

(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2012-509667

(P2012-509667A)

(43) 公表日 平成24年4月26日 (2012. 4. 26)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/06 (2006. 01)	C 1 2 Q 1/06	4 B 0 6 3
A 6 1 K 45/00 (2006. 01)	A 6 1 K 45/00	4 C 0 8 4

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 81 頁)

(21) 出願番号 特願2011-537676 (P2011-537676) (86) (22) 出願日 平成21年11月23日 (2009. 11. 23) (85) 翻訳文提出日 平成23年7月21日 (2011. 7. 21) (86) 国際出願番号 PCT/US2009/065483 (87) 国際公開番号 W02010/060019 (87) 国際公開日 平成22年5月27日 (2010. 5. 27) (31) 優先権主張番号 61/117, 450 (32) 優先日 平成20年11月24日 (2008. 11. 24) (33) 優先権主張国 米国 (US)	(71) 出願人 397068274 コーニング インコーポレイテッド アメリカ合衆国 ニューヨーク州 1 4 8 3 1 コーニング リヴァーフロント プ ラザ 1 (74) 代理人 110001025 特許業務法人藤村合同特許事務所 (72) 発明者 ファン イェ アメリカ合衆国 ニューヨーク州 1 4 8 7 0 ペインテッドポスト コンホクトン ロード 3 4 3 3 (72) 発明者 フェリエ アン エム. アメリカ合衆国 ニューヨーク州 1 4 8 7 0 ペインテッドポスト ウッドクレス トドライブ 9 3 6 4 最終頁に続く
---	---

(54) 【発明の名称】 分子を特徴付けるための方法

(57) 【要約】

創薬は、多くの挑戦に直面している複雑な仕事であり、多くの有望な候補が、病気の乏しい理解のためクリニックで効力がないかまたは毒性であると判明するように、少なからず、高い加害率を有する。従って、それらは生物学システムをターゲットにする。それ故、創薬の生産性を上昇させるために、薬剤ターゲットの完全な生物学的コンテキストおよび個々の遺伝子とタンパク質を越えた動きを考慮して、病気の分子機構のはるかにより深い理解を必要とすることについて、概して同意する。本方法は、活動のモード、毒性、あらゆる分子のターゲットおよび経路を体系的に示すためにラベルフリー細胞分析、特にDMRインデックスの使用に頼る。

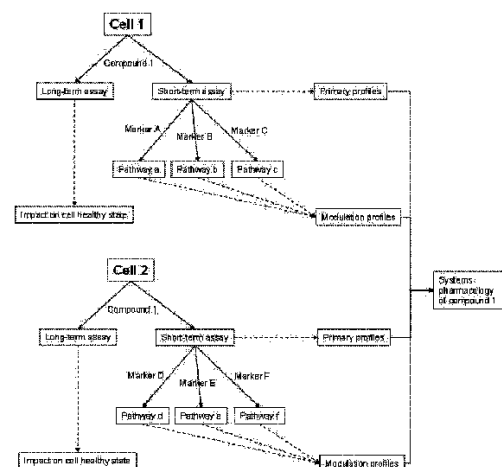


FIG. 1

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

分子を特徴付けるための方法であって、

a. 必要に応じて 1 次プロファイルを生成している分子のバイオセンサ反応を収集するステップと、

b. 2 次プロファイルを生成している前記分子の存在下において細胞パネルにおけるマーカパネルのバイオセンサ反応を収集するステップと、

c. 各バイオセンサシグナルバイオセンサパラメータの特定のセットを抽出するステップと、

d. ポジティブコントロールに対して各バイオセンサパラメータを規格化して変調比較を生成するステップと、 10

e. 前記マーカパネルまたは前記細胞パネルの関数として少なくとも 1 つのバイオセンサパラメータの前記変調比較をプロットして分子変調インデックスを生成するステップと、

f. 必要に応じて、前記分子の前記 1 次プロファイルと前記分子変調インデックスとを組み合わせる分子バイオセンサインデックスを生成するステップと、

g. 前記分子バイオセンサインデックスとモジュレータバイオセンサインデックスのライブラリとを比較するステップと、を含むことを特徴とする方法。

【請求項 2】

前記バイオセンサは DMR を検出することを特徴とする請求項 1 に記載の方法。 20

【請求項 3】

前記分子バイオセンサインデックスにおける 1 つ以上の分子変調プロファイルに類似する前記モジュレータバイオセンサインデックスにおける 1 以上のマーカ変調プロファイルを特定するステップを更に含むことを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記分子は、前記分子バイオセンサインデックスが前記モジュレータバイオセンサインデックスに類似するとき、前記モジュレータと活動の類似したモードを共有することを特徴とする請求項 2 に記載の方法。

【請求項 5】

前記ステップ a は、アゴニストモードにおいて実施されることを特徴とする請求項 1 に記載の方法。 30

【請求項 6】

前記ステップ d における前記ポジティブコントロールは、前記細胞のサンプルが前記マーカのみによって処理されているときに生成されたマーカの 1 次プロファイルを含むことを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

前記変調比較は、増強を含むことを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 8】

前記変調比較は、抑制を含むことを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 9】

前記変調比較は、非変調を含むことを特徴とする請求項 1 に記載の方法。 40

【請求項 10】

前記モジュレータバイオセンサインデックスのライブラリは分子変調インデックスを含むことを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 11】

前記モジュレータバイオセンサインデックスのライブラリは分子バイオセンサインデックスを含むことを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 12】

前記モジュレータバイオセンサインデックスのライブラリは、同一の細胞パネルのための同一マーカパネルに対して異なる分子を含むことを特徴とする請求項 1 に記載の方法。 50

【請求項 13】

前記分子バイオセンサインデックスとモジュレータバイオセンサインデックスとの間の類似性は、活動のモードのインジケータとして使用されることを特徴とする請求項 3 に記載の方法。

【請求項 14】

前記類似性は前記分子バイオセンサインデックス間のパターン認識分析に基づいていることを特徴とする請求項 3 に記載の方法。

【請求項 15】

前記類似性は前記分子変調インデックス間のパターン認識分析に基づいていることを特徴とする請求項 3 に記載の方法。

【請求項 16】

前記類似性は前記分子変調インデックスに関するスコアのマトリックスに基づいていることを特徴とする請求項 3 に記載の方法。

【請求項 17】

前記マーカパネルは、リガンドのライブラリから選択され、前記リガンドの各々は細胞における特定の細胞シグナリング経路を示すバイオセンサシグナルを生成していることを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 18】

細胞におけるマーカの不存在下または存在下において前記分子の長期間バイオセンサシグナルを生成するステップをさらに含むことを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 19】

前記マーカは前記分子が前記細胞に添加される前、またはそのとき、またはその後に添加されることを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 20】

前記細胞パネルは、特定の病気に関連する細胞のタイプ、特定の起源からの細胞のタイプ、特定のターゲットに関連する細胞のタイプ、特定の生理学的機能に関連する細胞のタイプ、を含むことを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 21】

前記細胞パネルは、体内に生じた細胞、操作された細胞、変形された細胞、不死化された細胞、主要な細胞、胚幹細胞、成体幹細胞、癌幹細胞、幹細胞由来細胞を含むことを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 22】

前記ステップ (a) は、前記細胞を特定の投与量の分子と接触させるステップを含むことを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 23】

前記特定の投与量は $1 \mu\text{M}$ 、 $5 \mu\text{M}$ 、 $10 \mu\text{M}$ 、 $50 \mu\text{M}$ から選択される所定の分子濃度であることを特徴とする請求項 22 に記載の方法。

【請求項 24】

前記特定の投与量は 1 ng/ml 、 10 ng/ml 、 100 ng/ml 、 $1 \mu\text{g/ml}$ 、 $10 \mu\text{g/ml}$ 、 $100 \mu\text{g/ml}$ から選択される所定の分子濃度であることを特徴とする請求項 22 に記載の方法。

【請求項 25】

前記特定の投与量は、前記細胞におけるバイオセンサシグナルを誘発するために、マーカの EC_{50} 、 EC_{80} 、 EC_{90} 、 EC_{95} 、 EC_{100} であることを特徴とする請求項 22 に記載の方法。

【請求項 26】

前記ステップ (b) は、前記細胞を前記マーカパネルにおける特定の投与量のマーカと接触させるステップを含むことを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 27】

前記ステップ (b) は、前記細胞をある期間リガンドに接触させ、その後前記細胞を前

10

20

30

40

50

記マーカに接触させるステップを含むことを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 28】

前記ステップ (b) は、前記細胞をある期間前記マーカに接触させ、その後前記細胞を前記分子に接触させるステップを含むことを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 29】

前記ステップ (b) は、前記細胞を前記マーカおよび前記分子に同時に接触させるステップを含むことを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 30】

前記ステップ (d) は、

(1) マーカの 1 次プロファイルの P-DMR の振幅と、前記マーカに対する前記分子の 2 次プロファイルの P-DMR の振幅

(2) マーカの 1 次プロファイルの N-DMR の振幅と、前記マーカに対する前記分子の 2 次プロファイルの N-DMR の振幅

(3) マーカの 1 次プロファイルの R P-DMR の振幅と、前記マーカに対する前記分子の 2 次プロファイルの R P-DMR の振幅

またはこれらの組み合わせを比較するステップを含むことを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 31】

前記変調比較は変調差、変調割合またはこれらの組み合わせを含むことを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 32】

インデックスを生成する方法であって、

a. 1 より多いマーカに対する分子の変調プロファイルを収集するステップと、

b. インデックスにおける前記分子の変調比較をリストアップするステップと、を含むことを特徴とする方法。

【請求項 33】

変調インデックスは 1 つの細胞タイプにおいておよび複数のマーカに関して得られることを特徴とする請求項 32 に記載の方法。

【請求項 34】

変調インデックスは複数の細胞タイプにおいておよび単一のマーカに関して得られることを特徴とする請求項 32 に記載の方法。

【請求項 35】

変調インデックスは複数の細胞のタイプにおいておよび複数のマーカに関して得られることを特徴とする請求項 32 に記載の方法。

【請求項 36】

変調インデックスは複数のマーカに関して得られることを特徴とする請求項 32 に記載の方法。

【請求項 37】

創薬の方法であって、

a. 未知の分子インデックスと既知のモジュレーターインデックスとを比較するステップと、

b. 未知の分子リガンドインデックスが前記既知のモジュレーターインデックスと類似しているかどうか判定するステップと、を含むことを特徴とする方法。

【請求項 38】

分子を特徴付けるための方法であって、

a. 細胞をマーカに接触させるステップと、

b. 前記細胞の前記マーカに対する反応を分析して 1 次プロファイルを得るステップと、

、

c. 細胞をマーカおよび分子に接触させるステップと、

d. 前記細胞の前記マーカおよび前記分子に対する反応を分析して変調プロファイルを

10

20

30

40

50

得るステップと、を含むことを特徴とする方法。

【請求項 39】

分子を特徴付けるための方法であって、

- a. 細胞をマーカおよび分子に接触させるステップと、
- b. 前記細胞の前記マーカおよび前記分子に対する反応を分析するステップと、を含むことを特徴とする方法。

【請求項 40】

先行するステップの後に前記分子を合成するステップを更に含むことを特徴とする請求項 39 に記載の方法。

【請求項 41】

前記分子の派生物のライブラリを制作するステップを更に含むことを特徴とする請求項 40 に記載の方法。

【請求項 42】

1 以上のステップは機械で実行されることを特徴とする請求項 41 に記載の方法。

【請求項 43】

前記機械は汎用コンピュータであることを特徴とする請求項 42 に記載の方法。

【請求項 44】

前記機械はバイオセンサであることを特徴とする請求項 43 に記載の方法。

【請求項 45】

組成を作成する方法であって、

分子を合成するステップを含み、前記分子は分子として特徴付けられ、分子インデックスは、モジュレータインデックスに対して類似性を有し、請求項 1 に記載の方法を用いて特定され得ることを特徴とする方法。

【請求項 46】

請求項 45 のプロセスによって製造された製造物。

【請求項 47】

バイオセンサ細胞分析を使用して分子をスクリーニングする方法であって、

- a. 細胞のパネルを選択するステップと、
- b. 各々が前記細胞パネルにおける各細胞に対応するように複数のマーカのパネルを選択するステップと、
- c. 分子処理された細胞のパネルを生成している分子でパネルにおける各細胞を処理するステップと、
- d. バイオセンサ反応をモニタリングして前記分子の 1 次プロファイルのパネルを各細胞に関して生成するステップと、
- e. マーカパネルの各マーカを、分子処理された細胞のパネルの各細胞に個別に特定の投与量で加えるステップと、
- f. バイオセンサ反応をモニタリングして、マーカのバイオセンシングナルに影響を与えている分子の 2 次プロファイルのパネルを各マーカに関して生成するステップと、
- g. 前記細胞のパネルに亘るおよび前記マーカのパネルに対する分子バイオセンサインデックスを生成するステップと、
- h. 前記分子バイオセンサインデックスと既知のモジュレータバイオセンサインデックスとを比較するステップと、を含み、

前記分子バイオセンサインデックスと前記モジュレータバイオセンサインデックスとの間の類似性が前記分子の活動のモードに関するインジケータであることを特徴とする方法。

【請求項 48】

前記細胞のパネルは特定の病気、特定の細胞ターゲット、特定の起源に関連し、または特定の人間生理学および病態生理学の代表であることを特徴とする請求項 47 に記載の方法。

【請求項 49】

少なくとも1つの細胞システムが前記細胞のパネルに含まれることを特徴とする請求項48に記載の方法。

【請求項50】

前記細胞システムは、2つの細胞のタイプからなることを特徴とする請求項49に記載の方法。

【請求項51】

前記ステップeにおける特定の投与量は、前記細胞におけるバイオセンシング信号を誘発するために、少なくともそのEC₅₀、EC₈₀、EC₉₀、EC₉₅、EC₁₀₀である濃度を含むことを特徴とする請求項47に記載の方法。

【請求項52】

分子を特徴付けるための方法であって、

a. 既知のリガンドのパネルで細胞のパネルをパニングして前記既知のリガンドが所定の細胞タイプにおいて強いバイオセンシング信号を誘発できるかどうかを判定するステップと、

b. マーカとして強いバイオセンシング信号を誘発し得る既知のリガンドを選択し、所定の細胞タイプのためのマーカのライブラリを生成するステップと、

c. 特定の細胞タイプにおいてバイオセンシング信号を誘発するその能力に関する各マーカの潜在力および効能を判定するステップと、

d. 特定の細胞タイプにおいて各マーカによって誘発されたシグナリング経路およびネットワーク相互作用を割り出すステップと、

e. 各細胞タイプに関するマーカのパネルをダウンセレクトするステップと、

f. 前記分子の1次プロファイルのパネルを生成するために、前記細胞のパネルにおいてバイオセンシング信号を誘発する前記分子の能力を調べ、および前記マーカパネルに対する前記分子の2次プロファイルまたは変調プロファイルのパネルを生成するために、前記細胞のパネルにおいてマーカ誘導されたバイオセンシング信号を変調する前記分子の能力を調べる分析を実施するステップと、

g. 分子バイオセンサインデックスを生成するステップと、

h. 前記分子バイオセンサインデックスと既知のモジュレータバイオセンサインデックスのライブラリを比較するステップと、を含むことを特徴とする方法。

【請求項53】

分子を特徴付けるための方法であって、

a. 1次プロファイルを生成している分子のDMR反応を収集するステップと、

b. 2次プロファイルを生成している分子の存在下において、細胞パネルにおけるマーカパネルのDMR反応を収集するステップと、

c. バイオセンシング信号の各々からDMRパラメータの特定のセットを抽出するステップと、

d. ポジティブコントロールに対して各DMRパラメータを規格化して変調比較を生成するステップと、

e. 前記マーカパネルまたは前記細胞パネルの関数として少なくとも1つのバイオセンサパラメータの前記変調比較をプロットして分子変調インデックスを生成するステップと、

f. 必要に応じて、前記分子の前記1次プロファイルと前記分子変調インデックスを組み合わせて分子DMRインデックスを生成するステップと、

g. 前記分子DMRインデックスとモジュレータDMRインデックスのライブラリを比較するステップとを含むことを特徴とする方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

I. 背景

2. 本開示は、共鳴導波グレーティング (RWG: resonant waveguide grating) バイオセンサまたは表面プラズモン共鳴 (SPR: surface plasmon resonance) バイオセンサまたは電気バイオセンサの如きバイオセンサに関し、特に分子を特徴付ける上記のバイオセンサの使用に関する。また、本開示は、分子に関するインデックスの生成方法および創薬の方法に関する。

【発明の概要】

【0002】

II. 概要

3. 本開示は、ラベルフリーバイオセンサ細胞分析を用いる分子を特徴付けるための方法、組成、製品および機械を提供し、リガンドを含む分子のシステム生物学およびシステム薬理学分析および創薬の実施を提供する。また、本開示は、特定の分子に関するインデックスを生成するための方法、組成、製品および装置を提供し、あらゆる分子の活動のモードを判定するために異なる分子のインデックスの比較分析を使用する方法を提供する。

【図面の簡単な説明】

【0003】

III. 図面の簡単な説明

【図1】図1は、本開示の実施例における、創薬のための細胞プロファイル薬理学アプローチの図を示す。

【図2】図2は、本開示の実施例における、創薬のための細胞プロファイル薬理学アプローチの例を示す。

【図3A】図3Aは、開示の実施例における、16の異なるリガンドの1次プロファイルを示す。各リガンドは10 μ Mであり、A549細胞に作用している。

【図3B】図3Bは、開示の実施例における、16の異なるリガンドの1次プロファイルを示す。各リガンドは10 μ Mであり、A549細胞に作用している。

【図4】図4は、本開示の実施例における、A431細胞に作用しているビヒクル溶液の1次プロファイル（ネガティブコントロール）と比較した静止状態のA431細胞に作用している32 nMの上皮増殖因子（EGF）の1次プロファイルを示す。

【図5】図5は、本開示の実施例における、静止状態のA431細胞に作用している32 nMのEGFの1次プロファイル（コントロール）および4つの異なるリガンドの2次プロファイルを示す。2次プロファイルの各々は、各リガンド（BLM-265、AG1478、U0126、ロットレリン）による細胞の約1時間の前処理の後、32 nMのEGFに対するA431細胞の光学反応を測定することにより得られた。

【図6A】図6Aは、リガンドのパネルによって32 nMのEGF誘導された静止状態のA431細胞の光シグナルの変調プロファイルの例を示す。リガンドの不存在下および存在下におけるA431細胞のEGF DMRシグナルの3つの光学反応パラメータは、リガンドの関数として分析されプロットされた。3つのパラメータは、A431細胞のEGF DMRシグナルの（A）P-DMR（ポジティブDMR）、（B）N-DMR（ネガティブDMR）、（C）RP-DMR（リカバリポジティブDMR）の振幅である。あらゆる分子による前処理なしの分子のDMRシグナルは、ポジティブコントロール（ポジティブ）として使用され、一方、ビヒクルのみ（すなわち分析緩衝液）で処理された細胞のDMRシグナルはネガティブコントロールとして使用された。

【図6B】図6Bは、リガンドのパネルによって32 nMのEGF誘導された静止状態のA431細胞の光シグナルの変調プロファイルの例を示す。リガンドの不存在下および存在下におけるA431細胞のEGF DMRシグナルの3つの光学反応パラメータは、リガンドの関数として分析されプロットされた。3つのパラメータは、A431細胞のEGF DMRシグナルの（A）P-DMR（ポジティブDMR）、（B）N-DMR（ネガティブDMR）、（C）RP-DMR（リカバリポジティブDMR）の振幅である。あらゆる分子による前処理なしの分子のDMRシグナルは、ポジティブコントロール（ポジティブ）として使用され、一方、ビヒクルのみ（すなわち分析緩衝液）で処理された細胞のDMRシグナルはネガティブコントロールとして使用された。

【図6C】図6Cは、リガンドのパネルによって32nMのEGF誘導された静止状態のA431細胞の光シグナルの変調プロファイルの例を示す。リガンドの不存在下および存在下におけるA431細胞のEGF DMRシグナルの3つの光学反応パラメータは、リガンドの関数として分析されプロットされた。3つのパラメータは、A431細胞のEGF DMRシグナルの(A) P-DMR (ポジティブDMR)、(B) N-DMR (ネガティブDMR)、(C) RP-DMR (リカバリポジティブDMR)の振幅である。あらゆる分子による前処理なしの分子のDMRシグナルは、ポジティブコントロール(ポジティブ)として使用され、一方、ビヒクルのみ(すなわち分析緩衝液)で処理された細胞のDMRシグナルはネガティブコントロールとして使用された。

【図7】図7は、静止状態のA431細胞に作用している(A) 32nM EGF、(B) 5μM ヒスタミン、(C) 1μM ニコチン酸)、(D) 2nM エピネフリンの1次プロファイルを示す。

【図8】図8は、A549細胞に作用している(A) 40nM ピナシジル、(B) 8μM SLIGKVアミド、(C) 250μg/ml ポリ(I:C)、(D) 8μM ホルボール12-ミリステート13-アセテート(PMA)、(E) 10μM ヒスタミン、(F) 16μM フォスコリンの1次プロファイルを示す。

【図9】図9は、本開示の実施例における、(A) 静止状態のA431細胞に作用している分子HA-1077の1次プロファイル、(B) A549細胞に作用しているHA-1077の1次プロファイル、(C) HA1077の変調インデックスを示す。変調インデックスは、HA1077の非存在下および存在下における細胞におけるマーカ誘導された反応の特定のパラメータを比較することによって生成された。正の値は、HA-1077が細胞におけるマーカ光シグナルの特定のパラメータを増強していることを示し、一方、負の値は、HA-1077が細胞におけるマーカ誘導されたシグナルの特定のパラメータを抑制または減衰させていることを示す。

【図10】図10は、本開示の実施例における、(A) 静止状態のA431細胞に作用している分子H-8の1次プロファイル、(B) A549細胞に作用しているH-8の1次プロファイル、(C) H-8の変調インデックスを示す。

【図11】図11は、本開示の実施例における、(A) 静止状態のA431細胞に作用している分子LY294002の1次プロファイル、(B) A549細胞に作用しているLY294002の1次プロファイル、(C) LY294002の変調インデックスを示す。

【図12】図12は、本開示の実施例における、(A) 静止状態のA431細胞に作用している分子ケルセチンの1次プロファイル、(B) A549細胞に作用しているケルセチンの1次プロファイル、(C) ケルセチンの変調インデックスを示す。

【発明を実施するための形態】

【0004】

I V. 詳細な説明

16. 本開示の様々な実施例が図面を参照しつつ詳細に説明されている。様々な実施例に対する言及は、本開示の範囲を制限しない。本開示は、添付の請求の範囲によってのみ制限される。さらに、本明細書に記載された例は、限定となることを意図しておらず、単に請求の範囲に記載された発明の多くの可能な実施例のうちのいくつかを記載しているにすぎない。

【0005】

A. 定義

1. 材料(Material)

17. 材料(material)は対象物の構成に進入する(化学的、生物化学的、生物学的または混合された)何かの具体的な部分である。

【0006】

2. 物質(Substance)

18. 物質などの用語は、あらゆる対象物である。材料は、物質である。分子、リガン

10

20

30

40

50

ド、マーカ、細胞、タンパク質およびDNAは、物質とみなすことができる。機械または製品は、物質それ自体というよりもむしろ物質で造られているものとみなされるであろう。

【0007】

3. 分子 (Molecule)

19. ここで使用される場合、分子などの用語は、化学分子または一定の分子量を有する分子の形式で存在する生物学上または生物化学上または化学上の実在物（エンティティ）をいう。分子などの用語は、そのサイズにかかわらず、化学上または生物化学上のまたは生物学上の分子である。

【0008】

20. いくつかの分子は、炭素を含んでいないが（酸素分子などの単純な分子ガスおよびいくらかの硫黄ベースポリマーなどのより複雑な分子を含む）、多くの分子は、有機分子と呼ばれるタイプのものがある（とりわけ、共有結合によって接続された炭素原子を含む分子）。「分子」という一般的な用語は、タンパク質、核酸、炭水化物、ステロイド、有機薬剤、小分子、受容体、抗体、脂質などの多くの記述的な分子のクラスまたはグループを含んでいる。適切であるとき、1つ以上のこれらのより記述的な用語（タンパク質のようにそれらの多くは、それ自身が分子のオーバーラップしているグループを記述している）は、そのような分子が一般的なクラス「分子」とタンパク質などの固有名のあるサブクラスの両方の代表であるとする意図を損なうことなく分子のサブグループの本発明の方法の適用のためにここに使用される。明確に示されない限り、「分子」という用語は、特定の分子およびその塩（薬理学的に許容できる塩など）を含む。

【0009】

4. リガンド (Ligand)

21. リガンドなどの用語は、生物学的目的を果たすために生体分子を有する合成物と結合およびこれを形成できる物質、組成または分子である。リガンドとそのターゲット分子との事実上不可逆の共有結合は、生体系においては稀である。受容体に結合しているリガンドは、化学構造、すなわち、受容体タンパク質の三次元形状を変化させる。受容体タンパク質の立体配置的な状態は、受容体の機能的状態を決定する。結合の性向または強度は、親和性と呼ばれている。リガンドは、基質、ブロッカー、抑制剤、活性剤および神経伝達物質を含む。放射性リガンドは、ラジオアイソトープラベル化リガンドであり、蛍光リガンドは、蛍光性にタグ付けされたリガンドである。リガンドが受容体生物学および生物化学の研究のためのトレーサーとしてしばしば使用される故、両者を考慮することができる。リガンドおよびモジュレータは、相互交換可能に使用される。

【0010】

5. マーカ (Marker)

22. マーカなどの用語は、バイオセンサ細胞分析においてシグナルを生成するリガンドである。シグナルは、少なくとも1つの特定の細胞シグナリング経路の特性、および/または、少なくとも1つの特定のターゲットを通して媒介された少なくとも1つの特定の細胞のプロセスである。シグナルは、正または負または正負のどのような組み合わせであってもよい（例えば発振）。

【0011】

6. 混合分子 (Molecule mixture)

23. 混合分子などの用語は、少なくとも2つの分子を含む混合物である。2つの分子は、限定されないが、構造的に異なってもよいし（すなわち、鏡像異性体）、組成的に異なってもよいし（例えばタンパク質アイソフォーム、グリコーゲン、または異なるポリエチレングリコール（PEG）の改変を有する抗体）、構造的および組成的に異なってもよい（浄化されていない天然抽出物、または浄化されていない合成化合物）。

【0012】

7. 未知の分子 (Unknown molecule)

24. 未知の分子などの用語は、生物学上／薬理学上／生理学上／病態生理学上の活動

10

20

30

40

50

が知られていない分子である。

【0013】

8. 既知の分子 (Known molecule)

25. 既知の分子などの用語は、薬理学上／生物学上／生理学上／病態生理学上の活動が知られており、その正確な活動のモードが既知または未知である分子である。

【0014】

9. テスト分子 (Test molecule)

26. テスト分子などの用語は、テスト分子に関するなんらかの情報を獲得する方法において使用される分子である。テスト分子は、既知または未知の分子であり得る。

【0015】

10. 薬剤候補分子 (Drug candidate molecule)

27. 薬剤候補分子などの用語は、その薬剤またはファルマコフォアとして機能する能力についてテストされるテスト分子である。この分子はリード分子 (lead molecule) としてみなすことができる。

【0016】

11. 変調する (Modulate)

28. 変調すること、またはその形式は、細胞ターゲット通して媒介された細胞活動を増加させるまたは減少させるまたは維持させることを意味する。これらの用語の1つが使用されているところはどこでも、それがコントロールから例えば1%、5%、10%、20%、50%、100%、500%、1000%増加された、または、コントロールから1%、5%、10%、20%、50%、100%減少されたことが開示されたと理解される。

【0017】

12. モジュレータ (Modulator)

29. モジュレータなどの用語は、細胞ターゲットの活動をコントロールするリガンドである。それは、ターゲットタンパク質などの細胞ターゲットに結合するシグナル変調分子である。

【0018】

13. 既知のモジュレータ (Known modulator)

30. 既知のモジュレータなどの用語は、ターゲットの少なくとも1つが既知の親和性で知られているモジュレータである。例えば、既知のモジュレータは、PI3K抑制剤、PKA抑制剤、GPCRアンタゴニスト、GPCRアゴニスト、RTK抑制剤、上皮増殖因子受容体中和抗体、ホスホジエステラーゼ抑制剤、PKC抑制剤、活性剤などであり得る。

【0019】

14. 細胞 (Cell)

31. 細胞などの用語は、半透性の膜によって外面的に隔てられた原形質の小さい通常微細な密集体をいう。状況に応じて、1以上の核およびさまざまな他の細胞器官が含まれ、単独でまたは密集体のような他のものとの相互作用で生物のすべての基本的な機能を実行する能力があり、合成細胞構造、細胞モデルシステム、および人工の細胞システムを含む独立に機能する能力がある生命体の最も小さい構造ユニットを形成している。

【0020】

32. 細胞は、異なる細胞タイプを含み得る。例えば、特定の疾病に関連する細胞、特定の起源からの細胞のタイプ、特定のターゲットに付随する細胞のタイプ、または特定の生物学上の機能に関連する細胞のタイプなどである。細胞は、体内に生じた細胞、操作された細胞、変形された細胞、不死化された細胞、初代細胞、胚幹細胞、成体幹細胞、癌幹細胞、幹細胞由来細胞であり得る。

【0021】

33. 人間は、約210の異なる既知の細胞からなる。どのようにして細胞が生成され (例えば、操作され、変形され、不死化され、または人体から新鮮に分離されて)、そし

10

20

30

40

50

て、細胞がどこで取得されるか（例えば、異なる年齢の人体または異なる病期）を考慮すれば、細胞のタイプの数はほとんど無限である。

【0022】

15. マトリックス (Matrix)

34. マトリックスなどの用語は、ある規則に従って他の何かが生じ、具体化し、または進展するポイントを構成する何かである。マトリックスは、分析が行われる過程およびもたらされる結果の質において重大な影響を持つ。例えば、本開示の実施例において、分子を特徴付けるために細胞のパネルを選択するためのマトリックスは、限定されないが、例えば、特定の病気（例えば、アレルギー反応または炎症性の病気、病原菌感染、乳がん、皮膚がん、大腸がん、肝疾患、膵臓がん、心臓疾患などに関与する細胞のパネル）、または特定の起源（例えば、神経細胞、肺細胞、皮膚細胞、筋肉細胞、肝細胞などのパネル）、または特定の細胞ターゲット（例えば、受容体、酵素、キナーゼ、発癌遺伝子、構造タンパク質、DNA、RNA）、または人間生理学および病態生理学を代表する細胞のタイプの広いスペクトル（例えば角質化する上皮細胞からなる細胞のパネル、ウェット重層上皮細胞、外分泌上皮細胞、ホルモン分泌細胞、代謝および貯蔵細胞、バリア機能細胞（肺、腸、外分泌腺、および泌尿生殖路）、近接した体内の体腔と並ぶ上皮細胞、推進機能を持つ繊毛細胞、細胞外のマトリックス分泌細胞、収縮性細胞、血液および免疫システム細胞、感覚変換器細胞、自律神経細胞、感覚器および抹消神経支持細胞、中枢神経系ニューロンおよびグリア細胞、レンズ細胞、色素細胞、生殖細胞、ナース細胞、および間質細胞）を含む。他の実施例において、少なくとも2つの細胞のタイプの混合群が、細胞システムとして使用され得る。

10

20

【0023】

16. 細胞培養 (Cell culture)

35. 「細胞培養」は、原核細胞または真核細胞がコントロールされた状況下で育成されている過程をいう。「細胞培養」は、多細胞の真核生物から得られた細胞、特に動物細胞の培養のみならず、複合組織および器官の培養をも含む。

【0024】

17. バイオセンサ (Biosensor)

36. バイオセンサなどの用語は、生物学的構成要素と生理学的検出器構成要素とを結合した検体の検出のためのデバイスをいう。バイオセンサは通常3つのパーツ、すなわち、生物学的な構成要素またはエレメント（例えば組織、微生物、病原体、細胞、またはこれらの組み合わせ）と、検出部エレメント（例えば、光学的、圧電的、電気化学的、測熱法的、磁氣的などの物理学的な方法で動作する）と、これらの両構成要素と協働するトランスデューサと、により構成されている。生物学的な構成要素またはエレメントは、例えば、生体細胞、病原対またはこれらの組み合わせであってもよい。実施例において、光学バイオセンサは、生体細胞、病原体またはこれらの結合における分子識別または分子刺激現象を定量化可能なシグナルに変換する光学トランスデューサを含み得る。

30

【0025】

18. アッセイ (Assaying)

37. 「アッセイ」、「分析する」などの用語は、分子または細胞などの物質の特性、例えば、リガンドまたはマーカのような1つ以上の外因刺激による刺激時における存在、非存在、量、範囲、キネティクス、ダイナミクスまたは細胞の光学的あるいはバイオイम्ピーダンス反応 (bioimpedance response) のタイプを判定するための分析をいう。刺激に対する細胞の反応のバイオセンサシグナルを生成することは分析であり得る。

40

【0026】

19. 長期間分析 (Long term assay)

38. 長期間分析などの用語は、生体細胞における所定の分子の長期間の影響を調査するために使用される。長期間分析の特定のタイプは、「長期間バイオセンサ細胞分析」である。1つの実施例において、各細胞のタイプは、長時間（例えば、8時間、16時間、24時間、32時間、48時間、72時間）分子にさらされるのみである。この長期間分

50

析は、健全な状態の細胞における分子の影響（例えば、生存力、アポトーシス、細胞サイクル規則、細胞粘着規則、増殖）を判定するのに使用される。また、この長期間分析は、早期の細胞シグナリング反応（例えば、分子刺激後30分、60分、120分、180分）を含んでおり、分子誘導された細胞シグナリングイベントまたは経路を調べるために直接的に使用され得る。

【0027】

39. 他の実施例において、マーカの存在下における長期間バイオセンサ細胞分析は、分子とマーカとの間の細胞生物学および生理学の長期影響の相互制御（cross regulation）を調べるために使用される。マーカは、分子の前、同時または後に加えられる。例えば、マーカ（例えば H_2O_2 ）が細胞パネルにおける少なくとも1つの細胞のタイプのアポトーシスを誘発するとき、その分子が保護性であるか否かを判定するために上記の長期間分析を使用することができる。逆もまた真であり、そのような長期間分析は、分子誘導された細胞イベント（例えばアポトーシスまたはネクローシス）に対するマーカの保護性のまたは相乗的な役割を判定するために使用することができる。

【0028】

20. 短期間分析（Short term assay）

40. 短期間分析などの用語は、生体細胞における所定の分子の短期間の影響を調査するために使用される。短期間分析の特定のタイプは、「短期間バイオセンサ細胞分析」である。1つの実施例において、各細胞のタイプは、短時間（例えば、5分、10分、30分、45分、60分、90分、180分、240分）分子にさらされるのみである。この短期間分析は、早期の細胞シグナリング反応を検出するためにしばしば使用され、分子誘導された細胞シグナリングイベントまたは経路を調べるために、またはマーカ誘導された細胞反応を変調する分子の能力を調べるために直接的に使用され得る。

【0029】

21. 2ステップ分析（Two step assay）

41. 2ステップ分析などの用語は、細胞パネルにおける各細胞のタイプが分子誘導されたバイオセンサシグナルを調べるためにはじめに分子にさらされ、マーカ誘導されたバイオセンサシグナルを変調する分子の能力を調査するために特定のマーカまたはマーカのパネルがその後に続く。この分析は、2モード分析と呼ぶことができる。すなわち、はじめのアゴニズムモードとそれに続くアンタゴニズムモードである。分子の活動のモード（例えばターゲット、アゴニズムまたはアンタゴニズムおよび潜在力または効能）

22. アゴニストおよびアタゴニストモード（Agonist and antagonist mode）

42. アゴニズムモードなどの用語は、DMRシグナルなどのバイオセンサシグナルを誘発する分子の能力を判定するために細胞が分子にさらされる分析であり、一方、アンタゴニズムモードは、マーカに反応する細胞のバイオセンサシグナルを変調する分子の能力を判定するために分子の存在下において細胞がマーカにさらされる分析である。

【0030】

23. パルス刺激分析（A pulse stimulation assay）

43. パルス刺激分析などの用語は、細胞が非常に短い時間（例えば、数秒または数分）分子にさらされる場合に使用される。このパルス刺激分析は、細胞またはターゲットに作用する分子のキネティクスおよびマーカ誘導されたバイオセンサシグナルへの影響を調べるために使用され得る。パルス刺激分析は、単に分子を加えた直後の一定の時間において液体処理装置によって分子溶液を細胞分析緩衝液に置き換えることにより実施することができる。

【0031】

24. 処理（Treating）

44. 処理またはトリートメントなどの用語は、少なくとも2つの態様で使用され得る。第1に、処理またはトリートメントまたはこれらと同類の用語は、対象に対してなされる管理または行為をいう。第2に、処理またはトリートメントなどの用語は、あらゆる2つのもの、例えば分子と細胞などあらゆる2つ以上の物質を一緒に混合することをいう。

この混合は、少なくとも2つの物質の間で接触が生じ得るように、これらをまとめる。

【0032】

45. 処理またはトリートメントなどの用語が病気を持つ対象という状況において使用されているとき、それは例えば治療または症状の軽減さえも意味しない。「治療の」などの用語が処理またはトリートメントなどの用語と併せて使用されているとき、それは、内在的な病気の症状が軽減され、および／または症状を引き起こしている1つ以上の内在的な細胞の、生理学上の、または生物化学上の原因またはメカニズムが低減されることを意味する。低減は、この文脈において使用される場合、病気の状態に関係していることを意味し、病気の分子状態を含み、単なる病気の生物化学上の状態ではないことが理解される。

10

【0033】

25. 接触 (Contacting)

46. 接触などの用語は、もし、分子相互作用が少なくとも2つの物体（例えば分子、細胞、マーカ、少なくとも1つの合成物または組成、または少なくとも2つの組成、または製品または機械を有するこれらのどれも）の間で可能である場合、分子相互作用が起こり得るように近接させることを意味する。例えば、接触は、少なくとも2つの組成、分子、製品または物体を接触させること（すなわち、それらが混ざるまたは触れるまで近接するように）をいう。例えば、組成Aの溶液と培養細胞Bを用意し、培養細胞Bに組成Aの溶液を注ぐと、組成Aの溶液は細胞培養Bに接触する。細胞をリガンドと接触させることは、細胞にリガンドをもたらし、細胞がリガンドにアクセスすることを確実にするであろう。

20

【0034】

47. ここに開示されているあらゆるものは、他のあらゆるものと接触され得ることが理解される。例えば、細胞は、マーカまたは分子、バイオセンサなどと接触され得る。

【0035】

26. 誘発 (Trigger)

48. 誘発などの用語は、反応などのイベントを開始または機動する活動をいう。

【0036】

27. 検出 (Detect)

49. 検出などの用語は、本開示の装置または方法における分子誘導またはマーカ誘導された細胞反応を発見または感知する能力および識別された分子に関する感知された反応を識別する能力をいう。

30

【0037】

28. 反応 (Response)

50. 反応などの用語はあらゆる刺激に対するあらゆる反応である。

【0038】

29. 細胞反応 (Cellular Response)

51. 細胞反応などの用語は、細胞による刺激に対するあらゆる反応である。

【0039】

30. バイオセンサ反応 (Biosensor Response)

40

52. バイオセンサ反応、バイオセンサ出力シグナル、バイオセンサシグナルなどの用語は、細胞反応に対する細胞を有するセンサシステムのあらゆる反応である。バイオセンサは、細胞反応を定量化できるセンサ反応に変換する。バイオセンサ反応は、RWGまたはSPRなどの光学バイオセンサによって測定されたとき刺激に対して光学的な反応となり、電気バイオセンサによって測定されたとき刺激に対してバイオイम्ピーダンス反応 (bioimpedance response) となる。バイオセンサ反応は、刺激に対する細胞反応と直接的に関係している故、バイオセンサ反応と細胞反応は、本開示の実施例において相互交換可能に使用され得る。

【0040】

31. DMR 反応 (DMR response)

50

53. DMRなどの用語は、光学バイオセンサを使用しているバイオセンサ反応である。DMRは動的密集体再配分 (dynamic mass redistribution) または動的細胞物質再配分 (dynamic cellular matter redistribution) をいう。P-DMRはセンシングゾーン内に位置する増加する密集体を示すポジティブなDMR反応である。N-DMRはセンシングゾーン内に位置する減少する密集体を示すネガティブなDMR反応である。R P-DMRは、刺激性のイベント後に規定レベルに戻る密集体配分を示すリカバリ P-DMR 反応である。

【0041】

32. 反応の分析 (Assaying the response)

54. 「反応の分析」は、反応を特徴付ける手段を使用することを意味する。例えば、もし、分子が細胞と接触した場合、バイオセンサは分子への露出における細胞の反応を分析するために使用され得る。

【0042】

33. プロファイル (A profile)

55. プロファイルなどの用語は、細胞などの組成に関して集められたデータをいう。プロファイルは、ここに記載されているように、ラベルフリーバイオセンサから集められ得る。

【0043】

34. 1次プロファイル (Primary profile)

56. 1次プロファイルなどの用語は、分子が細胞と接触したときに生成されるバイオセンサ反応、バイオセンサ出力シグナルまたはプロファイルをいう。典型的には、1次プロファイルは、正味ゼロのバイオセンサシグナル (すなわちベースライン) に対する初期細胞反応の規格化のあとに得られる。

【0044】

35. 2次プロファイル (Secondary profile)

57. 2次プロファイルなどの用語は、分子の存在下においてマーカに反応する細胞のバイオセンサ反応またはバイオセンサ出力シグナルである。2次プロファイルは、マーカ誘導された細胞反応またはバイオセンサ反応を変調する分子の能力のインジケータとして使用され得る。

【0045】

36. 変調プロファイル (Modulation profile)

58. 変調プロファイルなどの用語は分子の存在下におけるマーカの2次プロファイルとあらゆる分子の不存在下におけるマーカの1次プロファイルとの間の比較である。比較は、例えば、2次プロファイルから1次プロファイルを差し引く、または1次プロファイルから2次プロファイルを差し引く、または2次プロファイルを1次プロファイルに対して規格化することによりなされる。

【0046】

37. ライブラリ (Library)

59. ライブラリなどの用語はコレクションである。ライブラリはここに開示されたあらゆるもののコレクションであり得る。例えばインデックスのコレクション、インデックスライブラリであり得る。すなわち、それは、プロファイルのコレクション、プロファイルライブラリであり得る。または、それは、DMRインデックスのコレクション、DMRインデックスライブラリであり得る。また、それは、分子のコレクション、分子ライブラリであり得る。それは細胞のコレクション、細胞ライブラリであり得る。それはマーカのコレクション、マーカライブラリであり得る。ライブラリは、例えば、ランダムまたは非ランダムであり、確定または不確定であり得る。例えば、DRMインデックスまたは既知のモジュレータのバイオセンサインデックスが開示されている。

【0047】

38. パネル (Panel)

60. パネルなどの用語は、あらかじめ定められた標本 (例えば、マーカ、細胞、経路

10

20

30

40

50

）のセットである。パネルは、ライブラリから標本を選定することにより生成され得る。

【0048】

39. マーカパネル (Marker panel)

61. マーカパネルなどの用語は、少なくとも2つのマーカからなるパネルである。マーカは、異なる経路、同じ経路、異なるターゲット、同じターゲットに関するものであってもよい。

【0049】

40. 細胞パネル (Cell panel)

62. 細胞パネルなどの用語は、少なくとも2つの細胞のタイプからなるパネルである。細胞は、ここに開示されるどんなタイプまたは組合せであってもよい。

10

【0050】

41. 分子の存在下 (In the presence of the molecule)

63. 「分子の存在下」などの用語は、培養された細胞の分子への接触または露出をいう。接触または露出は、刺激物が細胞と接触する前またはそのときに実施され得る。

【0051】

42. バイオセンサシグナル (Biosensor Signal)

64. バイオセンサシグナルなどの用語は、刺激による細胞の反応によって生成されたバイオセンサで測定された細胞のシグナルをいう。

【0052】

43. DMRシグナル (DMR signal)

65. DMRシグナルなどの用語は、刺激による細胞の反応によって生成された光学バイオセンサで測定された細胞のシグナルをいう。

20

【0053】

44. 規格化 (Normalizing)

66. 規格化などの用語は、例えば、少なくとも1つの共通変数を除去するために、データ、プロファイル、反応を調整することを意味する。例えば、もし2つの反応が生じた場合（1つは細胞に作用するマーカに関するもの、1つは細胞に作用するマーカおよび分子に関するもの）、規格化は分子の不存在下におけるマーカ誘導された反応と、分子存在下における反応との比較の行為をいい、規格化された反応が、マーカに対する分子の変調に起因する反応を表すように、マーカのみ起因する反応を除去することをいう。変調比較は、分子存在下において、マーカの1次プロファイルおよびマーカの2次プロファイルを規格化することにより生成される（変調プロファイル）。

30

【0054】

45. コントロール (Control)

67. コントロール、コントロールレベル、コントロール細胞などの用語は、変化が測定された標準として定義され、たとえば、コントロールは実験に左右されず、その代わりに定義済みのパラメータのセットに従う。または、コントロールは前処理レベルまたは後処理レベルに基づく。それらは、テストランと平行またはその前または後に実施され得る。または、それらは、あらかじめ定められた標準であり得る。例えば、コントロールは、実験からの結果をいい、被検体または対象物または試薬などがテスト中において、手順またはエージェントまたは可変的なその他の省略を除いて、平行した実験の場合のように扱われ、それは実験結果判定における比較の標準として使用される。従って、コントロールは、手順、エージェント、または可変的なその他のものに関係する効果を判定するために使用され得る。例えば、細胞上のテスト分子の効果が疑わしい場合、a) 分子の存在下における細胞の特徴を単に記録し、b) aを行い、その後既知の活動または活動の欠如、またはコントロール組成（例えば分析緩衝液（ビヒクル））にコントロール分子を加えることの影響も記録し、コントロールに対するテスト分子の影響を比較することができるかもしれない。ある状況において、いったんコントロールが実行されると、コントロールは標準として使用され得る。この場合、コントロール実験を再度実施する必要はない。他の状況においては、コントロール実験は比較がなされる度に平行に実施されるべきである。

40

50

【0055】

46. ポジティブコントロール (Positive control)

68. ポジティブコントロールなどの用語は、データコレクションに関する状態がデータコレクションをもたらし得ることを示すコントロールである。

【0056】

47. 変調比較 (Modulation comparison)

69. 変調比較などの用語は、1次プロファイルおよび2次プロファイルを規格化した結果である。

【0057】

48. インデックス (Index)

70. インデックスなどの用語は、データのコレクションである。例えば、インデックスは、1つ以上の変調プロファイルを含むリスト、表、ファイル、またはカタログであり得る。インデックスはどんなデータの組み合わせからでも生成することができることが理解される。例えば、DMRプロファイルは、P-DMR、N-DMR、RP-DMRを有し得る。インデックスは、プロファイルの完成データ、P-DMRデータ、N-DMRデータ、RP-DMRデータ、またはこれらの中のあらゆるポイント、またはこれらまたは他のデータの組み合わせを用いて生成され得る。インデックスは、そのようなあらゆる情報のコレクションである。典型的には、インデックスを比較するとき、インデックスは同種のデータであり、すなわち、P-DMRに対してP-DMRデータである。

【0058】

49. バイオセンサインデックス (Biosensor Index)

71. バイオセンサインデックスなどの用語は、バイオセンサデータのコレクションで構成されるインデックスである。バイオセンサインデックスは、1次プロファイルまたは2次プロファイルなどのバイオセンサプロファイルのコレクションであり得る。インデックスはあらゆるデータのタイプによって構成され得る。例えば、プロファイルのインデックスは、N-DMRデータポイントにより構成され得、それは、P-DMRデータポイントであってもよく、またはその両方または、インピーダンスデータポイントであってもよい。それは、プロファイルカーブ (プロファイル曲線) に関連するすべてのデータポイントであってもよい。

【0059】

50. DMRインデックス (DMR index)

72. DMRインデックスなどの用語は、DMRデータのコレクションにより構成されるバイオセンサインデックスである。

【0060】

51. 分子バイオセンサインデックス (Molecule biosensor index)

73. 分子バイオセンサなどの用語は、分子に関して収集されたデータによって生成されるバイオセンサインデックスである。例えば、分子バイオセンサインデックスは、細胞のパネルに作用している分子のプロファイルにより構成され、マーカのパネル (細胞のパネルにおける1つの細胞のための各マーカのパネル) に対する分子の変調プロファイルにより構成され得る。

【0061】

52. 分子DMRインデックス (Molecule DMR index)

74. 分子DMRインデックスなどの用語は、分子に関して収集されたデータによって生成されるDMRインデックスである。例えば、分子バイオセンサインデックスは、細胞のパネルに作用している分子のプロファイルおよびマーカのパネル (細胞のパネルにおける1つの細胞のための各マーカのパネル) に対する分子の変調プロファイルにより構成され得る。

【0062】

53. 分子インデックス (Molecule index)

75. 分子インデックスなどの用語は、分子に関連するインデックスである。

10

20

30

40

50

【0063】

54. モジュレータバイオセンサインデックス (Modulator biosensor index)

76. モジュレータバイオセンサインデックスなどの用語は、分子に関して収集されたデータによって生成されるバイオセンサインデックスである。例えば、モジュレータバイオセンサインデックスは、細胞のパネルに作用しているモジュレータのプロファイルおよびマーカのパネル（細胞のパネルにおける1つの細胞のための各マーカのパネル）に対するモジュレータの変調プロファイルにより構成され得る。

【0064】

55. モジュレータDMRインデックス (Modulator DMR index)

77. モジュレータDMRインデックスなどの用語は、分子に関して収集されたデータによって生成されるDMRインデックスである。例えば、モジュレータDMRインデックスは、細胞のパネルに作用しているモジュレータのプロファイルおよびマーカのパネル、（細胞のパネルにおける1つの細胞のための各マーカのパネル）に対するモジュレータの変調プロファイルにより構成され得る。

【0065】

56. 分子変調インデックス (Molecule modulation index)

78. 分子変調インデックスなどの用語は、細胞のパネルに作用するマーカのパネルのバイオセンサ出力シグナルを変調する分子の能力を表示するインデックスである。変調インデックスは、分子の存在下におけるマーカでの刺激に対する細胞の反応の特定のバイオセンサ出力シグナルパラメータを、あらゆる分子の不存在下におけるそれに対して規格化することにより生成される。

57. 既知のモジュレータバイオセンサインデックス (Known modulator biosensor index)

79. 既知のモジュレータバイオセンサインデックスなどの用語は、既知のモジュレータに関して収集されたデータによって生成されたモジュレータバイオセンサインデックスである。例えば、既知のモジュレータバイオセンサインデックスは、細胞のパネルに作用している既知のモジュレータのプロファイルおよびマーカのパネル（細胞のパネルにおける1つの細胞のための各マーカのパネル）に対する既知のモジュレータの変調プロファイルにより構成され得る。

【0066】

58. 既知のモジュレータDMRインデックス (Known modulator DMR index)

80. 既知のモジュレータDMRインデックスなどの用語は、既知のモジュレータに関して収集されたデータによって生成されるモジュレータDMRインデックスである。例えば、既知のモジュレータDMRインデックスは、細胞のパネルに作用している既知のモジュレータのプロファイルおよびマーカのパネル（細胞のパネルにおける1つの細胞のための各マーカのパネル）に対する既知のモジュレータの変調プロファイルにより構成され得る。

【0067】

59. マーカバイオセンサインデックス (Marker biosensor index)

81. マーカバイオセンサインデックスなどの用語は、マーカに関して収集されたデータによって生成されるバイオセンサインデックスである。例えば、マーカバイオセンサインデックスは、細胞のパネルに作用しているマーカのプロファイルおよびマーカのパネル（細胞のパネルにおける1つの細胞のための各マーカのパネル）に対するマーカの変調プロファイルにより構成され得る。

【0068】

60. マーカDMRインデックス (Marker DMR index)

82. マーカDMRインデックスなどの用語は、マーカに関して収集されたデータによって生成されるDMRインデックスである。例えば、マーカDMRインデックスは、細胞のパネルに作用しているマーカのプロファイルおよびマーカのパネル（細胞のパネルにおける1つの細胞のための各マーカのパネル）に対するマーカの変調プロファイルにより構

成され得る。

【0069】

61. インデックスの類似性 (Similarity of indexes)

83. インデックスの類似性などの用語は、インデックスのパターンおよび／またはスコアのマトリックスに基づいて、2つのインデックス間、または少なくとも3つのインデックス間（1つは分子に関するもの）における類似性を表す用語である。スコアのマトリックスは、対応する細胞における異なる分子の1次プロファイルのサイン、および各マーカに対する異なる分子の変調プロファイルの性質およびパーセンテージのように、それらのカウンターパートに強く関係している。例えば、より高いスコアは、より類似している特徴に対して与えられる。より低いまたは負のスコアは非類似の特徴に対して与えられる。分子変調インデックスにおいて見いだせる変調のタイプは、ポジティブ、ネガティブ、ニュートラルの3つしかない故、類似性マトリックスは比較的単純である。例えば、単純なマトリックスは、同一の変調（例えばポジティブな変調）にスコア+1を割り当て、非同一の変調にスコア-1を割り当てる。

【0070】

84. あるいは、異なるスコアが変調のタイプに関連して与えられ得るが、異なるスケールで与えられ得る。例えば、10%、20%、30%、40%、50%、60%、100%、200%というポジティブな変調は、これらに相応して、+1、+2、+3、+4、+5、+6、+10、+20というスコアが与えられ得る。逆に、ネガティブな変調に対しては、同様にしかし逆のスコアが与えられ得る。このアプローチに従えば、マーカのパネルに対するHA1077の変調インデックスは、図9Cに示されるように、PKA/PKG抑制剤HA1077は、異なるマーカによって誘導されたバイオセンサ反応を異なるように変調することを示している。すなわち、A549細胞において、ピナシジル（-86%）、ポリ（I:C）（+18%）、PMA（+36%）、SLIGKV-アミド（+22%）、フォルスコリン（+18%）、ヒスタミン（初期のP-DMR、+26%）、ヒスタミン（末期のP-DMR、+55%）、および静止状態のA431細胞において、エピネフリン（-38%）、ニコチン酸（+8%）、EGF（P-DMR（+19%））、EGF（N-DMR（-20%））、ヒスタミン（-50%）。従って、同格関係におけるHA1077変調インデックスのスコアは、（-8.6、1.8、3.6、2.2、1.8、2.6、5.5、-3.8、0.8、1.9、-2、-5）として割り当てられる。一方、H8に関しては、同格関係におけるそのスコアは、（-7.2、1.8、2.2、3.2、2、3.8、6.5、-1.6、1、0.3、-2、1.6）である。

【0071】

85. HA1077およびH8のインデックスは、（1）単純なスコアマトリックスに基づいて比較され得る。これにおいて、A549およびA431の双方におけるそれらの主要なインデックスは、類似しており（スコア+1、+1）、変調インデックスは類似している（スコア+1、+1、+1、+1、+1、+1、+1、+1、+1、+1、+1、-1）。（2）スケールに基づくスコアマトリックスに基づいて比較され得る。これにおいて、両スコア同格（スコアコーディネーション）は類似しており、しかし同一ではない。おそらく、細胞ターゲットに作用するそれらの潜在力差による。両方のインデックスが同じ投与量（10μM）を使って生成される点は注目に値する。そして（3）顕著な変調プロファイル（例えば、ピナシジル反応）を使用した分類に基づいて比較され得る。これにおいて、両分子は類似した変調をもたらす。上記の点を全て考慮すると、HA1077とH8が試験される2つの細胞株において類似した主要な活動のモードを示すと結論付けることができる。同様に、LY294002およびケルセチンの両方もまた試験される2つの細胞株において類似した主要な活動のモードを示す。しかしながら、HA1077/H8およびLY294002/ケルセチンは異なる活動のモードを示す。

【0072】

62. 特性づける (Characterizing)

86. 特製づけるなどの用語は、リガンド、分子、マーカまたは細胞に関するプロファイルの獲得など、物質（リガンド、分子、マーカ、または細胞など）に関するあらゆる情報を集めることをいう。

【0073】

63. 増強する (Potentiate)

87. 増強する、増強されたなどの用語は、分子によって引き起こされた細胞におけるマーカのバイオセンサ反応の特定のパラメータの増加をいう。分子の存在下におけるマーカの1次プロファイルと同じ細胞における同じマーカの2次プロファイルとの比較により、分子による細胞のマーカ誘導されたバイオセンサ反応の変調を計算することができる。ポジティブな変調は分子がマーカによって誘導されたバイオセンサシグナルの増加を引き起こすことを意味する。

10

【0074】

64. より高いおよび抑制するなどの用語

88. より高い、増加する、高めるまたは上昇などの用語またはこれらの用語の変形は、例えばコントロールを比較したときに、規定レベルを超えて増加することをいう。低い、より低い、減少する、低下するまたは低下などの用語またはこれらの用語の変形は、例えばコントロールを比較したときに、規定レベルを下回って減少することをいう。例えば、規定レベルは、アゴニストまたはアンタゴニストなどの分子を細胞に加える前、分子の不存在下において、分子を加えたときに生体内レベルにおいて標準的である。抑制するなどの用語は減じることまたは食い止めることをいう。

20

【0075】

65. 分子薬理学 (Molecule pharmacology)

89. 分子薬理学などの用語は、システム細胞生物学またはシステム細胞薬理学または細胞に作用する分子の活動のモードをいう。分子薬理学は、限定されないが、毒性、特定の細胞のプロセス（例えば、増殖、分化、反応性酸素種シグナリング）に影響を与える能力または、特定の細胞ターゲット（例えば、PI3K、PKA、PKC、PKG、JAK2、MAPK、MEK2またはアクチン）を変調する能力によって特徴付けられる。

【0076】

66. 受容体 (Receptor)

90. 受容体などの用語は、移動性シグナリング（またはシグナル）分子が付着し得る細胞の原形質膜または細胞質に埋められるタンパク質分子である。受容体が結合している分子は、リガンドと呼ばれ、ペプチド（神経伝達物質など）、ホルモン、製薬または毒素である場合があり、そのような結合が生じたとき、受容体は通常、細胞反応を開始する構造的な変化を起こす。しかしながら、いくつかのリガンドはどんな反応も誘導することなく（例えばアンタゴニスト）、単に受容体をブロックする。受容体におけるリガンド誘導された変化は、リガンドの生物学的活動を構成する生理学的変化をもたらす。

30

【0077】

67. 細胞ターゲット (Cellular target)

91. 細胞ターゲットなどの用語は、その活動が外部刺激によって変更され得るタンパク質または核酸などのバイオポリマーである。細胞ターゲットは、最も一般的には酵素、キナーゼ、イオンチャネルおよび受容体などのタンパク質である。

40

【0078】

68. シグナリング経路 (Signaling pathway(s))

92. 定義された経路などの用語は、シグナル（例えば外因性のリガンド）の受信から細胞反応（例えば細胞ターゲットの発現増加）までの細胞の経路（パス）である。いくつかのケースにおいて、受容体に結合しているリガンドによって引き起こされた受容体活性化は、リガンドに対する細胞の反応と直接的に結びつく。例えば、神経伝達物質GABAは、イオンチャネルの一部である細胞表面受容体を活性化することができる。ニューロン上のGABA受容体と結合しているGABAは、受容体の一部である塩素選択性イオンチャネルを開く。GABA受容体活性化は、負に荷電する塩化物イオンを、活動ポテン

50

シャルを生じるニューロンの能力を抑制するニューロンへ移動させる。しかしながら、多くの細胞表面受容体に関して、リガンド受容体相互作用は、細胞の反応に直接的に結びつかない。リガンドの細胞のふるまいに対する最終的な生理学上の効果が生じる前に、活性化された受容体は、細胞の中の他のタンパク質と最初に相互作用しなければならない。しばしば、いくつかの相互作用している細胞タンパク質の連鎖のふるまいは、受容体活性化の後、変更される。受容体活性化によって誘発される細胞変化のセット全体は、シグナル伝達機構または経路と呼ばれている。シグナリング経路は比較的単純であるか極めて複雑であり得る。

【0079】

69. 分子処理された細胞 (Molecule-treated cell)

10

93. 分子処理された細胞などの用語は分子にさらされた細胞である。

【0080】

70. 細胞プロセス (Cellular process)

94. 細胞プロセスなどの用語は、細胞によってまたは細胞内で起こるプロセスである。細胞プロセスの例には、限定されないが、増殖、アポトーシス、ネクローシス、分化、細胞シグナル伝達、極性変化、マイグレーションまたは変形などが挙げられる。

【0081】

71. 期間 (Period of time)

95. 期間は、時間経過を表すあらゆる期間をいう。例えば1秒、1分、1時間、1日および1年はすべて期間である。

20

【0082】

72. 短期間 (Short period of time)

96. 短期間などの用語は1分から300分の間の期間である。

【0083】

73. 別の期間 (another period of time)

97. 別の期間などの用語は、ある期間に連続して生じている期間である。

74. 細胞のパネルに亘りおよびマーカのパネルに対して (across the panel of cells and against the panels of markers)

98. 「細胞のパネルに亘りおよびマーカのパネルに対して」というフレーズは、細胞のパネルにおける各細胞に作用している分子の1次プロファイルおよびマーカのパネルを変調する分子の変調プロファイルを調べるための体系的なプロセスをいう。マーカ／細胞ペアに関し、細胞の各タイプに独立に作用する分子の1次プロファイルをはじめに調べることでプロセスは開始され、これに続いて、同じ細胞において、分子の存在下においてマーカの2次プロファイルを調べる。「対し」という用語は、マーカ誘導されたバイオセンサ反応を変調する分子の能力を明示するために特異的に使用される。

30

【0084】

75. 分子の活動のモードに関するインジケータ (indicator for the mode of action of the molecule)

99. インジケータなどの用語は、表示するものである。特に、「分子の活動のモードのためのインジケータ」は、よく知られているモジュレータのバイオセンサインデックスと比較した分子のバイオセンサインデックスの類似性などのものを意味する。それは、分子とよく知られたモジュレータとが類似した活動のモードを共有していると解釈できる。

40

【0085】

76. 特定の人間生理学と病態生理学の代表 (representative of a particular human physiology and pathophysiology)

100. 代表などの用語は、標本またはあるクラスのタイプまたはものの種類となることである。例えば、ヒト肺がん細胞株A549の細胞特性がヒト肺がんの生理学を代表すると考えられる。したがって、A549は、ヒト肺がんの細胞生物学および生理学を研究するためのモデル細胞株として使用される。

【0086】

50

77. 長期間バイオセンサシグナル (long-term biosensor signal)

101. 長期間バイオセンサシグナルは、長期の分析から生成されるバイオセンサシグナルである。

【0087】

78. 長期間DMRシグナル

102. 長期間DMRシグナルなどの用語は、長期の光学バイオセンサ細胞分析から生成される光学バイオセンサシグナルである。

【0088】

79. パニング (Panning)

103. パニングなどの用語は、1つ以上の受容体または細胞ターゲットの存在に関し、細胞をスクリーニングすることをいう。

【0089】

80. 強いバイオセンサシグナル (Robust biosensor signal)

104. 強いバイオセンサシグナルは、その振幅がノイズレベルまたはネガティブコントロール反応上で顕著である (例えば 3x、10x、20x、100x、1000x) バイオセンサシグナルをいう。ネガティブコントロール反応は、しばしば、分析緩衝液 (すなわちビヒクル) を加えた後の細胞のバイオセンサ反応である。ノイズレベルは、あらゆる溶液を更に加えることをしない細胞のバイオセンサシグナルである。細胞は、あらゆる溶液の添加の前に常に溶液で覆われていることは、留意に値する。

【0090】

81. 強いDMRシグナル

105. 強いDMRシグナルなどの用語は、強いバイオセンサシグナルのDMR形式である。

【0091】

82. 潜在力 (Potency)

106. 潜在力などの用語は、所定の強さの影響を生じることを要求される量の面から表される分子活動の大きさである。例えば、非常に強力な薬は、低い濃度でより大きな反応を引き起こす。潜在力は、親和性および効能に比例する。親和性は、薬剤分子が受容体に結合する能力である。

【0092】

83. 効能 (Efficacy)

107. 効能などの用語は、理想的または最適な状況の下で望ましい規模の影響を生じる能力である。効能と効果という関連した概念を区別するのはこれらの状況であり、それは現実の状況の下での変化に関するものである。効能は、受容体占有と分子、細胞、組織またはシステムレベルで反応を開始する能力との関係である。

【0093】

84. 定義された経路 (Defined pathway(s))

108. 定義された経路などの用語は、 G_p 経路、 G_s 経路、 G_i 経路、EGFR経路またはPKC経路などの特定の経路である。

【0094】

85. ネットワーク相互作用 (Network interaction)

109. ネットワーク相互作用などの用語は、少なくとも2つの特定のシグナリングカスケードまたは経路間の相互作用である。例えば、A431細胞のブラジキニンB2受容体の活性化は少なくとも2重のシグナリング経路をもたらす (すなわち G_q および G_s 経路)。これにおいて2つの経路は、互いに相互規制 (cross-regulated) することができる。そのような相互規制は、ネットワーク相互作用の1つのタイプである。他の例は、A431細胞におけるEGFRシグナリングである。それは、複合の多成分性の信号伝達経路に関連する。これらの経路は、主にネットワーク相互作用を介した、フィードバック、シグナル増幅、および多重シグナルとシグナリング経路との間の1つの細胞内における相互作用の機会を提供する。

10

20

30

40

50

【0095】

86. 生物化学アプローチ (Chemical biology approach)

110. 「生物化学アプローチ」などの用語は、化学技術およびツール（しばしば合成化学を通じて生産される合成物）の使用を生物学系の研究と操作に取り入れる化学的なアプローチである。いくつかの生物化学の形式は、化学レベルで生物学系を直接精査することによって生物学的問題に答えようとする。生物化学、遺伝学または分子生物学を使っている研究と対照的に、突然変異生成が新しいバージョンの生物または興味深い細胞を提供することができる所で、特定の目的のために設計されたか、生物化学または細胞ベースのスクリーニングに基づいて特定された小分子を用いて、生物化学は、試験管内で、そして、生体内でかつての精査システムを研究している。

10

【0096】

87. 細胞生物学アプローチ (Cell biology approaches)

111. 細胞生物学アプローチなどの用語は、細胞研究（それらの生理学上の特性、それらの構造、それらが含む細胞小器官、それらの環境に対する相互作用、それらのライフサイクル、分割と死）を含む科学的なアプローチある。これは、微視的および分子レベルの双方でなされる。細胞の構成要素および細胞がいかに関与するかを知ることは、すべての生物科学の基本となる。

【0097】

88. バイオセンサ細胞分析を中心とした細胞プロファイル薬理学 (Biosensor cellular assay-centered cell profile pharmacology)

20

112. バイオセンサ細胞分析を中心とした細胞プロファイル薬理学などの用語は、ラベルフリーバイオセンサ細胞分析を使用している分子の薬理学を判定する方法である。

89. システム生物学 (Systems biology)

113. システム生物学などの用語は、混合物内およびそれらが機能する生理学的環境における生物学的プロセスの体系的なインターロゲーションである。

【0098】

90. システム薬理学 (Systems pharmacology)

114. システム薬理学などの用語は、薬理学ゴールの追求において、システム生物学を使用することである。

【0099】

30

91. マーカのバイオセンサシグナルを変調する (Modulate the biosensor signal of a marker)

115. 「バイオセンサシグナルを変調する」などの用語は、バイオセンサシグナルまたはマーカによる刺激に反応する細胞のプロファイルの変化を引き起こすことである。

【0100】

92. DMRシグナルを変調する (Modulate the DMR signal)

116. 「DMRシグナルを変調する」などの用語は、DMRシグナルまたはマーカによる刺激に反応する細胞のプロファイルの変化を引き起こすことである。

【0101】

93. (薬剤候補分子の) 直接作用 (Direct action (of a drug candidate molecule))

40

117. 直接作用などの用語は、細胞に独立に作用している（薬剤候補分子の）結果である。

【0102】

94. 細胞プロファイル薬理学

118. 細胞プロファイル薬理学などの用語は、分子による個々または全体的な刺激に反応する細胞の1次プロファイル、および分子の不存在下にけるマーカ分子のパネルによる個々または全体的な刺激に反応する細胞の2次プロファイルを生成するために、ラベルフリーバイオセンサ、特に光学バイオセンサを使用している。、1次プロファイルおよび2次プロファイルの双方のコレクションおよびそれらの結果として生じる変調プロファイ

50

ルが、個々にまたは全体的に使用され、分子の薬理を判定する。

【0103】

95. 分子の不存在および存在下における細胞／マーカのキネティック反応 (Kinetic response of the cells/markers in the absence and presence of a molecule)

119. 「分子の不存在および存在下における細胞／マーカのキネティック反応」などのフレーズは、分子の不存在下および存在下におけるマーカによって誘導された細胞反応の全体分析または部分分析時系列をいい、それは例えば、パターン認識分析を用いた薬理学または分子の活動のモードを調べるために直接に使用され得る。

【0104】

96. 付着する (Attach)

120. 「付着する」、「付着」、「接着する」、「接着した」、「接着性の」「不動化した」などの用語は、例えば、本開示の表面修飾物質、適合化剤、細胞、リガンド候補分子および同様の主体を、物理吸着、化学的結合および同様のプロセスまたはこれらの組み合わせによって表面に固定化するまたは不動化することを一般的にいう。特に、「細胞付着」、「細胞吸着」などの用語は、表面への細胞の結合または相互作用を言い、例えば、培養による、または、アンカー物質、適合化剤（例えばフィブロネクチン、コラーゲン、ラミン、ゼラチン、ポリリジン、その他）での相互作用による、または、実体によるものである。「付着細胞」、「固定化された細胞」などの用語は、原核または真核細胞などの気質の外面に付随し、固定化され、接触してとどまっている細胞または細胞核または細胞システムをいう。培養した後のそのようなタイプの細胞は、付着したまま洗浄および培地交換に耐え、生存することができる。プロセスは多くの細胞ベースの分析に不可欠である。

【0105】

97. 弱い付着細胞 (Weakly adherent cells)

121. 弱い付着細胞は、細胞培養の間、基質の表面と弱く相互作用するまたは付随するまたは接触する、原核または真核細胞などの細胞または細胞株または細胞システムをいう。しかしながら、これらのタイプの細胞、例えばヒト胎児由来肝臓 (HEK) 細胞などは洗浄または培地交換などの物理的に阻害する方法によって基質の表面から容易に分離される。

【0106】

98. 浮遊細胞 (Suspension cells)

122. 浮遊細胞は、培地内で好ましく培養されている細胞または細胞株をいい、細胞は、培養の間、基質の表面に付着または接着しない。しかしながら、浮遊細胞は、一般に、化学的手段（例えば共有結合または抗体-細胞表面受容体相互作用）または物理的手段（例えば、定着、重力により、バイオセンサが埋められるウェルの底）によってバイオセンサ表面と接触する。

【0107】

99. 対象 (Subject)

123. 至るところに使用されるように、対象などの用語は個体を意味する。従って、「対象」は、例えば猫、犬、などの飼いならされた動物、家畜（例えば、牛、馬、豚、羊、山羊など）、実験動物（例えば、マウス、うさぎ、ラット、モルモットなど）および哺乳類、人間以外の哺乳類、霊長類、人間以外の霊長類、齧歯動物、鳥、爬虫類、両生類、魚および他のどの動物も含み得る。ある態様において、対象は、例えば霊長類または人間などの哺乳類である。対象は人間でなくてもよい。

【0108】

100. 随意的な (Optional)

124. 「随意的な」、「必要に応じて」などの用語は、後に記述されるイベントまたは状況が起こるまたは起こらないことを意味し、および、記述がイベントまたは状況が起こる場合または、それが起こらない場合を含んでいることを意味する。例えば、「必要に応じて、組成は組み合わせからなることができる」というフレーズは、記述が組み合わせ

10

20

30

40

50

および組み合わせの不存在（すなわち、組合せの個々の要素）の双方を含むように、組成が異なる分子の組合せから成り得るまたは組合せを含まないかもしれないことを意味する。

【0109】

101. A

125. 明細書および添付された請求の範囲において使用される場合、単数形「a」、「an」および「the」などの用語は、文脈が別の方法で明確に指示しない限り、複数の指示物を含む。従って、たとえば、「製薬キャリア」という言及は、そのような2以上のキャリアの混合物を含む。

【0110】

102. 省略 (Abbreviations)

126. 技術の通常の知識を有する者によく知られている省略が、使用されている。（例えば時間に「hr」、グラムに「g」または「gm」、ミリリットルに「mL」および室温に「rt」、ナノメートルに「nm」、モルに「M」などの省略）

103. 範囲 (Range)

127. 範囲は、「およそ」1つの特定の値からおよび／または「およそ」他の特定の値までとしてここに示される。そのような範囲が示されたとき、他の実施例は、当該1つの特定の値からおよび／または当該他の特定の値までを含む。同様に、値が近似値として示されたとき、前例の「およそ」の使用により、特定の値は、他の実施例を形成すると理解されるであろう。範囲の各々の終点が、他の終点との関係においておよび他の終点と独立して、有意であるとさらに理解されるであろう。また、ここに明らかにされた多くの値があり、そして、各値がその値自体に加えて特定の値である「およそ」としてここに開示されていることも理解されるであろう。例えば、もし値10が開示されているとき、約10もまた同時に開示されている。熟練した職人によって適切に理解されるように、ある値が「その値よりも小さいまたは等しい」と開示されているとき、その値は、「その値より大きいまたは等しい」および値の間のとりえる範囲も開示されていると理解される。例えばもし、値「10」が開示されている場合、「10未満または10に等しい」および「10より大きいまたは10に等しい」も開示される。この出願のいたるところに、データはいくつかの異なるフォーマットで提供されており、このデータは、終点および始点およびデータポイントのあらゆる組み合わせに関する範囲を示していることも理解される。例えば、もし、特定のデータポイント「10」および特定のデータポイント「15」が開示されている場合、より大きい、より大きいまたは等しい、より少ない、より少ないまたは等しい、10および15に等しい値が10と15の間の値と同様に開示されているものと考えられると理解される。2つの特定のユニット間の各ユニットも開示されていると理解される。例えば、もし、10および15が開示されているとき、11、12、13および14も開示される。

【0111】

104. からなる (Comprise)

128. 記述および本明細書の請求の範囲を通して、語「からなる」およびその語の変形は、「含むがこれに限定されるものではない」を意味し、例えば、他の追加的な、構成要素、整数またはステップを排除することを意図していない。

【0112】

105. 本質的に～からなる (Consisting essentially of)

129. 実施例における「本質的に～からなる (Consisting essentially of)」とは、例えば、表面組成、表面組成を形成もしくは使用する装置、またはバイオセンサの表面組成、および本開示の製品、デバイスまたは装置をいい、特許請求の範囲に記載された構成要素またはステップを含み得る。さらに、特定の反応物、特定の添加物もしくは成分、特定の薬剤、特定の細胞もしくは株化細胞、特定の表面変更因子または表面状態、特定のリガンド候補等、の変更可能な構造、材料またはプロセスなどのように、組成、物品、装置および本開示の作製および使用の方法の基本的且つ新規な性質に物質的に作用し

10

20

30

40

50

ない他の構成またはステップを含み得る。本開示の構成またはステップの基本的な性質に物質的に作用し得るかまたは本開示に望ましくない特徴を与え得る要素は、例えば、バイオセンサ表面に対する細胞の親和性の減少、細胞表面受容体または細胞内受容体に対する刺激の異常親和性、リガンド候補等の刺激物に反応する異常または反対の細胞活動、及びこれらと同様の特徴を含む。

【0113】

106. 安定な (Stable)

130. 医薬品組成物に関して使われるとき、「安定な」などの用語は、定まった期間の特定の貯蔵条件下における有効成分の特定の損失量（通常10%）未満の意味として技術的に理解される。組成が安定であると思われることを要求される時間は各々の製品の使用に関連し、製品を生産することの商業的実用性によって決定される。品質管理と点検のためにそれを保持し、最終的な使用の前に再びそれが貯蔵庫に保持されたところで、卸売業者に、または、直接顧客に出荷される。2、3ヵ月の時間の安全係数を含んで、医薬のための最小限の製品寿命は、通常1年、望ましくは18ヵ月以上である。ここに使われる場合、「安定な」という語は、これらの市場現実性および、すぐに達成できる環境状況（例えば2℃～8℃の冷蔵状態）で製品を格納および輸送する能力に及ぶ。

【0114】

107. 構成要素 (Components)

131. 開示された組成を準備するのに使用される構成要素およびここに開示された方法の中で使用される構成要素自体が開示されている。これらおよび他の材料がここに開示され、これらの材料の組み合わせ、サブセット、相互作用、グループなどが開示されているとき、様々な個々のおよび全体的な組合せの各々の特定の言及と、これらの分子の順列とがはっきりと開示されない場合であっても、各々はここにおいて熟慮され、記載されていることが理解される。従って、もし、分子A、BおよびCのクラスと、分子D、EおよびFのクラスと、組み合わせ分子の例A-Dとが開示され、各々が個々に列挙されていない場合でさえ、各々が個々におよび全体的に考慮された意味のある組み合わせ、A-E、A-F、B-D、B-E、B-F、C-D、C-EおよびC-Fが開示されているものと考えられる。従って、例えばA-E、B-FおよびC-Eのサブグループは開示されているものと考えられる。この概念は、開示された組成の作製および使用方法におけるステップを含む本出願のすべてのアスペクトに適用されるが、これに限定されるものではない。従って、もし、実施され得る追加のステップの多様性がある場合、これらの追加のステップの各々は、あらゆる特定の実施例または開示された方法の実施例の組み合わせで実施され得ることが理解される。

【0115】

108. 模倣する (Mimic)

132. ここに使用されているように、「模倣する」などの用語は、参照物体の1以上の機能を実行することをいう。例えば、分子模倣は、分子の1以上の機能を実行する。

【0116】

109. または (Or)

133. 語「または」などはここで使用されているように、特定のリストのあらゆる1のメンバーを意味し、そのリストのメンバーのあらゆる組み合わせをも含む。

【0117】

110. 刊行物 (Publications)

134. 本出願を通して、様々な刊行物が参照されている。これらの刊行物の開示の全体は、これが関係する到達技術水準について、より完全に説明するために参照によってこの出願に組み入れられる。開示された引用例は、その引用例に含まれる信頼されている文章中で論じられている材料に関し、個々におよび具体的に参照によってここに組み入れられる。

【0118】

111. サンプル (Sample)

135. サンプルなどの用語は、動物、植物、菌類などを意味する。すなわち、天産物、天産物抽出物など；動物からの組織または器官；細胞（対象内、対象から直接とられる、または培養内に維持されたまたは培養された細胞株からの細胞のどちらでも）；細胞可溶化物（または溶解物フラクション）または細胞抽出物；または細胞または細胞材料（例えばポリペプチドまたは核酸）に由来する一つ以上の分子を含んでいる溶液。サンプルは、ここに記載されるように分析される。また、サンプルは、細胞または細胞成分を含むどんな体液や排出物（例えば、限定されないが、血液、尿、便、唾液、涙、胆汁）であってもよい。

【0119】

112. 約 (About)

136. 例えば、構成要素の中の成分の数、濃度、体積、プロセス温度、プロセス時間、収率、流速、圧力などの値およびそれらの範囲を修飾している本開示の実施例の記述において使用されている「約」は、起こることがありえる数の量における変化に言及している。（たとえば、合成物、組成、濃縮物または使用製剤を作るために使用される典型的な測定および処理手順；これらの手順における不注意によるエラー；方法を実行するのに用いられる製品、ソース、出発材料または成分の純度における違い；などの考慮点を通して）。用語「約」は、特定の初期濃度または混合物を含む組成または製剤の老化によって異なっている量、特定の初期濃度または混合物を含む組成または製剤を混合するまたは処理することによって異なっている量を包含する。「約」という用語によって修飾されたかどうかにかかわらず、ここに添付された請求の範囲は、これらの量と等価なものを含む。

【0120】

113. 値 (Values)

137. 組成、要素、添加物、細胞タイプ、マーカなどのアспектおよびそれらの範囲のために開示された特定且つ好ましい値は、説明のためにのみ用いられる。それらは、定義された他の値または定義された範囲の中の他の値を除外しない。組成、装置および開示の方法は、それらが有するどんな値または値のどんな組み合わせ、特定の値、さらなる特定の値およびここに開示された好ましい値も含む。

【0121】

138. 従って、開示された方法、組成、製品および機械は、ここに論じられるように様々な構成要素、ステップ、分子、および組成などから成り、またこれらにより構成され、または本質的にこれらからなるような態様で、結合され得る。それらは、例えば、ここに定義されたようなりガンドを含む分子を特徴づけるための方法、ここに定義されたようなインデックスを生成する方法、ここに定義されたような創薬の方法においてそれらは使用され得る。

【0122】

114. 合成物および組成

139. 合成物および組成は、この技術において標準的な意味を有する。特定の指定物（分子、物質、マーカ、細胞または試薬組成など）からなる、またこれらの指定物により構成される、また本質的にこれらの指定物からなる組成が開示されることが理解される。従って、特定の指定マーカが使用されている場合、そのマーカからなり、そのマーカにより構成され、または本質的にそのマーカからなる組成が開示されることが理解される。適正な特定の指定がなされた場合は常に、その指定物の合成物も開示されるものと理解される。例えば、もし、EGFなどの特定の生物学的材料が開示された場合、その合成物形式におけるEGFも開示される。

【0123】

B. 組成、方法、製品および装置

140. 製薬およびバイオテクノロジー産業は、一見対立するゴールによる課題を抱えている。（1）新薬のために低消耗を達成すること、（2）市場への新薬の導入時間を減らすこと。創薬は、ほとんど無制限の数の化学物質から望ましい薬理学上および生理学上の性質を有する捉えどころのない分子を選ぶことを必要とする。残念なことに、薬の選択

は、とても費用が高く、本質的に低効率プロセスであり得る。先進技術への相当な投資にもかかわらず、新薬承認の数は、近年低いままであった。現在の研究開発生産性のギャップは－1年につき採用される新薬候補の数に対する製薬研究開発費の増加額－広範囲にわたる懸念、およびその問題とその潜在的解決に関するいくつかの異なる意見を生み出した。

【0124】

141. 状況を激化させるために、ジェノミクスとプロテオミクスの最近の進歩は、新薬の潜在的目標数をかなり増やした。目的指向型の創薬技術は、既知の目的に対する前の成功にもかかわらず、新たな目的（すなわち、前の薬剤の目的ではない分子）に対して薬剤を供給することがしばしばできなかった。注目すべきは、過去10年の間、そのような「革新的な」目標に対して、全産業で平均して1年につき2～3つの小分子薬だけであった。その結果、多くの企業は、創薬および開発において使われるツール、技術および実践を再検査している。この内省は、特に創薬において、システム生物学およびシステム薬理学ベースの評価および薬剤作用の検証、およびさらなる生理学関連技術の必要性をハイライトした。

【0125】

1. 分子を特徴付ける方法

142. 創薬のためのラベルフリーバイオセンサ細胞分析を使用する方法が開示されている。とくに、創薬のためのラベルフリーバイオセンサ細胞分析を中心とする細胞プロファイル薬理学に関する方法が開示されている。本方法は、人間生理学および人間病態生理学を代表する異なるタイプの細胞のパネルへの作用を直接モニタすることにより、およびマーカ分子のパネルを用いて、個々にまた全体的に、刺激に反応する各細胞のバイオセンシング信号を変調する薬剤候補分子の能力を判定することにより、薬剤候補分子のシステム細胞薬理学を判定するラベルフリーバイオセンサの使用を含む。細胞に対する分子の直接作用は1次プロファイルをもたらす一方、マーカ誘導されたバイオセンシング信号に対する分子の変調は、2次プロファイルという結果をもたらす。両タイプのプロファイルは、通常、リアルタイム動的細胞反応として記録される。分子の不存在下における1次プロファイルとマーカのパネルが作用している複数の細胞に亘る分子の存在下における2次プロファイルを結合することにより、これらのマーカに対する分子の変調プロファイルのパネルがもたらされる。変調プロファイルの全体または一部のパネルは、DMRインデックスの如きバイオセンサイネックスなどの変調インデックスを生成するために結合され得る。分子インデックスと薬理学的に知られた分子のパネルの確立されたインデックスとを比較することにより、細胞受容体、ターゲット、分子が介在する経路を割り出すことが可能となる。この細胞プロファイル薬理学アプローチは、あらゆる分子の活動（例えば、ターゲット、経路、アゴニズムまたはアンタゴニズム、または毒性）のモードに関する情報を提供するだけでなく、それらの潜在力、選択性およびシステム細胞薬理学の割り出しを可能とする。

【0126】

143. 本創薬のアプローチおよび本方法は、限定されるものではないが、物質、分子、リガンド、マーカ、分子、組成、未知の分子、既知の分子、テスト分子、薬剤候補分子、分子混合物、モジュレータ、既知のモジュレータ、細胞、アゴニスト、アンタゴニスト、ライブラリ、パネル、マーカパネル、細胞パネル、受容体、細胞ターゲット、定義された経路、分子処理された細胞、シグナル経路、付着細胞、弱い付着細胞、浮遊細胞、バイオセンサ、および対象物さえも含む、ここに開示されているあらゆる物理的構成要素を使用することができる。

【0127】

144. 本創薬のアプローチおよび本方法は、限定されるものではないが、反応、細胞反応、DMR反応、プロファイル、1次プロファイル、2次プロファイル、変調プロファイル、バイオセンシング信号、DRMシグナル、コントロール、ポジティブコントロール、ネガティブコントロール、モジュレータ比較、インデックス、バイオセンサイネックス

ス、分子バイオセンサインデックス、分子DMRインデックス、分子インデックス、モジュレータバイオセンサインデックス、モジュレータDMRインデックス、分子モジュールインデックス、既知のモジュレータバイオセンサインデックス、既知のモジュレータDMRインデックス、マーカバイオセンサインデックス、マーカDMRインデックス、マーカバイオセンサインデックス、マーカインデックス、インデックスの類似性、マトリックス、分子薬理学、細胞プロセス、期間、短期間、他の期間、インジケータ、人間生理学、人間病態生理学、長期バイオセンサシグナル、長期DMRシグナル、強いバイオセンサシグナル、強いDMRシグナル、効率、ネットワーク相互作用、生物化学、細胞分析を中心とする細胞プロファイル薬理学、システム細胞薬理学および細胞プロファイル薬理学を含む、ここに開示されたあらゆる物理的／而上学的構成要素または情報関連構成要素を使用することができる。

10

【0128】

145. 本創薬のアプローチおよび本方法は、限定されるものではないが、変調、細胞培養、分析、長期間分析、短期間分析、2ステップ分析、パルス刺激分析、処理、接触、誘発、検出、反応分析、規格化、特徴づけ、増強、パニング、バイオセンサシグナル変調、DMRシグナル変調、および付着を含む、ここに開示されたあらゆる方法要素を使用することができる。

【0129】

146. 構成要素のどれもが、少なくとも上記の構成要素リスト上において列挙された構成要素に関し、あらゆる組み合わせにおいて使用され得、各順列は具体的にここに列挙されていることが理解される。

20

【0130】

147. 細胞プロファイル薬理学ベース創薬のために、異なるタイプの細胞のパネルを判定するマトリックスが開示される。

【0131】

148. ある実施例においてヒト細胞は、薬剤候補分子などの分子の薬理学を割り出すために使用される。候補薬の薬理学を割り出すためのヒト細胞の全てのタイプを使用することは実際ほとんど不可能である。薬剤候補分子の可能性およびドラッグビリティをアンサンブルするために、異なる細胞のパネルが、特定の目的のために選択され、使用され得る。例えば、広いスペクトラムタイプの細胞のパネルが潜在的副作用を評価するために使用される一方、特定疾患を治療する分子の潜在力および効能を判定するために特定疾患関連細胞のパネルが使用される。一方で、特定の器官からの細胞のパネルが分子の特異性を調べるために使用され、特定のターゲットのための細胞のパネルが同一のターゲット介して作用している分子の広いかかわり合いを判定するために使用される。各細胞の特定の細胞バックグラウンドに起因して、特定の細胞ターゲットの活動の変調が、異なる細胞反応（しばしば細胞状況依存的な「表現型」反応と呼ばれる。）をもたらすことが知られている。薬剤候補分子は同一の細胞ターゲットの活動を変調する機能的選択性を示すことができる。従って、同じターゲットを発現する異なるタイプの細胞に亘って異なる細胞反応をもたらす。

30

【0132】

a) シグナリング経路および細胞ターゲット

149. 細胞の各タイプに関し、マーカ／細胞ターゲット／経路のパネルの使用が開示されている。マーカ／細胞ターゲット／経路の選択は、各細胞のタイプにおけるDMRシグナルなどのバイオセンサシグナルを誘発するそれらの能力に関してリガンドのパネルの先決を開始し、各リガンドのシステム細胞生物学（例えば、経路、ターゲットのリガンド誘導された変調から下流を含むネットワーク相互作用）およびシステム細胞薬理学（例えば、ターゲット特異性および潜在力および効能）を割り出すための生物化学変調プロファイルリングがこれに続く。リガンドは、（1）そのリガンドが、バイオセンサ細胞分析を使用している細胞内において強いバイオセンサシグナルを生成しているとき、（2）リガンドバイオセンサシグナルが少なくとも1つの特定の細胞シグナリング経路および／また

50

は少なくとも1つの特定のターゲットを媒介する少なくとも1つの特定の細胞プロセスの特徴であるときマーカーとしての資格を得ることができる。

【0133】

150. マーカーは、細胞パネルにおける細胞の各タイプに関して異なる場合がある。例えば、細胞1に関してマーカーAおよびBおよびCが使用され得る。一方、細胞2に関してマーカーDおよびEおよびFが使用され得る。他の実施例において、少なくとも1つのマーカーは、パネルにおける細胞の少なくとも2つのタイプにおいて共通である。例えば、ヒスタミンはパネルにおけるA549およびA431の双方においてマーカーとして使用され得る。他の実施例において、パネルにおける各細胞のためのマーカーの数は異なる場合がある（例えば細胞1に対して1つのマーカー、細胞2に対して2つのマーカー、細胞3に対して2つのマーカー、細胞4に対して4つのマーカー）。他の実施例において、パネルにおける各細胞のためのマーカーの数は同一であり得る（例えば、各細胞に対して1つのマーカー、または各細胞に対して2つのマーカー、または各細胞に対して3つのマーカー）。

【0134】

151. 実施例において、マーカーのパネルが、細胞シグナリング経路の多数を包括的にカバーするために選択される場合がある（例えば、 G_q 経路に対して1つのマーカー、 G_i 経路に対して1つのマーカー、 G_s 経路に対して1つのマーカー、EGFR経路に関して1つのマーカー、トール様受容体経路に関して1つのマーカーなど）。ある実施例においては、マーカーのパネルは、興味深い特定の病気に応じて（炎症性疾患、伝染病、ガン、糖尿病、肥満、ニューロン疾患、自己免疫疾患、喘息の気道炎症、COPDの気道病理学、アルツハイマー病、白斑症、結腸直腸がん、膵性腺癌またはウイルス誘導された気道炎症など）シグナリング経路の特定のセット（例えば、PI3K経路、Akt経路、PKA経路、MAPK経路、JNK経路、トール様受容体経路、 G_p 経路、 G_s 経路、 G_i 経路、 $G_{12/13}$ 経路、EGFR経路、mTOR経路、またはIKK経路など）をカバーするために選択される場合がある。

【0135】

152. 主要な細胞シグナリング経路は、限定されるものではないが、14-3-3誘導された細胞内シグナリング（例えば、細胞周期制御、アポトーシス）、アクチンベース運動性RhoファミリーGTPアーゼ、cAMP-PKA経路、GPCRs媒介Gs経路、GPCRs媒介Gq経路、GPCRs媒介Gi経路、GPCRs媒介G12/13経路、AIF経路、Aktシグナリング、上皮細胞内のアルドステンシグナリング、AMPKエンザイム混合経路、MHCsによる抗原プロセッシングおよびプレゼンテーション、細胞死受容体を介したまたはHIV1によるアポトーシス、苦味シグナリング、cAMP経路、ヘルパーT細胞内のCD28シグナリング、細胞アポトーシス経路、セラミド経路、ケモカインシグナリング、CREB経路、サイクリンおよび細胞周期制御、eNOSシグナリング、ERKシグナリング、エストロゲン経路、FAKシグナリング、FGF経路、 $G_{12/13}$ シグナリング、GPCR経路、成長ホルモンシグナリング、GSK3シグナリング、インターロイキン（例えばIL-1、IL-2、IL-22、IL-3、IL-23、IL-9）経路、iNOSシグナリング、インスリン受容体経路、インテグリン経路、インターフェロン経路、細胞内カルシウムシグナリング、IP3経路、JAK-STAT経路、JNK経路、MAPKシグナリング、ミトコンドリアのアポトーシス、mTOR経路、NF- κ B経路、NGF経路、ノッチシグナリング、p38シグナリング、アポトーシス媒介p53、PDGF経路、ホスホリパーゼC経路、PI3Kシグナリング、PKAシグナリング、PKC経路、PTEN経路、Rac1経路、RANK経路、Rap1経路、Ras経路、RhoA経路、RNAi経路、siRNA経路、SMADシグナリング、STAT3経路、SUMO経路、T細胞受容体シグナリング、TGF- β 経路、トロンビンシグナリング、TNFシグナリング、トール様受容体経路、VEGF経路、WNTシグナリングを含む。これらの多くの経路およびシグナリングイベントが多くの収束点（インテグレートポイントまたはジョイントと称される）を共有し、および互いに相互作用しているので、ここに開示されるバイオセンサ細胞分析はシグナリング

およびネットワーク相互作用に関する情報を提供することができる。ここに提供されるように細胞プロファイル薬理学創薬のために、マーカ／ターゲット／経路のパネルに含まれるこれらの全ての経路を持つ必要はない。

【0136】

153. バイオセンサ細胞プロファイル薬理学ベースの発見のための複数のタイプの分析の使用が開示されている。1つの実施例において、長期間バイオセンサ細胞分析が細胞のパネルにおける分子の長期間の影響を調べるために使用される。ここで、各細胞のタイプは長期間（例えば8時間、16時間、24時間、32時間、48時間、72時間）分子にさらされるのみである。この長時間分析は、健全な細胞状態に対する分子の影響を判定するために使用される（例えば、生存度、アポトーシス、細胞周期制御、細胞接着度、増殖）。また、この長期間分析は、初期細胞反応（例えば分子刺激の後10分、30分、60分、120分、180分）を含み、分子誘導された細胞シグナリングイベントまたは経路を調べるために直接的に使用され得る。

10

【0137】

154. 他の実施例において、マーカの存在下における長期間のバイオセンサ細胞分析は、分子とマーカ間の細胞生物学および生理学上の長期間影響の相互規制を調べるために使用される。マーカは、分子の前または同時または後に添加され得る。例えば、マーカ（例えば H_2O_2 ）が細胞パネルにおける少なくとも1つのタイプの細胞のアポトーシスを誘発するとき、分子が保護性であるか否かを判定するためにそのような長期分析を使用することができる。

20

【0138】

155. 他の実施例において、DMRシグナルなどの分子誘導されたバイオセンサシグナルを調べるためにはじめに細胞パネルにおける細胞の各タイプが分子にさらされ、これに続いて特定のマーカまたはマーカのパネルが独立に処理される一方、少なくとも2ステップ分析が使用される。この分析はしばしば2モード分析と称される（はじめのアゴニズムモードおよびこれに続くアンタゴニズムモード）。アゴニズムモードは、DMRシグナルなどのバイオセンサシグナルを誘発する分子の能力を判定することを企図している。一方、アンタゴニズムモードは、マーカのパネル（細胞パネルにおける1つの細胞タイプのための各マーカのパネル）のDMRシグナルなどのバイオセンサシグナルを変調する分子の能力を判定することを企図している。

30

【0139】

156. 他の実施例において、パルス刺激分析が使用され得る。これにおいて、細胞は非常に短い時間（例えば数秒または数分）分子にさらされるのみである。このパルス刺激分析は、細胞／ターゲットに作用する分子のキネティクスおよびマーカ誘導されたDMRシグナルに対するその影響を調べるために使用され得る。パルス刺激分析は、分子添加直後の所定時間に、液体処理装置によって単に分子溶液を細胞分析緩衝液と置き換えることで実施することができる。

【0140】

2. インデックスの生成方法

157. 薬剤候補分子などの分子のシステム細胞薬理学を調べる方法が開示されている。その方法は、分子のシステム細胞薬理学の直接分析、または分子—およびよく知られたモジュレータ（例えばPI3K抑制剤、PKA抑制剤、GPCRアンタゴニスト、GPCRアンタゴニスト、RTK抑制剤、EGFR中和抗体またはホスホジエステラーゼ抑制剤、PKC抑制剤または活性化因子）誘導されたDMRインデックスなどのバイオセンサシグナル間のパターン認識に基づく間接分析のためのDMRインデックスなどのバイオセンサシグナルインデックスの生成を含む。

40

【0141】

158. 1つの実施例において、方法は、（1）アゴニストモードにおける分子のDMR反応などのバイオセンサ反応を収集するステップ、（2）分子の不存在下および存在下において細胞パネルにおけるマーカのパネルのDMR反応などのバイオセンサ反応を収集

50

するステップ、(3) DMRシグナルなどのバイオセンサシグナルの各々からDMRパラメータなどのバイオセンサ反応パラメータの特定のセットを抽出するステップ、(4) ポジティブコントロール(すなわち、あらゆる分子の不存在下におけるマーカで処理された細胞)に対して各パラメータを規格化し、変調(増強または抑制または無変調を示すことができる)のパーセンテージを生成するステップ、(5) マーカ/細胞の関数として各パラメータの変調のパーセンテージをプロットし、分子のバイオセンサシグナルを生成するステップ、(6) 分子誘導されたバイオセンサシグナルインデックスと、既知のモジュレータバイオセンサシグナルインデックスのライブラリ、またはあらゆる分子誘導されたバイオセンサシグナルインデックスのライブラリを、細胞/マーカのパネルに対して比較するステップ、を含む。

10

【0142】

159. 1つの実施例において、方法は、(1) アゴニストモードにおける分子のDMR反応を収集するステップ、(2) 分子の不存在下および存在下において細胞パネルにおけるマーカのパネルのDMR反応を収集するステップ(3) DMRシグナルの各々からDMRパラメータの特定のセットを抽出するステップ(4) ポジティブコントロール(すなわち、あらゆる分子の不存在下におけるマーカで処理された細胞)に対して各DMRパラメータを規格化し、変調(増強または抑制または無変調を示すことができる)のパーセンテージを生成するステップ、(5) マーカ/細胞の関数として各DMRパラメータの変調のパーセンテージをプロットし、分子のDMRインデックスを生成するステップ、(6) 分子誘導されたDMRインデックスと既知のモジュレータDMRインデックスのライブラリ、またはあらゆる分子誘導されたDMRインデックスのライブラリとを、細胞/マーカのパネルに対して比較するステップ、を含む。

20

【0143】

160. DMRインデックスなどの分子バイオセンサシグナルインデックスとDMRインデックスなどのモジュレータバイオセンサシグナルインデックスとの間の類似性が分子の活動のモード(例えばターゲット、アゴニズムまたはアンタゴニズムおよび潜在力または効能)のインジケータとして使用され得る。DMRインデックスなどの分子バイオセンサシグナルインデックスがDMRインデックスなどのモジュレータバイオセンサシグナルインデックスに近づくほど、モジュレータが作用する同じターゲットを分子が変調する可能性が高くなる。アゴニストモードにおけるDMRシグナルなどの分子バイオセンサシグナルは、DMRインデックスなどのバイオセンサシグナルインデックス内に含まれ得る。

30

【0144】

161. ある実施例において、分子は、1つのインデックスと他のインデックス(例えば既知のマーカインデックスに対する分子インデックス)との間で少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%の類似性を有していると特定される。しかしインデックスが作り出される多くの点(例えばプロファイルからのP-DMRデータ)で、類似性が判定されることがある。この例では、類似性は2つ方法のうちの1つにおいて判定され得る。すなわち、1) 各インデックスに関してすべてのP-DMRデータポイントのうちの少なくとも例えば80%、または2) 各インデックスに関して各データポイントで少なくとも80%の類似性。

40

【0145】

162. ある実施例において、分子の活動のモードは、マーカインデックスのライブラリ、モジュレータインデックスまたはあらゆる分子インデックスとの比較による従来の分子インデックスのパターン認識分析を用いて特性される。

【0146】

163. ある実施例において、分子の活動のモードはスコアのマトリックスを用いて特定される。対応する細胞における異なる分子の1次プロファイルのサイン、および各マーカに対する異なる分子の変調プロファイルの性質やパーセンテージのように、スコアのマトリックスは、それらのカウンターパートに強く関係している。例えば、より高いスコア

50

は、より類似している特徴に与えられ、より低いスコアまたは負のスコアは非類似の特徴に与えられる。分子変調インデックスにおいて見いだせる変調のタイプは、ポジティブ、ネガティブ、ニュートラルの3つしかない故、類似性マトリックスは比較的単純である。例えば、単純なマトリックスは、+1のスコアの同一の変調（例えばポジティブな変調）および-1のスコアの非同一の変調を割り当てる。代替の実施例において、異なるスコアが1つのタイプの変調ではあるが異なるスケールをもつ変調に対して与えられる。例えば、10%、20%、30%、40%、50%、60%、100%、200%などのポジティブな変調は、相応して、スコア+1、+2、+3、+4、+5、+6、+10、+20が与えられる。一方、ネガティブな変調に関しては、同様に、しかし逆のスコアが与えられる。このアプローチに従えば、マーカのパネルに対するHA-1077の変調インデックスは、図9Cに示されるように、PKA/PKG抑制剤HA-1077が異なるマーカによって誘導されたバイオセンサ反応を異なるように変調することを示す。すなわち、A549細胞において、ピナシジル（-95%）、ポリ（I:C）（+18%）、PMA（+36%）、SLIGKV-アミド（+22%）、フォルスコリン（+18%）、ヒスタミン（+26%）、および静止状態のA431細胞においてエピネフリン（-38%）、ニコチン酸（+8%）、EGF（P-DMR（+19%））、EGF（N-DMR（-20%））、ヒスタミン（-50%）。従って、同格関係におけるHA-1077変調インデックスのスコアは、（-9.5、1.8、3.6、2.2、1.8、2.6、-3.8、0.8、1.9、-2、-5）のように割り当てられる。同様に、H8に関しては、同格関係におけるそのスコアは、（-7.2、1.8、2.2、3.2、2、3.8、6.5、-1.6、1、0.3、-2、1.6）である。HA-1077とH8との間でスコアを比較することにより、両分子は、試験される2つの細胞株において類似の活動のモードを示すと結論付けることができる。

10

20

【0147】

3. 創薬の方法

164. 薬剤候補分子を含むあらゆる分子のシステム薬理学およびシステム細胞薬理学評価のための方法が開示されている。方法は、DMRインデックスなどの、分子のバイオセンサインデックスを作成するために細胞/ターゲット/マーカ/経路の選択に頼る。分子のDMRシグナルなどのバイオセンサシグナルを誘発する能力およびDMRシグナルなどのマーカ誘導されたバイオセンサシグナルを変調する能力の分析は、異なる分析のタイプと併せて、分子の統合的薬理学を体系的な評価をもたらす。

30

【0148】

165. 開示された創薬のための細胞プロファイル薬理学アプローチの原理を示す図1を参照する。この例において、2つの細胞のタイプ、細胞1および細胞2が使用されている。この2つの細胞のタイプは、関連があってもなくてもよい。各細胞のタイプのための2つの分析のタイプ、すなわち、分子のみによる長期間分析、および2ステップ（または2モード）分析などの短期間分析である。長期間分析は、健全な細胞状態に対する分子の影響（例えば、増殖率、細胞周期制御、毒性、細胞接着の変更など）を判定するために使用される。この2モード評価は、両タイプの細胞における、DMRシグナルなどの分子誘導されたバイオセンサシグナルを判定する、はじめのアゴニストモード、およびこれに続くDMRシグナルなどの、各細胞のためのマーカのパネルによって誘導された、バイオセンサシグナルに対する分子の変調を判定するアンタゴニストモードを含む。ここでは、細胞1に対してマーカA、BおよびCまたは細胞2に対してマーカD、EおよびFのように、各細胞は自己のマーカのパネルを有している。細胞1に対応する経路a、bおよびcまたは細胞2に対応する経路d、eおよびfのように、各マーカは、異なる経路を介したシグナリングをもたらす。あるいは、これらの経路は互いに相互作用し、または、それらの少なくとも2つは、類似または同一であり得る。変調プロファイルの集合は、変調インデックスを作成するために使用され得る。分子の1次プロファイルとともに、2つの細胞のタイプおよび6つのマーカに対する分子に関するDMRインデックスなどのバイオセンサインデックスが作成され得る。DMRインデックスなどのバイオセンサインデックスは、

40

50

既知のモジュレータのライブラリに関する DMR インデックスなどのバイオセンサインデックスのライブラリに対するパターン認識を通じて、分子薬理学を判定するためにさらに使用される。

【0149】

166. 分子薬理学判定のために、どのようにバイオセンサ細胞プロファイル薬理学ベースアプローチが使用されているかを示す図2を参照する。このアプローチは、細胞から始めて、特定の経路を介した細胞シグナリング（例えば、Cq 結合ヒスタミン1 受容体媒介シグナリング）を誘発するマーカのパネルに対する分子をテストし、最後に、DMR インデックスなどの既知のモジュレータ誘導されたバイオセンサシグナルインデックスのライブラリとの比較を通じたパターン認識（または特定のデータポイント）を用い、分子が作用する特定のターゲットを判定する。結果として、分子の統合的薬理学が割り出される。

10

【0150】

167. 開示された細胞プロファイル薬理学は、マーカ分子のパネルによる個々のまたは全体的な刺激に反応する細胞の1次プロファイルを生成するために、ラベルフリーバイオセンサ、特に光学バイオセンサを使用する。各マーカ分子は、受容体または細胞ターゲットを活性化して細胞にバイオセンサシグナルをもたらす。バイオセンサ中心測定を使用して分子薬理学を判定およびスクリーニングするための方法が開示されている。当該方法は、以下のステップを含む。

【0151】

20

168. 1) 細胞のパネルを選択するステップ。これにおいて、細胞はマトリックスに基づいて選択される。

【0152】

169. 2) 各細胞のタイプにおける細胞ターゲットおよびマーカのパネルを決定するステップ。これにおいて、マーカ分子による細胞ターゲットの変調は、定義された経路を介した細胞シグナリングをもたらすだけでなく、ラベルフリーバイオセンサによって検出されたバイオセンサシグナルをもたらす。

【0153】

170. 3) 分子で各細胞を処理するステップ。

【0154】

30

171. 3a) マーカのパネルで各細胞を処理してパネルから各マーカの1次プロファイルを生成するステップ。

【0155】

172. 4) 短時間の細胞反応をモニタリングして分子の1次プロファイルを生成するステップ。

【0156】

173. 5) 分子処理された細胞にマーカのパネルを個別に添加するステップ。これにおいて、各マーカは特定の投与量で与えられ（例えばEC₅₀、EC₈₀、EC₉₀、EC₉₅、EC₁₀₀）、各マーカのシグナルに影響を与えている分子の2次プロファイルを生成する。

40

【0157】

174. 6) 別の期間に細胞反応をモニタリングするステップ。

【0158】

175. 6a) 分子の存在下における各マーカの2次プロファイルと、マーカのパネルからの各マーカの1次プロファイルの各々とを比較するステップ

176. 7) 細胞のパネルに亘るおよびマーカのパネルに対する分子のバイオセンサインデックスを生成するステップ。

【0159】

177. 8) 分子のバイオセンサインデックスと既知の薬理学を持つモジュレータのバイオセンサインデックスとを比較するステップ。これにおいて、分子バイオセンサインデ

50

ックスとモジュレータバイオセンサインデックスとの間の類似性は、分子の活動のモードに関するインジケータである。

【0160】

178. 9) 必要に応じて、細胞におけるマーカの不存在下または存在下における分子の長期間バイオセンシング信号を生成するステップを含む。

【0161】

179. 開示された細胞プロファイル薬理学は、マーカ分子のパネルによる個々または全体的な刺激に反応する細胞の1次DMRプロファイルを生成するために、ラベルフリー光学バイオセンサを使用する。各マーカ分子は、受容体または細胞ターゲットを活性化し、細胞にDMR信号をもたらす。バイオセンサ中心測定を使用した分子薬理学を判定およびスクリーニングする方法が開示されている。当該方法は、以下のステップを含む。

10

【0162】

180. 1) 細胞のパネルを選択するステップ。これにおいて、細胞はマトリックスに基づいて選択される。

【0163】

181. 2) 各細胞のタイプにおける細胞ターゲットおよびマーカのパネルを決定するステップ。これにおいて、マーカ分子による細胞ターゲットの変調は、定義された経路を介した細胞シグナリングをもたらすだけでなく、ラベルフリーバイオセンサによって検出されたDMR信号をもたらす。

【0164】

20

182. 3) 分子で各細胞を処理するステップ。

【0165】

183. 4) 短時間の細胞DMR反応をモニタリングして分子の1次DMRプロファイルを生成するステップ。

【0166】

184. 5) 分子処理された細胞にマーカのパネルを個別に添加するステップ。これにおいて、各マーカは特定の投与量で与えられ（例えばEC₅₀、EC₈₀、EC₉₀、EC₉₅、EC₁₀₀）、各マーカのシグナルに影響を与えている分子の2次DMRプロファイルを生成する。

【0167】

30

185. 6) 別の期間に細胞DMR反応をモニタリングするステップ。

【0168】

186. 7) 細胞パネル全体でおよびマーカのパネルに対して、分子のDMRインデックスを生成するステップ。

【0169】

187. 8) 分子のDMRインデックスと既知の薬理学を持つモジュレータのDMRインデックスを比較するステップ。これにおいて、分子DMRインデックスとモジュレータDMRインデックスとの間の類似性は、分子の活動のモードに関するインジケータである。

【0170】

40

188. 必要に応じて、細胞におけるマーカの不存在下または存在下における分子の長期間DMR信号を生成するステップを含む。

【0171】

189. 細胞システムの使用および接点測定 (point-of-contact measures: 例えば、細胞成長率、特定のサイトカイン放出) に大きく依存した従来のシステム生物学およびシステム薬理学ベースの創薬と異なり、開示された方法は、分子薬理学および病態生理学を調べるために、ラベルフリーバイオセンサベースのキネティック測定と併せて、異なるタイプの体内に生じた細胞または操作された細胞のパネルを使用するものである。従来のシステム生物学アプローチは、特徴づけのために大規模分析ツール（例えばタンパク質マイクロアレイ、DNAマイクロアレイまたは質量分光法）を使用する。

50

【0172】

190. 細胞プロファイル薬理学のための体内に生じたまたは操作された細胞システムを使用する方法もまた開示されている。病気に関連する複雑性は、異なる細胞のタイプと一緒に組み合わせることにより、およびネットワーク規制および突発的な特性を引き出すために同時に複数の経路を活性化させることにより、細胞システム内に操作され得る。例えば、炎症性疾患に対する細胞システムアプローチは、内皮細胞、血中単核細胞、および複雑なサイトカインまたは免疫刺激環境の組み合わせを含み得る。

【0173】

191. システム生物学、および特に細胞シグナリング経路の解明およびダイナミック分析は、創薬の新しい枠組みを提供する。これらの多くの、多様な、相互作用している構成要素の結合した振る舞いに対する洞察は、反復的なアプローチにおける実験的、数学的、計算科学の統合を通して成し遂げられる。病気の分子機構のこの文脈上の理解を通して、システムアプローチは、治療的な変調の規制のおよび代謝性のネットワークの特定と検証を更に容易にする可能性を有し、従って、ターゲットおよびバイオマーカー、薬剤候補の「オフターゲット」および副作用の特定を助ける。開示された方法は、例えば、分子または物質を調べるためのシステム生物学の使用を可能とする。

【0174】

192. 開示された方法は、従来のシステム生物学ベースのアプローチの利益をも有する。例えば、細胞の組み合わせ、各システムにおける刺激および読み取り、および一緒に分析されるシステムの組み合わせは、できるだけ多くの既知の疾病変調エージェントおよび薬剤を、最小限の測定の設定で検出し、区別するために使用され得る。開示された創薬アプローチは、再び最初に生物学を置いて、発見プロセスを通して生物学的洞察を適用する。それは衝突を特定し、複雑な細胞システムまたは様々な活動的な細胞、興味のある疾病状態にある経路およびネットワークのモデルとなる細胞のパネルにおいて、それらの引き出された生物学に基づいてリードを最適化する。このアプローチにおいて、薬剤候補それ自身は、ターゲット遺伝子またはタンパク質ではなく、検証に使用される。

【0175】

4. バイオセンサおよびバイオセンサ分析

193. ラベルフリー細胞ベース分析は、通常、生体細胞における分子誘導された反応をモニタするためにバイオセンサを使用する。分子は自然に生じたもの、人工的なものであってもよく、浄化されたまたは浄化されていない混合物であってもよい。バイオセンサは、典型的には、光学的、電気的、熱量計的、音響的、磁氣的などのトランスデューサを利用し、バイオセンサと接触する細胞における分子認識イベントまたは分子変調された変化を定量化可能な信号に変換する。これらのラベルフリーバイオセンサは、分子相互作用分析のために使用され、分子複合体が時間経過とともにどのように形成され、分離するかを特徴付けることを伴い、細胞が刺激に対してどのように反応するかを特徴付けることを伴う。本方法において適用することができるバイオセンサは、例えば、表面プラズモン共鳴 (SPR : surface plasmon resonance) および共鳴導波グレーティング (RWG : resonant waveguide grating) バイオセンサ、共鳴ミラー、偏光解析器などの光学バイオセンサシステム、バイオインピーダンスシステムなどの電気バイオセンサシステムを含み得る。

【0176】

a) SPR バイオセンサおよびシステム

194. SPR は、プリズムを使用して、表面のプラズモンを励起する導電性金属膜 (例えば、金) を有する平面ガラス基板に、入射角の範囲をカバーしている偏光のウェッジを方向付ける。結果として生じるエバネッセント波は、電子電荷密度波 (すなわち、表面のプラズモン) を起こし、反射光の強度低減をひきおこしながら、金の層で自由電子雲と相互作用し、および自由電子雲によって吸収される。この強度最小限が起こる共鳴角度は、センサ表面の反対の面の金層の近くの溶液の屈折率の関数である。

【0177】

b) RWG バイオセンサおよびシステム

195. RWG バイオセンサは、たとえば、基板（例えば、ガラス）、組込格子または周期的構造による導波管薄膜および細胞層を含み得る。RWG バイオセンサは、回折格子を用いて導波管内での光の共鳴結合を利用し、解曲面の界面で全反射をもたらし、界面で次々と電磁場を生成する。この電磁場は事実上薄れていく。それは、センサ表面から指数的に減衰することを意味する。それが初期値の $1/e$ にまで減衰する距離は、侵入深さとして知られており、特定の RWG バイオセンサのデザインの関数であるが、一般的には 200 nm のオーダーである。このタイプのバイオセンサは、センサ表面で、又はその近くで、細胞層のリガンド誘導された変化を特徴づけるために、そのようなエバネッセント波を利用する。

【0178】

196. RWG 機器は、角度シフトまたは波長シフト測定に基づくシステムに細分化される。波長シフト測定において、入射波長の範囲を一定の角度でおおっている偏光は、導波管を照らすのに用いられる。特定の波長の光は、導波管に接続されて導波管に沿って伝搬する。一方、角度シフト機器では、センサはモノクロの明りで照らされ、そして、光が反響して結合される角度が測定される。

【0179】

197. 反響状況はバイオセンサの表面と直接接触している細胞層によって影響される（例えば、細胞集密度、粘着性および状態）。リガンドまたは分析体が生体細胞内の細胞ターゲット（例えば、GPCR、キナーゼ）と相互作用するとき、細胞層内の局所屈折率のどんな変化も、反響角度（または波長）のシフトとして検出され得る。

【0180】

198. コーニング（登録商標）エピック（登録商標）システムは、ラベルフリー生物化学または細胞ベースの分析のために（コーニング社、コーニング、ニューヨーク州）、RWG バイオセンサを使用する。エピック（登録商標）システムは RWG プレートリーダーと、SBS (Society for Biomolecular Screening) 標準マイクロタイタープレートと、により構成されている。細胞のリガンド誘導された変化の結果、プレートリーダー内の探知器システムは、入射光線の波長の変動を測るために、統合光ファイバを利用する。一連のイルミネーション検出ヘッドが直線的な態様で配列され、反射スペクトルが 348 ウェルマイクロプレートのコラムの中の各ウェルから同時に集められる。各センサが複数回アドレスされ得るように、全プレートがスキャンされ、各コラムは順番にアドレスされる。入射光の波長が収集され、分析に使用される。温度変動による入射波長の変動を最小にするために温度コントロールユニットを機器に含めることができる。測定された反応は細胞の集団の平均化された反応を表す。システムの様々な特徴は、サンプルローディングのように自動化することができ、また、 96 または 386 ウェルマイクロプレートを用いたときのように多重化することがきる。液体の取扱いは、オンボード液体ハンドラーまたは外部液体ハンドリングアクセサリにより行われる。具体的には、分子溶液は、直接加えられるか、各ウェルの底で培養されている細胞を有する細胞分析プレートのウェルの中へピペットで移されます。細胞分析プレートは、細胞を覆っているある量の分析緩衝液を含んでいる。上下に数回ピペット操作することによる単純なミキシングステップが分子添加ステップに組み込まれる場合がある。

【0181】

c) 電気バイオセンサおよびシステム

199. 電気バイオセンサは、基板（例えば、プラスチック）、電極および細胞層により構成される。この電氣的検出見方法では、細胞は、基板上に配列される小さな金電極の上で培養され、システムの電気インピーダンスが時間とともに追跡される。インピーダンスは、細胞層の導電性の変化の指標となる。通常、固定周波数または様々な周波数のわずかな定電圧が電極または電極アレイに印加され、回路を通した電流は時間とともにモニタされる。リガンド誘導された電流変化は細胞分析の指標を提供する。全体細胞センシングのためのインピーダンス測定は、 1984 年に最初に実現された。それ以来、インピーダンスベースの測定は、細胞接着および細胞伸展、細胞微細動作、細胞形態変化、および細

10

20

30

40

50

胞死などを含む細胞イベントの広い範囲を研究するために適用されてきた。古典的なインピーダンスシステムは、小さな検出電極と大きなリファレンス電極の使用に起因して、分析ばらつきが大きいことに苦慮している。このばらつきを克服するために、最新世代のシステム、例えばCellKeyシステム（MDS Scieix、サウスサンフランシスコ、カリフォルニア州）およびRT-CES（ACEA Biosciences社、サンディエゴ、カリフォルニア州）は、微小電極アレイを有する集積回路を利用している。

【0182】

d) 高空間解像度バイオセンサイメージシステム

200. SPRイメージシステム、偏光解析法イメージシステムおよびRWGイメージシステムを含む光学バイオセンサイメージシステムは、高い空間解像度を提供し、本開示の実施例において使用され得る。例えば、SPRイメージャー（登録商標）II（GWC Technologies社）はプリズム結合されたSPRを使用し、固定された入射角度でSPR測定を行い、CCDカメラで反射光を収集する。表面の変化は反射率の変化として記録される。従って、SPRイメージングは、配列のすべての要素の測定を同時に収集する。

【0183】

201. イメージングベースのアプリケーションのためのRWGバイオセンサに基づく掃引波長光学インターロゲーションシステム（swept wavelength optical interrogation system）が使用され得る。このシステムでは、高速調整可能なレーザ源が、センサまたはマイクロプレートフォーマットにおけるRWGバイオセンサのアレイを照らすのに用いられる。センサスペクトルは、センサから反射された光出力をレーザ波長がスキャンしたときの時間関数として検出することによって構築され得る。電子化された共鳴波インターロゲーションモデルリングを持つ測定データの分析は、固定化された受容体または細胞層を有するバイオセンサの空間的に解像されたイメージの構築をもたらす。イメージセンサの使用は必然的にイメージングベースのインターロゲーションスキームをもたらす。2次元ラベルフリーイメージは、可動部分なしで得ることができる。

【0184】

202. あるいは、垂直偏波またはp分極された TM_0 モードを用いる角度インターロゲーションシステムを使用することができる。このシステムは、各々がおよそ $200\mu m \times 3000\mu m$ または $200\mu m \times 2000\mu m$ の寸法で、RWGセンサを照らすように光ビームのアレイを生成するための照射システムと、これらのセンサから反射された光ビームの角度の変化を記録するためのCCDカメラベースの受信システムと、からなる。光ビームのアレイは、回折光学レンズと組み合わせたビームスプリッターによって得ることができる。このシステムは、3秒ごとに同時に最大49個のセンサ（ 7×7 ウェルセンサアレイ）をサンプリングまたは、10秒ごとに最大348ウェルマイクロプレートの全部をサンプリングすることができる。

【0185】

203. あるいは、スキャニング波長インターロゲーションシステムを使用することができる。このシステムにおいて、一定の角度を持つ入射波長の範囲をカバーしている偏光が導波グレーティングバイオセンサの全体を照射およびスキャンするために使用され、各位置での反射光が同時に記録される。スキャニングを通して、バイオセンサ全体の高解像度イメージが得られる。

【0186】

5. 生体細胞における動的密集体再配分（DMR：Dynamic Mass Redistribution）シグナル

204. 細胞ターゲットを介した刺激に対する細胞反応は、下流のシグナリングネットワークの時空間ダイナミクスによってコード化され得る。この理由から、リアルタイムの細胞シグナリングの統合のモニタリングは、細胞生物学および生理学を理解するのに役立つ生理学的に関連した情報を提供することができる。

【0187】

205. 共鳴導波グレーティング (RWG) バイオセンサを含む光学バイオセンサは、細胞物質の動的再配分に関する統合された細胞反応を検出することができ、従って、細胞シグナリングを研究するための非侵襲的な手段を提供する。全ての光学バイオセンサは、それらがセンサ表面でまたはその直近で局所屈折率における変化を測定し得る点で共通である。原則として、ほとんどすべての光学バイオセンサは、細胞センシングに適用でき、細胞におけるリガンド誘導された変化を特徴づけるエバネッセント波を使用することができる。エバネッセント波は電磁界であり、溶液表面の界面における光の全反射によって生成される。エバネッセント波は、通常、侵入深さまたはセンシングボリュームとして知られている特有の深さで溶液内に短い距離（数百ナノメートル）で広がる。

【0188】

10

206. 近年、リガンドによる刺激に反応して生体細胞で測定される光信号のパラメータおよび性質を記述する、理論的、数学的モデルが開発された。既知の細胞生物物理学と組み合わせた3層導波システムに基づくこれらのモデルは、受容体を介して媒介された特定の細胞プロセスをリガンド誘導された光信号にリンクさせる。

【0189】

207. バイオセンサは入射光線による照射領域に位置する細胞の平均的な反応を測定する故、細胞の高密集層が最適分析結果を達成するために使用され得る。バイオセンサの短い侵入深さと比較した細胞の大きな寸法のために、センサ構成は、従来にない3層システムであるとみなされる。すなわち、基板、格子構造を有する導波フィルム、細胞層。従って、実効屈折率（すなわち、検出信号）におけるリガンド誘導された変化は、最初のオーダーに対して、細胞層の底部の屈折率の変化に正比例していることがありえる。：

20

【0190】

【数1】

$$\Delta N = S(C) \Delta n_c$$

【0191】

208. ここで $S(C)$ は細胞層に対する感度である。 Δn_c はバイオセンサによって検知されたりガンド誘導された細胞層の局所屈折率における変化である。細胞内の所定の量の屈折率が、タンパク質などの生体分子の集中によって広く検出されるので、 Δn_c は、検知量内におけるリガンド誘導された細胞ターゲットまたは分子集合体の局所集中における変化に正比例するものとみなされ得る。センサ面から離れて広がっているエバネッセント波の指数的に減衰している性質を考慮して、リガンド誘導された光信号は、

30

【0192】

【数2】

$$\Delta N = S(C) \alpha d \sum_i \Delta C_i \left[e^{\frac{-z_i}{\Delta Z_c}} - e^{\frac{-z_{i+1}}{\Delta Z_c}} \right]$$

40

【0193】

により支配される。

【0194】

209. ここで ΔZ_c は、細胞層への侵入深さであり、 α は、特定の屈折増加（タンパク質に関し約 $0.18 / \text{mg} / \text{g}$ ）であり、 Z_i は密集体再配分が生じる距離であり、 d は細胞層の1枚の想像上の厚さである。ここでは、細胞層は垂直方向で同等の間隔をあけ

50

た薄片に分けられる。上記の式は、リガンド誘導された光信号がセンサ面から離れた異なった距離で起こっている密集体再配分の合計（全体的な反応に対する不揃いの寄与で）であることを示す。さらに、検出された信号は、波長または角度シフトに関してセンサ面に対して直角に生じている密集体再配分に主に敏感である。その動的な性質のために、それは動的密集体再配分（DMR）シグナルとも称される。

【0195】

6. 細胞およびバイオセンサ

210. 細胞は、それらが受ける情報を処理し、コード化して、統合するために、複数の細胞経路または機械に頼る。分析物のタンパク質ターゲットへの結合を特に測定する光学バイオセンサを用いた親和性分析と異なり、生体細胞はより複雑かつダイナミックである。

10

【0196】

211. 細胞シグナリングを調べるために、細胞はバイオセンサの表面と接触され、それは細胞培養を通して達成される。これらの培養された細胞は、3つの接触のタイプを通して、バイオセンサ表面に付着され得る。すなわち、焦点接着、近接接触、および細胞外マトリックス接触であり、それぞれ、表面からのそれら自身の特有の離間距離を有する。結果として、基底細胞膜は、通常、表面から10–100nm離れて位置する。浮遊細胞に関しては、細胞は、細胞表面受容体の共有結合、または細胞表面受容体の特定の結合、または単に重力による定着を通してバイオセンサ表面と接触され得る。この理由により、バイオセンサは、細胞の底部を検知することができる。

20

【0197】

212. 細胞は、多くの場合、表面依存的な粘着力と増殖を示す。強力な細胞分析法を達成するために、バイオセンサ表面は、細胞接着と増殖を強化するコーティングを必要とする。しかしながら、表面特性は、細胞生物学に直接的な影響を持つ。たとえば、基板材料の機械整合性がそうすることができるように、表面に結び付いたリガンドは、細胞の反応に影響することができ、細胞によって印加された力の下でそれがどのように変形するかを指示する。異なった培養状態(時間、血清濃度、密集度など)に起因して、得られた細胞状態は、1つの表面と別の表面および1つの状態と他の状態とで異なる場合がある。従って、細胞状態をコントロールする特別な取り組みが、バイオセンサベースの細胞分析を発展させるのに必要である。

30

【0198】

213. 細胞は比較的大きい寸法（通常数十ミクロンの範囲）の動的な物体である。細胞は、刺激がなくても絶えず微小運動を起こす。（動的な運動および細胞構造の改造（亜細胞の溶液で経時的顕微鏡検査法による組織培養においておよびナノメートルレベルのバイオインピーダンス測定により観察される。）

214. 非刺激状況下において、RWGバイオセンサで試験されるように、細胞は、一般的にほとんど正味ゼロのDMR反応を生成する。これは、大きなサイズのレーザスポットと連結光の長い伝搬長によって測定されたときの、光学バイオセンサの部分的に低い空間解像度のためである。レーザスポットのサイズは、調査領域のサイズを決定する。通常、1つの分析点のみが、一度に追跡され得る。従って、バイオセンサは、通常、光入射領域に位置する大きい細胞集団の平均化された反応を測定する。細胞は単一細胞レベルで微小運動を起こすにもかかわらず、大きい細胞集団は、平均正味ゼロのDMR反応を引き起こす。さらに、細胞内巨大分子は高度に組織化されて、哺乳類の細胞の適切なサイトに空間的に制限される。局在化は細胞がそれらの適当なパートナーと相互作用しているタンパク質の特異性および効能を制御し、タンパク質活性化および非活性化メカニズムを空間的に切り離すことを可能とするので、細胞上および細胞内の厳しくコントロールされたタンパク質の局在化は、特定の細胞機能および反応を割り出す。このコントロールにより、非刺激状況の下で、検出範囲内における細胞の局所密集密度は均衡状態に達し、従って、正味ゼロの光学反応をもたらす。一貫した光学反応を達成するために、調べられる細胞は、大部分の細胞が分割の1サイクルを完了するような期間、従来の培養状況の下で培養さ

40

50

れ得る。

【0199】

215. 生体細胞は、外因性信号を感知し、反応する優れた能力を有する。細胞シグナリングは、環境要因が反応の直線連鎖を誘発し、一つの明確な反応をもたらす直線ルートを介して機能するものと以前考えられた。しかし、研究は、外的刺激に対する細胞反応はさらに複雑であることを示した。細胞が受信した情報は、複合テンポラル (complex temporal)、リン酸の空間パターン、シグナリングタンパク質のトポロジーの再配分で処理され、コード化され得ることが明らかになった。適当なサイトに対するタンパク質の空間的および時間的ターゲティングは、タンパク質-タンパク質相互作用の特異性および効能を規制するのに重要となり、従って細胞シグナリングおよび反応のタイミングを指示するのに重要となる。中枢の細胞決定 (例えば細胞骨格再編成、細胞周期チェックポイントおよびアポトーシス) は、活性化されたシグナルトランスデューサの正確な時間的制御と相対的な空間分布に依存する。従って、一般的にGタンパク質結合受容体 (GPC) のような細胞ターゲットを通して媒介される細胞シグナリングは、一般的に整然として管理された態様で進行し、一連の空間的、時間的イベントにより構成され、そして、その多くは局所密集体密度における変化または細胞の局所細胞物質における再配分をもたらす。これらの変化または再配分は、検知量範囲内で起こるとき、光学バイオセンサを使ってリアルタイムに直接追従することができる。

10

【0200】

7. 生体細胞の生理学的反応としてのDMRシグナル

20

216. 受容体生物学を研究するための従来の薬理学的アプローチとの比較を通じて、リガンドが細胞システムにおいて発現された受容体に対して特有であるとき、リガンド誘導されたDMRシグナルは、受容体特有で、投与量依存的で、飽和可能であることが示された。かなりの数のGタンパク質結合受容体 (GPCR) リガンドに関しては、効能 (EC_{50} で測定される) は、従来の方法を使用することで測定されたものとほとんど同じであることがわかっている。さらに、脱感作および再感作がすべてのGPCRで共通であるため、DMRシグナルは期待される脱感作パターンを示す。さらに、DMRシグナルもGPCRリガンドの忠実度を維持し、従来のテクノロジーを使用して得られるものと類似している。さらに、バイオセンサは完全アゴニスト、部分アゴニスト、インバースアゴニスト、アンタゴニストおよびアロステリックモジュレーターを識別することができる。合わせて考えると、これらの調査結果は、DMRが生体細胞の生理学的反応をモニタすることができることを示す。

30

【0201】

8. 生再体細胞内のリガンド-受容体ペアのシステム細胞生物学情報を含むDMRシグナル

217. リガンドを用いた細胞の刺激は、一連の空間的・時間的イベントをもたらす、その限定されない例は、リガンド結合、受容体活性化、タンパク質補充、受容体内部移行およびリサイクリング、第2メッセンジャーオルタネーション、細胞骨格改造、遺伝子発現および細胞接着変化である。各々の細胞イベントは、それ自身の特徴 (例えば、キネティクス、期間、振幅、密集体移動) があり且つバイオセンサは、検知量範囲内で密集体再配分に関わる細胞イベントに主に敏感であるので、これらの細胞イベントは、別々にDMRシグナルの全体に寄与することができる。生物化学、細胞生物学および生物物理学的なアプローチは、リガンド誘導されたDMRシグナルに関し、細胞メカニズムを説明するのに用いられる。近年では、生物化学 (それは特定の細胞シグナリング構成要素への干渉のために化学を直接使用する) は生物学的問題に対処するのに用いられてきた。これは、多くの異なるタイプの細胞ターゲットの活動を具体的にコントロールする多数のモジュレータの識別の結果、可能となる。このアプローチは、上皮細胞増殖因子 (EGF) 受容体、 G_q および G_s 結合受容体を含む受容体を通して媒介されるシグナリングおよびそのネットワーク相互作用をマッピングするために採用されてきた。

40

【0202】

50

218. EGF Rは、受容体型チロシンキナーゼのファミリーに属する。EGFはEGFRの固有のタンパク質-チロシンキナーゼ活動と結合して刺激し、そして、シグナル伝達カスケードを開始し、主にMAPK、AktおよびJNK経路と関わる。EGF刺激による、A431細胞における密集体再配分をもたらす多くのイベントがある。一内因的にEGFRを過剰発現させている細胞株。EGFRシグナリングは、細胞状態に依存していることが知られている。その結果、EGF誘導されたDMRシグナルもまた細胞状態に依存している。0.1%の胎児ウシ血清での20時間の培養で得られた静止細胞においては、EGF刺激は3つの異なった連続したフェーズを有するDMRシグナルをもたらす。すなわち、(i)信号増加を伴うポジティブフェーズ(P-DMR)、(ii)移行フェーズ、(iii)減衰フェーズ(N-DMR)である。生物化学と細胞生物学調査はEGF誘導されたDMRシグナルが主にRas/MAPK経路にリンクされ、MEKを通して進行して細胞分離をもたらすことを示している。第1に、ダイナミンまたはクラスリン活動のどちらの障害物も、P-DMRイベントの大きさに、ほとんど影響を及ぼさない。ダイナミンとクラスリン(EGFR活性化の2つの下流の構成要素)は、EGFR内部移行およびシグナリングを実行する重要な役割を担う。第2に、MEK活動の障害物は、P-DMRイベントを部分的に弱める。MEKは、MAPK経路の重要な構成要素であり、EGF刺激の後、最初に細胞質から細胞膜まで転位し、受容体での内部移行がこれに続く。

10

【0203】

219. 一方、N-DMRイベントは、細胞分離および受容体内部移行に起因している。蛍光画像は、EGF刺激がかなりの数の受容体内部移行および細胞分離をもたらすことを示している。受容体内部移行またはMEK活動の障害物は細胞分離を妨げ、受容体内部移行はダイナミンとクラスリンの両方を必要とすることが知られている。これは、ダイナミンまたはクラスリン活動の障害物が受容体内部移行および細胞分離のどちらも妨げなければならない一方、MEK活動の妨害物が受容体内部移行でなく細胞分離のみを妨げなければならないことを示唆している。予想されるように、ダイナミンまたはクラスリン抑制剤はEGF誘導されたN-DMRを完全に妨げる(〜100%)。一方、MEK抑制剤は、N-DMRを部分的に弱める(〜80%)。蛍光画像も、MEKではなく、ダイナミンの活動の妨害が受容体内部移行を弱めることを確認する。

20

【0204】

9. 生体細胞に作用するリガンドのシステム細胞薬理学情報を含むDMRシグナル

30

220. DMRシグナルは細胞の底部での細胞物質の動的再配分を含む多くの細胞イベントの寄与からなる統合された細胞反応であるので、DMRシグナルなどのリガンド誘導されたバイオセンサシグナルは、システム細胞薬理学情報を含む。GPCRはしばしば細胞内で豊かな振る舞いを示し、多くのリガンドは、細胞機構の特定の部分に働く有効なバイアスを誘導し、経路バイアスされた効能を示すことが知られている。従って、受容体の下流の細胞イベントがどのように測定され、リガンド薬理学に関する読み出した情報がどのように使用されるかに依存して、リガンドが複数の効能を有する可能性が高い。大部分が経路バイアスされ、1つのシグナリングイベントだけを分析する従来の細胞分析では、GPCRリガンドのシグナリングポテンシャルを体系的に表すことは、実際には困難である。しかしながら、ラベルフリーバイオセンサ細胞分析は、細胞シグナリングの事前知識を必要とせず、経路バイアスなしおよび経路感度良好であるので、これらのバイオセンサ細胞分析は、リガンド選択シグナリング研究およびあらゆるリガンドのシステム細胞薬理学に受け入れられる。

40

10. バイオセンサパラメータ

221. RWGバイオセンサまたはバイオインプीडダンスバイオセンサなどのラベルフリーバイオセンサは、リガンド誘導されたリアルタイム細胞反応に追従することができる。非侵襲性で操作のないバイオセンサ細胞分析は、細胞シグナリングの事前知識を必要としない。結果として生じるバイオセンサシグナルは、受容体シグナリングおよびリガンド薬理学に関する高度な情報を含んでいる。マルチパラメータは、刺激による細胞の動的バイオセンサ反応から得ることができる。これらのパラメータは、限定されるものではない

50

が、全体的なダイナミクス、フェーズ、信号振幅を含み、動的パラメータは、あるフェーズから他のフェーズへの遷移時間、各フェーズのキネティクスを含む (Fang, Y., および Ferrie, A.M. (2008) 「生体細胞における β 2 アドレナリン受容体に作用するリガンド案内された機能的選択性のためのラベルフリーバイオセンサ」, FEBS Lett. 582, 558-564 ; Fang, Y. ほか (2005)) 「ラベルフリー光学バイオセンサで測定された生体細胞における EGF 受容体シグナリングの動的密集体再配分の特性」 Anal. Chem., 77, 5720-5725 ; Fang, Y. ほか (2006)) 「生体細胞検知のための共鳴導波グレーティングバイオセンサ」 Biophys. J., 91, 1925-1940 参照)

1 1. DMR パラメータ

a) バイオセンサ出力パラメータ

2 2 2. 多くの異なるバイオセンサ出力パラメータが、ここで議論される。刺激誘導された細胞中での指向性の密集体再配分のキネティクスを定めている 6 つのパラメータは、全体的なダイナミクス (すなわち形状)、反応のフェーズ (静止状態の A 4 3 1 細胞における EGF 誘導された DMR シグナルの特定の例において、細胞反応に関して 3 つの主な段階がある。すなわち、ポジティブ動的密集体再配分 (Positive-Dynamic Mass Redistribution (P-DMR))、ネガティブ動的密集体再配分 (Negative-Dynamic Mass Redistribution (N-DMR))、および回復ポジティブ動的密集体再配分 (Recovery Positive-Dynamic Mass Redistribution (RP-DMR))、キネティクス、各フェーズの全体の期間、各々の DMR イベントの総規模、および P-DMR から N-DMR フェーズまでまたは N-DMR から RP-DMR までの遷移時間であり得る。動的密集体再配分は、しばしば動的細胞物質再配分または指向性密集体再配分と称される。他のバイオセンサ出力パラメータは、共鳴ピークから得られる。たとえば、最大半減 (PWHM) でのピークの位置、強さ、ピーク形状、ピーク幅が、使用され得る。バイオセンサ出力パラメータは、バイオセンサの共鳴バンドイメージからも得ることができる。5 つの更なる特徴、すなわちバンド形状、位置、強さ、配置および幅。ここに明らかにされるように、バイオセンサを使用するあらゆる細胞分析のあらゆる所定の応用のために、これらのパラメータの全てが独立して、または、一緒に使用され得る。どんなパラメータのサブセットまたは組み合わせによる使用でも、細胞受容体分析に関するサイン、および EGF 受容体ベースの分析に関する特定のサインなどのように、所定の分析または特定の分析における所定のバリエーションに関してサインを生じることができる。

【0 2 0 5】

(1) 刺激誘導された指向性密集体再配分のキネティクスに関するパラメータ

2 2 3. 刺激誘導された DMR のキネティクスに関する多くのバイオセンサ出力パラメータがある。これらのパラメータは、細胞への刺激性イベントが起こったときにバイオセンサデータ出力に生じる変化率を見ている。刺激性イベントは、例えば培養液への細胞の添加、温度変化または pH 変化、細胞への放射線の導入などの細胞の状態が変化し得るあらゆるイベントである。刺激性イベントは、刺激性イベントによって生成される細胞に対して指向性密集体再配分などのあらゆる刺激性の効果をもたらし得る。刺激性イベントは、分子、化学的、生物化学的、生物学的、ポリマーであり得る。生物化学のまたは生物学のものは、ペプチド、synthetic ペプチド、自然発生ペプチドであり得る。例えば、炎症誘発性ペプチドブラジキニン、プロテアーゼ酵素トロンビン、および血圧規制ペプチドアンジオテンシンを含む多くの異なるペプチドがシグナリング分子として活動する。これらの 3 つのタンパク質は、それらのシーケンスおよび生理学において識別でき、異なる細胞表面受容体を通して活動する一方、G タンパク質結合受容体 (GPCRs) と呼ばれている細胞表面受容体の共通クラスに割り当てられている。GPCR の他のポリペプチドリガンドは、バソプレシン、オキシトシン、ソマトスタチン、ニューロペプチド Y、GnRH、leutinizing ホルモン、卵胞刺激ホルモン、副甲状腺ホルモン、オレキシン、ウロテンシン II、エンドルフィン、エンケファリンおよび他の多くを含む。GPCR は、ペプチドリガンドだけでなく小分子神経伝達物質 (アセチルコリン、ドーパミン、セロトニンとアドレナリン)、光、臭気物質、味覚、脂質、ヌクレオチドおよびイオンにも反応する、広く

て多様な遺伝子ファミリーである。GPCRによって用いられる主要なシグナリングメカニズムは、細胞内カルシウム放出とcAMP生成を含む下流の第2のメッセンジャーシステムに結合するGタンパク質GTPaseタンパク質と相互作用することである。ペプチドGPCRにより用いられる細胞内シグナリングシステムは、すべてのGPCRに用いられるそれらと類似しており、典型的には、それらが相互作用するGタンパク質および活性化される第2のメッセンジャーシステムに応じて分類される。Gs結合GPCRに関し、受容体によるGタンパク質Gsの活性化は、アデニル酸シクラーゼの下流の活性化およびサイクリックAMPの生成を刺激する一方、Gi結合受容体はcAMP生成を抑制する。cAMP生成の鍵となる結果の一つは、プロテインキナーゼAの活性化である。Gq結合受容体はホスホリパーゼCを刺激し、IP3およびジアシルグリセロールを放出する。細胞内カルシウムの放出およびこれに続くプロテインキナーゼC、カルモジュリン依存的な経路の起動を引き起こすために、IP3はERで受容体と結合する。GPCRのためのこれらの第2のメッセンジャーシグナリングシステムに加えて、GPCR経路は、チロシンキナーゼ成長因子受容体とmapキナーゼ経路を含む他のシグナリング経路とクロストークを示す。EGF受容体または焦点粘着性複合体のようなどちらの受容体型チロシンキナーゼのトランス活性化でも、アダプタータンパク質Shc、Grb2およびSosおよびErk1およびErk2を活性化している下流のmapキナーゼを介してras活性化を刺激することができる。Srcキナーゼは、GPCRによってrasおよびmapキナーゼ経路の活性化において重要な仲介役を担うことができる。

10

【0206】

20

224. 若干の刺激性のイベントが起こることがあり得るが、データ出力の変化は生じない。指向性密集体再配分または細胞または細胞培養の変化を引き起こしたいくつかの方法において細胞の状態が変化したので、この状況はやはり刺激性イベントである。

【0207】

225. ここに明らかにされるように、特定のサインがあらゆる分析またはあらゆる細胞状態に関して判定され得るものと理解される。多くの異なる分析に関し、ここに明らかにされる多数の「サイン」があり、しかし、ここで実施されるあらゆる分析に関し、その分析の「サイン」は判定され得る。ここに記載されるように、あらゆる所定の分析に関する1つ以上の「サイン」があり得、判定され得る。バイオセンサ出力データを収集し、1つ以上のパラメータを見た後、所定の分析のためのサインが取得され得る。最適サインを特定するために複数の実験を実行することが必要である場合があり、そして、異なる状況の下で最適サインを見つけるために実験を実行することが必要である場合があり、しかし、これは可能である。ここに明らかにされる方法のどれもが、例えば、それらの上に加えられるサインを「特定する」または「判定する」または「提供する」ステップを有することができるものと理解される。

30

【0208】

(a) 全体的なダイナミクス

226. 見ることができるパラメータの1つは、データ出力の全体的なダイナミクスである。全体的なダイナミクスパラメータは、データコレクションの完全な運動実態を観察する。観察される全体的なダイナミクスの1つの態様は、時間とともにデータ出力によって生成されるカーブの形状における時間ごとの変化である。従って、データ出力によって生成されるカーブの形状は、刺激イベントの発生に応じて変わることができるか、安定したままでいることができる。変化の方向は、全体的な密集体再配分を示す。例えば、ポジティブDMR (P-DMR) フェーズは、センサのエバネッセントテイル内での密集体の増加を示す。正味ゼロのDMRは、センサのエバネッセントテイル内での密集体のほとんど正味ゼロの変化があることを示唆する。ネガティブDMRは、センサのエバネッセントテイル内での密集体の正味の減少を示す。

40

【0209】

227. 光学バイオセンサを用いて得られる刺激誘導された細胞反応の全体的なダイナミクスは、単一のフェーズ (P-DMRまたはN-DMRまた正味ゼロのDMR) または

50

2つのフェーズ（例えば2つのフェーズは、これら3つのフェーズのどんな組み合わせであってもよい）、または多数のフェーズ（さらに1つのP-DMRが時間経過の間に生じ得る。）からなる。

【0210】

（b）反応のフェーズ

228. 時間の関数として観察され得るもう1つのパラメータはデータ出力において生じるフェーズ変化である。ラベルフリーバイオセンサはカーブを作るグラフ化し得るデータ出力を生成する。このカーブは移行ポイントを有し、例えば、増加状態から減少状態にまたは反対にデータが変化する。これらの変化はフェーズ移行と呼ぶことができ、そして、それらが起こる時間およびそれらがなす形がたとえば、バイオセンサ出力パラメータとして使用され得る。例えば、P-DMR、正味のゼロのDMR、N-DMRまたはRP-DMRがある。P-DMR、N-DMRおよびRP-DMRの振幅は、別々のバイオセンサ出力パラメータとして測定することができる。

【0211】

（c）キネティクス

229. もう1つのバイオセンサ出力パラメータは、データ出力のあらゆる側面のキネティクスであり得る。例えば、フェーズ移行の完了の割合である。例えば、どれだけ速くフェーズ移行が完了するかまたはデータ出力が完了するのにどれぐらいの時間がかかるかなど。多の測定できるキネティクスの他の例は、データ出力の全てのフェーズに要する時間の長さである。もう1つの例は、P-DMRおよびN-DMRフェーズの一方または両方のトータル所要時間である。もう1つの例は、P-DMRおよびN-DMRフェーズの一方または両方のトータル振幅を得る時間または率である。もう1つの例は、P-DMRからN-DMRフェーズへの移行時間 τ であり得る。P-DMRおよびN-DMR双方のイベントまたはフェーズのキネティクスは測定することが可能である。

【0212】

（2）共鳴ピークに関するパラメータ

230. 所定の導かれたモードの共鳴ピークは、たとえば、光の強さ対バイオセンサへの光のカップリングの角度または光の強さ対バイオセンサへのカップリング光の波長を見ることによって起こるデータ出力のタイプである。光導波ライトモードスペクトルは、バイオセンサに照射する光の角度の広い範囲を使用し、角度の関数としてインカップルされた強度の強さをモニタする方法で光の強度対バイオセンサへの光のカップリングの角度を見ることによって現れるデータ出力のタイプである。このスペクトルにおいて、多数の導かれたモードの多数の共鳴ピークは共に生じる。共鳴ピークとOWLSスペクトルの背後の主役が同じであるので、所定の導かれたモードの共鳴ピークまたは多数の導かれたモードのOWLSスペクトルを相互交換可能に使用することができ、光の特定の波長が生じるとき、特定の角度でバイオセンサに照射するように光が生成されたとき、光源から放射された光は、バイオセンサに結合し、このカップリングがバイオセンサから生じる信号を増加させる。このカップリング光の角度または波長の関数としての強度変化は共鳴ピークと呼ばれる。センサの異なる所定モードは、異なる特徴を有する類似した共鳴ピークを引き起こすことができる。DMRまたは細胞影響を評価するためにこのピークに関係する、使用され得る所定モードの共鳴ピークまたは共鳴スペクトルを定める多くの異なるパラメータがある。これらのサブセットは以下において議論される。

【0213】

（a）ピーク位置

231. データ出力がグラフで示されるとき、共鳴ピークのピークは、たとえば、光の特定の波長でも、またはバイオセンサへの光カップリングの特定の入射角でも生じる。これが生じる角度または波長、位置は、刺激性イベントに対する反応における密集体再配分または細胞イベントにより変化する。たとえば、EGF受容体などの特定の受容体のための潜在的成長因子の存在下において、培養細胞に関する共鳴ピークの位置は、共鳴ピークの中心位置の変化をもたらすカップリングの角度またはカップリングの波長を増加させ

あるいは減少させることができる。ピーク強度の位置は測定可能であり、且つ測定するのに良好なポイントであり、共鳴ピークに沿ったあらゆるポイントの位置も測定し得ることが理解できる。例えばピーク強度の75%の位置、ピーク強度の50%の位置、ピーク強度の25%の位置、ピーク強度の66%の位置、ピーク強度の45%の位置（ピーク強度の1~100%の全てのレベルが開示されているものと考えられる。）しかし、ピーク強度以外の点を使うとき、ピーク強度の前および後には常にポジションがあり、それはたとえば、ピーク強度の45%である。従って、ピーク強度以外のどんな強度に関しても、2つの位置が、常にその強度が起こるピークの中にある。これらの非ピーク強度の位置はバイオセンサ出力パラメータとして使用することができる。しかし、その強度の位置はピーク前の強度なのかピーク後の強度なのかを単純に知る必要がある。

10

【0214】

(b) 強度

232. 共鳴ピークの特定の強度の位置が正にバイオセンサ出力パラメータとして使用し得るとき、強度それ自体の大きさもバイオセンサパラメータとして使用することができる。特に関連した強度の1つは、所定のモードの共鳴ピークの最大強度である。細胞または細胞培養に特定の影響を及ぼす刺激性のイベントの存在に基づいて、最大強度は、その位置と同様、最大強度の大きさは、変化し、この変化は測定され、サインとして使用され得る。ちょうど共鳴ピーク位置のように、共鳴ピーク強度はピーク内のあらゆる強度または位置で測定され得る。例えば、バイオセンサ出力パラメータとして最大強度の50%である強度、最大強度の30%、最大強度の70%、または最大強度の1%から100%の間のあらゆるパーセントである強度を使用することができる。同様に、強度の位置のように、最大強度以外の強度が使用される場合（例えば最大強度の45%）、この強度を有する共鳴ピーク内に常に2つの位置がある。ちょうど強度位置パラメータのように、非最大強度が使用されるとき、その強度は最大強度前なのか最大強度後なのかを考慮しなければならない。

20

【0215】

233. 例えば、最初の細胞密集度がおよそ50%（密集度50%で、バイオセンサ表面上の細胞は、最大PWHM値に至る傾向がある）であるとき、抑制剤と活性剤の双方の存在は、培養後、最大半減（PWHM）におけるピーク幅の減少という結果をもたらす。しかしながら、トータル角度シフト（すなわち、共鳴ピークの中央位置）などの他のバイオセンサ出力パラメータが、全く影響を受けない分子から抑制剤と促進剤とを識別するのに使用することができる。PWHM長は、図6Bで例示されるように、ピークの最大強度（高さ）の半分であるピーク上の点の間で描かれる線の長さである。すべてのセンサ上の細胞密度が実質的に同一または殆ど同じであるとき、どんな処理もされていない細胞を有するセンサと比較して、例えば細胞増殖の抑制剤は、全く処理されていない細胞に関するシフトより小さな角度シフトを引き起こす傾向があり、その一方、活性剤はより大きな角度シフトを引き起こす。細胞増殖を（抑制剤として）抑制するまたは（活性剤として）刺激する分子の潜在能力または能力は、すべての分子の濃度が同じであることを前提として、PWHM値に対するそれらの影響によって判定することができる。共鳴ピークの中心位置の変化との組み合わせにおいて、規定のPWHM値の変化は、抑制剤または活性剤を取り除くのに用いることができる。所定のモードの共鳴ピークを検出するために使用されるインターロゲーションシステムに依存して、PWHMの単位または値は変化し得る。たとえば、角度インターロゲーションシステムについては、単位は度であり得る。PWHMにおける度の変化は例えば1000分の1、1000分の2、1000分の3、1000分の5、1000分の7または10000分の1であり得る。

30

40

【0216】

(c) ピーク形状

234. 使用することができる他のバイオセンサ出力パラメータは、全体的なピーク形状またはある強度間またはある強度におけるピークの形状である。例えば、最大半減ピーク強度でのピークの形状またはあらゆる他の強度（例えば30%、40%、70%、88

50

%または20と100%の間のあらゆるパーセント)がバイオセンサ出力パラメータとして使用できる。形状は、特定の強度よりも下または上のピークの領域によって特徴付けられる。例えば、最大半減ピーク強度においてピーク前の強度の点およびピーク後の点がある。線は、これらの2つの点の間で引くことができ、共鳴ピーク内のこの線の上の領域または共鳴ピーク内のこの線の下領域が決定され、バイオセンサ出力パラメータとなる。所定ピークの統合された領域もまた細胞に作用している分子の影響を分析するために使用することができる。と理解される。

【0217】

235. バイオセンサ出力パラメータに関する他の形状は、特定ピーク強度における共鳴ピークの幅であり得る。例えば、最大半減ピーク強度(HMPW)での共鳴ピークの幅は、ピーク強度の50%である共鳴ピーク上のピーク強度前の点と、ピーク強度の50%であるピーク後である線上の点との間の線のサイズを測定することによって決定され得る。この測定はその後、バイオセンサ出力パラメータとして使用される。共鳴ピークの幅はピーク強度の20%と100%の間のあらゆる強度に関して、このように測定され得る。(この例は、図(例えば図6B)を通して見るができる。)

(3) バイオセンサの共鳴バンドイメージに関するパラメータ

236. これまで、ほとんどの光学バイオセンサは、センサ表面に固定された調査分子へのターゲット分子の結合または、センサ表面上の細胞付着または細胞生存度をひとつずつモニタしている。複数のバイオセンサ上の結合イベントまたは細胞付着または細胞生存度に関し、研究者は一般に時間連続した方法でこれらのイベントをモニタしている。したがって、異なるセンサ間の直接比較は、挑戦であり得る。さらに、これらの検出システムがそれが波長または角度インターロゲーションであるか否かにかかわらず、センサを照らすために小スポット(直径~100-500 μm)のレーザ光を使用している。反応または共鳴ピークは、照射領域からの細胞反応の平均を表している。96ウェルバイオセンサマイクロプレート(例えばコーニングのエピックマイクロプレート)では、各RWGセンサは、およそ3 $\times$ 3 mm^2 であり、各ウェルの底に位置する。一方、384マイクロプレート形式では、センサは一般的に1 $\times$ 1 mm^2 の寸法を有する。したがって、現在のセンサテクノロジーを使用して得られる反応は、センサ表面の小部分を表すのみである。理想的には、検出システムによって複数のバイオセンサに付着した生体細胞の反応を同時にモニタすることを可能とするのみならず、各センサの比較的大きい面積または複数の領域からのシグナルインターロゲーションを可能にしなければならない。

【0218】

237. イメージング光学インターロゲーションシステム(例えばCCDカメラ)を介した共鳴バンドは、例えば、単一のセンサを横断する定義された位置での反射光(すなわちアウトカップル光)の強度と対比して物理的位置を見ることによって生じるデータ出力のタイプである。反射光は、インカップル光に直接的に関係する。あるいは、共鳴バンドは、センサに照射する小さいレーザスポットを使用して、1次元または2次元でセンサ全体をスキャンし、所定の導かれたモードの共鳴ピークを収集する方法で、スキャンングインターロゲーションシステムを介して収集される。センサ内の位置の関数としての共鳴ピークまたは光強度はセンサの共鳴バンドを形成するために最終的に再構成され得る。バイオセンサでは、特定の波長の光が生じたとき、または特定の角度でバイオセンサに照射するように光が生成されたとき、アウトカップル光は、センサ表面またはその近傍における屈折率変化の関数として変化し、この変化はイメージングシステムによって収集された各センサの共鳴バンドの特徴のシフトをもたらす。さらに、培養後のセンサ全体に亘る細胞の不均一な付着は、共鳴バンドを使用して直接に可視化することができる(例えば、図1における円で囲まれた共鳴バンドを参照)。理想的なマルチウェルバイオセンサマイクロプレートにおいて、各センサの位置は、他のバイオセンサに対して規格化することに関連している。すなわち、センサは、各ウェルの中央を通してマイクロプレートにおける行または列を横断して整列される。したがって、得られる共鳴バンドイメージは、刺激に反応する細胞付着または細胞変化に関する内部参照として使用され得る。したがって、所定の

モードの各センサのそのような共鳴バンドは、DMRまたは細胞の影響を評価するためにこのバンドに関連して使用され得る追加のパラメータを提供する。これらのサブセットは以下において議論される。

【0219】

(a) バンド形状

238. 使用され得る他のバイオセンサ出力パラメータは、所定モードの各バイオセンサの共鳴バンドの形状である。形状は各センサの広い領域を横断する強度分布によって定められる。形状は、広い領域を横断する刺激に反応する細胞付着または細胞変化の均一性のインジケータとして使用され得る（例えば、図1に示すように、各共鳴バンドは $\sim 200\text{ mm} \times 3000\text{ mm}$ の寸法を有するセンサ全体に亘る反応を表している。）

10

(b) 位置

239. 所定モードの各センサの共鳴ピークの位置と同様、各共鳴バンドの位置は、バイオセンサ出力パラメータとして使用され得る。強度は、各バンドの最大強度を有する中央位置を生成するためにイメージングソフトウェアを使用して定量化される。そのような位置は、刺激または分子処理に反応する細胞変化を試験するために使用され得る。

【0220】

(c) 強度

240. まさに共鳴バンドの位置のように、イメージングシステムを使用して収集されたアウトカップル光の強度は、バイオセンサ出力パラメータとして使用され得る。全バンドの平均強度またはイメージングバンドにおける各ピクセルの絶対強度は、細胞付着の質を試験し、細胞反応を評価するために使用され得る。

20

【0221】

(d) 分布

241. イメージングシステムを用いて収集され、定められた角度または波長を有するアウトカップル光の分布は、バイオセンサ出力パラメータとして使用され得る。このパラメータは、細胞または調査分子が固定されていないセンサそれ自身の表面特性を評価するために、およびセンサ表面の照射領域を横断する細胞付着の質を試験するために使用され得る。さらに、このパラメータは、全体領域にわたる細胞密度が同一であるときに、細胞への分子の影響の均一性を試験するために使用され、または、照射領域に亘るある領域と他の領域で細胞密度が異なるとき、分子誘導された細胞反応における細胞密度の影響を試験するために使用され得る。

30

【0222】

(e) 幅

242. まさに所定モードの共鳴ピークのPWHMのように、イメージングシステムを使用して得られる共鳴バンドの幅は、バイオセンサ出力パラメータとして使用され得る。共鳴ピークのために使用することができる唯一のPWHMの代わりにセンサの照射領域の複数の領域における複数のバンド幅を得ることができることを除き、このパラメータは、共鳴ピークのPWHM値のそれらとほとんど同一の特徴、すなわち、有用な情報内容を共有している。共鳴バンドイメージによって得られる他のパラメータと同様、幅は上述したアプリケーションに使用することができる。

40

【0223】

243. これらの全てのパラメータは、ここに開示されたようなバイオセンサを用いたあらゆる細胞分析の与えられるあらゆるアプリケーションのために独立にまたは一緒に使用することができる。パラメータのあらゆるサブセットまたは組み合わせの使用は、例えば細胞受容体に関するサイン、およびEGF受容体ベース分析に関する特定のサインのように、所定の分析または特定の分析における所定のバリエーションに関するサインを生成する。

【0224】

12. 方法

244. 分子を特徴付けるための方法が開示されている。当該方法は、1次プロファイ

50

ルを生成している分子のバイオセンサ反応を収集するステップと、2次プロファイルを生成している分子の存在下において、細胞パネルにおけるマーカパネルのバイオセンサ反応を収集するステップと、バイオセンサシグナルの各々からバイオセンサパラメータの特定のセットを抽出するステップと、ポジティブコントロールに対して各バイオセンサパラメータを規格化して変調比較を生成するステップと、マーカパネルまたは細胞パネルの関数として少なくとも1つのバイオセンサパラメータの変調比較をプロットして分子変調インデックスを生成するステップと、必要に応じて、分子の1次プロファイルと分子変調インデックスを組み合わせて分子バイオセンサインデックスを生成するステップと、必要に応じて、分子バイオセンサインデックスとモジュレータバイオセンサインデックスのライブラリを比較するステップとを含む。

10

【0225】

245. バイオセンサ細胞分析を使用して分子をスクリーニングする方法が開示されている。当該方法は、細胞のパネルを選択するステップと、それぞれが細胞パネルにおける各細胞に対応するように複数のマーカのパネルを選択するステップと、分子処理された細胞のパネルを生成している分子でパネルにおける各細胞を処理するステップと、バイオセンサ反応をモニタリングして分子の1次プロファイルのパネルを各細胞に関して生成するステップと、マーカパネルの各マーカを、分子処理された細胞のパネルの各細胞に個別に特定の投与量で加えるステップと、バイオセンサ反応をモニタリングして、マーカのバイオセンサシグナルに影響を与えている分子の2次プロファイルのパネルを各マーカに関して生成するステップと、細胞のパネルに亘るおよびマーカのパネルに対する分子バイオセンサインデックスを生成するステップと、必要に応じて、分子バイオセンサインデックスと既知のモジュレータバイオセンサインデックスとを比較するステップと、を含み、分子バイオセンサインデックスとモジュレータバイオセンサインデックスとの間の類似性が分子の活動のモードに関するインジケータであることを特徴とする。

20

【0226】

246. 分子を特徴付ける方法が開示されている。当該方法は、既知のリガンドのパネルで細胞のパネルをパニングして既知のリガンドが所定の細胞タイプにおいて強いバイオセンサシグナルを誘発できるかどうかを判定するステップと、マーカとして強いバイオセンサシグナルを誘発し得る既知のリガンドを選択し、所定の細胞タイプのためのマーカのライブラリを生成するステップと、特定の細胞タイプにおいてバイオセンサシグナルを誘発する能力に関する各マーカの潜在力および効能を判定するステップと、特定の細胞タイプにおいて各マーカによって誘発されたシグナリング経路およびネットワーク相互作用を割り出すステップと、各細胞タイプに関してマーカのパネルをダウンセレクトするステップと、分子の1次プロファイルのパネルを生成するために、細胞のパネルにおいてバイオセンサシグナルを誘発する分子の能力を調べ、およびマーカパネルに対する分子の2次プロファイルまたは変調プロファイルのパネルを生成するために細胞のパネルにおいてマーカ誘導されたバイオセンサシグナルを変調する分子の能力を調べる分析を実施するステップと、分子バイオセンサインデックスを生成するステップと、必要に応じて、分子バイオセンサインデックスと既知のモジュレータバイオセンサインデックスのライブラリを比較するステップと、を含む。

30

40

【0227】

247. 分子を特徴づける方法が開示されている。当該方法は、1次プロファイルを生成している分子のDMR反応を収集するステップと、2次プロファイルを生成している分子の存在下において、細胞パネルにおけるマーカパネルのDMR反応を収集するステップと、バイオセンサシグナルの各々からDMRパラメータの特定のセットを抽出するステップと、ポジティブコントロールに対して各DMRパラメータを規格化して変調比較を生成するステップと、マーカパネルまたは細胞パネルの関数として少なくとも1つのバイオセンサパラメータの変調比較をプロットして分子変調インデックスを生成するステップと、必要に応じて、分子の1次プロファイルと分子変調インデックスを組み合わせて分子DMRインデックスを生成するステップと、必要に応じて分子DMRインデックスとモジュレ

50

ータDMRインデックスのライブラリを比較するステップとを含む。

【0228】

248. バイオセンサがDMRを検出する方法が開示されている。当該方法は、分子バイオセンサインデックスにおける1以上の分子変調プロファイルと類似しているモジュレータバイオセンサインデックスにおける1以上のマーカ変調プロファイルを特定するステップをさらに含み、分子は、分子バイオセンサインデックスがモジュレータバイオセンサインデックスに類似しているとき、類似した活動のモードをモジュレータと共有し、アゴニストモードにおいてステップa)が実行され、ステップd)におけるポジティブコントロールは、細胞のサンプルがマーカのみで処理されているときに生成されたマーカの1次プロファイルを含み、変調比較は増強作用を含み、変調比較は抑制作用を含み、変調比較は非変調を含み、モジュレータバイオセンサインデックスのライブラリは分子バイオセンサインデックスを含み、モジュレータバイオセンサインデックスのライブラリは同一の細胞パネルに関する同一のマーカパネルに対して異なる分子からなり、分子バイオセンサインデックスとモジュレータバイオセンサインデックスとの間の類似性は、活動のモードのインジケータとして使用され、類似性は分子バイオセンサインデックス間のパターン認識分析に基づいており、類似性は分子変調インデックス間のパターン認識分析に基づいており、類似性は分子変調インデックスに関するスコアのマトリックスに基づいており、細胞のパネルは特定の病気、特定の細胞ターゲット、特定の起源、特定の人間生理学および病態生理学の代表と関連し、少なくとも1つの細胞システムは細胞のパネルに含まれ、細胞システムは2つの細胞のタイプを含み、マーカのパネルは、リガンドのライブラリから選択され、リガンドの各々は細胞における特定の細胞シグナリング経路を示すバイオセンサシグナルを生成し、ステップe)におけるマーカの特定の投与量は、細胞においてバイオセンサシグナルを誘発するために、少なくともEC₅₀、EC₈₀、EC₉₀、EC₉₅、EC₁₀₀の濃度からなり、細胞におけるマーカの不存在下または存在下において分子の長期間バイオセンサシグナルを生成するステップをさらに含み、マーカは分子が細胞に添加される前、またはそのとき、または後に添加され、細胞パネルは、特定の病気に関連する細胞のタイプ、特定の起源からの細胞のタイプ、特定のターゲットに関連する細胞のタイプ、特定の生理学的機能と関連する細胞のタイプ、を含み、細胞パネルは、体内に生じた細胞、操作された細胞、変形された細胞、不死化された細胞、主要な細胞、胚幹細胞、成体幹細胞、癌幹細胞、幹細胞由来細胞を含み、ステップ(a)は細胞を特定の投与量の分子と接触させるステップを含み、ステップ(b)は細胞をマーカパネルにおける特定の投与量のマーカと接触させるステップを含み、ステップ(b)は細胞を特定の投与量の分子と接触させるステップを含み、特定の投与量は1μM、5μM、10μM、50μMから選択される所定の分子濃度であり、特定の投与量は1ng/ml、10ng/ml、100ng/ml、1μg/ml、10μg/ml、100μg/mlから選択される所定の分子濃度であり、特定の投与量は、細胞におけるバイオセンサシグナルを誘発するために、マーカのEC₅₀、EC₈₀、EC₉₀、EC₉₅、EC₁₀₀であり、ステップ(b)は細胞をある期間リガンドに接触させ、その後細胞をマーカに接触させるステップを含み、ステップ(b)は細胞をマーカおよび細胞に同時に接触させるステップを含み、ステップ(d)は(1)マーカの1次プロファイルのP-DMRの振幅と、マーカに対する分子の2次プロファイルのP-DMRの振幅、(2)マーカの1次プロファイルのN-DMRの振幅と、マーカに対する分子の2次プロファイルのN-DMRの振幅、(3)マーカの1次プロファイルのRP-DMRの振幅と、マーカに対する分子の2次プロファイルのRP-DMRの振幅、またはこれらの組み合わせを比較するステップを含み、変調比較は変調差、変調割合、またはこれらの組み合わせを含む。

【0229】

249. インデックスを生成する方法が開示されている。当該方法は、1より多いマーカに対する分子の変調プロファイルを収集するステップと、インデックスにおける分子の変調比較をリストアップするステップとを含む。

【0230】

10

20

30

40

50

250. 開示されている方法において、変調インデックスは1つの細胞タイプにおいておよび複数のマーカに関して得られ、変調インデックスは複数の細胞タイプにおいておよび単一のマーカに関して得られ、変調インデックスは複数の細胞のタイプにおいておよび複数のマーカに関して得られ、変調インデックスは複数のマーカに関して得られる。

【0231】

251. 創薬の方法が開示されている。当該方法は、未知の分子インデックスと既知のモジュレータインデックスとを比較するステップと、未知の分子リガンドインデックスが既知のモジュレータインデックスと類似しているかどうか判定するステップと、を含む。

【0232】

252. 分子を特徴付ける方法が開示されている。当該方法は、細胞をマーカに接触させるステップと、マーカに対する細胞の反応を分析して1次プロファイルを得るステップと、細胞をマーカおよび分子に接触させるステップと、マーカおよび分子に対する細胞の反応を分析して変調プロファイルを得るステップと、を含む。

【0233】

253. 分子を特徴付ける方法が開示されている。当該方法は、細胞をマーカおよび分子に接触させるステップと、細胞のマーカおよび分子に対する反応を分析するステップと、を含む。

【0234】

254. 開示されている方法は、さらに、先行するステップの後に分子を合成するステップを含み、さらに分子の派生物のライブラリを制作するステップを含み、1以上のステップは機械で実施され、機械は汎用コンピュータであり、機械はバイオセンサである。

【0235】

255. 組成を作成する方法が開示されている。当該方法は、分子を合成するステップを含み、分子は分子として特徴付けられ、分子インデックスはモジュレータインデックスに対して類似性を有し、ここに記載の方法を使用してそのように特定される。

【0236】

256. ここに開示された方法のプロセスによって製造された製造物が開示されている。

【0237】

V. 実施例

A. 実験の手順

1. 材料

257. ADP、ATP、UTP、UDP、アデノシン、スベルミン、ヒスタミン、エピネフリン、エライジン酸、リポキシンA4、ニコチン酸、ピナシジルは、ポリ(I:C)、フォルスコリン、および上皮細胞増殖因子(EGF)はシグマケミカル社(セントルイス、ミズーリ州)から購入された。ホルボール12-ミリスチン酸塩13-アセテート(PMA)、HA1077、H-8、LY294002、ケルセチン、U0126、AG1478、BML-265、ロットレリン、および80のキナーゼ抑制剤からなるバイオモル・キナーゼライブラリは、バイオモルインターナショナルInc(プリマスミーティング、ペンシルベニア州)から得られた。ブラジキニン、アドレノメデュリン、SFLLR-アミド、アンギオテンシン、ニューロペプチドYおよびSLIGKV-アミドは、バッセムアメリカス社(トランス、カリフォルニア州)から得られた。エピック(登録商標)384バイオセンサマイクロプレート細胞培養コンパチブルはコーニング社(コーニング、ニューヨーク州)から得られた。

【0238】

2. 細胞培養

258. すべての細胞株は、アメリカンタイプセルカルチャー(マナッサス、バージニア州)から得られた。細胞培養培地は以下のとおりである。すなわち、10%の胎児ウシ血清(FBS)、4.5g/リットルのブドウ糖、2mMのグルタミン、人間の類表皮癌A431および人間の肺がんA549のための抗生物質で補われたダルベッコ変法イーグ

10

20

30

40

50

ル培地 (DMEM) である。

【0239】

259. 細胞は、典型的には、バイオセンサマイクロプレートで、3~15の経代で、調和する50 μ lの培地内で懸濁している1ウェルあたり1~2 $\times$ 10⁴の細胞を使用して成長され、細胞は、1日あたり大気/5%CO₂下において37℃で培養された。無血清DMEMでの連続培養を通して~20時間の飢餓にさらされたA431を除いて、他の細胞のタイプは、飢餓なしで直接分析された。分析時点のすべての細胞の密集度は、95%~100%であった。

【0240】

3. 光学バイオセンサシステムおよび細胞分析

260. エピック (登録商標) 波長インターロゲーションシステム (コーニング社、コーニング、ニューヨーク州) がすべての細胞検知に使用された。このシステムは温度コントロールユニット、光学検出ユニット、およびロボット工学を用いたオンボード液体ハンドリングユニットにより構成されている。検出ユニットは、統合された光ファイバを軸とし、15秒の時間間隔での細胞反応の運動計測を可能にする。

【0241】

261. RWGバイオセンサは、センサ表面の近傍で局所屈折率の微細な変化を検出することができる。細胞の中の局所屈折率は、生物量 (例えば、タンパク質、分子複合体) の密度およびその配置の関数であるので、体内に生じた細胞においてリガンド誘導された動的密集体再配分を非侵襲的に検出するために、バイオセンサはそのエバネッセント波を利用する。エバネッセント波は、細胞内に広がって、距離に応じて指数関数的に減衰し、受容体活性化を通して媒介されたどんな光学反応もエバネッセント波がサンプリングしている細胞の部分における平均を表しているのみであるということを暗示しながら、150nmの量の特徴検知をもたらす。受容体活性化の下流における多くの細胞イベントの寄せ集めは、リガンド誘導されたDMRのキネティクスおよび振幅を判定する。

【0242】

262. バイオセンサ細胞分析のために、HBSS (1 $\times$ ハンクスでバランスされた食塩水プラス20mMのヘブス、pH 7.1) を用いて貯蔵された濃厚溶液を薄めることによって、分子溶液は作製された。分子溶液は、384ポリプロピレン分子貯蔵プレートに移され、分子ソースプレートを用意した。2ステップ分析が実施されたとき、分子およびマーカーソースプレートの双方は、別々に作製された。並行して細胞は、HBSSで2回洗浄され、30 μ lのHBSS内に維持され、細胞分析プレートを用意した。細胞分析プレートおよび分子およびマーカーソースプレートの双方は、その後リーダシステムのホテル内で保温された。1時間の保温の後、細胞分析マイクロプレートにおけるすべてのバイオセンサのベースライン波長が記録され、ゼロに規格化された。その後、2~10分の連続記録が実施され、ベースラインが確立され、細胞が定常状態に至ることが確保された。その後、細胞反応は、オンボード液体ハンドラーを使用して細胞分析プレートに10 μ lのマーカー溶液をピペットで移すことによって誘発された。

【0243】

263. マーカー誘導された反応における分子の影響を調べるために、一定用量 (一般的にEC₈₀またはEC₁₀₀) のマーカーによる第2の刺激が加えられた。第2の刺激の直前に、マイクロプレートのすべてのバイオセンサの共鳴波長は、第2のベースラインを確立するために再び規格化された。2つの刺激は、通常1時間の間隔をおいて切り離されている。すべての調査は、コントロールされた温度 (28℃) において実施された。それぞれ少なくとも3回の反復を有する独立した少なくとも2セットの実験が実施された。分析変動係数は、10%よりも小さいことがわかった。

【0244】

B. 実施例1: 細胞プロファイル薬理学ベースの創薬のアウトライン

264. 第1に、2つの上皮ガン細胞株が、創薬に対する細胞プロファイル薬理学アプローチを例示するために選ばれた。上皮層は、感染に対する最初の障壁であり、生来の免

10

20

30

40

50

疫のキープレーヤーの1つである。感染の間、すべての病原体は、気道、消化管、泌尿生殖器または皮膚の切れ目（または火傷）を通して上皮を通過する経路を見つけなければならない。2つの細胞株は、人間の気道上皮細胞A549および人間の皮膚上皮細胞A431であった。

【0245】

265. 第2に、既知のリガンドが、選択された細胞のタイプにおいて強いDMRシグナルを誘発することができたかどうかを判定するために、既知のリガンド（例えば、GPCRアゴニスト、受容体チロシンキナーゼアゴニスト、トール様受容体（TLRs）アゴニスト、プロテインキナーゼC（PKC）活性化剤、アデニルシクラーゼ活性化剤、ホスホジエステラーゼ抑制剤、イオンチャネルオープナーまたは活性化剤、アクチン崩壊エージェン

10

【0246】

266. 第3に、各リガンドの潜在力および効能が、各細胞タイプにおけるDMRシグナルを誘発するリガンドの能力の面から判定された。

【0247】

267. 第4に、特定の細胞タイプの各々において各リガンドによって誘発されたシグナリング経路およびネットワーク相互作用が生物化学および細胞生物学アプローチを組み合わせることによって割り出された。

【0248】

268. 第5に、これらのマーカが誘発するシグナリング経路および他の要因（例えば疾患特有のターゲットまたは経路）に応じて、マーカのパネルが細胞タイプごとにこれらのリガンドのコレクションから選ばれた。通常、特定の経路情報を含んでいるDMRシグナルなどの強いバイオセンシングシグナルをもたらすことができるリガンドは、マーカとなる。マーカのライブラリは、所定の細胞のタイプに関して特定され得る。1以上のマーカが特定の細胞ターゲットまたは受容体のために使用され得る点に注意する必要がある。たとえば、A431におけるβ2-アドレナリン受容体に関して、エピネフリン、ノルエピネフリン、イソプロテレノール、サルメテロール、CGP12177およびピンドロールをマーカとして選択することができる。

20

【0249】

269. 第6に、細胞のパネルにおいてDMRシグナル（すなわち分子の1次プロファイル）を誘発する分子の能力や細胞のパネルにおいてマーカ誘導されたDMRシグナル（すなわち、分子の2次プロファイル）を変更する分子の能力を調べるために、一連の分析が実施された。

30

【0250】

270. 第7に、DMRインデックスが、細胞／マーカのパネルに対する分子に関して生成された。

【0251】

271. 第8に、分子DMRインデックスは、細胞／マーカの同じパネルに対する既知のモジュレータのDMRインデックスのライブラリと比較された。

40

C. 実施例2：ターゲットパニングで特定されたA549細胞におけるマーカ／ターゲット

272. (1) A549細胞が選択されたリガンドのパネルに対して受容体を内因的に発現するかどうか、(2) リガンドのパネルを用いたこれらの受容体のターゲットティングが強いDMRシグナルをもたらすかどうかの判定を精査するためにターゲットパニング調査が実施された。

【0252】

273. 第1に、各々10 μMの濃度であるリガンドターゲットティングGPCRのパネルが選択され、エピック（登録商標）システムを用いたDMR測定を使用してA549細胞上でのそれらの活動が調査された。リガンドパネルは4つのP2YアゴニストADP、

50

A T、U T P、U D P、アデノシン受容体アゴニストアデノシン、カルシウム感知受容体アゴニストスベルミン、ヒスタミン受容体アゴニストヒスタミン、アドレナリン受容体アゴニストエピネフリン、遊離脂肪酸受容体アゴニストエライジン酸、リボキシン受容体アゴニストリボキシンA 4、ブラジキニン受容体アゴニストブラジキニン、アドレナリン受容体アゴニストアドレナリン、P A R 1 アゴニストS F L L R-アミド、アンギオテンシン受容体アゴニストアンギオテンシン、ニューロペプチドY受容体アゴニストニューロペプチドYおよびP A R 2 アゴニストS L I G K V-アミドを含んでいた。図3 Aおよび図3 Bに示されるように、これらのすべてのリガンドはA 5 4 9細胞において強いD M Rシグナルをもたらした。

【0253】

274. 次に、第2のリガンドパネルが選択され、エピック（登録商標）システムを用いたD M R測定を使用してA 5 4 9細胞上でのそれらの活動が調査された。パネルは、プロテインキナーゼC活性剤P M A、内在性K_{A T P}イオンチャネル活性剤ピナシジル、アデニルシクラーゼ活性剤フォルスコリン、内在性トル様受容体（T L R）活性剤ポリ（I：C）を含んでいた。図8に示されるように、このリガンドのパネルはA 5 4 9細胞において強いD M Rシグナルをもたらした。

【0254】

275. これらのリガンドがA 5 4 9細胞において強いD M Rシグナルを誘発したという判定の後、エピック（登録商標）システムを使用してマーカに対するA 5 4 9細胞の投与依存的な反応を得ることで、各々のマーカの潜在力と効能が判定された。

【0255】

276. 次に、各リガンドのD M Rシグナルの原因になっている細胞シグナリング経路が生物化学および細胞生物学アプローチを用いてさらに調査された。全てのこれらのリガンド誘導されたD M Rシグナルが特定であるが異なるシグナリング経路情報を含むという結果が示された。したがって、これらの全てのリガンドをA 5 4 9細胞のためのマーカに選択することができる。これらのマーカの全てまたは部分的なコレクションは、A 5 4 9細胞のためのマーカのパネルとして結集され得る。

【0256】

D. 実施例3：A 4 3 1細胞における上皮細胞増殖因子受容体のシステム細胞生物学分析

277. 培地を含む血清で1日間の培養し、これに続く0.1%の胎児のウシ血清を含む培地での20時間の飢餓培養を通じて得られた部分的静止状態の細胞においてエピック（登録商標）細胞分析が実施された。分析は、A 4 3 1細胞のE G F刺激が2つの異なった連続するフェーズのD M Rシグナルをもたらすことを示した。すなわち（i）信号増加（P-D M R）を伴うポジティブフェーズ、および（i i）減衰フェーズ（N-D M R）である。生物化学および細胞生物学調査は、このE G F誘導されたD M Rシグナルが、主にR a s / M A P K経路にリンクされ、M E Kを通して進行して、細胞分離をもたらすことを示した。（F a n g, Y.ほか（2005）「ラベルフリー光学バイオセンサで測定された生体細胞におけるE G F受容体シグナリングの動的密集体再配分の特徴」A n a l . C h e m, 77, 5720-5725）

278. ここで、完全な静止状態にあるA 4 3 1細胞におけるE G F Rのシステム細胞生物学が波長インターロゲーションシステムを使用してその後再調査された。E G Fは、プロテアーゼおよび脂肪酸を含まない0.1%のウシ血清アルブミン（B S A）を含む1×H B S S内に懸濁された。最適な状態の下で、E G Fは、静止状態のA 4 3 1細胞において投与依存的反応を誘発した（データを示さず）。図4に示されるように、E C₈₀（～32 nM）のE G Fは、完全に静止状態の細胞において顕著かつ強いD M Rシグナルをもたらした。E D F D M Rシグナルは、3つのフェーズにより構成された。すなわち、最初のP-D M Rイベント、これに続くN-D M Rイベントおよび回復したP-D M R（R P-D M R）イベントである。その一方、図4のネガティブコントロールにおいて示されるように、分析バッファ単独（すなわち、ビヒクル）では、少しの明らかなD M Rシグ

10

20

30

40

50

ナルも誘発しなかった。図4において、各DMRシグナルは32回の反復の平均化された反応を示している。

【0257】

279. ターゲット特異性およびEGFのシグナリング経路が第2の分析のセットを用いて精査された。図5に示すように、BML-265またはAG1478による静止状態のA431細胞の前処理は、32nMのEGFによって誘導されたDMRシグナルをほとんど完全に遮断した。これは、BML-265およびAG1478の双方がEGFRチロシンキナーゼ抑制剤である故、EGF DMRシグナルがEGFRの活性化に起因することを示唆する。図5に示すように、U0126による静止状態のA431細胞の前処理は、N-DMRとRP-DMRシグナルを顕著かつ選択的に減らした。これは、U0126がMEKキナーゼ抑制剤である故、おそらくMEK-FAK媒介される細胞分離に起因して、N-DMRイベントがMAPK経路を通じて少なくとも部分的に進行することを示唆する。また、図5に示されるように、ロットレリンによる細胞の前処理は、特に早期のP-DMRイベントおよび早期のN-DMRイベントの一部の打ち切りを引き起こした。これはロットレリンがPKC抑制剤である故、EGF DMRシグナルの早期のDMR反応が、EGFRの下流のPKC経路の活性化に起因することを示唆する。

【0258】

280. 最後に、EGF DMRシグナルが、80のマーカのバイオモルキナーゼ抑制剤ライブラリを使って、体系的に精査された。10マイクロモルの濃度の各キナーゼマーカが約1時間、完全に静止状態のA431細胞を処理するために使用された。分子前処理の後、EGF誘導されたDMRシグナルが測定された。3つのDMRパラメータ、すなわち、P-DMR、N-DMR、RP-DMRの振幅が各反応から抽出され、キナーゼモジュレータの関数としてプロットされた。図6A、6Bおよび6Cに示すように、これらの様々なキナーゼ抑制剤は別個のEGF DMRパラメータを別々に変調した。これは、EGF DMRシグナルが、EGFRによって調停された静止状態のA431細胞のシグナリングに関するシステム細胞生物学情報を実際に含むことを示唆する。

【0259】

E. 実施例4：A431およびA549細胞に関する異なったマーカのパネルによって誘導されたDMRシグナル。

【0260】

281. マーカの第1のパネルが各マーカの濃度EC₈₀またはEC₁₀₀に近い濃度の静止状態のA431細胞に接触され、エピック（登録商標）システムによりDMR測定結果が得られた。このマーカのパネルは、エピック（登録商標）細胞分析を用いて、A431細胞において特定されたマーカのライブラリから選択された。このパネルは、上皮細胞増殖因子（EGF）、エピネフリン、ニコチン酸およびヒスタミンを含んでいた。これらのマーカの各々は、細胞シグナリングの広い配列をもたらす。上述したEGFR DMRと同様、生物化学および細胞生物学アプローチを併用したエピック（登録商標）細胞分析を使用して、我々はA431細胞におけるマーカ誘導されたDMRシグナルの各々の原因となる経路およびネットワーク相互作用を割り出した。主な観測が以下にまとめられている。上皮細胞増殖因子は、PLC-P13K経路、MAPK経路、STAT経路およびPKC経路を含む異なる多数の細胞シグナリングをもたらすA431における内在性EGF受容体のための天然のアゴニストである。エピネフリンは、A431細胞における内在性β2-アドレナリン受容体のための天然のアゴニストであり、その活性化がcAMP/PKA経路をもたらす。ニコチン酸は、A431における内在性GPR109A受容体のための天然のアゴニストであり、その活性化はGi媒介シグナリングおよびMAPK経路をもたらす。ヒスタミンは、A431における内在性ヒスタミンタイプ1受容体（H1R）のための天然のアゴニストであり、その活性化はGq媒介シグナリングおよびPKC経路をもたらす。図7は、エピック（登録商標）細胞分析によって測定されたマーカの第1のパネルによる刺激に反応する完全静止状態のA431細胞のDMRシグナルを示している。各DMRシグナルは、4回の反復の平均化された反応を示している。

【0261】

282. マーカの第2のパネルが各マーカの濃度 EC_{80} または EC_{100} に近い濃度の A549 細胞に接触され、エピック（登録商標）システムにより DMR 測定結果が得られた。上述した EGFR DMR と同様、生物化学および細胞生物学アプローチを併用したエピック（登録商標）細胞分析を使用して、我々は A549 細胞におけるマーカ誘導された DMR シグナルの各々の原因となる経路およびネットワーク相互作用を割り出した。主な観測が以下にまとめられている。ポリ（I：C）は、A549 における内在性 Toll 様受容体のためのアゴニストであり、その活性化は IKK 経路および AKT 経路をもたらす。SLIGKV-アミドは、A549 における内因性プロテアーゼ活性化受容体サブタイプ 2（PAR2）のためのアゴニストであり、その活性化は G_q 、 G_i および $G_{12/13}$ 媒介シグナリングをもたらす。ピナシジルは、A549 における内在性 ATP 感受性カリウム（ K_{ATP} ）イオンチャネルのためのオープナーであり、その活性化は Rho および JAK 媒介シグナリングをもたらす。PMA はタンパク質キナーゼ C（PKC）のための活性化剤であり、その活性化は PKC 経路および脱顆粒をもたらす。ヒスタミンは、内因性ヒスタミン受容体（支配的に $H1R$ およびおそらく $H3R$ ）のための天然のアゴニストであり、その活性化は A549 におそらく G_q および G_i 媒介シグナリングを介した 2 重のシグナリングをもたらす。フォルスコリンは、アデニルシクラーゼのための活性化剤であり、その活性化は、A549 に $cAMP/PKA$ 経路をもたらす。図 8 は、エピック（登録商標）細胞分析によって測定されたマーカの第2のパネルによる刺激に反応する A549 細胞の DMR シグナルを示している。各 DMR シグナルは、4 回の反復の平均化された反応を示している。

【0262】

F. 実施例 5：リガンドの DMR インデックス

283. DMR インデックスは、4 つのリガンド分子に対して生成された。静止状態の A431 および増殖性の A549 細胞は、それらの 1 次プロファイルを生成するために約 1 時間リガンド分子に別々にさらされ、これに続いて一定の濃度の各マーカで更に 1 時間刺激され（図 7 および図 8 に示すように）、双方のタイプの細胞におけるマーカのパネルに対して分子の 2 次プロファイルが生成された。次に、分子の DMR インデックスをプロットするための読み出しとして 1 以上の DMR パラメータが選択された。A549 におけるピナシジル DMR 反応に関し、N-DMR の振幅（すなわち、刺激後 30 分の振幅）が選択された。A549 におけるポリ（I：C）DMR 反応に関し、末期の DMR の振幅（すなわち、刺激後 50 分の振幅）が選択された。A549 における PMA 反応に関し、末期の DMR の振幅（すなわち、刺激後 50 分の振幅）が選択された。A549 における SLIGKV-アミド反応に関し、P-DMR 振幅（すなわち、刺激後 20 分の振幅）が選択された。A549 におけるフォルスコリン反応に関し、P-DMR の振幅（すなわち、刺激後 50 分の振幅）が選択された。A549 におけるヒスタミン反応に関し、初期の DMR 振幅（すなわち、刺激後 10 分の振幅）および末期の反応（すなわち刺激後 30 分の振幅）の双方が選択された。A431 におけるエピネフリン反応に関し、P-DMR 振幅（すなわち、刺激後 50 分の振幅）が選択された。A431 におけるニコチン酸 DMR に関し、P-DMR 振幅（すなわち、刺激後 3 分の振幅）が選択された。A431 における EGF DMR に関し、P-DMR 振幅（すなわち、刺激後 4 分の振幅）および N-DMR 振幅（すなわち刺激後 4 分-40 分の間の減衰している振幅）の双方が選択された。A431 におけるヒスタミン反応に関し、P-DMR 振幅（すなわち、刺激後 3 分の振幅）が選択された。各マーカに対するマーカの変調の割合は、細胞におけるマーカに対する分子の 2 次プロファイルを、同一の細胞に作用している同一のマーカの 1 次プロファイルに対して規格化することにより算出される。

【0263】

284. 図 9、10、11、12 に示されるように、リガンド分子の DMR インデックスは、2 つの反応のタイプを含み得る。すなわち、双方の細胞株におけるアゴニストモード反応（すなわち、リガンド誘発された 1 次プロファイル）と、アンタゴニスト DMR イ

ンデックス（すなわち、マーカの２つのパネルに対するリガンドの細胞株ごとの２次プロファイル）である。

【０２６４】

２８５．図９は、既知のリガンド、PKA/PKG抑制剤HA1077に関するDMRインデックスを示している。HA1007は、A549およびA431細胞の双方において類似のN-DMRシグナルを誘発した。HA1077は、A549においてほとんど完全にピナシジル反応を弱め、A431において部分的にエピネフリン反応を弱め、A431において部分的にヒスタミン反応を弱めた。しかしながら、HA1077は、A549においてPMA反応およびヒスタミン反応を顕著に強めた。

【０２６５】

２８６．図１０は、他の既知のリガンドのDMRインデックス、PKA/PKG抑制剤H-8のDMRインデックスを示している。H-8は、HA-1077と比較して類似のDMRインデックスをもたらす。しかしながら、A431細胞においてヒスタミン反応およびエピネフリン反応を弱めることに関して、H-8はより効果的ではなかった。これらの結果は、双方の抑制剤は、同一のターゲットPKAを変調することを示唆している。

【０２６６】

２８７．図１１は、既知のリガンド、PI3K抑制剤LY294002のDMRインデックスを示している。LY294002は、A431におけるEGF反応を選択的且つ部分的に弱めるが、A431におけるヒスタミン反応を強める。図１２に示すように、他のPI3K抑制剤ケルセチンは、類似のDMRインデックスを生成した。これらの結果は、双方の抑制剤は同一のターゲットPI3Kを変調することを示唆している。

【０２６７】

２８８．図９、１０、１１および１２に示すように、HA1077またはH-8のDMRインデックスは、LY294002またはケルセチンのDMRインデックスと劇的に異なり、HA1077およびH-8はLY290042またはケルセチンよりも異なる細胞ターゲットをターゲットにしていることを示唆している。

【０２６８】

G．実施例６：エピック（登録商標）システムによる分析のためのA431およびA549細胞の準備

１．目的

a) このプロトコルは、エピック（登録商標）システムを用いた分子の細胞プロファイル薬理学分析のための解凍方法、継代（passage）、シードおよび２つの異なる付着細胞株（A431およびA549）の準備におけるガイダンスを提供する。

【０２６９】

２．方法の原理および推奨

a) 原理：

（１）細胞がある分子にさらされているとき、それらはエピック（登録商標）システムを介して検出されモニタされる態様で反応することができる。それがエンドサイトーシス、アポトーシス、細胞輸送または細胞再編成によるかどうかにかかわらず、これらの動作はRWGバイオセンサの検知量で見ることができ、追跡することができる。

【０２７０】

（２）現在、これらの効果を調査するのに用いられる２つの細胞株がある。A549は、付着細胞株であり、染色体の数が１２の様式の低三倍体人間細胞株であり、細胞の２４％で生じ、上皮性の形態を有する。A431は人間の類表皮がん由来する付着細胞で、上皮性の形態を示す。

【０２７１】

b) 推奨

（１）A549およびA431細胞の双方は、２－１５の継代が使用されるべきである。より高い継代は、不定なバイオセンサ反応をもたらす。

【０２７２】

10

20

30

40

50

3. 設備およびセットアップ

- a) A 4 3 1 細胞株 (# C R L - 1 5 5 5、A T C C、マナッサス、バージニア州)
- b) A 5 4 9 細胞株 (# C C L - 1 8 5、A T C C、マナッサス、バージニア州)
- c) D M E M (# 1 0 5 6 6 - 0 1 6、インビトロジェン、カールズバッド、カリフォルニア州)
- d) 保証され、熱不活性化された胎児のウシ血清 (# 1 0 0 8 2 - 1 3 9、インビトロジェン、カールズバッド、カリフォルニア州)
- e) ペニシリンーストレプトマイシン液 (1 0 0 ×) (# 1 5 1 4 0 - 1 2 2、インビトロジェン、カールズバッド、カリフォルニア州)
- f) ジェネテシン (1 0 0 ×) (# 1 0 1 3 1 - 0 2 7、インビトロジェン、カールズバッド、カリフォルニア州) 10
- g) トリプシン-E D T A (E D T A 4 N a 含有 0. 2 5 % トリプシン) 1 × (# 2 5 2 0 0 - 0 5 6、インビトロジェン、カールズバッド、カリフォルニア州)
- h) 1 M ヘベス緩衝液 (# 1 5 6 3 0 - 0 8 0、インビトロジェン、カールズバッド、カリフォルニア州)
- i) カルシウムおよびマグネシウムを含むが、フェノールレッドを含まない 1 × ハンクス平衡塩類溶液 (1 × H B S S) (# 1 4 0 2 5 - 0 9 2、インビトロジェン、カールズバッド、カリフォルニア州)
- j) Z シリーズ、Z - p a k (# 8 3 2 0 3 1 2、ベックマンコールター、フラートン、カリフォルニア州) 20
- k) Dilu-Vial (# 3 - 3 4 1 - 1 3、フィッシャーサイエンティフィック、ピッツバーグ、ペンシルベニア州)
- l) ベントキャップを有するコーニング 2 5 c m ² 細胞培養フラスコ (T - 2 5) (# 4 3 0 6 3 9、コーニング社、コーニング、ニューヨーク州)
- m) ベントキャップを有するコーニング 7 5 c m ² 細胞培養フラスコ (T - 7 5) (# 4 3 0 6 4 1、コーニング社、コーニング、ニューヨーク州)
- n) コールターカウンター Z 1 (モデル Z 1 D、ベックマンコールター、フラートン、カリフォルニア州)
- o) コーニングエピック (登録商標) 3 8 4 ウェルバイオセンサマイクロプレート細胞培養コンパチブル (# 5 0 4 0、コーニング社、コーニング、ニューヨーク州) 30
- p) コーニング 3 8 4 ウェルポリプロピレン分子貯蔵プレート (# 3 6 5 3、コーニング社、コーニング、ニューヨーク州)

4. 溶液および試薬

- a) コンプリート D M E M (c D M E M)
 - (1) D M E M
 - (2) 1 0 % 胎児ウシ血清
 - (3) 1 0 0 μ g / m l ペニシリンーストレプトマシ (1 ×)
- b) 細胞分析緩衝液
 - (1) H B S S (1 0 m M ヘベスを含む 1 × H B S S、p H 7. 1)

5. 手順

- a) 最初の細胞増殖 (T - 2 5 フラスコからの細胞の分配 / パッセージング (Passaging)) 40
 - (1) コンプリート D M E M 培地を 3 7 ° C のウォーターバスに入れ、それを 3 7 ° C で暖める。
 - 【0 2 7 3】
 - (2) トリプシン / E D T A 0. 2 5 % を室温下に置く。
 - 【0 2 7 4】
 - (3) 使用した培地を吸引する。
 - 【0 2 7 5】
 - (4) 2 m l (T - 2 5) の 0. 2 5 % トリプシン / E D T A をフラスコに加え、前後 50

にゆっくりフラスコをゆらすことによりフラスコ内の細胞を洗浄する。

【0276】

(5) トリプシン／EDTAを吸引する。

【0277】

(6) 2 ml (T-25) の0.25%トリプシン／EDTAをフラスコに加える。

【0278】

(7) CO₂ (5%) のインキュベータで3-5分間 (A549) または8-12分間 (A431) または細胞が表面から剥離するまで37℃で保温する。フラスコは前後に揺らさない。それは細胞凝縮を引き起こす場合がある。

【0279】

(8) 3 ml のコンプリート培地をT-25フラスコに加え、フラスコ内で数回上下にピペット動作することにより細胞を分散させる。

【0280】

(9) 新たなフラスコに分配する準備をする。

【0281】

(a) 1:10の希釈度 (A431) -新しいT-75フラスコの中の15 ml のcDMEMに1.5 ml の新たに分散した細胞を加える-分配した細胞の間で5日間

(b) 1:15の希釈度 (A549) -新しいT-75フラスコの中の14 ml のcDMEMに1 ml の新たに分散した細胞を加える-分配した細胞の間で4日間

(10) 細胞が顕微鏡の下で視覚的点検によって90%より高い密集度に至るまで湿度95%、37℃にセットされたCO₂ (5%) インキュベータに、T-75フラスコを入れる。- 再び、増殖させる (分配する) 準備をする。

b) 細胞増殖 (T-75フラスコからの細胞の分配／パッセージング (Passaging))

(1) コンプリートDMEM培地を37℃のウォータバスに入れ、それを37℃で暖める。

【0282】

(2) トリプシン／EDTA 0.25%を室温下に置く。

【0283】

(3) 使用した培地を吸引する。

【0284】

(4) 3 ml (T-75) の0.25%トリプシン／EDTAをフラスコに加え、前後にゆっくりフラスコをゆらすことによりフラスコ内の細胞を洗浄する。

【0285】

(5) トリプシン／EDTAを吸引する。

【0286】

(6) 3 ml (T-75) の0.25%トリプシン／EDTAをフラスコに加える。

【0287】

(7) CO₂ (5%) のインキュベータで3-5分間 (A549) または8-12分間 (A431) または細胞が表面から剥離するまで37℃で保温する。フラスコは前後に揺らさない。それは細胞凝縮を引き起こす場合がある。

【0288】

(8) ほとんど全ての細胞がフラスコ表面から剥離した後、12 ml (T-75) のコンプリート培地を細胞に加える。フラスコ内で数回上下にピペット動作することにより細胞を分散させる。

【0289】

(9) 新たなフラスコに分配する準備をする。

【0290】

(a) 1:10の希釈度 (A431) -新しいT-75フラスコの中の14 ml のcDMEMに1.5 ml の新たに分散した細胞を加える-分配した細胞の間で5日間

(b) 1:15の希釈度 (A549) -新しいT-75フラスコの中の14 ml のc

10

20

30

40

50

D MEMに1 m lの新たに分散した細胞を加える－分配した細胞の間で4日間

(10) 細胞が顕微鏡の下で視覚の点検によって90%より高い密集度に至るまで湿度95%、37℃にセットされたCO₂(5%)インキュベータに、T-75フラスコを入れる。－再び、増殖させる(分配する)準備をする。

【0291】

c) 細胞カウント

(1) ベックマンコールターのパーティクルカウンターをオンにする。

【0292】

(2) カウンティング容器を10 m lの希釈剤で満たす。

【0293】

(3) 10 m lに対して50 µ lの細胞を加える。

【0294】

(4) スタートボタンを押してカウントを開始する。

【0295】

(5) カウンタは、カウントが終了すると結果を表示させる。

【0296】

(6) カウントを繰り返す－カウントの変動が5%以上である場合はより多く。

【0297】

(7) 最初のストックにおける細胞/m lの濃度を判定する。すなわち、
[(#の細胞)(10ml)]/[(サンプル中の0.05ml)(0.5ml コールターサンプリング量)] または (#の細胞)(400)

(8) トータル細胞 = 細胞/m lの濃度 × 細胞のトータル量

d) 細胞シーディング

(1) 収穫後、T-75フラスコから細胞を収集する。

【0298】

(2) 細胞の数をカウントする。

【0299】

(3) 室温下、2000 r p mで5分間、細胞を回転させる。

【0300】

(4) 培地を吸引する。

【0301】

(5) 50 m lの遠心分離チューブの中のc D MEM培地を用いて細胞を最終シーディング濃度(A431では400000細胞/m l、A549では320000細胞/m l)で再懸濁させる。

【0302】

(6) 自動ピペッターを使用して50 µ lの細胞を384ウェルバイオセンサプレート
の各ウェルに加える。

【0303】

(7) ウェルの底で捕捉された気泡がないことを確認する。

【0304】

(8) 気泡をピペットで外部に取り出し、ウェルに戻すことにより気泡を除去する必要がある。

【0305】

(9) プレートを少なくとも15－30分間層流フード内で保温する。

【0306】

(10) 望ましい密集度に達するまで(通常一晩中)、5%のCO₂インキュベータ内で37℃、湿度95%にて細胞を保温する。

【0307】

e) A431細胞を飢餓にする

(1) 分析が実施される前日に細胞を少なくとも16時間飢えさせる必要がある。

10

20

30

40

50

【0308】

(2) 血清フリー培地 (1×Pen/Strepを含むDMEM) を37℃下に置く。

【0309】

(3) 適切な容器内でプレートをはじくか、プレート洗浄機を使用することによって、血清培地の全てを除去する。

【0310】

(4) 50 µl の血清フリー培地を各ウェルに加える。

【0311】

(5) ステップ(3) および(4) を1回繰り返す

(6) 次の日まで、5% CO₂ のインキュベータ内で37℃、湿度95%にて細胞を保温する。 10

【0312】

6. エピック (登録商標) ベータシステムによる実験の準備

a) バイオテックの ELx405UCW プレート洗浄機を使用して、細胞を洗浄する。

【0313】

(1) CO₂ インキュベータから、細胞を有する細胞分析プレートを除去する。

【0314】

(2) 蓋を取り外す。

【0315】

(3) 50 µl の HBSS を使用して細胞をプレート洗浄機で2回洗浄する。 20

【0316】

(4) 1ウェルあたり50 µl の HBSS を加える。

【0317】

(5) 40 µl 残すのに余分なバッファを吸引する。

【0318】

b) 蓋を元に戻す。

【0319】

c) プレートを少なくとも1時間エピック (登録商標) 機器のホテル内にカバーした状態で入れる。

【0320】

7. パラメータのセットアップおよびエピック (登録商標) ベータシステムによる実験の実行 30

a) データ収集率 (一般的に15秒/読み出し)、ベースライン (～2分) および分析 (～60または90分) のための時間を含む適切な分析パラメータを選択する。

【0321】

b) 複合物リソースプレートのタイプ、蓋の除去、複合物添加および混合、蓋を元に戻すことを含む適切なロボットパラメータを選択する。

【0322】

c) チップを変更する (CyBio Cat # OL2001-25-250)

d) ソースプレート (分子プレート) およびテストプレート (細胞分析プレート) を装着する。 40

【0323】

e) 「プレートID」にプレートネームをタイプする

f) 標準プロトコルを使用する「分析プロトコル」で実行する。各スキャンは、分析プレートの底を横切る2回のスイープの平均である。

【0324】

(a) ベースラインのために120秒間のプレスキャンを行う。

【0325】

(b) 5×濃度で10 µl の分子を加える。

【0326】

(c) さらに2400秒間(～1時間)スキャンする。

【0327】

g) ソースプレートおよびテストプレートを取り外す。

【0328】

先にされた米国特許出願の利益の要求

1. 本出願は、2008年11月24日に出願された先の米国特許出願No. 61/17450の利益を要求する。本書面の内容およびここで言及された刊行物、特許、および特許文書の全ての開示が参照によって組み入れられる。

【0329】

VI. 参考文献

289. Fang, .Y., Ferrie, A.M., and Li, G. 著 (2005) 文献名「Probing cytoskeleton modulation by optical biosensors」 FEBS Lett., 579, 4175-4180

290. Fang, Y., Ferrie, A.M., Fontaine, N.H., Yuen, P.K. 著 (2005) 文献名「Characteristics of dynamic mass redistribution of EGF receptor signaling in living cells measured with label free optical biosensors」 Anal. Chem., 77, 5720-5725

291. Fang, Y., Li, G., Peng, J. 著 (2005) 文献名「Optical biosensor provides insights for bradykinin B2 receptor signaling in A431 cells.」 FEBS Lett. 579, 6365-6374

292. Fang, Y., Ferrie, A.M., Fontaine, N.H., Mauro, J., Balakrishnan, J. 著 (2006) 文献名「Resonant waveguide grating biosensor for living cell sensing」 Biophys. J., 91, 1925-1940

293. Fang, Y. 著 (2006) 文献名「Label-free cell-based assays with optical biosensors in drug discovery」 Assays and Drug development Technologies. 4(5), 583-595

294. Fang, Y., Li, G. and Ferrie, A.M. 著 (2007) 文献名「Non-invasive optical biosensor for assaying endogenous G protein-coupled receptors in adherent cells」 J. Pharmacol. Toxicol. Methods, 55, 314-322

295. Fang, Y. and Ferrie, A.M. 著 (2007) 文献名「Optical biosensor differentiates signaling of endogenous PAR1 and PAR2 in A431 cells」 BMC Cell Biol., 8, 24 (1-12)

296. Fang, Y. 著 (2007) 文献名「Non-invasive optical biosensor for probing cell signaling」 Sensors, 7, 2316-2329

297. Fang, Y., and Ferrie, A.M. 著 (2008) 文献名「label-free optical biosensor for ligand-directed functional selectivity acting on β 2 adrenoceptor in living cells」 FEBS Lett. 582, 558-564

298. Lee, P.H., Gao, A., van Staden, C., Ly, J., Salon, J., Xu, A., Fang, Y., and Verkleeren, R. 著 (2008) 文献名「Evaluation of dynamic mass redistribution technology for pharmacological studies of recombinant and endogenously expressed G protein-coupled receptors.」 Assay and Drug Development Technologies, 6, 83-93

299. Fang, Y., Frutos, A.G., Verkleeren, R. 著 (2008) 文献名「Label-free cell assays for GPCR screening. Comb.」 Comb. Chem.& HTS 11, 357-369

10

20

30

40

【図 1】

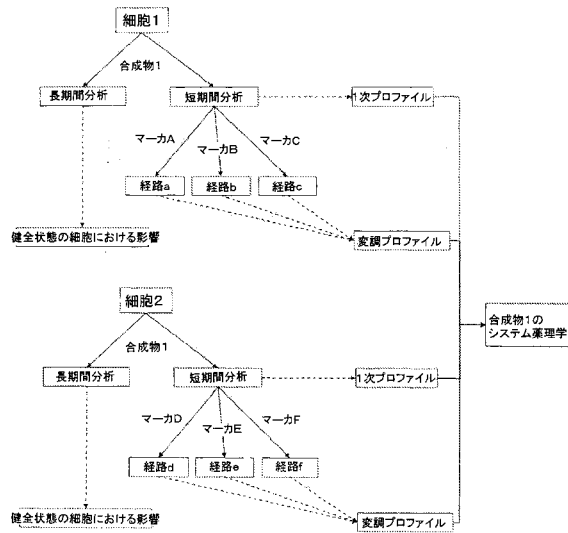


FIG. 1

【図 2】

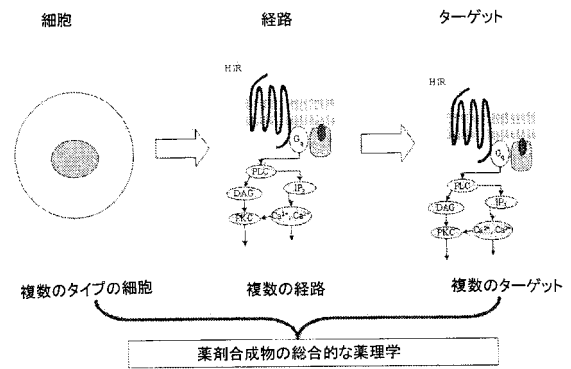


FIG. 2

【図 3 A】

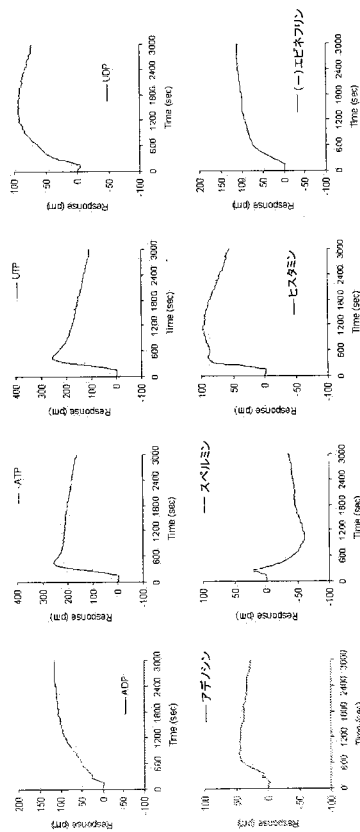


FIG. 3A

【図 3 B】

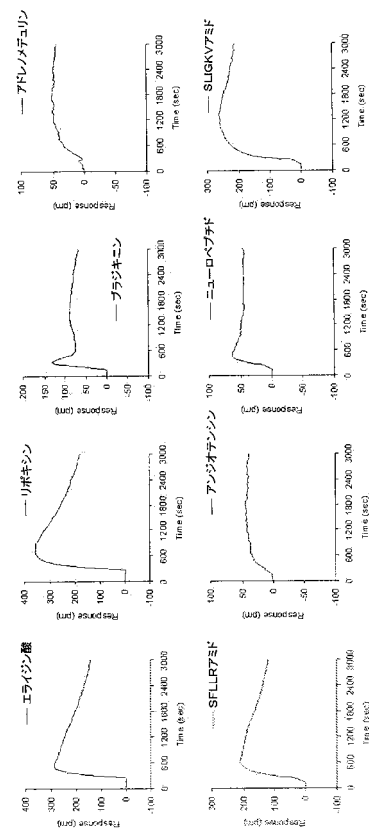


FIG. 3B

【図 4】

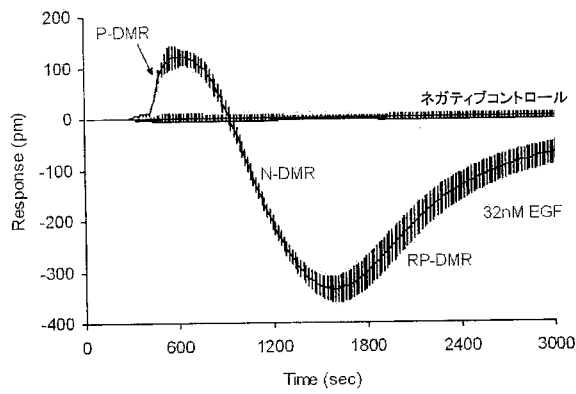


FIG. 4

【図 5】

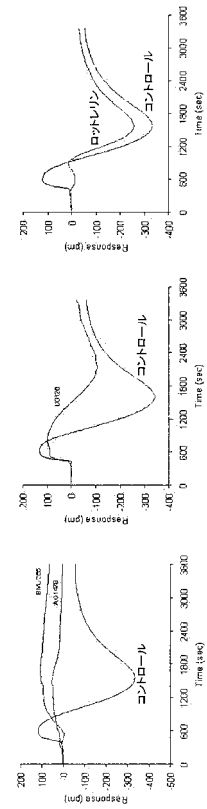


FIG. 5

【図 6 A】

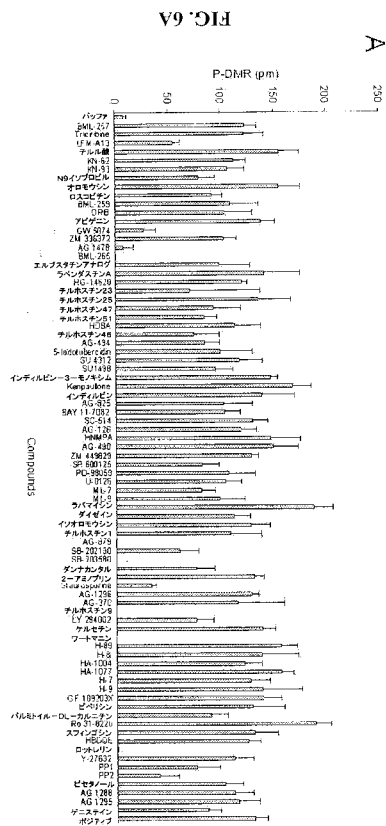


FIG. 6A

【図 6 B】

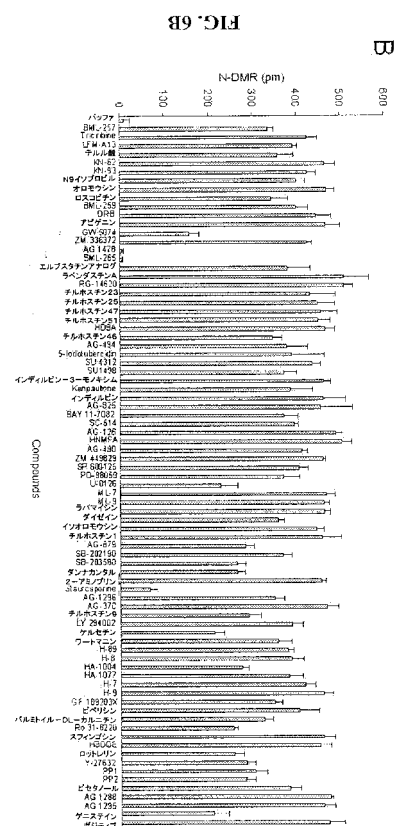
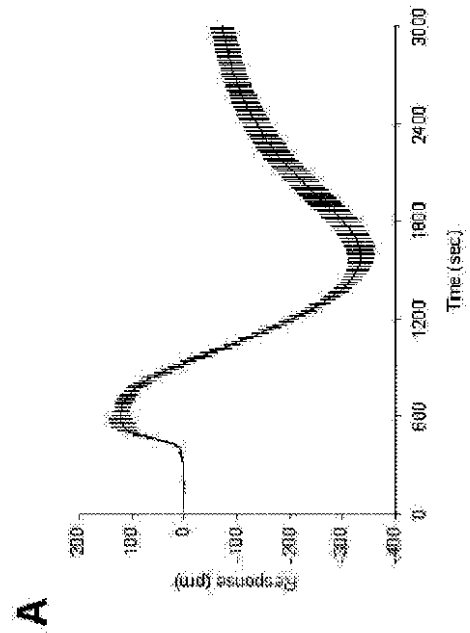
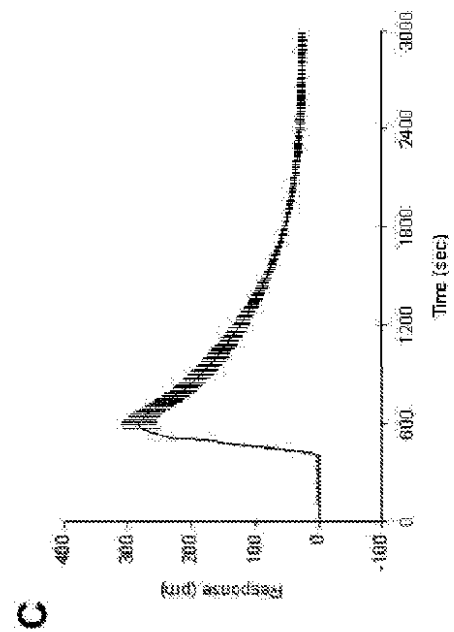


FIG. 6B

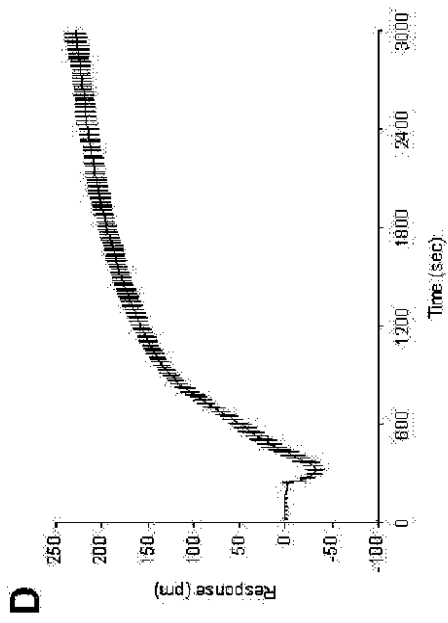
【图 7 A】



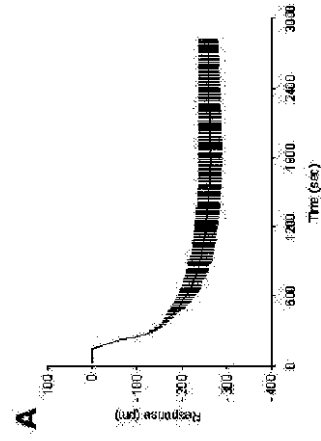
【图 7 C】



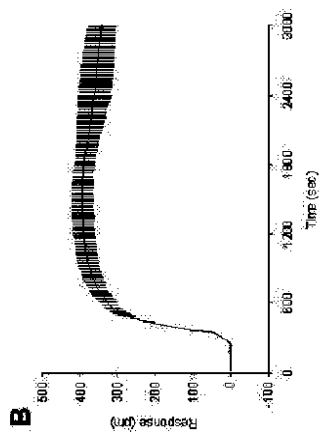
【図 7 D】



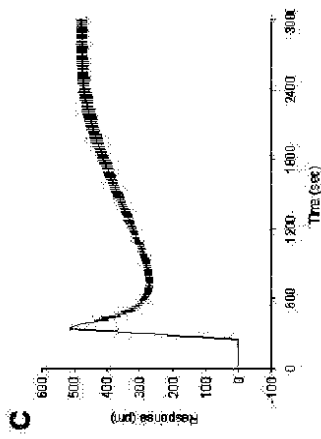
【図 8 A】



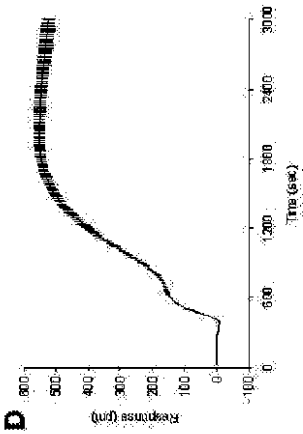
【図 8 B】



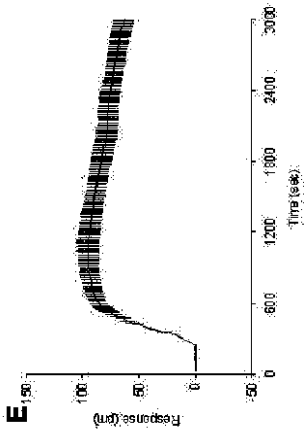
【図 8 C】



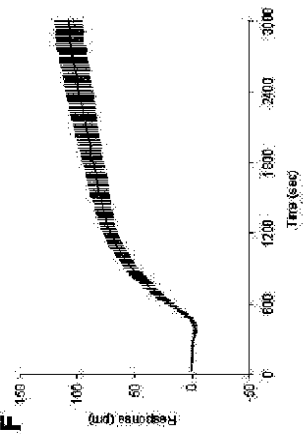
【図 8 D】



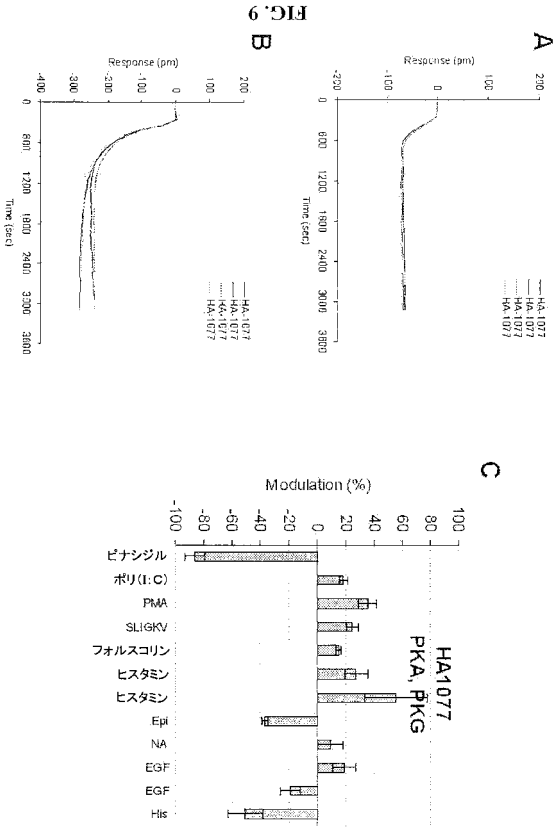
【図 8 E】



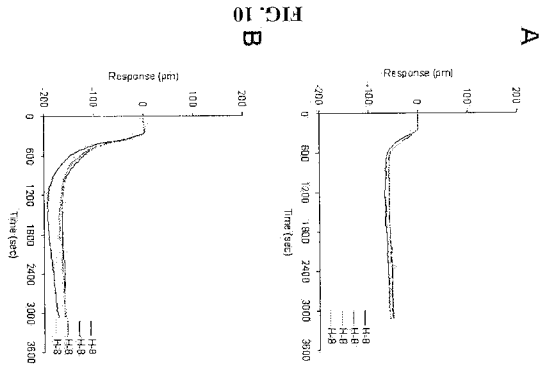
【図 8 F】



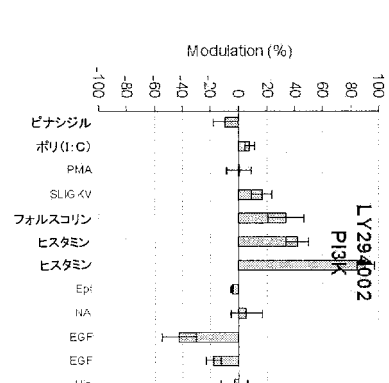
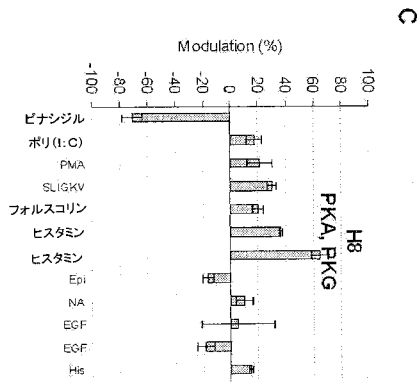
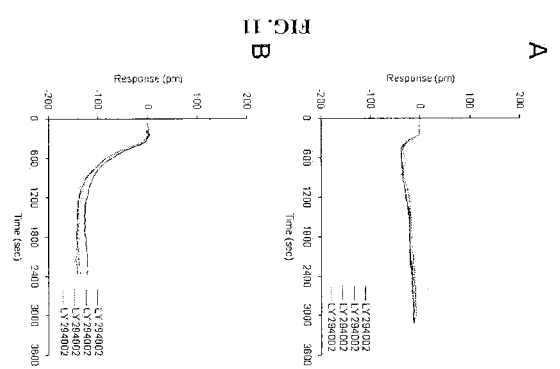
【図 9】



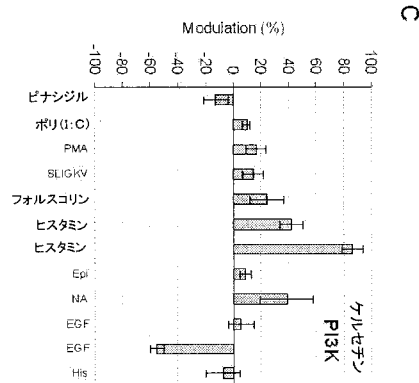
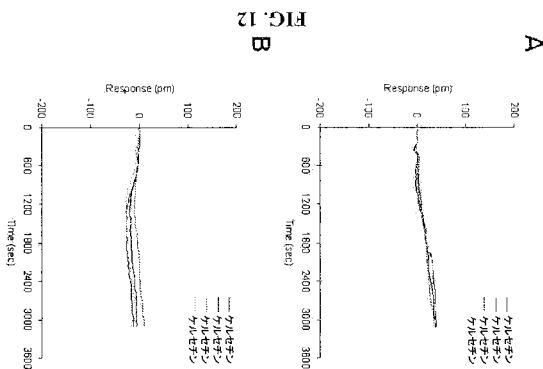
【図 10】



【図 11】



【図 12】



【手続補正書】

【提出日】 平成23年7月28日 (2011.7.28)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】 特許請求の範囲

【補正対象項目名】 全文

【補正方法】 変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

分子を特徴付ける方法であって、

a. 必要に応じて 1 次プロファイルを生成している分子のバイオセンサ反応を収集するステップと、

b. 2 次プロファイルを生成している前記分子の存在下において細胞パネルにおけるマーカパネルのバイオセンサ反応を収集するステップと、

c. 各バイオセンサシグナルからバイオセンサパラメータの特定のセットを抽出するステップと、

d. ポジティブコントロールに対して各バイオセンサパラメータを規格化して変調比較を生成するステップと、

e. 前記マーカパネルまたは前記細胞パネルの関数として少なくとも 1 つのバイオセンサパラメータの前記変調比較をプロットして分子変調インデックスを生成するステップと、

f. 必要に応じて、前記分子の前記 1 次プロファイルと前記分子変調インデックスとを組み合わせる分子バイオセンサインデックスを生成するステップと、

g. 前記分子バイオセンサインデックスとモジュレータバイオセンサインデックスのライブラリとを比較するステップと、を含むことを特徴とする方法。

【請求項 2】

前記分子バイオセンサインデックスにおける 1 つ以上の分子変調プロファイルに類似する前記モジュレータバイオセンサインデックスにおける 1 以上のマーカ変調プロファイルを特定するステップを更に含むことを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記分子は、前記分子バイオセンサインデックスが前記モジュレータバイオセンサインデックスに類似するとき、前記モジュレータと活動の類似したモードを共有することを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記ステップ a は、アゴニストモードにおいて実施されることを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

前記ステップ d における前記ポジティブコントロールは、前記細胞のサンプルが前記マーカのみによって処理されているときに生成されたマーカの 1 次プロファイルを含むことを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

前記モジュレータバイオセンサインデックスのライブラリは分子変調インデックスを含むことを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

創薬の方法であって、

a. 未知の分子インデックスと既知のモジュレータインデックスとを比較するステップと、

b. 未知の分子リガンドインデックスが前記既知のモジュレータインデックスと類似しているかどうか判定するステップと、を含むことを特徴とする方法。

【請求項 8】

組成物を作成する方法であって、

分子を合成するステップを含み、前記分子は分子として特徴付けられ、分子インデックスは、モジュレータインデックスに対して類似性を有し、請求項1に記載の方法を用いて特定され得ることを特徴とする方法。

【請求項9】

請求項8の方法によって製造された製造物。

【手続補正2】

【補正対象書類名】図面

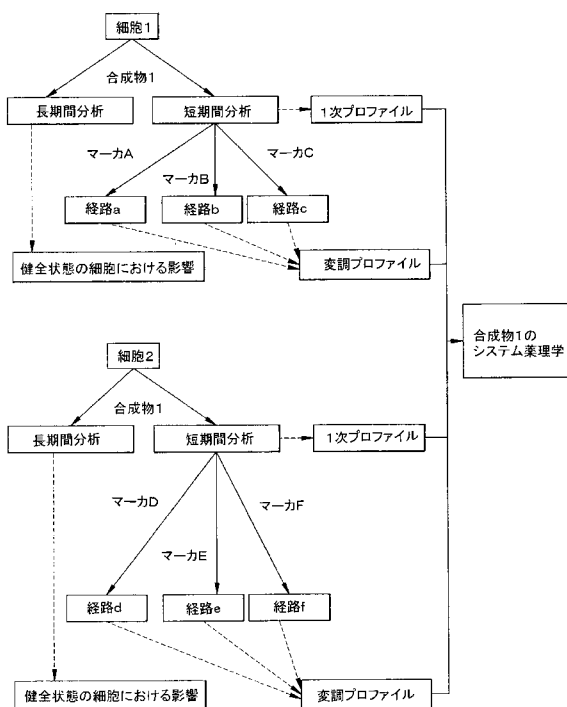
【補正対象項目名】全図

【補正方法】変更

【補正の内容】

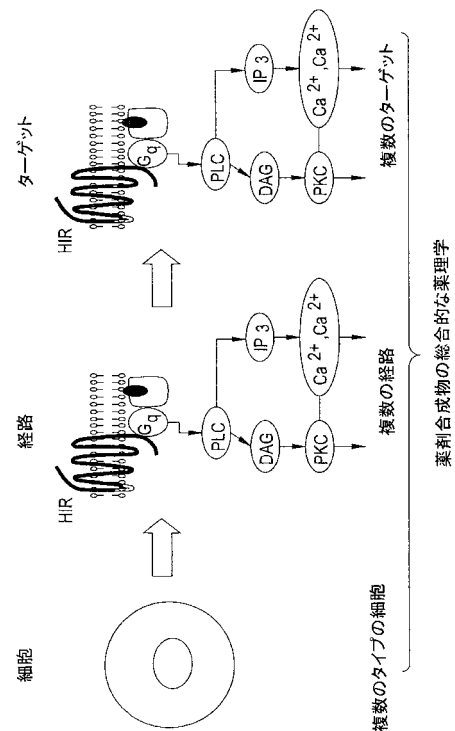
【図1】

FIG. 1

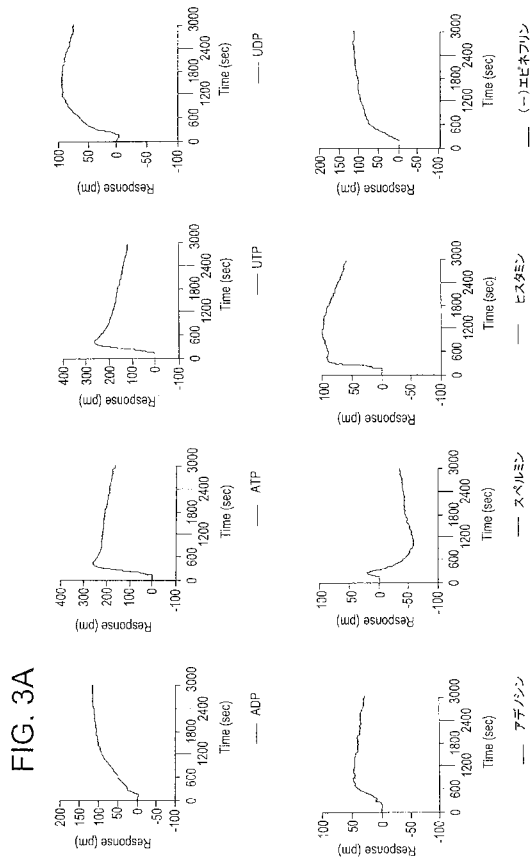


【図2】

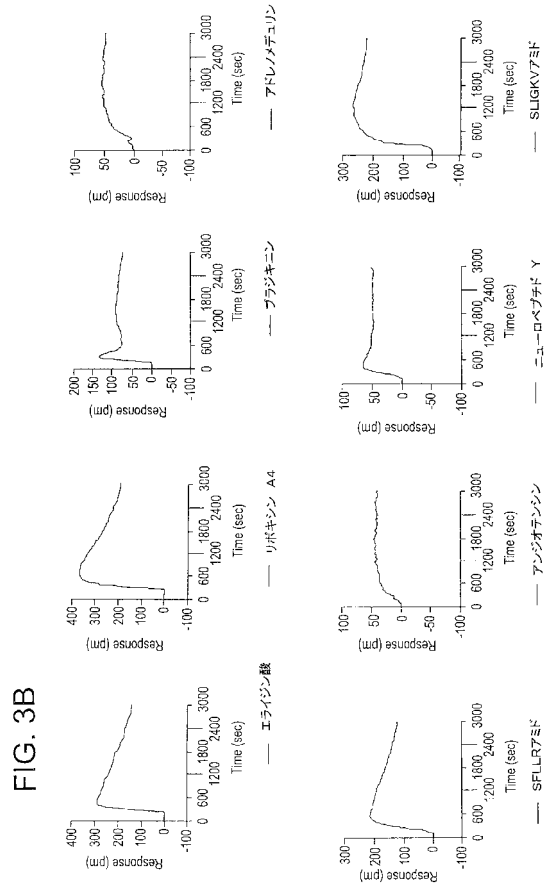
FIG. 2



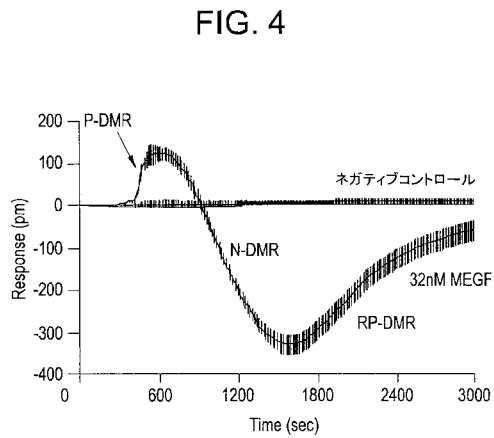
【図 3 A】



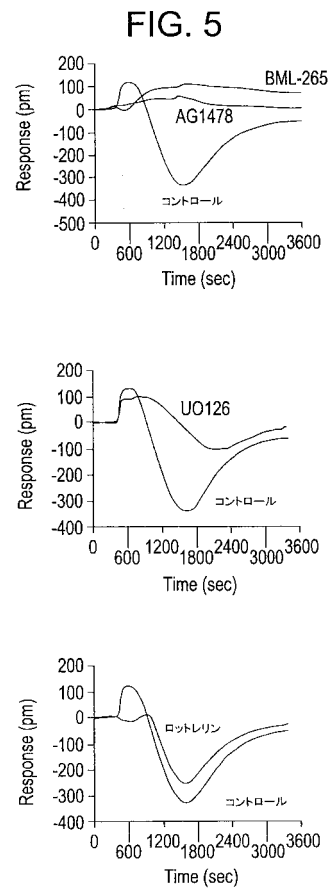
【図 3 B】



【図 4】

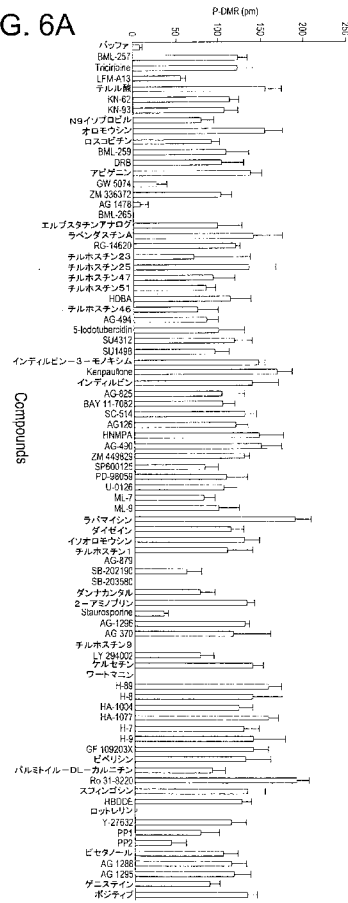


【図 5】



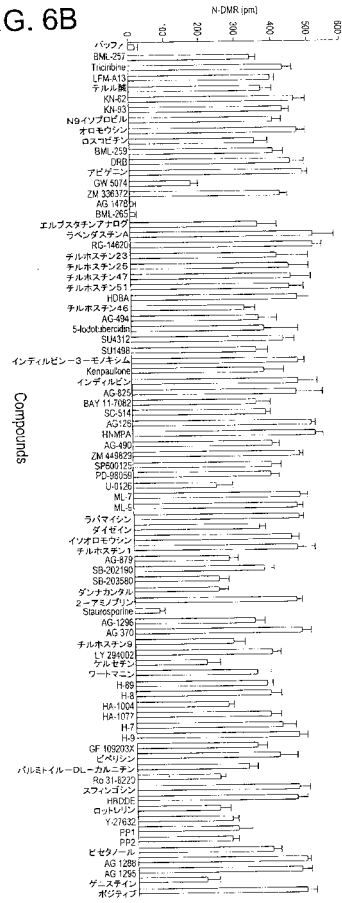
【図 6 A】

FIG. 6A



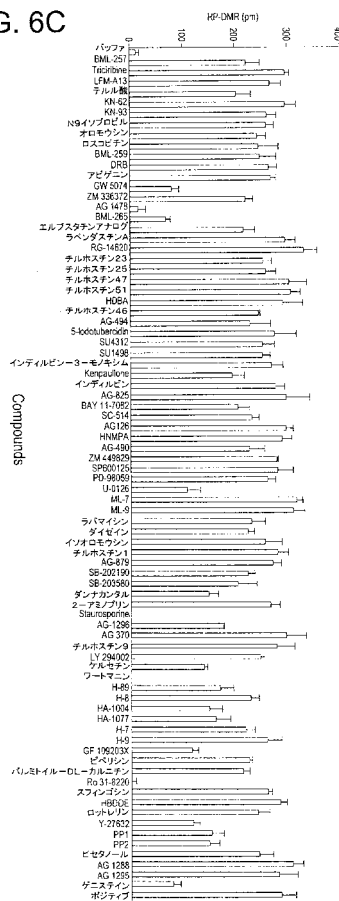
【図 6 B】

FIG. 6B



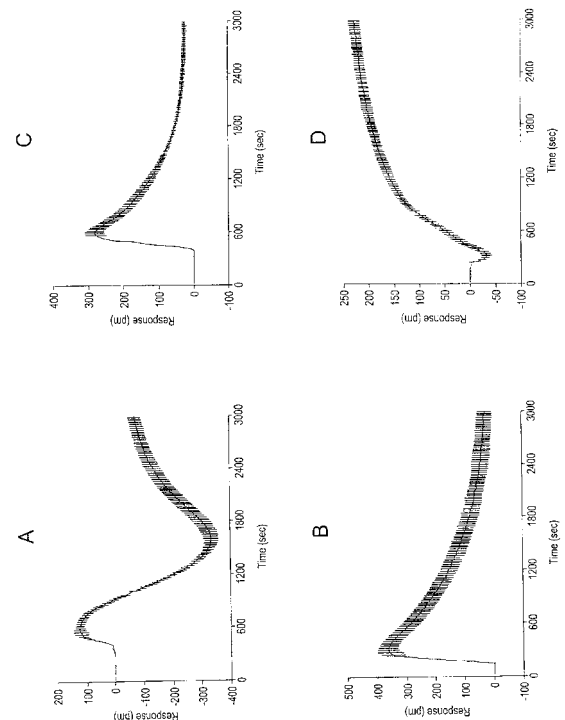
【図 6 C】

FIG. 6C



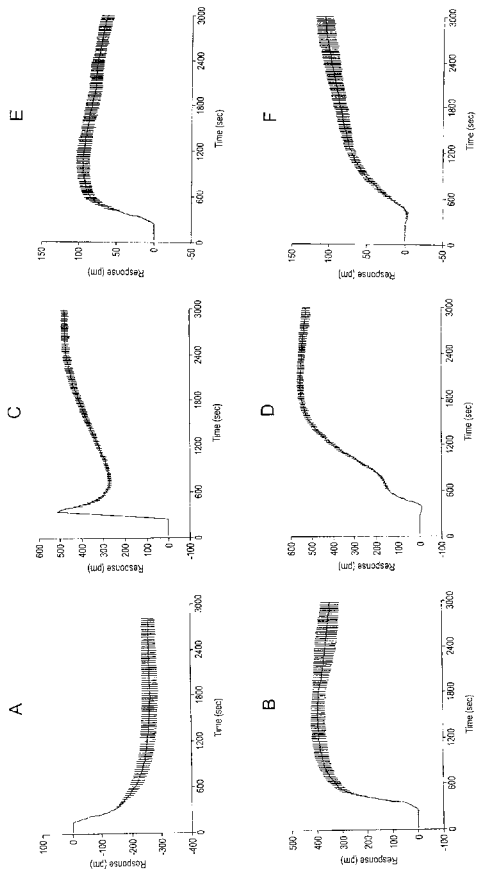
【図 7】

FIG. 7



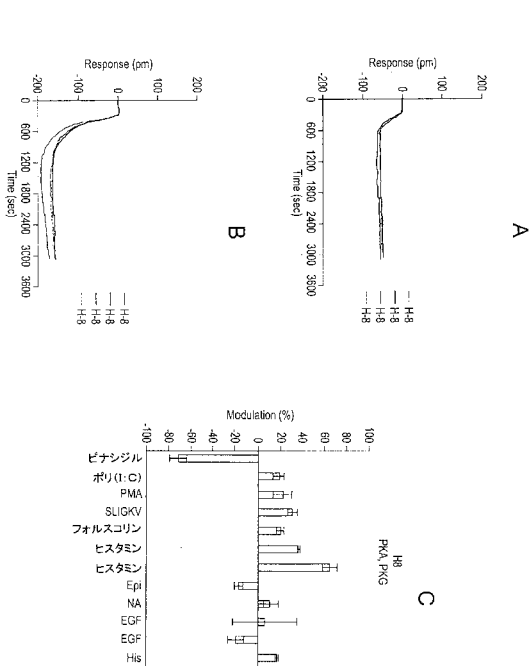
【図 8】

FIG. 8



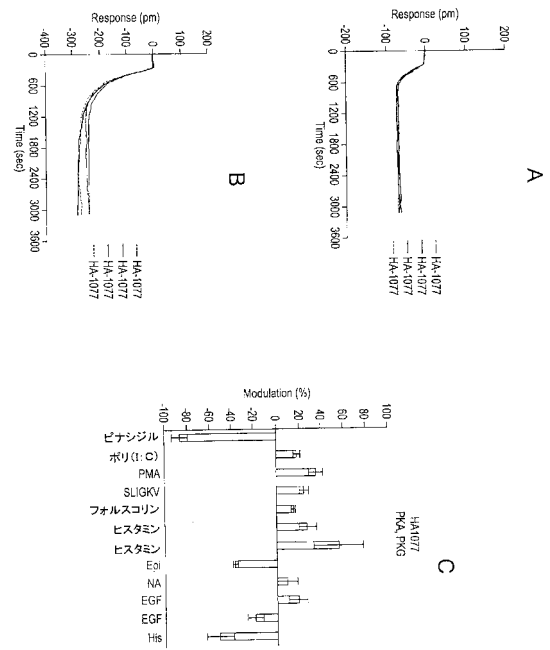
【図 10】

FIG. 10



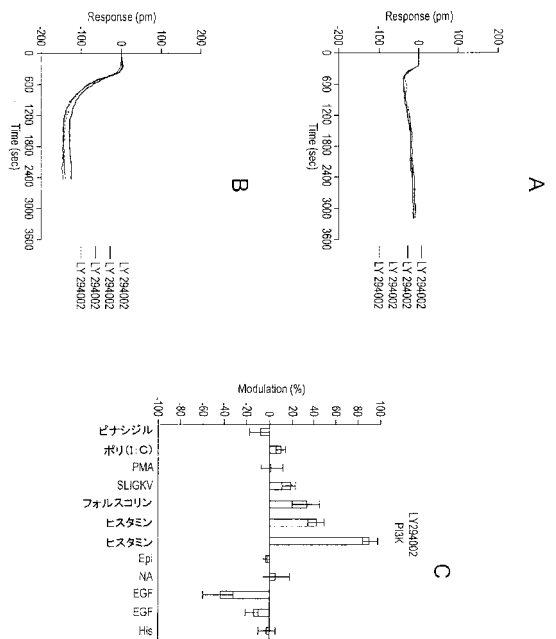
【図 9】

FIG. 9



【図 11】

FIG. 11



【図 12】

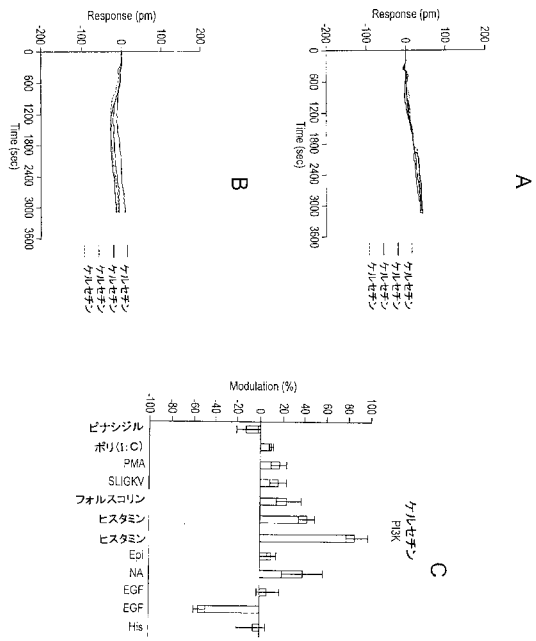


FIG. 12

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2009/065483

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. G01N33/543 G01N33/50 G06F19/00 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N G06F		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2006/160109 A1 (MACDONALD MARNIE L [US] ET AL) 20 July 2006 (2006-07-20) the whole document paragraphs [0086], [0087], [0090], [0093], [0187] example 2 figures 8-9, 13-19 ----- -/--	1-52
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family 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. "B" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 3 June 2010		Date of mailing of the International search report 21/06/2010
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040 Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Jenkins, Gareth

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2009/065483

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KUTSYY VADIM ET AL: "COMPOUND CLASSIFICATION USING IMAGE-BASED CELLULAR PHENOTYPES" METHODS IN ENZYMOLOGY; [METHODS IN ENZYMOLOGY], ACADEMIC PRESS INC, SAN DIEGO, CA, US, vol. 414, 1 January 2006 (2006-01-01), pages 440-468, XP008080093 ISSN: 0076-6879 the whole document figures 3,4 page 459 - page 460	1-46
X	YOUNG DANIEL W ET AL: "Integrating high-content screening and ligand-target prediction to identify mechanism of action" NATURE CHEMICAL BIOLOGY, vol. 4, no. 1, January 2008 (2008-01), pages 59-68, XP002568979 the whole document figures 2,4	1-46
X	TAYLOR D L ET AL: "Multiplexed high content screening assays create a systems cell biology approach to drug discovery" DRUG DISCOVERY TODAY: TECHNOLOGIES, ELSEVIER, vol. 2, no. 2, 1 July 2005 (2005-07-01), pages 149-154, XP004985713 ISSN: 1740-6749 the whole document figure 1 table 2 pages 150,153	1-46
X	US 2006/223051 A1 (FANG YE [US] ET AL) 5 October 2006 (2006-10-05) the whole document paragraphs [0017], [0039], [0069], [0070], [0077], [0078] figures 9,16,17	1-53
X	LEE PAUL H ET AL: "Evaluation of dynamic mass redistribution technology for pharmacological studies of recombinant and endogenously expressed G protein-coupled receptors" ASSAY AND DRUG DEVELOPMENT TECHNOLOGIES, vol. 6, no. 1, February 2008 (2008-02), pages 83-94, XP002568980 ISSN: 1540-658X cited in the application the whole document figures 2-5	1-46,53
	----- -/-	

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2009/065483

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	FANG YE: "Label-free cell-based assays with optical biosensors in drug discovery" ASSAY AND DRUG DEVELOPMENT TECHNOLOGIES, US, vol. 4, no. 5, 1 October 2006 (2006-10-01), pages 583-595, XP002488211 ISSN: 1540-658X the whole document page 589 - page 590 figure 6C	1-46,53
X	GIULIANO KENNETH A ET AL: "Systems cell biology based on high-content screening" METHODS IN ENZYMOLOGY; [METHODS IN ENZYMOLOGY], ACADEMIC PRESS INC, SAN DIEGO, CA, US, 1 January 2006 (2006-01-01), pages 601-619, XP009097131 ISSN: 0076-6879 the whole document page 608 - page 609	1-46
X	WO 2008/130488 A1 (CORNING INC [US]; FANG YE [US]; LAHIRI JOYDEEP [US]; VERRIER FLORENCE) 30 October 2008 (2008-10-30) the whole document claims 1,15,18 page 11, line 6 - line 16	1-46
X	WILKINSON JENNIFER M ET AL: "Compound profiling using a panel of steroid hormone receptor cell-based assays" JOURNAL OF BIOMOLECULAR SCREENING, vol. 13, no. 8, September 2008 (2008-09), pages 755-765, XP008122231 ISSN: 1087-0571 the whole document tables 1, 2b, 3	1-46,52
X	VILLA M L ET AL: "Interference of cephalosporins with immune response: Effects of cefonicid on human T-helper cells" INTERNATIONAL JOURNAL OF IMMUNOPHARMACOLOGY, ELMSFORD, NY, US LNKD-DOI:10.1016/0192-0561(91)90161-Y, vol. 13, no. 8, 1 January 1991 (1991-01-01), pages 1099-1107, XP023812733 ISSN: 0192-0561 [retrieved on 1991-01-01] the whole document figure 7	32-36
	-/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2009/065483

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MARRERO PONCE YOYANI ET AL: "Atom-based 2D quadratic indices in drug discovery of novel tyrosinase inhibitors: Results of in silico studies supported by experimental results" QSAR & COMBINATORIAL SCIENCE, vol. 26, no. 4, April 2007 (2007-04), pages 469-487, XP002582517 ISSN: 1611-020X the whole document abstract tables 6, 7 page 476, column 2, paragraph 3	37
X	MORO S ET AL: "The application of a 3D-QSAR (autoMEP/PLS) approach as an efficient pharmacodynamic-driven filtering method for small-sized virtual library: Application to a lead optimization of a human A3 adenosine receptor antagonist" BIOORGANIC & MEDICINAL CHEMISTRY, PERGAMON, GB LNKD- DOI:10.1016/J.BMC.2006.03.010, vol. 14, no. 14, 15 July 2006 (2006-07-15) , pages 4923-4932, XP025133391 ISSN: 0968-0896 [retrieved on 2006-07-15] the whole document	37
X	BEROZA PAUL ET AL: "Target-related affinity profiling: Telik's lead discovery technology" CURRENT TOPICS IN MEDICINAL CHEMISTRY, vol. 5, no. 4, 2005, pages 371-381, XP008122425 ISSN: 1568-0266 the whole document page 373 - page 375 figure 6 examples 1,2	37
X	JOHANN GASTEIGER: "Cheminformatics: a new field with a long tradition" ANALYTICAL AND BIOANALYTICAL CHEMISTRY, SPRINGER, BERLIN, DE LNKD- DOI:10.1007/S00216-005-0065-Y, vol. 384, no. 1, 1 January 2006 (2006-01-01), pages 57-64, XP019327765 ISSN: 1618-2650 the whole document page 62, column 1	37

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2006)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International application No.
 PCT/US2009/065483

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)

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

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

see additional sheet

1. ☒ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

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

International Application No. PCT/US2009 /065483

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

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

1. claims: 1-31

Method of independent claim 1.

2-10. claims: 32-53

The subject-matter of independent claims
32,37,38,39,45,46,47,52,53, respectively.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/US2009/065483

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2006160109	A1	20-07-2006	AU 2005309649 A1 01-06-2006
		CA 2590331 A1 01-06-2006	
		EP 1836631 A2 26-09-2007	
		WO 2006058014 A2 01-06-2006	
US 2006223051	A1	05-10-2006	EP 1882186 A2 30-01-2008
		JP 2008536117 T 04-09-2008	
		US 2009275074 A1 05-11-2009	
		WO 2006107506 A2 12-10-2006	
WO 2008130488	A1	30-10-2008	EP 2064542 A1 03-06-2009

フロントページの続き

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

(72)発明者 ラヒリ ジョイディーブ

アメリカ合衆国 ニューヨーク州 1 4 8 7 0 ペインテッドポスト オークウッドドライブ 5
3

(72)発明者 トラン エリザベス

アメリカ合衆国 ニューヨーク州 1 4 8 7 0 ペインテッドポスト ウッズエッジドライブ 2
2 8

Fターム(参考) 4B063 QA01 QA18 QQ08 QR77 QX05

4C084 AA17 NA14