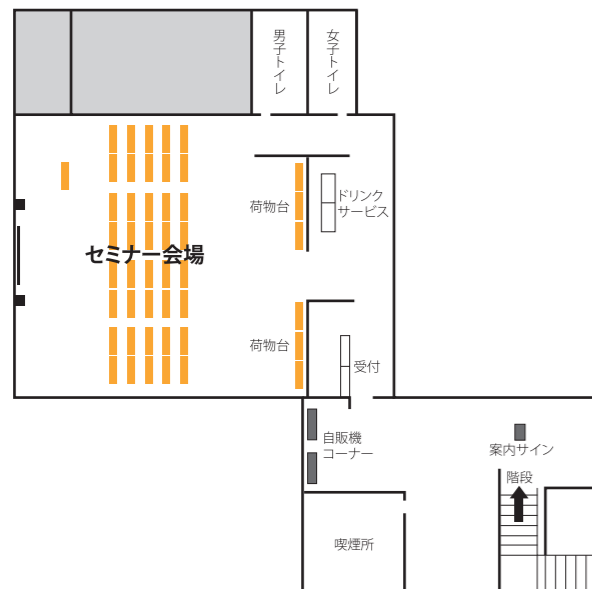
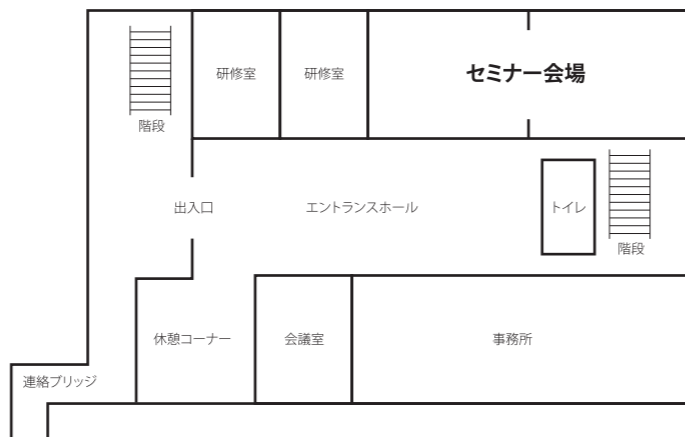


7月4日(水曜日) 東京会場
コクヨホール 多目的ホール



7月6日(金曜日) 神戸会場
臨床研究情報センター (TRI) 内 2階研修室



細胞内リン酸化シグナル研究の新展開

～セルベースで切り拓くキナーゼ阻害剤研究～

2012年 7月4日(水曜日) 東京 コクヨホール 多目的ホール

2012年 7月6日(金曜日) 神戸 臨床研究情報センター (TRI) 内 2階研修室

主催 カルナバイオサイエンス株式会社



本社 (BMA 3F) ラボ (2, 3, 4F)



カルナバイオサイエンス株式会社

〒650-0047 神戸市中央区港島南町1-5-5 BMA3F
電話: 078-302-7091 (営業部直通) / FAX: 078-302-7086
E-mail: info@carnabio.com

www.carnabio.com



カルナバイオサイエンス株式会社 主催 技術セミナー

細胞内リン酸化シグナル研究の新展開

～セルベースで切り拓くキナーゼ阻害剤研究～

CONTENTS 目次

ご挨拶

1

プログラム

2

Cancer cell line panel for mechanism of action studies and testing of new combination therapies

Guido J.R. Zaman, Ph.D.

3-4

逆相タンパク質マイクロアレイを用いた がん個別化医療マーカー・標的分子の同定

本田 一文 先生／増田 万里 先生

5-6

Cell-based protein tyrosine kinase assays for high-throughput profiling of compound activities

David Schwarz, Ph.D.

7-8

Streamlining Drug Discovery with ClariCELL™ Kinase Cell-Based Assays

Deborah J. Moshinsky, Ph.D.

9-10

製品・サービスのご紹介

11



このたびは、弊社主催セミナーにご参加いただき、誠にありがとうございます。
2012年は第10期という弊社にとって大きな節目の年であり、その年にこのようなセミナーを開催することができましたのも、ひとえに皆様のご理解、ご支援の賜物であると感謝申し上げます。本セミナーでは、弊社のビジネスパートナーが一堂に会し、今後弊社創業支援事業の新しい柱に育てていきたいと進めておりますセルベースアッセイの最新情報をお伝えさせていただきます。

これまで弊社では、キナーゼ阻害薬研究のツールとして、キナーゼタンパク質やプロファイリングサービスなどを提供して参りましたが、このたび、新たに革新的なセルベースアッセイのサービスを提供させていただくことになりました。

キナーゼ阻害薬の創製研究では、まずin vitroの酵素学的アッセイで化合物をスクリーニングし(1次評価)、そこで活性のあった化合物を、細胞を用いた系(セルベースアッセイ)で2次評価することが一般的ですが、in vitroの効果とセルベースアッセイでの効果が必ずしも相関しないという現象がしばしば認められます。これには、例えば、化合物が細胞内に入らない、ターゲットの選択が正しくない、オフターゲットの阻害が絡んでいるなど様々な要因が考えられますが、その原因究明・解決のために研究進捗が遅延することもあります。また、更に、ミューテーションの入ったがん細胞では、ターゲットがそのがんの増殖に関与しているか、あるいは代替シグナル経路の有無などを良く理解して細胞を選ばないと、阻害薬を正しく選択できないことになります。弊社では、本セミナーで紹介する様々なツールを提供させていただくことで、このような2次評価における問題の解決への糸口になればと考えております。ACD社やCAI社が独自に開発した技術では、ターゲットとするチロシンキナーゼあるいは、セリン/スレオニンキナーゼを発現した細胞を用いることにより、化合物を細胞で直接スクリーニングできるだけでなく、キナーゼ選択性評価も細胞を用いて調べることができます。また、遺伝的バックグラウンドの明らかなNTRC社のがん細胞パネルを用いれば、どのようなタイプのがん細胞に化合物が効くのかを容易に調べることができ、治療ターゲットの選択などのヒントになります。さらに、国立がん研究センターで開発されたRPPAは、高感度かつハイスループットのウェスタンブロットングといえる技術で、細胞内のリン酸化タンパク質を網羅的に解析することを可能にします。この技術を用いれば、細胞内で逐次変化しているリン酸化シグナルを調べることができ、先行薬や対照薬との違いを検討することも可能です。他にも様々な応用が考えられますが、例えば、NTRC社のがん細胞パネルと組み合わせ、化合物が有効ながんと無効ながんのシグナルをRPPAで調べることにより、代替経路の有無やバイオマーカーなどに関する多くの情報が得られると考えられます。

本日紹介させていただくこれらの新たなサービスを多くの研究者の方々に利用いただき、皆様の今後の研究のスピードアップ、高度化に貢献することができればと願っております。

本日のご来場誠にありがとうございました。今後とも弊社をご愛顧賜りますようよろしくお願い申し上げます。

平成24年 7月
カルナバイオサイエンス株式会社
代表取締役社長 **吉野 公一郎**

	7月4日(水曜日) 【東京】コクヨホール	7月6日(金曜日) 【神戸】TRI研修室
12	12:30～13:00 受 付	
13	13:00～13:10 開会のご挨拶	
	13:10～13:50 セミナー 1 Cancer cell line panel for mechanism of action studies and testing of new combination therapies Guido J.R. Zaman, Ph.D.	
	13:50～14:00 質疑応答	
14	14:00～14:40 セミナー 2 逆相タンパク質マイクロアレイを用いた がん個別化医療マーカー・標的分子の同定 本田 一文 先生／増田 万里 先生	
	14:40～14:50 質疑応答	
	14:50～15:10 休 憩	
15	15:10～15:20 製品・サービスのご紹介	
	15:20～16:00 セミナー 3 Cell-based protein tyrosine kinase assays for high-throughput profiling of compound activities David Schwarz, Ph.D.	
	16:00～16:10 質疑応答	
16	16:10～16:50 セミナー 4 Streamlining Drug Discovery with ClariCELL™ Kinase Cell-Based Assays Deborah J. Moshinsky, Ph.D.	
	16:50～17:00 質疑応答	
17	17:00～17:10 閉会のご挨拶	

Cancer cell line panel for mechanism of action studies and testing of new combination therapies

Guido J.R. Zaman, Ph.D.

Founder and Head of Biology
at the Netherlands Translational Research Center



Abstract

Many anti-cancer drugs have been discovered by screening of natural products or synthetic compounds in cell-based cytotoxicity assays. Despite the chemical diversity of these agents, their mechanism of actions are limited. Most compounds act by damaging DNA directly or through inhibition of topoisomerase I/II or binding to tubulin. These classical anti-cancer agents do not directly target the molecular mechanism responsible for malignant transformation. Consequently, their therapeutic index is relatively low. In contrast, recently developed targeted therapies, such as kinase inhibitors, act by selective inhibition of the oncogenic drivers of certain types of cancer. For example, imatinib targets BCR-ABL in chronic myelogenous leukemia (CML); vemurafenib targets mutated B-RAF in melanoma.

However, the single target therapy approach also has limitations:

- (1) tumorigenesis requires mutations in multiple genes;
- (2) unlike the BCR-ABL fusion protein in CML and mutated B-RAF in melanoma, many mutations in cancer cells result in a loss or in an inactivation of a protein (for instance, p53 mutations) and are therefore pharmacologically difficult to target;
- (3) biochemical activity and selectivity data cannot fully predict the effect of a compound in a cell or in a whole organism.

Thus, there is general consensus that biochemical assay data need to be complemented with data from cell-based assays.

The Netherlands Translational Research Center (NTRC) has access to a large panel of human tumor cell lines. Many of the cell lines in this panel have been used for many years in drug discovery programs worldwide. However, recently, detailed information on the genetic status of these cells has opened up totally new research avenues. Due to the increase in genomic information as well as new data on the sensitivity of these cell lines to existing drugs, cell panels are becoming an increasingly powerful tool for drug discovery.

The NTRC panel comprises a limited set of cell lines chosen for their diversity in oncogenic drivers and tumor origins. The panel therefore offers rapid turnaround combined with some unique possibilities for drug discovery:

- (1) a quick test to confirm the mechanism of action of newly developed targeted therapies;
- (2) an opportunity to study new synergistic combinations of novel and existing therapeutics in well-characterized genetic backgrounds;

- (3) to define potential patient responder populations in the design of proof-of-concept human clinical trials.

The potential of this approach will be exemplified through several industry examples.

To illustrate the power of combining cellular profiling data with broad kinome profiling two very recent studies of kinase inhibitors active in the Wnt signaling pathway will be presented. The first study describes the identification of a cross-reactivity of a selective protein kinase C inhibitor with glycogen synthase kinase 3 in the beta-catenin pathway. The second study describes the identification of cross-reactivity of two inhibitors of p38 mitogen-activated protein kinase with casein kinase delta. The cross-reactivities identified by kinome profiling were confirmed in cell-based assays

References

1. Barretina et al. (2012) The CancerCell Line Encyclopedia enables predictive modelling of anticancer drug sensitivity. *Nature* 483, 603-607.
2. Garnett et al. (2012) Systematic identification of genomic markers of drug sensitivity in cancer cells. *Nature* 483, 570-577.
3. Uitdehaag JCM, Verkaar F, Alwan H, de Man J, Buijsman RC, and Zaman GJR (2012) A guide to picking the most selective kinase inhibitor tool compounds for pharmacological validation of drug targets. *British Journal of Pharmacology* 166, 858-876.
4. Verkaar F, Blankesteyn WM, Smits JFM, and Zaman GJR (2010) Beta-galactosidase enzyme fragment complementation for the measurement of Wnt/beta-catenin signaling. *FASEB Journal* 24, 1205-1217.
5. Verkaar F, van der Doelen AA, Smits JFM, Blankesteyn WM, and Zaman GJR (2011) Wnt/beta-catenin signaling is inhibited by p38 MAP kinase inhibitors through cross-reactivity with casein kinase Idelta/epsilon. *Chemistry & Biology* 18, 485-494.

Biography

Dr. Guido Zaman founded NTRC in June 2011. He worked for 15 years at Merck & Co. (Organon) in Oss the Netherlands, where he has managed various collaborations with biotech industries and service providers on assay development and lead optimization.

逆相タンパク質マイクロアレイを用いた がん個別化医療マーカー・標的分子の同定

Abstract

がん治療戦略の決定には様々な因子が利用されている。古くから形態学的な因子である病理組織学的分化度、腫瘍サイズ・深達度、リンパ節や他臓器への転移の有無などから患者を層別化し、治療の個別化が行われてきた。近年ではゲノム解析による疾患関連遺伝子の探索やトランスクリプトーム解析による遺伝子の発現解析が、がん研究に革命的な変化をもたらした。ゲノム、トランスクリプトーム解析から得られた知見が個別化医療選択のバイオマーカーとして利用されているが、必ずしもこれら知見だけでがんの個性すべてを層別化できるわけではない。なぜならば、「①遺伝子変異や増幅が、下流のシグナルに影響を与え、悪性化のドライバーとして機能しているかはゲノム情報だけでは判定できない。②トランスクリプトーム解析から得られたmRNAの発現と、タンパク質の発現は必ずしも一致しない。③タンパク質の機能にはリン酸化などの翻訳後修飾が関与するが、トランスクリプトーム解析からはタンパク質の翻訳後修飾を推定することはできない」からである。

がん治療の分野ではタンパク質に対する分子標的治療が注目を集めている。特にタンパク質リン酸化酵素（プロテインキナーゼ）が治療標的として選択されている。プロテインキナーゼの生物学的機能を詳細に理解するには、キナーゼ自身の自己リン酸化や基質のリン酸化状態をシグナル経路に従い明らかにするのが早道である。特にキナーゼの異常は下流のシグナル経路の異常として検出できるため、簡便かつ網羅的に多数の検体からタンパク質のリン酸化をプロファイルする検出系は分子標的の同定やコンパニオンバイオマーカーの開発にパワフルなツールになり得ると考えられる。信頼性の高いリン酸化タンパク質の定量法の一つとして、抗リン酸化特異抗体が従来から利用されてきた。最近ではタンパク質のリン酸化部位特異的抗体が多く樹立されており、これら抗体をライブラリー化してリン酸化をプロファイルすれば、シグナル経路の活性化を信頼度高くマッピングすることが可能になる。

国立がん研究センター研究所創薬臨床研究分野では、90種類以上のがん細胞株からリン酸化状態を保持したままタンパク質を抽出し、ガラス基板上にマイクロアレイする逆相タンパク質マイクロアレイ技術（reverse phase protein microarray: RPPA）を確立した。本RPPAを183種類のタンパク質部位特異的リン酸化抗体を含む抗体ライブラリーで蛍光免疫染色を行い、タンパク質リン酸化を定量的にプロファイル



本田 一文 先生
医学博士
国立がん研究センター研究所
創薬臨床研究分野 ユニット長



増田 万里 先生
医学博士
国立がん研究センター研究所
創薬臨床研究分野 特任研究員

した。本タンパク質リン酸化プロファイルと各種キナーゼ阻害薬とのIC50を比較することにより、シグナル経路特異的な薬剤耐性機構の解明や薬剤効果の予測マーカーの開発が期待される。

本セミナーでは、技術開発の経緯、応用法、今後の展望についてお話したいと考える。

本田 一文 先生

Biography

東京医科大学助手、国立がんセンター研究所病理部リサーチレジデント、東京医科大学霞ヶ浦病院部長代行を経て、厚生労働技官として2002年より国立がんセンター研究所に勤務。2010年より現職。がん診断・治療に特化した研究開発を目指して奮闘中。

増田 万里 先生

Biography

米メリーランド州フッド・カレッジにてバイオメディカル・サイエンス修士号を取得後、米国立癌研究所フレデリック（NCI-FCRDC）でリサーチアソシエイト。帰国後、東京大学大学院医学系研究科にて2000年に博士号を取得。2001年より国立がん研究センターにて、がん抑制遺伝子CADM1の基礎研究に7年間従事後、現職。創薬標的及びバイオマーカー（がん分子標的治療薬の標的分子、薬剤感受性マーカーなど）の網羅的探索に従事。

Awards

- 1998年 佐々記念賞
- 2005年 日本分子腫瘍マーカー研究会
学術奨励賞
- 2008年 田宮記念賞
- 2011年 第1回バイオビジネスアワードJAPAN
彩都賞

Cell-based protein tyrosine kinase assays for high-throughput profiling of compound activities

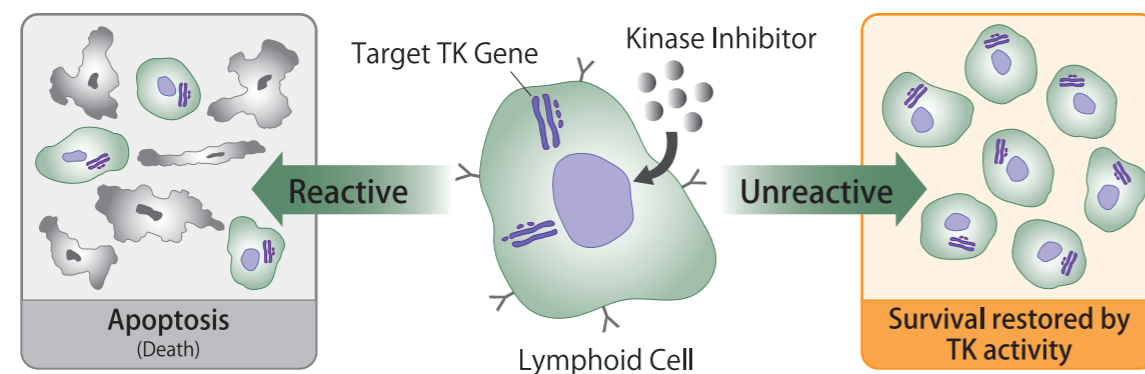
David Schwarz, Ph.D.

President & CSO, Advanced Cellular Dynamics, Inc.



Abstract

The protein tyrosine kinase family regulates numerous processes necessary for normal growth and maintenance of mammalian cells. Aberrant functions of these enzymes have been associated with a variety of human disorders including malignant transformation. The successful development of Imatinib (Glivec®) demonstrated that this family can be effectively and specifically targeted despite its common mechanistic action. Biochemical assays are very effective tools for the identification and optimization of candidate kinase inhibitors; however they lack the capacity to readily address the dynamic regulation of enzymatic function. This includes transitions between the active and inactive states and interactions with, and regulation by, other cellular proteins. To better examine these influences, we have developed a panel of live cell-based assays for the rapid, high-throughput evaluation of small chemical kinase inhibitors. Our panel leverages IL3-dependent Ba/F3 cells, which can be rendered cytokine-independent following the introduction of constitutively active kinases⁽¹⁾. The application of this technology is summarized in the figure below.



Our assays have been successfully applied across several kinase families by numerous customers, helping to better define compound activities^(2,3,4). Our internal application of this panel in the evaluation of experimental and clinically-validated inhibitors – on both native and mutant kinases - will be presented and discussed.

References

1. Daley, GQ. (1988). Transformation of an interleukin 3-dependent hematopoietic cell line by the chronic myelogenous leukemia-specific P210bcr/abl protein. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85: 9312-16.
2. Thress, K. et. al (2009). Identification and preclinical characterization of AZ-23, a novel, selective, and orally bioavailable inhibitor of the Trk kinase pathway. *Mol. Cancer Ther.* 8:1818-27.
3. Gozgit, JM. et. al (2012). Ponatinib (AP24534), a Multitargeted Pan-FGFR Inhibitor with Activity in Multiple FGFR-Amplified or Mutated Cancer Models. *Mol. Cancer Ther.* 11: 690-9.
4. Coffey, G. et. al (2012). Specific inhibition of spleen tyrosine kinase suppresses leukocyte immune function and inflammation in animal models of rheumatoid arthritis. *J. Pharmacol Exp. Ther.* 340: 350-9.

Biography

Dr. Schwarz received his Ph.D. from Dartmouth Medical School where he investigated retroviral immunity. His postdoctoral studies focused on thymocyte development, leading to discovery of the Schlafen family of growth regulatory genes. He joined Neurocrine Biosciences in 1998 and was responsible for developing secondary cell-based assays in support of internal exploratory and drug discovery projects. In 2007, he launched Advanced Cellular Dynamics and leads all aspects of new assay design, development and application.

Streamlining Drug Discovery with ClariCELL™ Kinase Cell-Based Assays

Deborah J. Moshinsky, Ph.D.
Founder and President, Cell Assay Innovations, LLC.



Abstract

Kinases are well-established targets for inhibition in Oncology and a number of other therapeutic areas. Traditionally, drug discovery projects have followed the paradigm of high-throughput screening (HTS) of small molecules against a purified enzyme, followed by testing in cell-based systems closer to human biology. This presentation will introduce ClariCELL™ kinase assays, which are utilized not only for hit follow-up testing, but also for cell-based HTS itself. The assays are designed and rigorously validated to be specific for a single kinase/substrate modification, yielding only hits that inhibit the specific phosphorylation event under study. Hence, the assays are also useful for mechanism-of-action studies, and to establish direct inhibition of a particular kinase in cells.

Key features of the ClariCELL kinase assay system include the following:

- Direct detection of substrate phosphorylation in human cells.
- Utility for mechanism of action studies, primary screening, lead optimization, selectivity, and safety studies.
- Analysis of tyrosine and serine/threonine kinases.
- Flexibility regarding cell line and substrate.
- Multiplexing capability, including drug-resistant mutant kinases.

A description of the ClariCELL kinase assay system will be given, along with ways in which it is utilized in the drug discovery process. Data with clinical kinase inhibitors and tool compounds against existing ClariCELL kinase assays will also be shared. Screening services are currently available for a number of assays, along with assay development services for customized assays.

References

1. Card, A., Caldwell, C., Min, H., Lokchander, B., Xi, H., Sciabola, S., Kamath, A., Clugston, S., Tschantz, W., Wang, L., and D. Moshinsky (2009). High-throughput biochemical kinase selectivity assays: panel development and screening applications. *J. Biomol. Screen.* 14(1):31-42.
2. Tecle H, Shao J, Li Y, Kothe M, Kazmirski S, Penzotti J, Ding YH, Ohren J, Moshinsky D, Coli R, Jhawar N, Bora E, Jacques-O'Hagan S, and J Wu (2009). Beyond the MEK-pocket: can current MEK kinase inhibitors be utilized to synthesize novel type III NCKIs? Does the MEK-pocket exist in kinases other than MEK? *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 19(1):226-9.
3. Caffrey DR, Lunney EA, and DJ Moshinsky (2008). Prediction of specificity-determining residues for small-molecule kinase inhibitors. *BMC Bioinformatics.* 9:491.
4. Sciabola, S., Stanton, R.V., Wittkopp, S., Wildman, S., Moshinsky, D., Potluri, S., and H. Xi (2008). Predicting kinase specificity profiles using Free-Wilson QSAR analysis. *J. Chem. Inf. Model.* 48(9):1851-67.
5. Changelian, P.S., Moshinsky, D., Kuhn, C.F., Flanagan, M.E., Munchhof, M.J., Harris, T.M., Doty, J.L., Sun, J., Kent, C.R., Magnuson, K.S., Perregaux, D.G., Sawyer, P.S., and E.M. Kudlacz (2008). The specificity of JAK3 kinase inhibitors. *Blood.* 111(4):2155-7.
6. Ismail, I.H., Martensson, S., Moshinsky, D., Rice, A., Tang, C., Howlett, A., McMahon, G., and O. Hammarsten (2004). SU11752 inhibits the DNA-dependent protein kinase and DNA double-strand break repair resulting in ionizing radiation sensitization. *Oncogene.* 23(4):873-82.
7. Moshinsky, D.J., Bellamacina, C.R., Boisvert, D.C., Huang, P., Hui, T., Jancarik, J., Kim, S.H., and A.G. Rice. (2003). SU9516: biochemical analysis of cdk inhibition and crystal structure in complex with cdk2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 310(3):1026-31.
8. Patel, N., Sun, L., Moshinsky, D., Chen, H., Leahy, K.M., Le, P., Moss, K.G., Wang, X., Rice, A., Tam, D., Laird, A.D., Yu, X., Zhang, Q., Tang, C., McMahon, G., and A. Howlett. (2003). A selective and oral small molecule inhibitor of vascular epithelial growth factor receptor (VEGFR)-2 and VEGFR-1 inhibits neovascularization and vascular permeability. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 306(3):838-45.
9. Moshinsky, D.J., Ruslim, L., Blake, R.A., and F. Tang. (2003). A widely applicable, high-throughput TR-FRET assay for the measurement of kinase autophosphorylation: VEGF receptor-2 as a prototype. *J. Biomol. Screen.* 8(4):447-52.

Biography

Deborah earned her PhD from MIT in 1998 and has since focused on assay development, small molecule screening, and drug discovery of tyrosine and serine/threonine kinase inhibitors in various industry positions. From 1998 to 2003 she was a scientist at SUGEN, Inc., a biotechnology company that developed Sutent®, a kinase inhibitor that is currently marketed for the treatment of multiple forms of cancer. In her most recent role at Pfizer, Inc., Deborah successfully developed a large panel of biochemical kinase assays (50), implemented a screening service for the research sites within the company, and coordinated outsourcing activities for biochemical profiling. She additionally possesses an established reputation in the kinase field, having a number of publications within drug discovery, panel assay development, and screening areas.



分子標的薬の開発・研究に必要な試薬・受託サービスを提供する
キナーゼのリーディングカンパニー

プロテインキナーゼ

Protein Kinases

- 自社で遺伝子取得から発現・精製まで一括管理
- 変異体を含む400種以上を5μg包装からバルクまで在庫・販売
- 各種キナーゼの変異体作製も可能

プロファイリング・スクリーニング受託

Profiling & Screening Services

- 系統樹を網羅した世界トップクラスのターゲット数(311種)
- 独自に開発したユニークな4種のセレクトパネル
- 信頼性の高い化合物の選択性情報をスピーディーに提供

アッセイキット

QSS Assist™ Assay Kits & Development

- 必要な試薬とプロトコルがセットになったReady-To-Runタイプ
- 当社受託サービスのノウハウを盛り込んだ信頼性の高い製品

結晶化サービス

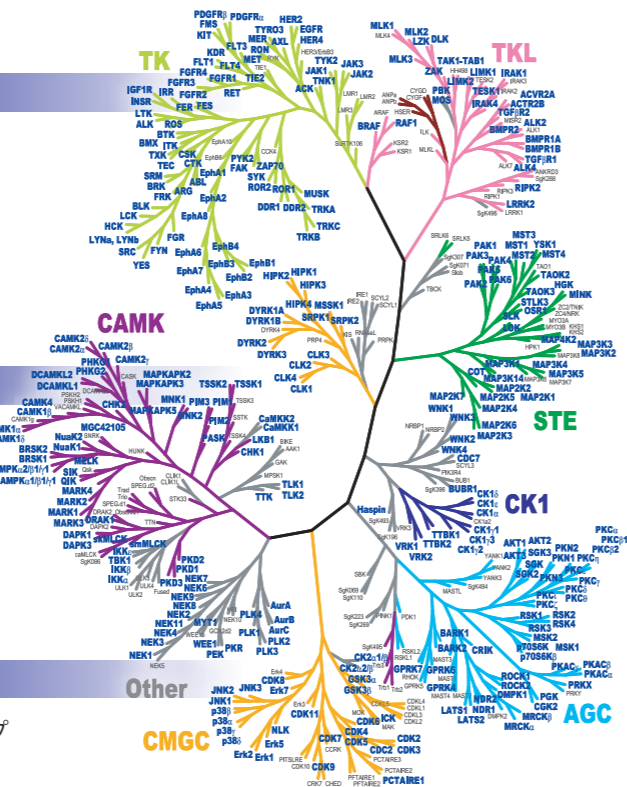
Crystallography Services

- ドイツCRELUX社との協業で共結晶構造解析を低コスト、スピーディーに提供
- 結晶化グレード蛋白質をリーズナブルな価格で提供

セルベースチロシンキナーゼアッセイ

Live-cell Kinase Assays

- 米国Advanced Cellular Dynamics社が開発したセルベースチロシンキナーゼパネル
- 市場最大・変異体を含む61種のチロシンキナーゼがアッセイ可能



カルナ<Carna>の由来

当社の社名である「カルナ(Carna)」はローマ神話の「人間の健康を守る女神」です。また、「身体の諸器官を働かせる女神」などとも言われています。当社は生命科学「バイオサイエンス(Bioscience)」を探究することで「人々の生命を守り、健康に貢献することを目指す」ことを基本理念としています。当社はまさに「カルナ(Carna)」でありたいと願っています。

