screened on that date or wherein x equals the name of the target.

Continuing with reference to Figure 3, in box **122**, the zero minute image of a spot on a scanned test plate is subtracted from a 30-minute image to increase contrast. In box **124**, a grid of 1,536 rectangles is added to identify pin touches, and in box **126**, pin touches or "spots" are identified by enabling an operator command, preferably a "find spots" command. In box **128**, limits are imposed on spot characteristics to eliminate background noise and to facilitate identification and quantification of spots. Spot characteristics include diameter, intensity, circularity, concavity and volume, which are determined as described below. Volume and diameter of the spots can also be increased or decreased to facilitate correspondence between the number of rectangles available in the grid and the number of spots. For example, minimum volume and diameter can be established to minimize noise and the like. Box **130** provides that if any spots are missed by a "find spots" command (i.e. Yes, spots were missed - referred to as **Y** in Figure 3), the operator can manually add the spots in box **132** upon visual inspection of the plate and upon defining a diameter in pixels and adding a circle. If no spots are missed (referred to as **N** in Figure 3), imaging proceeds directly to box **134**.

Continuing with reference to Figure 3, in box **134**, images obtained from test and control plates are compared and in box **136**, positive "hits" are identified by imposing the grid comprising 1,536 rectangles over the image of the plate, rotating the image as necessary using the grid to line up pin touches, and setting the gray scale to improve contrast. The plates are imaged, gray scale adjusted and a threshold level for a positive hit for a modulator compound of the target within the test plate is set. Positive spots on test plates are analyzed while spots found on both test and control plates are deemed endogenous hits and are not further analyzed. In box **138**, positive "hits" are identified by correlating the position of the hit in the grid comprising 1,536 rectangles to the candidate compound deposited in that position. In box **140**, the images are saved into an appropriate file or can optionally be archived onto an optical disk or CD. In box **142**, image

information is exported to appropriate word processing, spreadsheet or other software for organization and presentation.

In a preferred embodiment, volume is determined by slicing each spot in a serial of parallel chords one pixel apart. Volume is the summation of area under each chord. Diameter of a spot is calculated as the square root of (4*area/π). Intensity is calculated as volume divided by area. Circularity is calculated as 4π/(diameter X diameter). Concavity is defined as maximum indention for the small, enclosed convex region.

Any unused images are deleted, as are any greater than 30-minute images present in memory. Then, the camera/plate control and imaging procedure is activated as set forth above. Suitable WINDOWS® operating system driven commands can be provided, such as "file", "open" and "image". The term "reference" can be enabled to select a reference image from memory.

IV. Laboratory Examples

The following Laboratory Examples have been included to illustrate preferred modes of the invention. Certain aspects of the following Laboratory Examples are described in terms of techniques and procedures found or contemplated by the present inventors to work well in the practice of the invention. These Laboratory Examples are exemplified through the use of standard laboratory practices of the inventors. In light of the present disclosure and the general level of skill in the art, those of skill will appreciate that the following Laboratory Examples are intended to be representative only and that numerous changes, modifications and alterations can be employed without departing from the spirit and scope of the invention.

Materials and Methods Used in Laboratory Examples 1-6

Vectors Encoding Targets

Obtain cDNA in pJG3.6 vector, described in Graminski, G. F., et al., *J. Biol. Chem.* (1993) 268:5957-5964, or other suitable vector) for each target that is to be transfected. If several receptors are being transfected simultaneously, optimal concentrations of stock solutions usually range from

5-10 mg/mL. Also, before a screening is started on a compound set, it is recommended to have enough target encoding cDNA on hand to complete the entire compound set (for a 300K compound set, typically a range of 10-20 mg, depending on the receptor).

Other Materials and Reagents

CFM : Conditioned Fibroblast (or Frog) Media.

0.7X Trypsin/EDTA : Gibco BRL Cat # 25300-054, purchased as 1X stock.

0.7X PBS, pH 7.3: Prepared as 10X stock as: 80g/L NaCl, 2 g/L KH_2PO_4, 11.5 g/L Na_2HPO_4, 2.0 g/L KCl.

0.7X electroporation grade PBS, pH 7.0: same as PBS above except pH adjusted to pH 7.0.

0.7X L15/0.1% BSA: Cat# B2799, Sigma/Aldrich Chemical Co. of St. Louis, Missouri.

DMSO: Cat# D8779, Sigma/Aldrich Chemical Co. of St. Louis, Missouri.

Melatonin: Cat # M5250, Sigma/Aldrich Chemical Co. of St. Louis, Missouri.

800 mL Electroporation Cuvettes: Model # 58017-900, VWR Scientific Products of West Chester, Pennsylvania.

225-cm^3 tissue culture flask: Model # 3000, Costar of Oneonta, New York.

15 mL and 50 mL conical centrifuge tubes

Electroporator: ELECTRO CELL MANIPULATOR™, Model BT 600, BTX of San Diego, California.

Centrifuge: SORVALL RT6000D™, Kendro Laboratory Products, Newton, Connecticut.

SEAPLAQUE® agarose: Cat# 50101, FMC Corporation of Philadelphia, Pennsylvania.

Lids (for assay plate sold under the registered trademark OMNI PLATE®): Ref# SPO-161181, Nalge Nunc International of Rochester, New York and Naperville, Illinois

L15 w/o BSA: Cat# L-5520, Sigma Chemical Co. of St. Louis, Missouri.

Example 1

Electroporation of Melanophores for Transient Receptor Expression (DAY 01)

One to two hours prior to trypsinization, place 40 mL of fresh conditioned fibroblast (or frog) medium (CFM) onto 225 cm^3 flasks of melanophores to be transfected. Wash each flask with 5 mL 0.7X PBS, pH 7.4, and aspirate. Add 5 mL 0.7X Trypsin/EDTA to each flask and let sit 3-5 minutes. Shake flask to dislodge cells and add 10 mL CFM to each flask.

Transfer contents of each flask into 50 mL conical centrifuge tubes. Spin 900 rpm for 5 min at RT. Aspirate media and pool pellets into one 50 mL conical centrifuge tube using CFM. Count cells to obtain a given concentration. Spin tube at 900 rpm for 5 minutes. Aspirate CFM and resuspend in 40 mL 0.7X PBS, pH 7.4. Spin 900 rpm for 5 minutes. Aspirate PBS and resuspend pellet in cold electroporation grade 0.7X PBS, pH 7.0 to a final concentration of 15 X 10^6 cells/mL. Add 800 µL resuspended cells to cold microfuge tube containing mixture of cDNA. Incubate on ice for 20 min, mixing gently twice during incubation.

Transfer cDNA/cell solution to cold a 800 µL electroporation cuvette (w/o introducing bubbles). Electroporate at 500V, 625 mF, 720 ohms. Using a Pasteur pipette, immediately transfer electroporated cells to 30-40 mL of CFM. Place cells into 225 cm^3 flasks (2 cuvettes per flask) in a final volume of 45 mL CFM. Place cells on flat bench for ~3 hours. Aspirate media and replace with fresh CFM. Place cells in incubator for ~24 hours.

Example 2

Preparation of Cell Plates (DAY 02)

Wash each flask with 5 mL 0.7X PBS, pH 7.4, and aspirate. Add 5 mL 0.7X Trypsin/EDTA to each flask and let sit 2-3 minutes. Shake flask to dislodge cells and add 10 mL CFM to each flask. Transfer contents of each flask into 50 mL conical centrifuge tubes. Spin at 900 rpm for 5 min at room

temperature. Aspirate media and pool pellets into one 50 mL conical centrifuge tube using CFM. Count cells. Remove enough cells to make one 96 well plate (for quality control) at 30,000 cells per 100 µL per well. Prepare screen plates as described below.

Divide remaining cells among 50 mL conical tubes such that there are about 1-10 X 10^6 cells in 27 mL CFM per tube. Mix the tubes by inversion but avoid creation of bubbles if possible. Gently pour the cells from one tube into a assay plate lid (cells should preferably completely cover the entire surface of the lid). Place the next lid to be filled on top of the lid just filled.

Repeat the above procedure until all tubes are empty. Place an empty lid on top of the last lid filled. Repeat the above steps using control cells (e.g., PTH1-3-30 cells), making the same number of assay plate lids and one 96 well plate (for quality control). Allow the lids and plates to sit on a flat bench at ambient temperatures (e.g., 25°C) for ~2 hours. Place lids and 96 well plates in an airtight container and place in incubator for overnight (about 15-24 hours).

Example 3

Quality Control Plates (DAY 03)

Prepare 50 mL of melanophore assay buffer containing 5nM Melatonin. Serial dilute peptides (natural ligands for receptors being screened) as follows: Transfer 2 µL aliquots of 100 µM stocks of each peptide to a separate 1.5 mL microcentrifuge tube. Add 998 µL melanophore assay buffer/5nM melatonin to each tube and vortex. Transfer 20 µL of each to separate wells of a 96 well round bottom plate by placing the first peptide into well A1 of the 96-well plate, second peptide into A2, etc... Add 180 µL melanophore assay buffer/5nM melatonin to these same wells. Add 137 µL to wells B1-B8, B2-B8, etc..., as far over on the 96-well plate as done for the 20 µL transfers above. Mix row A. Transfer 63 µL from row A to row B and mix. Transfer 63 µL from row B to row C and mix. Continue this serial dilution all the way down the plate.

The working concentrations (2X) when the above dilutions are completed are as follows:

Row A	20 nM	Row E	200 pM
Row B	632 nM	Row F	63.2pM
Row C	2 nM	Row G	20 pM
Row D	632 pM	Row H	6.32 pM

Aspirate CFM from control 96-well plate. Add 50 µL 0.7 L15/0.1% BSA buffer containing 5 nM melatonin. Let plates sit 1-2 hours at room temperature. Read plates on SLT SPECTRA® plate reader (available from Kollmorgen Corporation of Waltham, Massachusetts). Add 50 µL from serial dilution plate to each well. Incubate 1 hour. Read plate on SLT SPECTRA® plate reader.

Example 4

Preparation of Cell Plates for Receiving Compounds (DAY 03)

Weigh out 1.25 g of SEAPLAQUE® agarose into a 125 mL heavy walled bottle. Add 100 mL of L15 (Leibovitz) medium w/o BSA and heat in a microwave oven, uncapped at a LOW setting for about 15-18 min. The final solution should show complete dissolution of the agarose as a clear solution. Place this in a water bath pre-heated to 42°C. Place 2 or 4 mL of agarose into 50 mL polypropylene tubes and keep them in the water bath at 42°C. The number of tubes should equal the number of plates to be prepared.

Make up 200 mL of room temperature 0.7X L15/0.1% BSA containing 18 nM melatonin. Carefully pour off the media on the lids prepared above (one at a time), remove excess media and place the lid on a level surface. Transfer 10 mL of the 0.7X L15/0.1% BSA/18nM melatonin to a one of the 50 mL tubes containing 2 mL agarose with a pipette (preferred method) or 8 mL of the 0.7X L15/0.1% BSA/18 nM melatonin to one of the 50 mL tubes containing 4 mL agarose. Use the pipette as a stirring rod while dispensing the 0.7X L15/0.1% BSA/18nM melatonin.

Immediately and carefully pour the 12 mL mixture onto a assay plate lid ensuring that entire bottom of the lid is covered. Pop any bubbles with a dry

needle. Repeat the above steps for each plate. Let assay plate lids sit at room temperature for 45 minutes. After 45 minutes, place the assay plate lids in a 95% humidified incubator (24°C) for storage until time for compound addition. These plates should be functional up to 12 hours.

Example 5

Preparation of Candidate Compound Source Plates

For each lid made containing transfected cells, remove from the freezer four 384-well source plates containing liquid candidate compound samples. Remove lids and any seal that may be on the plates. Place plates in stacks of four (plates should be kept in order using, for example, order of execution and plate numbers). Prepare sufficient 1μM αMSH in melanophore assay buffer to allow for 10 μL/well into 2 columns of every fourth drug plate. These columns provide control samples for the test plates.

The plates are marked by pipetting 10 μL of the above-referenced 1 μM αMSH solution into columns 22 and 24 of all the 384-well plates on top of each stack. Mark the end of each plate that received the 1 μM αMSH with an S (standard). The plates can also be marked by pipetting 10 μL of the above-noted 1μM αMSH solution into columns 21 and 23 of all the 384 well plates on bottom of each stack, and marking the end of each plate that received the αMSH with an S. One plate in every stack of four should now contain αMSH. Make sure the order of the plates does not change at any time.

Example 6

Compound Transfer and Assay

The Beckman BIOMEK® 2000 System is used to transfer test compounds from 4 different 384-well source plates onto to 2 melanophore-containing substrates using the BIOMEK® High-Density Replicating (HDR) PIN tool (Beckman part number 267618 -384 HDR). The HDR PIN tool contains 384 freefloating pins, which are either Posts or Nails. Posts transfer approximately 50-70 nL of each compound; nails transfer 10-30 nL. The program for compound transfer is written in Tool Command Language (Tcl),

which provides the x, y and z coordinates for the x, y and z movements of the arm of the Beckman BIOMEK® system. All plates are positioned to the back right of the plate holder.

Wash stations are loaded with 50 mL DMSO, 50 mL water and 60 mL ethanol to rinse pins thoroughly. The wash station also includes a blotting station containing a double thickness of paper towel placed inside a reservoir. All plates are positioned back and to the right of the plate holder. Transfers onto a test plate are in the order (See also Figure 2B):

1 3

2 4

For Gs/Gq agonists of the 7TM receptors expressed by the melanophores, darker spots develop on the gray cell lawn over time, directly below the HDR pin touches. Images are collected at 5-minute intervals using a CCD camera scanning stage setup (*image station*) as described herein above. Image collection and analysis are carried out according to the scanning stage layout of Table 1.

Table 1

Scanning Stage Layout

A1 Test Plate 1	A2 Control Plate 1	A3 Test Plate 2
B1 Control Plate 2	B2 Test Plate 3	B3 Control Plate 3
C1 Test Plate 4	C2 Control Plate 4	C3 Test Plate 5
D1 Control Plate 5	D2 Test Plate 6	D3 Control Plate 6

Once images are recorded up to a 30-minute timepoint for the final set of test plates, the schedule was stopped and all images were closed using the "Close All" command in the imaging system.

Examples 7-10

Mammalian Lawn Reporter Assays

Chinese hamster ovary (CHO) cells were transfected with a 6xCRE-luciferase reporter gene. A stable host cell line was selected, into which

cloned human receptors were transfected. Stable cell lines expressing these receptors were selected for screening purposes.

Materials Employed in Examples 7-10

T-225 tissue culture flasks (#3001) were obtained from Corning Costar of Cambridge, Massachusetts. DMEM/F12 (#311039-021), Fetal Bovine Serum (FBS) (#16140-071), L-glutamine (#25030-081), 0.05% trypsin (#25300-054), Dulbecco's phosphate-buffered saline (PBS) (#4190-144) and LMP Agarose (#5517UB) were purchased from Gibco BRL of Gaithersburg, Maryland. EX-CELL™ 301 Medium (#14331-79P) was from JRH BioSciences of Lenexa, Kansas. LUCLITE PLUS™ Luciferase Reporter Gene Assay Kit (#6016965) was purchased from Packard Instrument Company of Meriden, Connecticut. Chinese hamster ovary (CHO-K1) cells were obtained from the American Type Culture Collection of Manassas, Virginia. Human GLP-1 (7-36) (#6795) and human CRF peptide (1-41) (#2435) were obtained from Bachem of King of Prussia, Pennsylvania. 4-L-norleucine-7-D-phenylalanine-alpha melanocyte stimulating hormone ([NDP]-αMSH, #8764) was obtained from Sigma Chemical Co. of St. Louis, Missouri. Clear and opaque white OMNI PLATE® trays (altered footprint to accommodate HDR pin tool as disclosed herein above) were purchased from Nalge Nunc International Inc. A high-density replicating (HDR) tool, which has ninety-six 0.015-inch diameter transfer pins (#609089), was purchased from Beckman of Fullerton, California. UV lamp controlled by an AB-M H-1000 power supply box and an AB-M exposure control was purchased from ABM Inc. (San Jose, California). VIEWLUX® camera was from Wallac Oy Corporation, Turku, Finland.

Example 7

Multiple Receptor Assay

Cell lines expressing both a reporter gene and a G protein-coupled receptor (GPCR) were assayed for response to agonist in an agarose lawn format. A cell line expressing a GPCR was plated by itself, and several cell

lines expressing different GPCRs were mixed together to evaluate whether agonists for several receptors can be assayed simultaneously.

A reporter gene host cell line stably expressing a reporter construct comprising 6 cyclic AMP response elements (CREs) driving the expression of luciferase (6xCRE-luciferase$^+$) was generated as described by Goetz et al., (2000) *J. Biomolec. Screening* 5:377-384. The full-length cDNAs for melanocortin-1 receptor (MC1R) (GenBank Accession # X65634) and corticotrophin releasing factor receptor (CRHR1) (GenBank Accession # X72304) were obtained by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and were subcloned into the expression vector, pCDNA3 (Invitrogen, Carlsbad, California). The full-length cDNA for human glucagon-like peptide-1 (GLP-1) receptor (GenBank Accession # U10037) was provided by Dr. Joseph Dillon (Tufts University) and was subcloned into pCDNA3. Stable CHO-6xCRE-luc$^+$ cell lines expressing MC1R, CRHR1 or GLP-1 receptors were generated via electroporation as described by Goetz et al., (2000) *J. Biomolec. Screening* 5:377-384. The stable cell lines were propagated in T-225 tissue culture flasks in complete medium (DMEM/F12 containing 5% FBS and 2 mM L-glutamine).

Three days before assay, the cells were harvested using 0.05% trypsin, washed and resuspended in EX-CELL™ 301 medium containing 5% FBS and 2 mM glutamine at a concentration between 1 to 3 $X10^5$ cells/ml. The cell suspension was placed in spin flasks and was propagated in suspension at 37°C, 5% CO_2 in a tissue culture incubator. Eighteen hours before assay, cells were removed from suspension by centrifugation and were resuspended in serum-free EX-CELL™ 301 medium containing 2% glutamine at a concentration between $5X10^5$ to $1.5X10^6$ cells/ml.

1.5 grams of LMP agarose were dissolved in 100 ml of assay medium (DMEM/F12 medium containing 2% glutamine) in a microwave oven. The agarose was placed in a 47°C water bath until use. The cells were collected from suspension culture and were re-suspended in 60 ml of assay medium for determination of quantity of cells. The cell suspension was then further diluted to a final concentration of $2.5x10^7$ cells/6 ml. The 6 ml of cell

suspension and the melted agarose were mixed at 1:1 v/v and the mixture was then immediately poured into a white OMNI PLATE® tray. In experiments where 3 cells lines were mixed together in a lawn, the concentration was $2.5x10^7$ cells/2 ml for each cell line resulting in a total of 6 ml of cell suspension when the lines were combined. The agarose lawn of cells was then allowed to solidify at room temperature.

Solutions of peptides were then delivered to the lawn using a HDR 96-pin tool that delivers approximately 10 nanoliters (nl) of solution. After the addition of peptide, the lawns are incubated at 37°C, 5% CO_2 in a tissue culture incubator for 4 hours. 10 ml of a 1:1 mixture of LUCLITE PLUS™ reagent and PBS containing 1 mM $CaCl_2$/ 1 mM $MgCl_2$ was added to each OMNI PLATE® tray at room temperature under subdued light conditions. After 10 minutes, the excess liquid on top of the agarose lawn was removed. Luminescence was detected using a VIEWLUX® camera.

Images were acquired by focusing luminescent light from the OMNI PLATE® tray, for 90 seconds, onto a CCD camera chip via a telecentric lens. Digitized images were downloaded to a computer for image analysis using the ROBOIMAGE™ image analysis software package. Briefly, a 50 x 75 cell grid was superimposed on the image and the average gray intensity value grid unit is transferred into a Microsoft EXCEL® spreadsheet. The gray intensity was determined by scanning each grid unit to determine where the highest point in the region was located. The surrounding 9 grid units were averaged and this represented the z value for a given luminescent signal. The x and y co-ordinates were recorded to facilitate the production of graphical representations of the data.

The response of CHO-6xCRE-luc$^+$ cells expressing MC1, GLP-1 or CRH1 receptors to [NDP]-αMSH (1-13), GLP-1 (7-36), and CRH (1-41) is shown in Figures 5A-7B. Figures 5A, 6A, and 7A depict the image of luminescence emanating from the locations where solution-containing peptide was delivered to the surface of the lawn. Rows 1, 2 and 3 (top to bottom of plate) contain concentration curves for [NDP]-α-MSH, GLP-1, and CRH, respectively. Approximately 10 nanoliters (nl) of solutions containing, from

left to right, $5x10^{-4}$ M, $1.5x10^{-4}$ M, $5x10^{-5}$, $1.5x10^{-5}$ M, $5x10^{-6}$ M, and $1.5x10^{-6}$ M peptide was dispensed to the surface of the agarose lawn using the HDR pin tool. A concentration-response curve of luminescence activity was only observed when peptide was applied to the cell line expressing the appropriate receptor (e.g. GLP-1 peptide to the cell line expressing GLP-1 receptor). Note that the area of luminescence decreased with increasing size of the peptide, which could be attributed to decreased diffusion of the larger peptides.

Figures 5B, 6B, and 7B are line graph representations of the concentrations curves for each peptide. The response values were calculated by subtracting the background z values for the lawn from the z values for the area where peptide was delivered. These data support the use of a lawn format of cell lines stably expressing both a GPCR and a reporter gene construct in the assay for GPCR agonists.

Figures 8A and 8B depict the data obtained by mixing together the three stable cell lines expressing the MC1, GLP-1 or CRH receptors. The concentration-response curve data obtained with the cell mixture was very similar to the data shown in Figures 5A-7B. Thus, stable cell lines expressing a reporter gene and GPCRs can be mixed together in a lawn format for the simultaneous assay of GPCR agonists.

Example 8

Bead-Based Assay

Agonists for GPCRs were assayed using beads to which peptides or compounds are attached by a photolinker. The beads were either mixed in the agarose or were applied to the surface of the lawn. The attached compound or peptide was cleaved by exposure to UV light.

Cell culture and assay methods were as described in Example 1. Hexamer peptides were linked to 200 micrometer TENTAGEL™ microsphere beads (polystyrene core with TENTAGEL™ pegs – available from Rapp Polymere GmbH of Tübingen, Germany) by a photocleavable linker. Two peptides were tested for validation purposes: Peptide 1 - Ac-NH-Ser-Val-dHis-dPhe-Arg-Trp (SEQ ID NO:1) and Peptide 2 - Ac-NH-Val-Ala-dHis-dPhe-Arg-

Tyr (SEQ ID NO:2). Beads were added to the agarose lawn either by pushing the bead into the agarose with forceps or by suspending the beads in the melted agarose/cell mixture. Peptides were cleaved from the beads by exposure to ultraviolet light using a UV lamp set at 365 nm wavelength (λ).

A time course of the effect of ultraviolet light exposure (λ = 365 nm) on the response of a cell line expressing a reporter gene construct and the MC1 receptor to increasing concentrations of [NDP]-α-MSH is shown in Figure 9. The peptide concentrations and delivery were the same as described in Example 1. UV light exposure up to 32 minutes did not significantly affect the response to the peptide.

A time course of delivery of MC1R agonist peptides 1 and 2, which were linked to beads (described in methods), to a lawn of CHO-6CRE-luc^{+}-MC1R cells is shown in Figures 10A-10E. The peptides were cleaved from the beads by increasing the time of UV exposure. Figures 10A-10E depict UV exposure for 0, 0.5, 1, 3, and 10 minutes, respectively. A concentration-response curve for of [NDP]-α-MSH was run in row 1 on each lawn at the same concentrations as in Figure 9. Five (5) beads each of peptide 1 and 2 were pushed into the agarose layer with forceps. Peptide 1 and 2 were on the left and right of each lawn, respectively.

Figure 11A is a line graph representation of the average luminescence of the 5 beads at each time point. The response was calculated by subtracting the background z value for the lawn from the z value for each area to which the bead was applied. The magnitude of response is dictated by both the response of the reporter cell line and the amount of peptide that can be released from the beads. Both peptide 1 and 2 are full agonists for MC1R when tested in a well-based reporter assay so both peptides are capable of eliciting a response similar to [NDP]-α-MSH.

Figure 11A is a line graph representation of the [NDP]-α-MSH concentration curve from Figure 10E. The maximal response value was approximately 25. The response to both peptides 1 and 2 began to plateau at the 3-minute time point (Figure 11B) when the response value was well below the maximal response to [NDP]-α-MSH (Figure 11A). Thus, the plateau in the

magnitude of response is largely dependent on the amount of peptide that can be released from these particular beads. In the case of peptide 1, the maximal response could have also been dependent on the maximal response of the reporter gene system; however, this is certainly not the case for peptide 2. Figure 12 is a three-dimensional representation of the data from the 10-minute time point. The shaded bands from the top to bottom of each cone represent the weakening of signal as the peptide diffuses away from the initial point of delivery.

Figure 13A depicts an experiment in which peptide 1 and 2 beads were mixed with the agarose and cells before the lawn was poured. The hardened lawn containing the cells and beads was then exposed to UV light for 10 minutes. The areas of luminescence were the areas that contained beads. Figure 13B shows a contour graph of this data. Using this type of representation facilitates location of the center of the area of luminescence, and therefore, the location of the bead containing active peptide, which can be picked for retests and confirmation. These data support the assay of compounds or peptides that are delivered by release from beads. Furthermore, the beads can either be applied to the lawn or mixed together with the agarose and cells prior to pouring the lawn.

Example 9

Evaluation of White OMNI PLATE® Trays

Opaque white OMNI PLATE® trays specially designed for the lawn assay as described in methods were compared with commercially available clear OMNI PLATE® trays. The white trays were produced by adding titanium dioxide to the virgin polystyrene resin. As shown in Figure 14, it was observed that the signal to noise ratio was vastly improved using the white trays versus the clear trays. Thus, the white trays were used in Examples 7 and 8 above.

Example 10

Evaluation of LUCLITE™ Reagent

The question of whether the LUCLITE™ reagent might cause some breakdown of the compounds or codes linked to beads was raised. To address this question, the following experiment was performed.

The beads that contain a phenyl acetic acid capped analytical construct comprising a code portion (unique ratio of isotopically labeled amino acids) and a compound portion were tested. The beads with constructs linked to them were incubated for 0 minutes, 10 minutes, 1 hour, 2 hours and overnight with diluted LUCLITE™ reagent (1:1 LUCLITE™ reagent::PBS). The beads were then treated with DMF for 5 minutes. The construct was then released from the beads with trifluoroacetic acid and triethylsilane. By mass spectrometry analysis it was determined that that the LUCLITE™ reagent solution did not affect the integrity of either the code or compound portion of the construct.

This Example indicates that there is a long window of time between when the LUCLITE™ reagent is added and when the beads need to be picked out of the lawn after the trays have been imaged.

REFERENCES

The references listed below as well as all references cited in the specification are incorporated herein by reference to the extent that they supplement, explain, provide a background for or teach methodology, techniques and/or compositions employed herein.

Bevan, N., Scott, S., Shaw, P.E., Lee, M.G., Marshall, F.H., Rees, S. (1998) Nociception activates Elk-1 and Sap1a following expression of the ORL1 receptor in Chinese hamster ovary cells. *Neuroreport* 9:2703-2708.

Goetz A.S., Andrews, J.L., Littleton, T.R., Ignar, D.M. (2000) Development of a facile method for high throughput screening with reporter gene assays. *J. Biomolec. Screening* 5:377-384.

Himmler, A., Stratowa, C., Czernilofsky, A.P. (1995) Use of a luciferase reporter system for characterizing G-protein linked receptors. *Curr. Opin. Biotechnol.* 6:574-581.

Ignar, D.M., Rees, S. (2000) The study of drug-receptor interactions using reporter gene systems in mammalian cells. In Kenakin, T., Angus, J.A. (eds.), *The Pharmacology of Functional, Biochemical, and Recombinant Receptor Systems, Handbook of Experimental Pharmacology*. Springer-Verlag, Heidelberg, Vol. 148:391-412.

Stratowa, C., Himmler, A., Czernilofsky, A.P. (1995a) Use of a luciferase reporter system for characterizing G-protein linked receptors. *Curr. Opin. Biotechnol.* 6:574-581.

Stratowa, C. Machat, H., Burger, E., Himmler, A., Schafer, R., Spevak, W., Weyer, U., Wiche-Casatanon, M., Czernilofsky, A.P. (1995b) Functional characterization of the human neurokinin receptors NK1, NK3, and NK3 based on cellular assay system. *J. Recept. Signal Transduct. Res.* 15:617-630.

Weyer, U., Schafer, R., Himmler, A., Mayer, S.K., Burger, E., Czernilofsky, A.P. Stratowa C. (1993) Establishment of a cellular assay system for G protein-linked receptors: Coupling of human NK2 and 5-HT_2 receptors to phospholipase C activates a luciferase reporter gene. *Receptors Channels* 1:193-200.

The application of which this description and claims form a part can be used as a basis for priority in respect of any subsequent application. The claims of such subsequent application can be directed to any feature or combination of features described herein. They can take the form of product, composition, process or use claims and can include, by way of example and without limitation, one or more of the following claims.

It will be understood that various details of the invention can be changed without departing from the scope of the invention. Furthermore, the foregoing description is for the purpose of illustration only, and not for the purpose of limitation--the invention being defined by the claims.

CLAIMS

What is claimed is:

1. A method for screening candidate compounds for an ability to modulate the biological activity of a target, the method comprising:

(a) providing a substrate comprising a target and an indicator, the substrate adapted for receiving a plurality of candidate compounds;

(b) contacting the substrate with a plurality of candidate compound samples in a manner wherein an identity of each candidate compound can be determined and wherein the candidate compounds in the candidate compound samples interact with the target in the substrate;

(c) detecting a signal, the signal produced by the indicator upon interaction between the target and a candidate compound; and

(d) identifying a candidate compound as a modulator of the biological activity of the target based upon an amount of signal produced as compared to a control sample.

2. The method of claim 1, wherein the substrate further comprises a matrix selected from the group consisting of a biological matrix medium, a synthetic matrix medium, and combinations thereof.

3. The method of claim 2, wherein the biological matrix medium further comprising a material selected from the group consisting of agarose, collagen, laminin, basement membrane-derived complex, derivatives thereof, and combinations thereof.

4. The method of claim 3, wherein the agarose is low-melt agarose.

5. The method of claim 1, wherein the indicator is selected from the group consisting of a fluorogenic compound, a fluorescent compound,

a chemiluminescent compound, a colorimetric compound, a radiolabeled compound and combinations thereof.

6. The method of claim 1, wherein the substrate further comprises a cell.

7. The method of claim 6, wherein the cell expresses the target, the indicator, or both the target and the indicator.

8. The method of claim 7, wherein the cell expresses two or more targets.

9. The method of claim 6, wherein the cell is selected from the group consisting of a *Xenopus* melanocyte, a mammalian cell, a bacterial cell, a fungal cell and combinations thereof.

10. The method of claim 9, further comprising a combination of cells, wherein each cell within the combination of cells expresses one or more targets.

11. The method of claim 7, further comprising:

(a) contacting the substrate with a ligand for the target after loading the candidate compounds, whereby the candidate compounds interact with the target in the presence of the ligand within the predetermined pattern;

(b) detecting a signal within the predetermined pattern, the signal produced by the indicator upon blocking of an interaction between the target and the ligand; and

(c) identifying a candidate compound as a modulator of the biological activity of the target based upon an amount of signal produced as compared to a control sample.

12. The method of claim 6, further comprising a plurality of cells, wherein the cells are mixed throughout the substrate.

13. The method of claim 6, further comprising a plurality of cells, wherein the cells form a layer in the substrate.

14. The method of claim 13, wherein the substrate further comprises a matrix layer formed on the layer of cells in the substrate, wherein the matrix layer is positioned to receive the plurality of candidate compound samples.

15. The method of claim 14, wherein the matrix layer comprises a matrix selected from the group consisting of a biological matrix medium, a synthetic matrix medium, and combinations thereof.

16. The method of claim 15, wherein the biological matrix medium further comprising a material selected from the group consisting of agarose, collagen, laminin, basement membrane-derived complex, derivatives thereof, and combinations thereof.

17. The method of claim 16, wherein the agarose is low-melt agarose.

18. The method of claim 1, wherein the substrate comprises a cell-free substrate.

19. The method of claim 1, wherein the candidate compounds are conjugated to beads, and the method further comprises cleaving the candidate compounds from the beads.

20. The method of claim 19, wherein the candidate compounds are cleaved from the beads by exposing the beads to ultraviolet light.

21. The method of claim 20, wherein the beads are contacted with the substrate by mixing the beads with the cells and the matrix and pouring the mixture of beads, matrix and cells onto a support, to thereby form the substrate on the support.

22. The method of claim 1, wherein the plurality of candidate compound samples comprises liquid candidate compound samples.

23. The method of claim 1, wherein the plurality of liquid candidate compound samples comprises a number equivalent to a multiplier of a number of liquid candidate compound samples available from a source.

24. The method of claim 23, wherein the multiplier is a number ranging from 1 to 25.

25. The method of claim 24, wherein the number of liquid candidate compound samples available from the source is 96, 384 or 1,536.

26. The method of claim 1, wherein the plurality of liquid candidate compound samples comprises at least about 384 liquid candidate compound samples.

27. The method of claim 1, wherein the plurality of liquid candidate compound samples comprises at least about 1,280 liquid candidate compound samples.

28. The method of claim 1, wherein the plurality of liquid candidate compound samples comprises at least about 1,536 liquid candidate compound samples.

29. The method of claim 1, wherein the signal is detected at a plurality of time points after contacting the substrate with the plurality of liquid candidate compound samples.

30. The method of claim 29, wherein the step of identifying a candidate compound as a modulator of the biological activity of the target comprises a subtraction of a signal produced by the candidate compound at an initial time point from a signal produced by the candidate compound at a final time point.

31. The method of claim 1, wherein the amount of signal produced by a candidate compound is evaluated by analyzing a diameter of the signal, a volume of the signal, an area of the signal, a concavity of the signal, a circularity of the signal or combinations thereof.

32. The method of claim 1, wherein the substrate is contacted with the plurality of liquid candidate compound samples whereby the liquid candidate compound samples touch the surface of the substrate and a tool used to place the liquid candidate compound samples proximate to the substrate does not contact the substrate.

33. The method of claim 1, wherein the substrate is contacted with the plurality of liquid candidate compound samples whereby the liquid candidate compound samples and a tool used to deliver the liquid candidate compound samples to the substrate each contact the substrate.

34. A method for screening candidate compounds for an ability to modulate the biological activity of a target, the method comprising:

(a) providing a substrate comprising a cell that expresses the target and comprising an indicator, the substrate adapted for receiving at least about 384 candidate compounds;

(b) contacting the substrate with a plurality of liquid candidate compound samples to form a predetermined pattern of candidate compound samples on the substrate, whereby the candidate compounds within the candidate compound samples interact with the target within the predetermined pattern;

(c) detecting a signal within the predetermined pattern, the signal produced by the indicator upon interaction between the target and a candidate compound; and

(d) identifying a candidate compound as a modulator of the biological activity of the target based upon an amount of signal produced as compared to a control sample.

35. The method of claim 34, wherein the substrate further comprises a matrix selected from the group consisting of a biological matrix medium, a synthetic matrix medium, and combinations thereof.

36. The method of claim 35, wherein the biological matrix medium further comprising a material selected from the group consisting of agarose, collagen, laminin, basement membrane-derived complex, derivatives thereof, and combinations thereof.

37. The method of claim 36, wherein the agarose is low-melt agarose.

38. The method of claim 34, wherein the indicator is selected from the group consisting of a fluorogenic compound, a fluorescent compound, a chemiluminescent compound, a colorimetric compound, a radiolabeled compound and combinations thereof.

39. The method of claim 34, wherein the cell expresses the target, the indicator, or both the target and the indicator.

40. The method of claim 39, wherein the cell expresses two or more targets.

41. The method of claim 34, wherein the cell is selected from the group consisting of a *Xenopus* melanocyte, a mammalian cell, a bacterial cell, a fungal cell and combinations thereof.

42. The method of claim 34, further comprising a combination of cells, wherein each cell within the combination of cells expresses one or more targets.

43. The method of claim 34, further comprising:

(a) contacting the substrate with a ligand for the target after loading the candidate compounds, whereby the candidate compounds interact with the target in the presence of the ligand within the predetermined pattern;

(b) detecting a signal within the predetermined pattern, the signal produced by the indicator upon blocking of an interaction between the target and the ligand; and

(c) identifying a candidate compound as a modulator of the biological activity of the target based upon an amount of signal produced as compared to a control sample.

44. The method of claim 34, further comprising a plurality of cells, wherein the cells are mixed throughout the substrate.

45. The method of claim 34, further comprising a plurality of cells, wherein the cells form a layer in the substrate.

46. The method of claim 45, wherein the substrate further comprises a matrix layer formed on the layer of cells in the substrate, wherein the

matrix layer is positioned to receive the plurality of candidate compound samples.

47. The method of claim 46, wherein the matrix layer comprises a matrix selected from the group consisting of a biological matrix medium, a synthetic matrix medium, and combinations thereof.

48. The method of claim 47, wherein the biological matrix medium further comprising a material selected from the group consisting of agarose, collagen, laminin, basement membrane-derived complex, derivatives thereof, and combinations thereof.

49. The method of claim 48, wherein the agarose is low-melt agarose.

50. The method of claim 34, wherein the plurality of liquid candidate compound samples comprises a number equivalent to a multiplier of a number of liquid candidate compound samples available from a source.

51. The method of claim 50, wherein the multiplier is a number ranging from 1 to 25.

52. The method of claim 50, wherein the number of liquid candidate compound samples available from the source is 96, 384 or 1,536.

53. The method of claim 34, wherein the plurality of liquid candidate compound samples comprises at least about 384 liquid candidate compound samples.

54. The method of claim 34, wherein the plurality of liquid candidate compound samples comprises at least about 1,280 liquid candidate compound samples.

55. The method of claim 34, wherein the plurality of liquid candidate compound samples comprises at least about 1,536 liquid candidate compound samples.

56. The method of claim 34, wherein the signal is detected at a plurality of time points after contacting the substrate with the plurality of liquid candidate compound samples.

57. The method of claim 56, wherein the step of identifying a candidate compound as a modulator of the biological activity of the target comprises a subtraction of a signal produced by the candidate compound at an initial time point from a signal produced by the candidate compound at a final time point.

58. The method of claim 34, wherein the amount of signal produced by a candidate compound is evaluated by analyzing a diameter of the signal, a volume of the signal, an area of the signal, a concavity of the signal, a circularity of the signal or combinations thereof.

59. The method of claim 34, wherein the substrate is contacted with the plurality of liquid candidate compound samples whereby the liquid candidate compound samples touch the surface of the substrate and a tool used to place the liquid candidate compound samples proximate to the substrate does not contact the substrate.

60. The method of claim 34, wherein the substrate is contacted with the plurality of liquid candidate compound samples whereby the liquid candidate compound samples and a tool used to deliver the liquid candidate compound samples to the substrate each contact the substrate.

61. A method for screening candidate compounds for an ability to modulate the biological activity of a target, the method comprising:

(a) providing a substrate comprising a plurality of cells forming a layer in the substrate, where the cells express the target, the substrate further comprising an indicator, the substrate adapted for receiving at least about 1,536 candidate compounds;

(b) contacting the substrate with a plurality of liquid candidate compound samples to form a predetermined pattern of candidate compound samples on the substrate, whereby the candidate compounds within the candidate compound samples interact with the target within the predetermined pattern;

(c) detecting a signal within the predetermined pattern, the signal produced by the indicator upon interaction between the target and a candidate compound; and

(d) identifying a candidate compound as a modulator of the biological activity of the target based upon an amount of signal produced as compared to a control sample.

62. The method of claim 61, wherein the substrate further comprises a matrix layer formed on the layer of cells in the substrate, wherein the matrix layer is positioned to receive the plurality of candidate compound samples.

63. The method of claim 62, wherein the matrix layer comprises a matrix selected from the group consisting of a biological matrix medium, a synthetic matrix medium, and combinations thereof.

64. The method of claim 63, wherein the biological matrix medium further comprising a material selected from the group consisting of agarose, collagen, laminin, basement membrane-derived complex, derivatives thereof, and combinations thereof.

65. The method of claim 64, wherein the agarose is low-melt agarose.

66. The method of claim 61, wherein the indicator is selected from the group consisting of a fluorogenic compound, a fluorescent compound, a chemiluminescent compound, a colorimetric compound, a radiolabeled compound and combinations thereof.

67. The method of claim 61, wherein the cells express both the target and the indicator.

68. The method of claim 63, wherein the cell expresses two or more targets.

69. The method of claim 61, wherein the cells are selected from the group consisting of a *Xenopus* melanocyte, a mammalian cell, a bacterial cell, a fungal cell and combinations thereof.

70. The method of claim 69, further comprising a combination of cells, wherein each cell within the combination of cells expresses one or more targets.

71. The method of claim 61, further comprising:

(a) contacting the substrate with a ligand for the target after loading the candidate compounds, whereby the candidate compounds interact with the target in the presence of the ligand within the predetermined pattern;

(b) detecting a signal within the predetermined pattern, the signal produced by the indicator upon blocking of an interaction between the target and the ligand; and

(c) identifying a candidate compound as a modulator of the biological activity of the target based upon an amount of signal produced as compared to a control sample.

72. The method of claim 61, wherein the plurality of liquid candidate compound samples comprises a number equivalent to a multiplier of a number of liquid candidate compound samples available from a source.

73. The method of claim 72, wherein the multiplier is a number ranging from 1 to 25.

74. The method of claim 72, wherein the number of liquid candidate compound samples available from the source is 96, 384 or 1,536.

75. The method of claim 61, wherein the plurality of liquid candidate compound samples comprises at least about 384 liquid candidate compound samples.

76. The method of claim 61, wherein the plurality of liquid candidate compound samples comprises at least about 1,280 liquid candidate compound samples.

77. The method of claim 61, wherein the plurality of liquid candidate compound samples comprises at least about 1,536 liquid candidate compound samples.

78. The method of claim 61, wherein the signal is detected at a plurality of time points after contacting the substrate with the plurality of liquid candidate compound samples.

79. The method of claim 78, wherein the step of identifying a candidate compound as a modulator of the biological activity of the

target comprises a subtraction of a signal produced by the candidate compound at an initial time point from a signal produced by the candidate compound at a final time point.

80. The method of claim 61, wherein the amount of signal produced by a candidate compound is evaluated by analyzing a diameter of the signal, a volume of the signal, an area of the signal, a concavity of the signal, a circularity of the signal or combinations thereof.

81. The method of claim 61, wherein the substrate is contacted with the plurality of liquid candidate compound samples whereby the liquid candidate compound samples touch the surface of the substrate and a tool used to place the liquid candidate compound samples proximate to the substrate does not contact the substrate.

82. The method of claim 61, wherein the substrate is contacted with the plurality of liquid candidate compound samples whereby the liquid candidate compound samples and a tool used to deliver the liquid candidate compound samples to the substrate each contact the substrate.

83. A method for screening candidate compounds for an ability to modulate the biological activity of a target, the method comprising:

(a) providing a substrate comprising a matrix, an indicator and a plurality of cells expressing a target, wherein the plurality of cells are suspended in the substrate, and wherein the substrate is adapted for receiving a plurality of candidate compounds;

(b) contacting the substrate with a plurality of candidate compound samples in a manner wherein an identity of each candidate compound can be determined, and wherein the candidate compounds within the candidate compound samples interact with the target within the substrate;

(c) detecting a signal produced by the indicator upon interaction between the target and a candidate compound; and

(d) identifying a candidate compound as a modulator of the biological activity of the target based upon an amount of signal produced.

84. The method of claim 83, wherein the matrix further comprises a material selected from the group consisting of agarose, collagen, laminin, basement membrane-derived complex, derivatives thereof, and combinations thereof.

85. The method of claim 83, wherein the indicator is selected from the group consisting of a fluorogenic compound, a fluorescent compound, a chemiluminescent compound, a colorimetric compound, a radiolabeled compound and combinations thereof.

86. The method of claim 83, wherein the indicator is a reporter gene expressed in the cell, the reporter gene expressing a detectable gene product.

87. The method of claim 86, wherein the indicator is produced by expression of the reporter gene and reaction of the reporter gene product with a signal development reagent in the matrix.

88. The method of claim 83, wherein the cells are mammalian cells.

89. The method of claim 83, wherein the cell expresses two or more targets.

90. The method of claim 83, further comprising a combination of identical or different cells, wherein each cell within the combination of cells expresses one or more targets.

91. The method of claim 90, further comprising a combination of identical or different cells, wherein each cell within the combination of cells expresses one or more targets, and one or more reporter genes.

92. The method of claim 91, wherein the substrate further comprises a solid support that is colored to facilitate detection of the signal.

93. The method of claim 92, wherein the color of the solid support is white.

94. The method of claim 83, wherein the candidate compounds are conjugated to beads, and the method further comprises cleaving the candidate compounds from the beads.

95. The method of claim 94, wherein the candidate compounds are cleaved from the beads by exposing the beads to ultraviolet light.

96. The method of claim 95, wherein the beads are contacted with the substrate by mixing the beads with the cells and the matrix and pouring the mixture of beads, matrix and cells onto a support, to thereby form the substrate on the support.

97. The method of claim 96, further comprising the steps of:

(a) incubating the substrate for a predetermined time at a predetermined temperature; and

(b) contacting the substrate with a signal development reagent after the incubating of step (a), whereby the indicator is produced by expression of the reporter gene and reaction of the reporter gene product with the signal development reagent.

98. The method of claim 83, wherein the plurality of candidate compound samples comprise liquid candidate compound samples.

99. The method of claim 83, wherein the signal is detected by acquiring an image of the substrate.

100. The method of claim 99, wherein the image of the signal is acquired by focusing the signal from the substrate on a CCD camera chip via a telecentric lens.

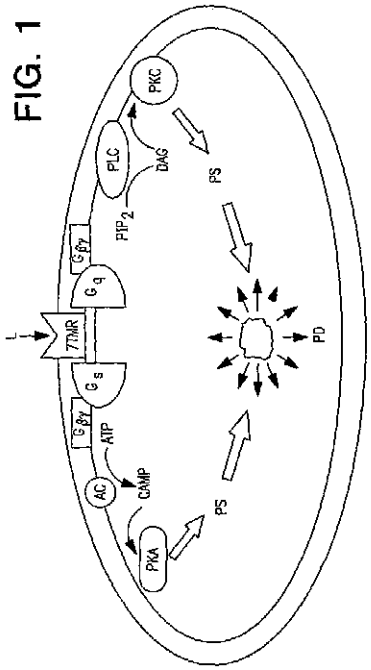
101. The method of claim 99, wherein the detecting of the signal further comprises:

(a) digitizing the image;

(b) overlaying the image with a grid comprising a plurality of grid units; and

(c) determining an average gray intensity value by scanning each of a predetermined number of grid units around the signal and averaging a gray intensity value of each grid unit in the predetermined number of grid units.

FIG. 1



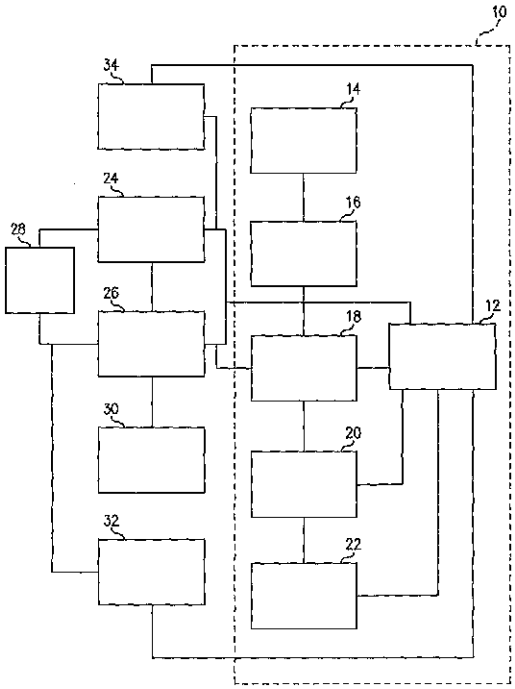


FIG. 2A

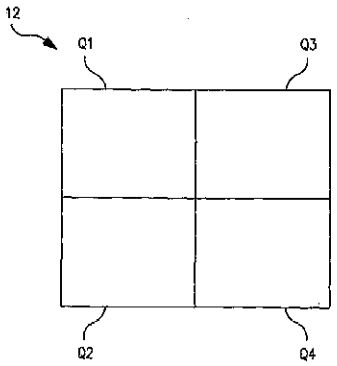


FIG. 2B

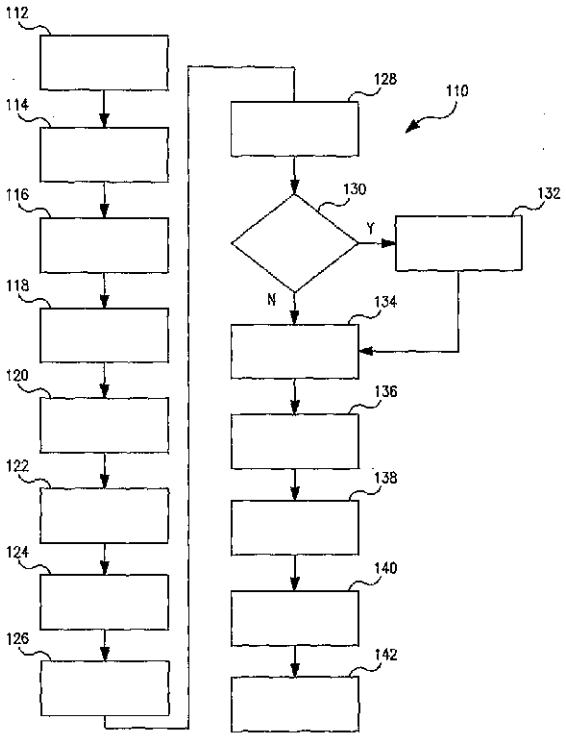

112
114
116
118
120
122
124
126
128
110
130
132
Y
N
134
136
138
140
142

FIG. 3

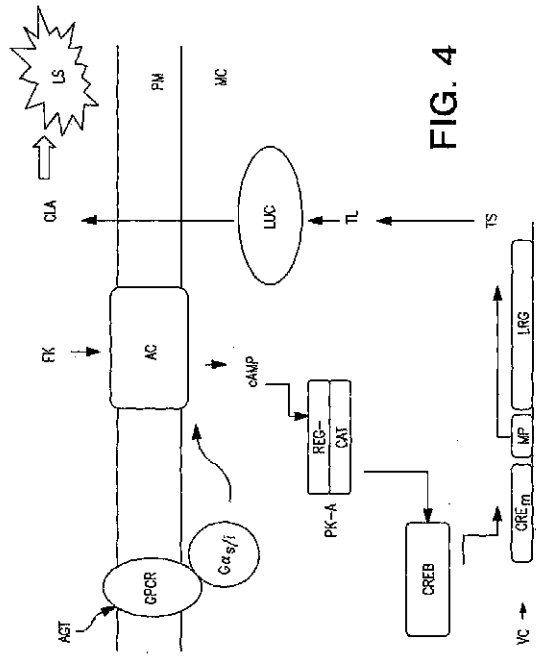

LS
PM
MC
CLA
LUC
TL
TS
FK
AC
cAMP
REG-
CAT
PK-A
LRG
MP
CREm
CREB
GPCR
AGT
VC

FIG. 4

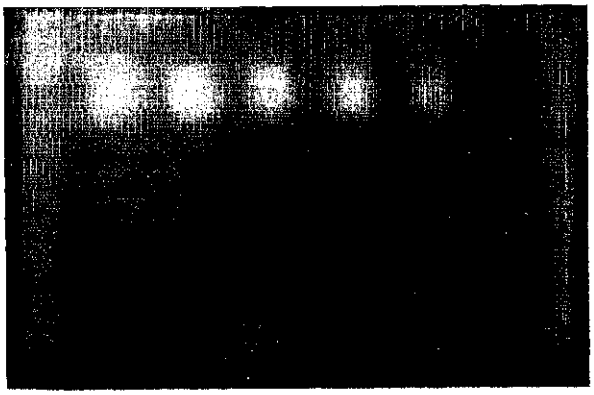


FIG. 5A

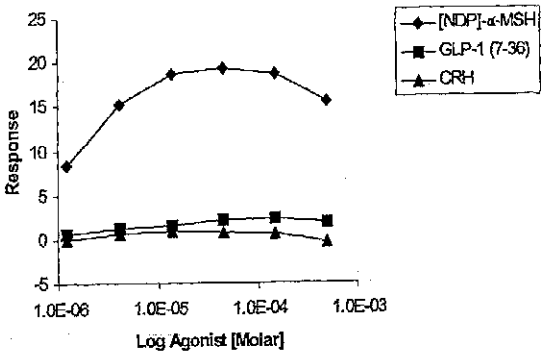

[NDP]-α-MSH
GLP-1 (7-36)
CRH
Response
25
20
15
10
5
0
-5
1.0E-06
1.0E-05
1.0E-04
1.0E-03
Log Agonist [Molar]

FIG. 5B

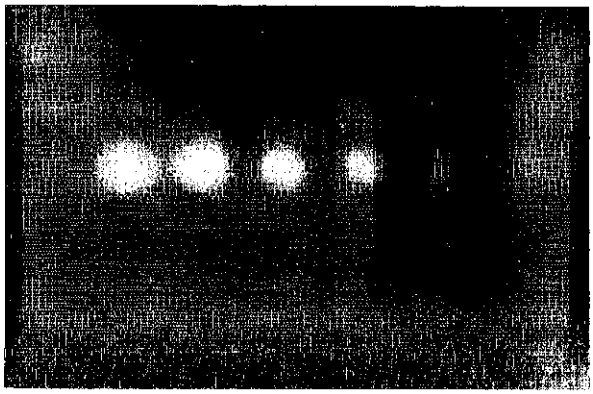


FIG. 6A

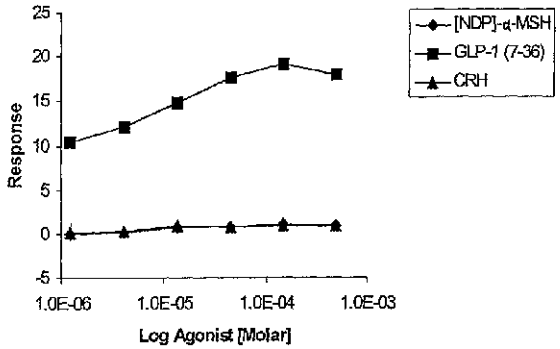

25
20
15
10
5
0
-5
Response
1.0E-06
1.0E-05
1.0E-04
1.0E-03
Log Agonist [Molar]
[NDP]-α-MSH
GLP-1 (7-36)
CRH

FIG. 6B

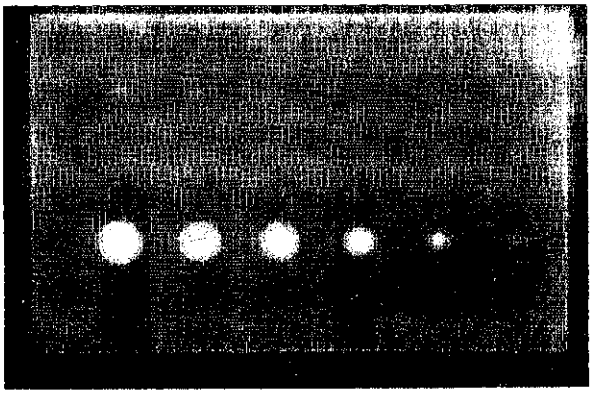


FIG. 7A

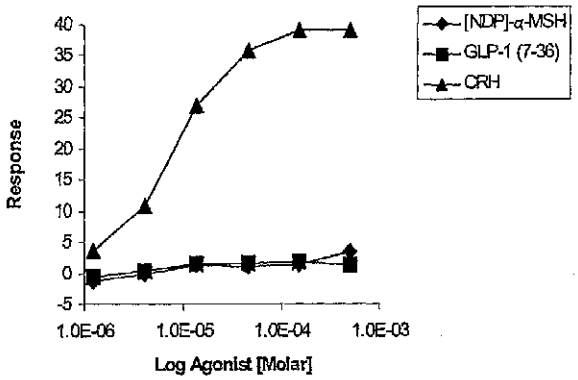

[NDP]-α-MSH
GLP-1 (7-36)
CRH
Response
40
35
30
25
20
15
10
5
0
-5
1.0E-06
1.0E-05
1.0E-04
1.0E-03
Log Agonist [Molar]

FIG. 7B

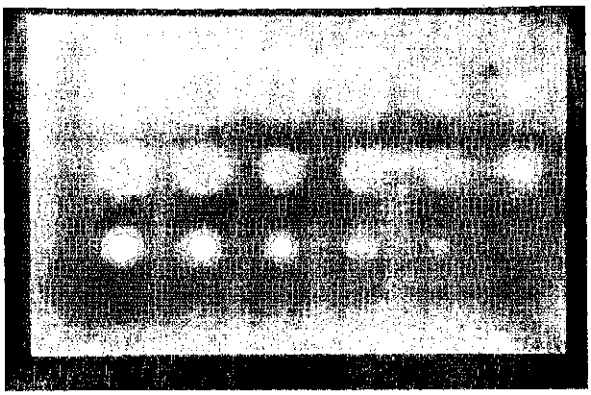


FIG. 8A

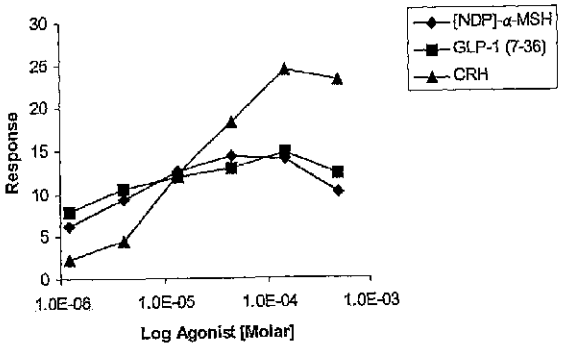

[NDP]-α-MSH
GLP-1 (7-36)
CRH
Response
30
25
20
15
10
5
0
1.0E-06
1.0E-05
1.0E-04
1.0E-03
Log Agonist [Molar]

FIG. 8B

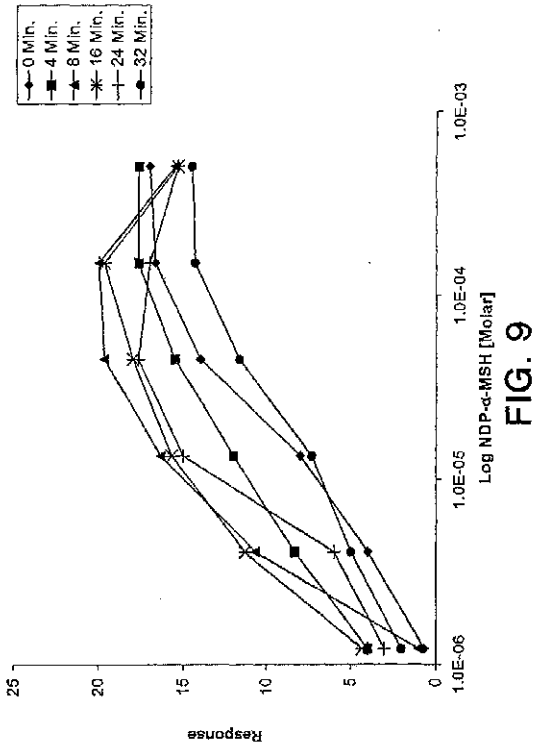

0 Min.
4 Min.
8 Min.
16 Min.
24 Min.
32 Min.
Response
25
20
15
10
5
0
1.0E-03
1.0E-04
1.0E-05
1.0E-06
Log NDP-α-MSH [Molar]

FIG. 9

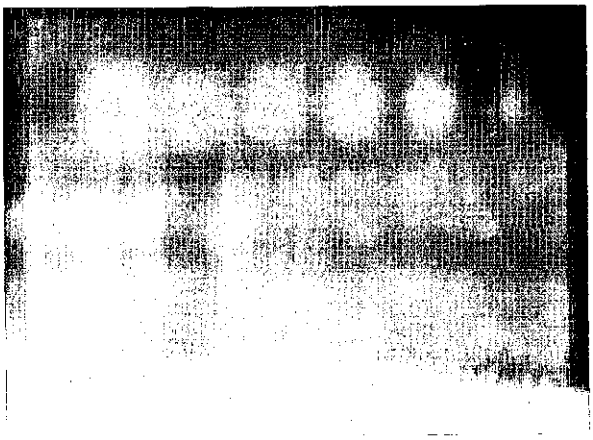


FIG. 10A

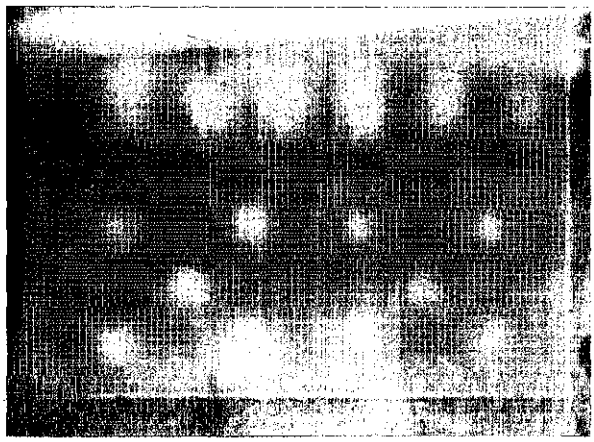


FIG. 10B

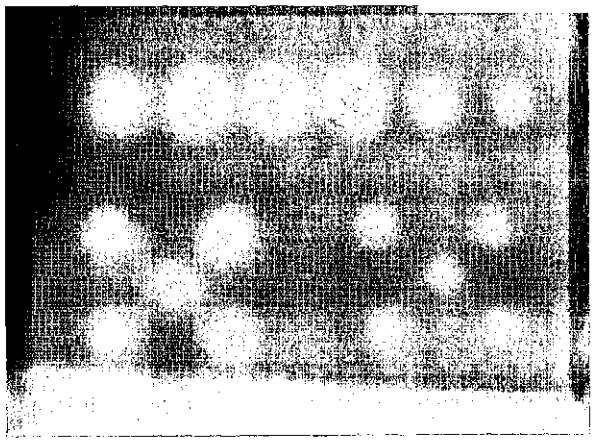


FIG. 10C

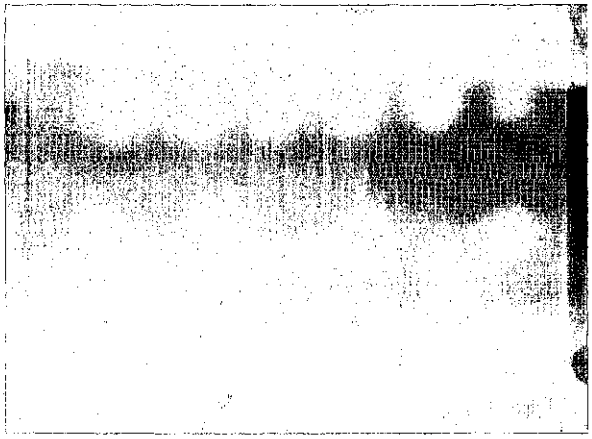


FIG. 10D

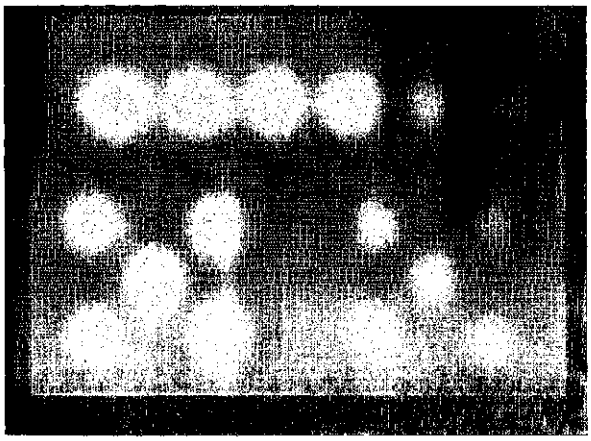


FIG. 10E

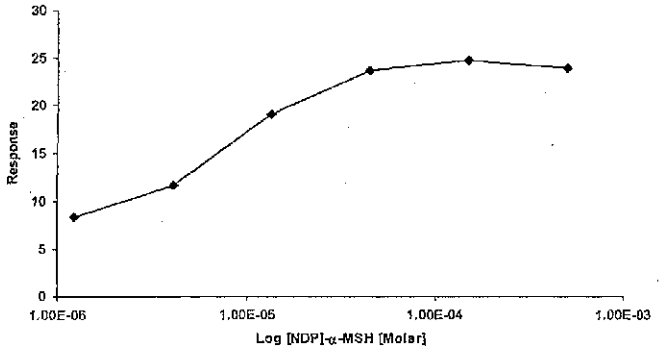


FIG. 11A

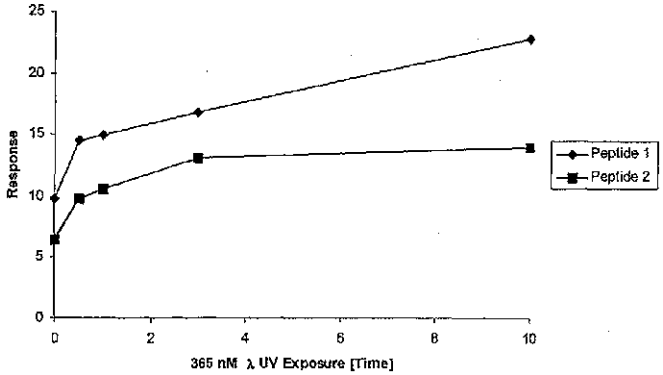


FIG. 11B

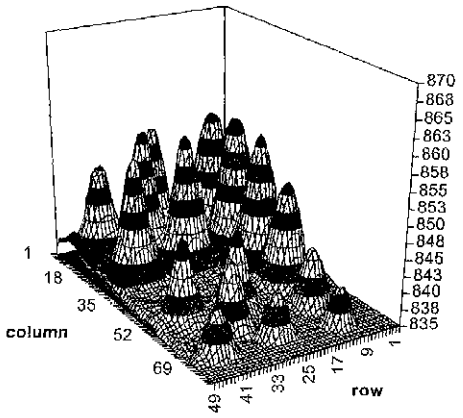

870
868
865
863
860
858
855
853
850
848
845
843
840
838
835
1
18
35
52
69
column
49
41
33
25
17
9
1
row

FIG. 12

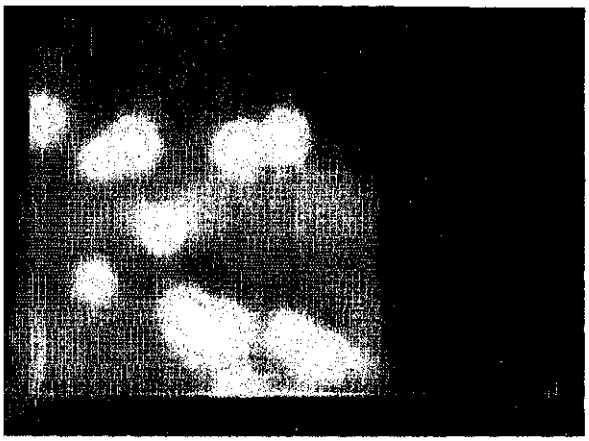


FIG. 13A

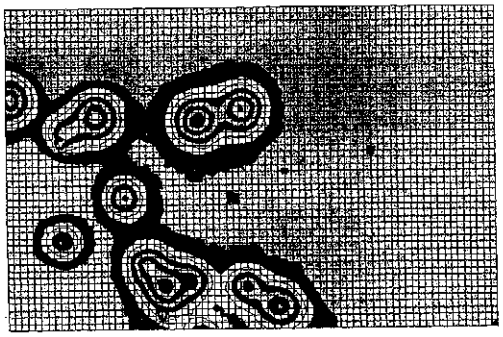


FIG. 13B

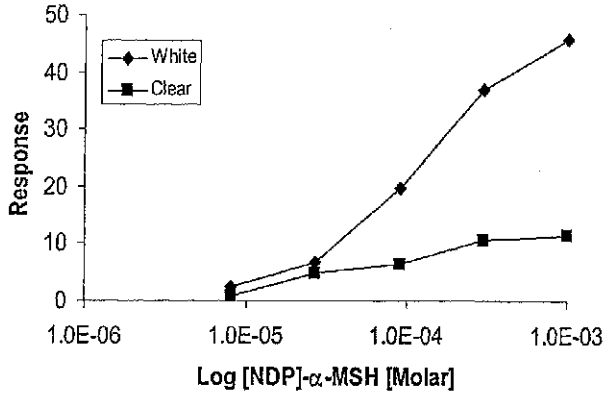

50
40
30
20
10
0
Response
White
Clear
1.0E-06
1.0E-05
1.0E-04
1.0E-03
Log [NDP]-α-MSH [Molar]

FIG. 14

PU3763WO Sequence Listing.txt
SEQUENCE LISTING

<110> GLAXO GROUP LIMITED

<120> HIGH THROUGHPUT METHOD FOR SCREENING CANDIDATE COMPOUNDS FOR BIOLOGICAL ACTIVITY

<130> Docket No. PU3763WO

<140>
<141>

<160> 3

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: MCR1 agonist peptide

<400> 1
Ser Val His Phe Arg Trp
1 5

<210> 2
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: MCR1 agonist peptide

<400> 2
Val Ala His Phe Arg Tyr
1 5

<210> 3
<211> 8

<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: cre motif

<400> 3
tgacgtca 8

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/US 01/19033

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 G01N33/548 G01N33/544 G01N33/58 G01N33/60

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)
EPO-Internal

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 00 17643 A (CELLOMICS INC ;DUMLAY R TERRY (US); GOUGH ALBERT H (US); RUBIN RIC) 30 March 2000 (2000-03-30)	1,5-13, 22-34, 38-43, 50-61, 66-83, 85-89, 91-93, 98-101
Y	the whole document	2-4, 15-17, 35-37, 46-49, 63-65,84
	--- -/--	

[X] Further documents are listed in the continuation of box C. [X] Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier document but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
27 September 2002	30/10/2002

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

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/US 01/19033

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication,where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5 854 004 A (HIMMLER ADOLF ET AL) 29 December 1998 (1998-12-29) the whole document	1,5-7,9, 11, 22-34, 39, 41-45, 51-61, 66,67, 69, 71-83, 86-88, 91-93, 98-101
X	US 5 780 258 A (CHEN JIN-LONG ET AL) 14 July 1998 (1998-07-14) claim 6	1,5-7, 11,22, 34,38, 39,41, 42,45, 83, 85-88, 90,91
X	US 6 057 114 A (AKONG MICHAEL ANTHONY ET AL) 2 May 2000 (2000-05-02) the whole document	1,5-7,9, 11, 22-34, 38,39, 41,43, 45, 51-61, 66,69, 71-83, 85,88, 98-101
Y	WO 96 30760 A (NOVONORDISK AS) 3 October 1996 (1996-10-03) abstract	2-4, 15-17, 35-37, 46-49, 63-65,84
Y	WO 96 01426 A (GRACE W R & CO) 18 January 1996 (1996-01-18) claim 4	2,3,15, 16,35, 36, 46-48, 63,64,84

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1998)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

information on patent family members

International Application No
PCT/US 01/19033

Patent document cited in search report		Publication date		Patent family member(s)		Publication date
WO 0017643	A	30-03-2000	AU	6048599	A	10-04-2000
			EP	1114320	A2	11-07-2001
			JP	2002525603	T	13-08-2002
			WO	0017643	A2	30-03-2000
US 5854004	A	29-12-1998	DE	4138621	A1	17-06-1993
			AT	165115	T	15-05-1998
			AU	668118	B2	26-04-1996
			AU	2945592	A	28-06-1993
			CA	2122356	A1	10-06-1993
			DE	59209288	D1	20-05-1998
			WO	9311257	A2	10-06-1993
			EP	0621901	A1	02-11-1994
			ES	2114951	T3	16-06-1998
			JP	7505046	T	08-06-1995
			TW	380162	B	21-01-2000
US 5780258	A	14-07-1998	AU	726014	B2	26-10-2000
			AU	4246597	A	26-03-1998
			EP	0929665	A1	21-07-1999
			JP	2000517193	T	26-12-2000
			WO	9810059	A1	12-03-1998
			US	6432654	B1	13-08-2002
US 6057114	A	02-05-2000	US	5670113	A	23-09-1997
			US	6372183	B1	16-04-2002
			AU	3416893	A	28-07-1993
			CA	2121506	A1	08-07-1993
			EP	0617791	A1	05-10-1994
			JP	3071464	B2	31-07-2000
			JP	7505710	T	22-06-1995
			WO	9313423	A1	08-07-1993
			US	6127133	A	03-10-2000
WO 9630760	A	03-10-1996	AU	5143096	A	16-10-1996
			WO	9630760	A1	03-10-1996
			EP	0817965	A1	14-01-1998
			JP	11504507	T	27-04-1999
WO 9601426	A	18-01-1996	AU	2953295	A	25-01-1996
			WO	9601426	A1	18-01-1996

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

フロントページの続き

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

(74)代理人 100118773
弁理士 藤田 節
(74)代理人 100096183
弁理士 石井 貞次
(72)発明者 ハイツリップ，ジル，エレイン
アメリカ合衆国 ２７７０９ ノースカロライナ州 リサーチ トライアングル パーク，ピー．オー．ボックス １３３９８，ファイブ ムーア ドライブ，グラクソスミスクライン
(72)発明者 イグナー，ダイアン，ミシェル
アメリカ合衆国 ２７７０９ ノースカロライナ州 リサーチ トライアングル パーク，ピー．オー．ボックス １３３９８，ファイブ ムーア ドライブ，グラクソスミスクライン
(72)発明者 ジャヤウィックレーメ，シャンナ，ケイ．
アメリカ合衆国 ２７７０９ ノースカロライナ州 リサーチ トライアングル パーク，ピー．オー．ボックス １３３９８，ファイブ ムーア ドライブ，グラクソスミスクライン
(72)発明者 キング，ホリー，ケイ
アメリカ合衆国 ２７７０９ ノースカロライナ州 リサーチ トライアングル パーク，ピー．オー．ボックス １３３９８，ファイブ ムーア ドライブ，グラクソスミスクライン
(72)発明者 リアコス，ジェームス，アーサー
アメリカ合衆国 ２７７０９ ノースカロライナ州 リサーチ トライアングル パーク，ピー．オー．ボックス １３３９８，ファイブ ムーア ドライブ，グラクソスミスクライン
(72)発明者 ヤング，キルステン，マリアン
イギリス国 エスジー１ ２エヌワイ ハートフォードシャー，スティーヴンエイジ，ガネルズウッド ロード，グラクソスミスクライン
(72)発明者 ルアン，ジェイソン，ジェイ．
アメリカ合衆国 ０２１３９ マサチューセッツ州 ケンブリッジ ファースト ストリート ２１５ ミレニウム インコーポレーテッド シー／オー
(72)発明者 サウルス，ハワード，レイ，ジュニア
アメリカ合衆国 ２７７０９ ノースカロライナ州 リサーチ トライアングル パーク，ピー．オー．ボックス １３３９８，ファイブ ムーア ドライブ，グラクソスミスクライン
(72)発明者 シャッファー，ジョエル，エドワード
アメリカ合衆国 ２７７０９ ノースカロライナ州 リサーチ トライアングル パーク，ピー．オー．ボックス １３３９８，ファイブ ムーア ドライブ，グラクソスミスクライン

Ｆターム(参考) 2G045 AA40 BA11 BB20 BB50 FB04
4B063 QA06 QA18 QQ08 QR77 QR84 QS11 QX01