

処理ウシ胎児血清(DCCFBS)を市販の Hyclone 社製のものを使用していた。プロトコールでは、市販 DCC-FBS 自体の使用は、結果が品質保証クライテリアを満たせば使用してもよいことになっているが、不具合の原因のひとつとして、これが疑われたため、現地調査後、CERI 調製 DCC-FBS を韓国 NiFDS/FDA に送付し、これを用いたアッセイの確認を実施した。

2.5.4. 韓国 NiFDS/KFDA 担当者の来日による手技の再確認

CERI 調製 DCC-FBS を使用により、Task-3 で見直した基本クライテリアおよび RU486 はクリアし、ある程度改善することが確認されたが、OHT、TAM の IC 値は未達であったため、韓国 NiFDS/KFDA 担当者が来日し、手技の再確認を CERI にて実施した。

2.5.5. 細胞 lot.、血清 lot.及び使用 plate lot.等についての検討

OHT、TAM の IC 値がクリアしない問題について、考えられる原因(細胞 lot.、血清 lot.、使用 plate lot.等)について、CERI にてそれぞれの検討を実施した。

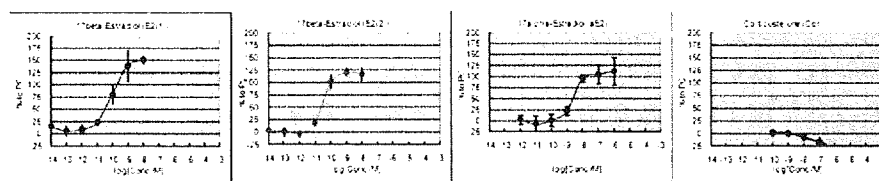
3. 結果及び考察

3.1. 韓国 NiFDS/KFDA 現地調査による技術、設備等の妥当性の確認

韓国 NiFDS/KFDA 担当者と CERI 担当者が同時実施したアッセイ結果を以下に示す。

NiFDS/KFDA

Fold Induction (FI)	2.3	FALSE	
1+2SD _{IC50, FI}	1.2	FALSE	
10%PC-FI	1.1	FALSE	
E2(1)	logPC10	-12.0	PASS
	logPC50	-10.5	PASS
E2(2)	logPC10	-11.4	PASS
	logPC50	-10.6	PASS
aE2	logPC10	-9.6	PASS
	logPC50	-8.6	PASS
Cor	logPC10	-	PASS
	logPC50	-	PASS



Japan (CERI)

Fold Induction (FI)	2.6	FALSE	
1+2SD _{IC50, FI}	1.2	PASS	
10%PC-FI	1.2	PASS	
E2(1)	logPC10	-11.9	PASS
	logPC50	-10.5	PASS
E2(2)	logPC10	-11.8	PASS
	logPC50	-10.6	PASS
aE2	logPC10	-9.7	PASS
	logPC50	-8.8	PASS
Cor	logPC10	-	PASS
	logPC50	-	PASS

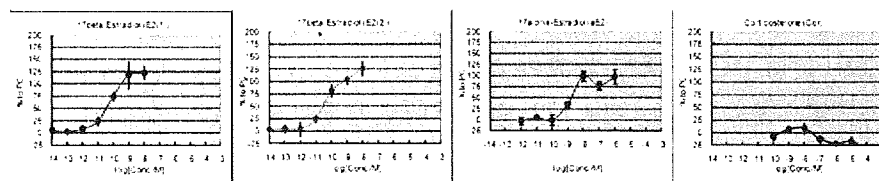
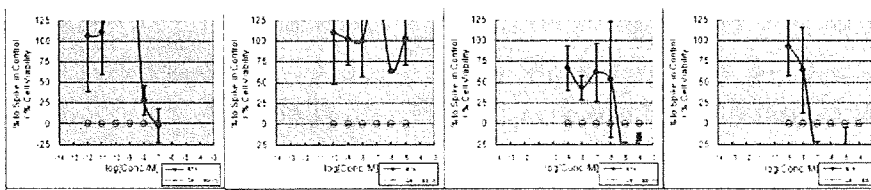


図3 韓国 NiFDS/KFDA と CERI 担当者が同時実施したアッセイ結果(アゴニスト系)

NiFDSKFDA

Fold Induction	1.4	FALSE
RTA of 1nM E2	249.16	Pass
RTA of 1µM OHT	2.28	Pass
RTA of 100 µM Dig.	-230.10	Pass
OHT		
log[lin.IC30]	-8.18	Fail
log[lin.IC50]	-8.09	Fail
TAM		
log[lin.IC30]	-6.05	Fail
log[lin.IC50]		Fail
RU486		
log[lin.IC30]		Fail
log[lin.IC50]	-8.28	Fail
Cor		
log[lin.IC30]	-8.19	Fail
log[lin.IC50]	-7.86	Fail



Japan (CERI)

Fold Induction	1.7	FALSE
RTA of 1nM E2	178.70	Pass
RTA of 1µM OHT	23.96	FALSE
RTA of 100 µM Dig.	-145.17	Pass
OHT		
log[lin.IC30]	-8.07	Fail
log[lin.IC50]	-7.60	Fail
TAM		
log[lin.IC30]		Fail
log[lin.IC50]		Fail
RU486		
log[lin.IC30]		Fail
log[lin.IC50]	-6.27	Fail
Cor		
log[lin.IC30]	-8.51	Fail
log[lin.IC50]	-7.96	Fail

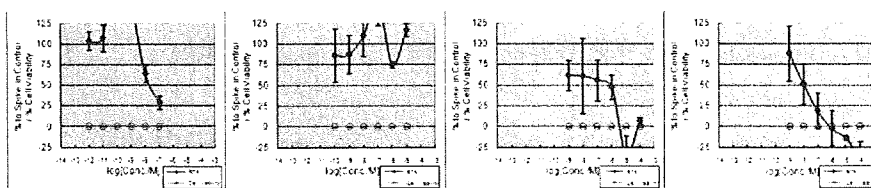


図4 韓国 NiFDS/KFDA と CERI 担当者で同時実施したアッセイ結果(アンタゴニスト系)

現地調査の結果、試薬類、プラスチック類及び設備には、バリデーションプロトコール推奨メーカー又は汎用されているメーカーのものが使用されており、問題はないと考えられた。

同時実施したアッセイについて、アゴニスト系では、Fold induction は低いですが PC10 及び PC50 値に関しては、いずれもクリアしており、反応カーブは、両者とも変わらずテクニカルな差は認められなかった。アンタゴニスト系では、Fold induction が低く、クライテリア値も、いずれもクリア出来ず、反応カーブは、いずれも大きく歪んでおり、問題が示唆された。同時実施したアッセイで双方の値に違いが認められなかったため、一方の操作手技自体に問題があるとは考えられなかった。

操作全体を通して、CERI と異なる点として、細胞培養培地に使用する dextran-coated-charcoal (DCC)処理ウシ胎児血清(DCCFBS)を市販の Hyclone 社製のものを使用している点があった。CERI では DCC 処理を施設内で実施している。各ラボにも当初 CERI より DCC-FBS を配布していたが、それを使い切ったため、市販品に切り替えているとのことであった。プロトコールでは、市販 DCC-FBS 自体の使用は、結果が品質保証クライテリアを満たせば使用してもよいことになっている。また、細胞ストックは、JCRB より購入し、2 継代目で凍結保存、今回それを解凍しトータルで 8 継代目の細胞を供していた。

以上のことを踏まえ、fold induction 低下の原因は、市販 DCC-FBS の使用、またはそれを用いて継代培養、ストックした細胞に問題がある可能性が疑われた。

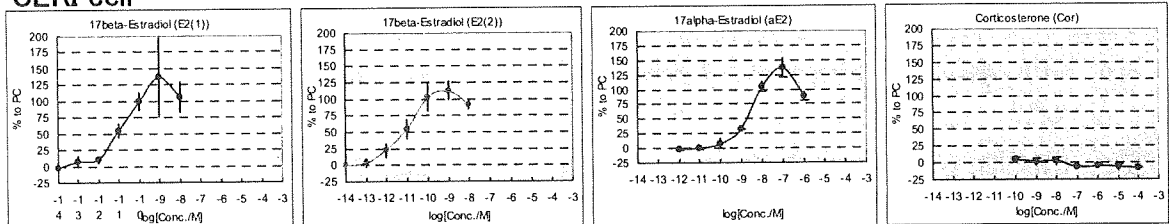
上記の想定した問題点を踏まえ、以下の 2 つを現地調査後、実施した。

- ①CERI 調製 DCC-FBS を韓国に送付し、それを用いてアッセイの確認を行う。
- ②CERI ストック細胞、韓国ストック細胞を送付、アッセイを行い、細胞の活性の確認を行う。

3.1.1. CERI ストック細胞及び韓国ストック細胞の細胞の活性の確認

不具合の原因のひとつとして、細胞自体の活性が疑われたため、現地調査後、CERI ストック細胞及び韓国ストック細胞の活性を CERI にて同時に測定し、比較を行った。その結果、両者の細胞ストック自体は問題ないことが確認された(図 5、表 5)。

CERI cell



NiFDS cell

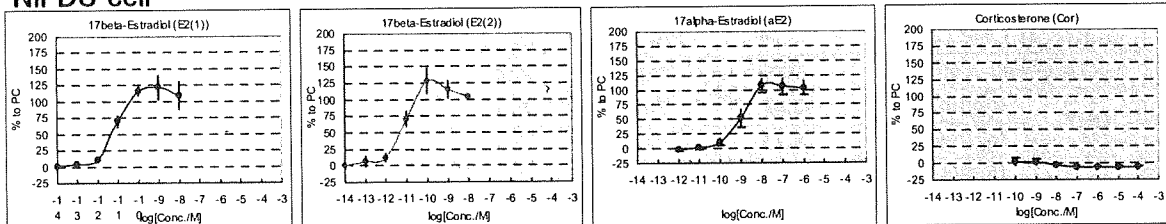


図 5 CERI ストック細胞及び韓国ストック細胞の細胞の活性の確認結果

表 5 CERI ストック細胞及び韓国ストック細胞の細胞の活性の確認結果

CERI cell				NiFDS cell			
Fold Induction (FI)		7.8	PASS	Fold Induction (FI)		8.4	PASS
1+2SD _{VC} FI		1.5	PASS	1+2SD _{VC} FI		1.5	PASS
10%PC-FI		1.7		10%PC-FI		1.7	
E2(1)	logPC10	-12.2	PASS	E2(1)	logPC10	-12.2	PASS
	logPC50	-11.1	PASS		logPC50	-11.3	PASS
E2(2)	logPC10	-12.7	PASS	E2(2)	logPC10	-12.4	PASS
	logPC50	-11.1	PASS		logPC50	-11.4	PASS
aE2	logPC10	-9.9	PASS	aE2	logPC10	-10.1	PASS
	logPC50	-8.8	PASS		logPC50	-9.0	PASS
Cor	logPC10	-	PASS	Cor	logPC10	-	PASS
	logPC50	-	PASS		logPC50	-	PASS

3.1.2. CERI 調製 DCC-FBS を用いた韓国でのアッセイの確認

現地調査後、CERI 調製 DCC-FBS を韓国 NiFDS/FDA に送付し、これを用いたアッセイの確認を実施した。その結果、CERI 調製 DCC-FBS を使用により、Task-3 で見直した基本クライテリアおよび RU486 はクリアし、ある程度改善することが確認されたが、OHT、TAM の IC 値は未達であった(図 6、表 6)。

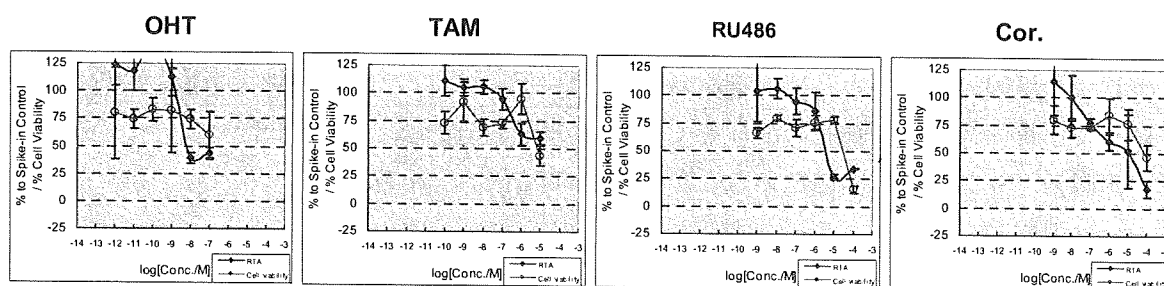


図 6 CERi 調製 DCC-FBS を用いた韓国でのアッセイの確認結果

表 6 CERi 調製 DCC-FBS を用いた韓国でのアッセイの確認結果

			Task-2	Task-3
Fold Induction		5.0	FALSE	>=4 Pass
RTA of 1nM E2		167.23	Pass	Pass
RTA of 1 μ M OHT		33.74	FALSE	Pass
RTA of 100 μ M Dig.		-22.32	Pass	Pass
OHT	log[lin.IC30]	-8.42	Fail	Fail
	log[lin.IC50]	-8.15	Fail	Fail
TAM	log[lin.IC30]	-6.22	Fail	Fail
	log[lin.IC50]	-	Fail	Fail
RU486	log[lin.IC30]	-5.73	in ±2SD	in ±2SD
	log[lin.IC50]	-5.39	in ±2SD	in ±2SD
Cor	log[lin.IC30]	-6.56	-	-
	log[lin.IC50]	-4.94	-	-

3.1.3. 韓国 NiFDS/KFDA 担当者の来日による手技の再確認

OHT、TAM の IC 値の未達の問題を解決するため、韓国 NiFDS/KFDA 担当者が来日し、手技の再確認を CERi にて実施した。その結果、両者とも基本クライテリアおよび RU486 はクリアしたが、NiFDS 担当者では TAM、CERi 担当者では OHT 及び TAM の IC 値はクリアしなかった。・同時実施したアッセイで双方の値に違いが認められなかったため、一方の操作手技自体に問題があるとは考えられなかった。CERi 担当者においても、OHT 及び TAM が基準を満たさないことから、考えられる原因を洗い出し、検討を実施することとした。

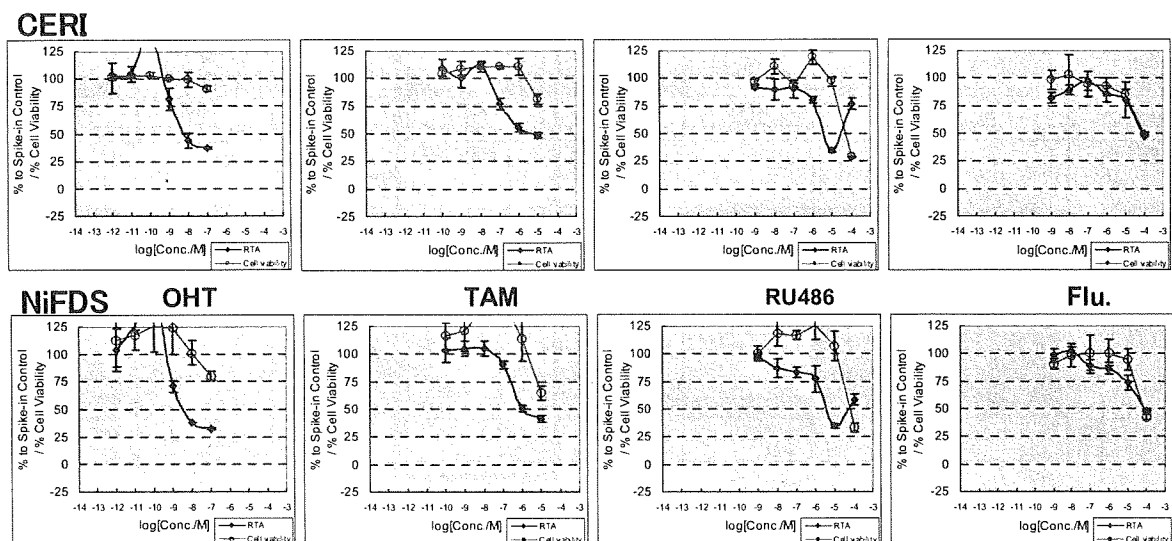


図7 韓国 NiFDS/KFDA 担当者の来日による手技の確認結果

表7 韓国 NiFDS/KFDA 担当者の来日による手技の確認結果

CER1				NiFDS			
Fold Induction		10.6	> 6 Pass	Fold Induction		9.4	> 6 Pass
RTA of 1nM E2		190.85	Pass	RTA of 1nM E2		187.89	Pass
RTA of 1 μ M OHT		33.35	Pass	RTA of 1 μ M OHT		34.18	Pass
RTA of 100 μ M Dig.		-9.19	Pass	RTA of 100 μ M Dig.		-10.73	Pass
OHT	log[lin.IC30]	-8.69	Fail	OHT	log[lin.IC30]	-8.96	in ±2SD
	log[lin.IC50]	-8.16	Fail		log[lin.IC50]	-8.36	in ±2SD
TAM	log[lin.IC30]	-6.67	Fail	TAM	log[lin.IC30]	-6.48	Fail
	log[lin.IC50]	-5.21	Fail		log[lin.IC50]	-5.90	Fail
RU486	log[lin.IC30]	-5.77	in ±2SD	RU486	log[lin.IC30]	-5.83	in ±2SD
	log[lin.IC50]	-5.33	in ±2SD		log[lin.IC50]	-5.35	in ±2SD
Flu.	log[lin.IC30]	-4.68	-	Flu.	log[lin.IC30]	-4.85	-
	log[lin.IC50]	-4.07	-		log[lin.IC50]	-4.07	-

3.1.4. 細胞 lot.、血清 lot.及び使用 plate lot.についての検討

CERI内でもOHT及びTAMのIC値がクリアしない問題について、考えられる原因(細胞 lot.、血清 lot.、使用 plate lot.)について、CERIにてそれぞれの検討を実施した。その結果、血清の lot. 及び血清と細胞相性の問題であることが判明した(表8)。これを踏まえ、適合する血清 lot.を確保し、CERIにてDCC処理後、韓国に再送付を行った。現在、韓国 NiFDS/KFDAにて本血清を用いた培養を開始している。

表 8 細胞 lot.、血清 lot.及び使用 plate lot.についての検討結果

条件	①		②		③		④		⑤		⑥		⑦		⑧		⑨		
血清Lot.	DCC-FBS① Lot.456025								DCC-FBS② Lot.672248		DCC-FBS③ Lot.454099		DCC-FBS④ Lot.398742						
細胞Lot.	細胞① Lot.080822(+5+2)				細胞② Lot.080820(+4)				細胞① Lot.080822(+5+2)		細胞② Lot.080820(+4)		細胞① Lot.080822(+5+2)		細胞② Lot.080820(+4)				
継代									+2時に播種										
Plate Lot.	Plate①#136101 Lot.099953				Plate②#136102 Lot.102598						Plate①#136101 Lot.099953								
Fold Induction	3.2	Fail	2.3	Fail	3.0	Fail	5.0	>=4 Pass	6.3	> 6 Pass	6.2	> 6 Pas	6.1	> 6 Pass	5.7	Fail	3.7	Fail	
RTA of 1nM E2	159.76	Pass	141.04	Pass	187.12	Pass	152.77	Pass	155.88	Pass	51.63	Pass	150.97	Pass	52.10	Pass	161.00	Pass	
RTA of 1µM OHT	-22.50	Pass	-29.03	Pass	-15.42	Pass	-2.20	Pass	9.66	Pass	0.21	Pass	7.81	Pass	10.61	Pass	-0.20	Pass	
RTA of 100 µM Dlg.	-43.75	Pass	-51.90	Pass	-49.09	Pass	-23.92	Pass	-17.76	Pass	17.81	Pass	-18.75	Pass	15.79	Pass	-35.01	Pass	
OHT	log(IIn.IC30)	-9.62	in ±2SD	-9.50	in ±2SD	-9.34	in ±2SD	-9.59	in ±2SD	-9.26	in ±2SD	-9.47	in ±2SD	-9.33	in ±2SD	9.54	in ±2SD	-9.28	in ±2SD
	log(IIn.IC50)	-9.34	in ±2SD	-9.27	in ±2SD	-9.12	in ±2SD	-9.27	in ±2SD	-8.95	in ±2SD	-9.19	in ±2SD	-8.99	in ±2SD	9.28	in ±2SD	-9.03	in ±2SD
TAM	log(IIn.IC30)	-7.57	Fail	-7.57	Fail	-7.29	in ±2SD	-7.46	in ±2SD	-6.96	in ±2SD	-7.52	in ±2SD	-7.26	in ±2SD	7.53	in ±2SD	-7.02	in ±2SD
	log(IIn.IC50)	-7.22	Fail	-7.20	Fail	-6.83	in ±2SD	-6.93	in ±2SD	-6.51	in ±2SD	-7.14	Fail	-6.70	in ±2SD	7.12	Fail	-6.60	in ±2SD
RU486	log(IIn.IC30)	-6.38	Fail	-7.29	Fail	-6.18	in ±2SD	-3.21	Fail	-6.10	in ±2SD	6.00	in ±2SD	-5.88	in ±2SD	6.45	Fail	-6.11	in ±2SD
	log(IIn.IC50)	-5.33	Fail	-5.95	Fail	-5.75	Fail	-5.70	Fail	-5.58	in ±2SD	5.60	in ±2SD	-5.49	in ±2SD	5.76	Fail	-5.62	Fail
Flu.	log(IIn.IC30)	-5.25	-	-	-	-4.94	-	-4.99	-	-4.77	-	-4.55	-	-4.52	-	4.94	-	-4.80	-
	log(IIn.IC50)	-4.72	-	-	-	-4.61	-	-4.45	-	-4.22	-	-	-	-	-	4.47	-	-4.33	-

4. 結論

日本で開発された HeLa-9903 細胞を用いたレポーター遺伝子アッセイ(エストロゲンアンタゴニスト検出法)の OECD テストガイドライン化に向けた国際バリデーション研究が実施されており、最終段階となっている。これまでの研究の結果から韓国 NiFDS/KFDA の実験施設の技術的課題が浮上した。開発ラボ(リードラボ)の立場から韓国 NiFDS/KFDA の現地調査を行い技術、設備等の妥当性を確認することにより課題の解決を図るとともに、バリデーション試験において示された問題の原因解明と対応の検討を実施した。

その結果、不具合の原因として、使用する血清の lot.及び血清と細胞相性の問題であることが判明した。これを踏まえ、適合する血清 lot.を確保し、CERI にて DCC 処理後、韓国に再送付を行い、現在、韓国 NiFDS/KFDA にて本血清を用いた培養を開始している。

血清の lot.及び血清と細胞相性の問題については、バリデーションレポート作成の際に記載すると共に、OECD テストガイドライン案作成の際にも 1 項目として、本アッセイを実施する場合の注意事項として盛り込む必要があると考えられた。

DRAFT REPORT :

LUMI-CELL ER VALIDATION STUDY – PHASE II b VER.2

Author:Masafumi Nakamura

Testing Facility: Hiyoshi Corporation / 908 Kitanoshocho Omihachiman Shiga,Japan

Experimental Start Date : 18-Sep-08

Experimental End Date : 05-May-09

Archive Location: Hiyoshi Corporation / 908, Kitanoshocho Omihachiman, Shiga, Japan

Study Director: Masafumi Nakamura, Hiyoshi Corporation

Key Personnel:

International Study Management Team

NICEATM

- Dr. William Stokes (NICEATM/NIEHS) – Co-Chair/Project Officer
- Dr. Raymond Tice (NICEATM/NIEHS) – Co-Chair
- Dr. David Allen (NICEATM/ILS) – NICEATM Principal Investigator
- Mr. Frank Deal (NICEATM/ILS) – Project Coordinator
- Ms. Patricia Ceger (NICEATM/ILS) – Assistant Project Coordinator

ECVAM

- Dr. Susanne Bremer

JaCVAM

- Dr. Hajime Kojima
- Dr. Atsushi Ono

Laboratory Personnel

- Mr. Hiroshi Murata – Facility Management
- Mr. Masafumi Nakamura – Study Director/Safety Officer
- Dr. Hajime Kojima – Director of Quality Assurance
- Mr. Tsukasa Yamamoto – Consultant
- Mr. Hiroshi Handa – Laboratory Technician

TABLE OF CONTENTS

QUALITY ASSURANCE STATEMENT ii

EXECUTIVE SUMMARY iii

1.0 Methods1

 1.1 Agonist Materials..... 1

 1.2 Antagonist Materials.....2

2.0 Results3

 2.1 Range Finding.....3

 2.2 Comprehensive Testing11

 2.3 Retest(Comprehensive Testing).....30

3.0 Problems Encountered32

4.0 Materials and Equipment Used33

5.0 Deviations From Protocol34

6.0 References.....34

PHASE II b REPORT APPROVAL.....35

QUALITY ASSURANCE STATEMENT

DRAFT REPORT 1: LUMI-CELL ER VALIDATION STUDY – PHASE II b

Listed below are the Phase IIb procedures performed by Hiyoshi Corporation that were inspected and audited by the Quality Assurance Unit during the study described in the report. Findings were reported to the study director and management periodically.

Procedures	Inspection/ Audit Date	Date Study Director Notified
Agonist testing for Phase IIb	18, 9, 2009	8, 12, 2009
Antagonist testing for Phase IIb	18, 9, 2009	8, 12, 2009

The results presented in this audited final report accurately reflect the raw data.

小島 肇
Hajime Kojima,
Quality Assurance Officer

23, 2, 2010
Date

EXECUTIVE SUMMARY

Hiyoshi has completed Phase IIb of international validation study of an estrogen receptor (ER) transcriptional activation (TA) assay (LUMI-CELL® ER assay) for the detection of ER agonists and antagonists designed by NICEATM, ECVAM and JaCVAM. In the Phase IIb, various independent tests were done for reference standards, controls, and test substances (8 Agonist test substances and 8 Antagonist test substances) using common protocol to evaluate ability of LUMI-CELL® ER. The result of reference standards, controls, and test substances tests will be used for establishing Phase IIb protocol and the historical database. The test result will be sent to Validation Study Project Coordinator and intralaboratory repeatability and intra- and inter-laboratory reproducibility will be evaluated.

25 Jan 2009

1.0 METHODS

The sponsor provided the BG1Luc4E2 (BG-1) cells for cell viability, agonist, and antagonist testing.

1.1 Agonist Materials

The sponsor provided the following test materials:

- H0009, H0010
- H0011, H0012
- H0013, H0014
- H0015, H0016

Two substances of the above-mentioned test materials were exposed in one plate.

Table 1 Materials Received for Agonist Testing

Sponsor Identification Number	Physical Description	Storage Conditions	Receipt Date	Received By	Comments
H0009	Solid	Room Temp	04-Dec-08	Masafumi Nakamura	
H0010	Solid	Room Temp	04-Dec-08	Masafumi Nakamura	
H0011	Solid	Room Temp	04-Dec-08	Masafumi Nakamura	
H0012	Solid	Room Temp	04-Dec-08	Masafumi Nakamura	
H0013	Solid	Room Temp	04-Dec-08	Masafumi Nakamura	
H0014	Solid	-4°C	04-Dec-08	Masafumi Nakamura	
H0015	Solid	Room Temp	04-Dec-08	Masafumi Nakamura	
H0016	Solid	Room Temp	04-Dec-08	Masafumi Nakamura	

25 Jan 2009

1.2 Antagonist Materials

- H0017, H0018
- H0019, H0020
- H0021, H0022
- H0023, H0024

Two substances of the above-mentioned test materials were exposed in one plate.

Table 2 Materials Received for Antagonist Testing

Sponsor Identification Number	Physical Description	Storage Conditions	Receipt Date	Received By	Comments
H00017	Liquid	Room Temp	04-Dec-08	Masafumi Nakamura	
H00018	Solid	Room Temp	04-Dec-08	Masafumi Nakamura	
H00019	Solid	Room Temp	04-Dec-08	Masafumi Nakamura	
H00020	Solid	-4°C	04-Dec-08	Masafumi Nakamura	
H00021	Solid	Room Temp	04-Dec-08	Masafumi Nakamura	
H00022	Solid	-4°C	04-Dec-08	Masafumi Nakamura	
H00023	Solid	-4°C	04-Dec-08	Masafumi Nakamura	
H00024	Solid	Room Temp	04-Dec-08	Masafumi Nakamura	

The laboratory purchased all other materials specified in the agonist and antagonist protocols and quality tested as specified in the protocols.

25 Jan 2009

2.0 RESULTS

2.1 Range Finding:

- The result of the Substance solubility was as follows;

Agonist

- H0009 1mg/ml in DMSO, 0.01mg/ml in DMSO/aqueous cell culture media
- H0010 1mg/ml in DMSO, 0.01mg/ml in DMSO/aqueous cell culture media
- H0011 1mg/ml in DMSO, 0.01mg/ml in DMSO/aqueous cell culture media
- H0012 10mg/ml in DMSO, 0.1mg/ml in DMSO/aqueous cell culture media
- H0013 10mg/ml in DMSO, 0.1mg/ml in DMSO/aqueous cell culture media
- H0014 10mg/ml in DMSO, 0.1mg/ml in DMSO/aqueous cell culture media
- H0015 10mg/ml in DMSO, 0.1mg/ml in DMSO/aqueous cell culture media
- H0016 10mg/ml in DMSO, 0.1mg/ml in DMSO/aqueous cell culture media

Antagonist

- H0017 2mg/ml in DMSO, 0.02mg/ml in DMSO/aqueous cell culture media
- H0018 2mg/ml in DMSO, 0.02mg/ml in DMSO/aqueous cell culture media
- H0019 2mg/ml in DMSO, 0.02mg/ml in DMSO/aqueous cell culture media
- H0020 2mg/ml in DMSO, 0.02mg/ml in DMSO/aqueous cell culture media
- H0021 20mg/ml in DMSO, 0.2mg/ml in DMSO/aqueous cell culture media
- H0022 20mg/ml in DMSO, 0.2mg/ml in DMSO/aqueous cell culture media
- H0023 2mg/ml in DMSO, 0.02mg/ml in DMSO/aqueous cell culture media
- H0024 20mg/ml in DMSO, 0.2mg/ml in DMSO/aqueous cell culture media

Table 3 Table for Range Finding Concentrations Tested and Cell Viability

Agonist

Substance Code	Concentrations Tested (final) ($\mu\text{g/mL}$)	Cell Viability Results
H0009	$1.00 \times 10^{+1}$	1
	1.00×10^0	1
	1.00×10^{-1}	1
	1.00×10^{-2}	1
	1.00×10^{-3}	1

25 Jan 2009

Substance Code	Concentrations Tested (final) ($\mu\text{g/mL}$)	Cell Viability Results
	1.00×10^{-4}	1
H0010	$1.00 \times 10^{+1}$	1
	1.00×10^0	1
	1.00×10^{-1}	1
	1.00×10^{-2}	1
	1.00×10^{-3}	1
	1.00×10^{-4}	1
H0011	$1.00 \times 10^{+1}$	1
	1.00×10^0	1
	1.00×10^{-1}	1
	1.00×10^{-2}	1
	1.00×10^{-3}	1
	1.00×10^{-4}	1
H0012	$1.00 \times 10^{+2}$	4
	$1.00 \times 10^{+1}$	1
	1.00×10^0	1
	1.00×10^{-1}	1
	1.00×10^{-2}	1
	1.00×10^{-3}	1
H0013	$1.00 \times 10^{+2}$	1
	$1.00 \times 10^{+1}$	1
	1.00×10^0	1
	1.00×10^{-1}	1
	1.00×10^{-2}	1
	1.00×10^{-3}	1
H0014	$1.00 \times 10^{+2}$	1
	$1.00 \times 10^{+1}$	1
	1.00×10^0	1

25 Jan 2009

Substance Code	Concentrations Tested (final) ($\mu\text{g/mL}$)	Cell Viability Results
	1.00×10^{-1}	1
	1.00×10^{-2}	1
	1.00×10^{-3}	1
H0015	$1.00 \times 10^{+2}$	1
	$1.00 \times 10^{+1}$	1
	1.00×10^0	1
	1.00×10^{-1}	1
	1.00×10^{-2}	1
	1.00×10^{-3}	1
H0016	$1.00 \times 10^{+2}$	4
	$1.00 \times 10^{+1}$	1
	1.00×10^0	1
	1.00×10^{-1}	1
	1.00×10^{-2}	1
	1.00×10^{-3}	1

Antagonist

Substance Code	Concentrations Tested (final) ($\mu\text{g/mL}$)	Cell Viability Results
H0017	$2.00 \times 10^{+1}$	1
	2.00×10^0	1
	2.00×10^{-1}	1
	2.00×10^{-2}	1
	2.00×10^{-3}	1
	2.00×10^{-4}	1
H0018	$2.00 \times 10^{+1}$	1
	2.00×10^0	1
	2.00×10^{-1}	1

25 Jan 2009

Substance Code	Concentrations Tested(final) ($\mu\text{g/mL}$)	Cell Viability Results
	2.00×10^{-2}	1
	2.00×10^{-3}	1
	2.00×10^{-4}	1
H0019	$2.00 \times 10^{+1}$	4
	2.00×10^0	1
	2.00×10^{-1}	1
	2.00×10^{-2}	1
	2.00×10^{-3}	1
	2.00×10^{-4}	1
H0020	$2.00 \times 10^{+1}$	1
	2.00×10^0	1
	2.00×10^{-1}	1
	2.00×10^{-2}	1
	2.00×10^{-3}	1
	2.00×10^{-4}	1
H0021	$2.00 \times 10^{+2}$	4
	$2.00 \times 10^{+1}$	1
	2.00×10^0	1
	2.00×10^{-1}	1
	2.00×10^{-2}	1
	2.00×10^{-3}	1
H0022	$2.00 \times 10^{+2}$	4
	$2.00 \times 10^{+1}$	1
	2.00×10^0	1
	2.00×10^{-1}	1
	2.00×10^{-2}	1
	2.00×10^{-3}	1
H0023	$2.00 \times 10^{+1}$	4

25 Jan 2009

Substance Code	Concentrations Tested(final) (µg/mL)	Cell Viability Results
	2.00 x 10 ⁰	1
	2.00 x 10 ⁻¹	1
	2.00 x 10 ⁻²	1
	2.00 x 10 ⁻³	1
	2.00 x 10 ⁻⁴	1
H0024	2.00 x 10 ⁺²	1
	2.00 x 10 ⁺¹	1
	2.00 x 10 ⁰	1
	2.00 x 10 ⁻¹	1
	2.00 x 10 ⁻²	1
	2.00 x 10 ⁻³	1

**Table 4 Summary of Experiments Template: Range Finder Testing
Agonist**

Experiments: Phase IIb Range Finder Testing					
Experiment I.D.	Substance Code	Date	Plate Induction	Experiment Used for Data Analysis or Repeated?	Rationale for Unacceptability
AgRF 1	H0009	23 Sep. 08	8.3	Used	Acceptable
	H0010	23 Sep. 08		Used	Acceptable
	H0011	23 Sep. 08		Used	Acceptable
	H0012	23 Sep. 08		Used	Acceptable
AgRF 2	H0013	23 Sep. 08	5.9	Used	Acceptable
	H0014	23 Sep. 08		Used	Acceptable
	H0015	23 Sep. 08		Used	Acceptable
	H0016	23 Sep. 08		Used	Acceptable

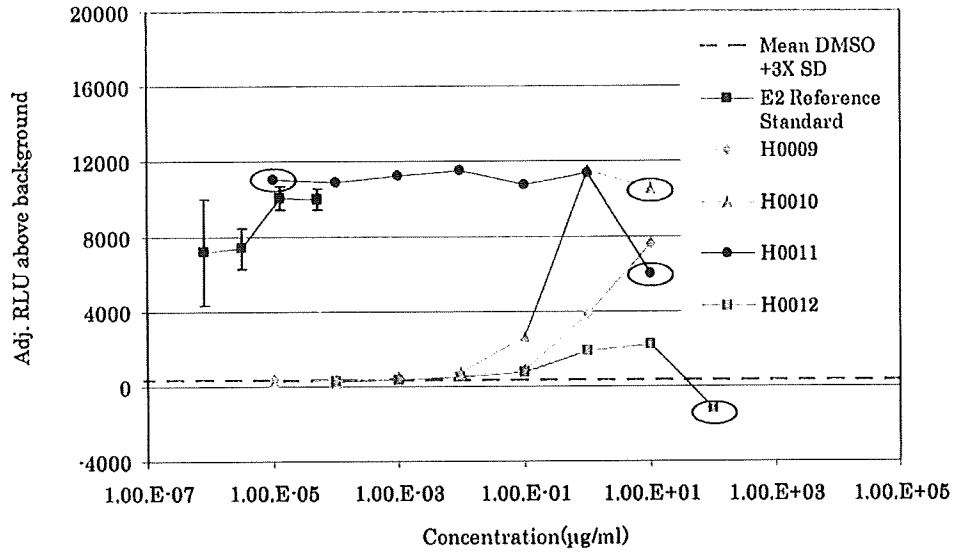
25 Jan 2009

Antagonist

Experiments: Phase IIb Range Finder Testing					
Experiment I.D.	Substance Code	Date	Plate Reduction	Experiment Used for Data Analysis or Repeated?	Rationale for Unacceptability
AntRF 1	H0017	23 Sep. 08	8.7	Used	Acceptable
	H0018	23 Sep. 08		Used	Acceptable
	H0019	23 Sep. 08		Used	Acceptable
	H0020	23 Sep. 08		Used	Acceptable
AntRF 2	H0021	23 Sep. 08	8.4	Used	Acceptable
	H0022	23 Sep. 08		Used	Acceptable
	H0023	23 Sep. 08		Used	Acceptable
	H0024	23 Sep. 08		Used	Acceptable

25 Jan 2009

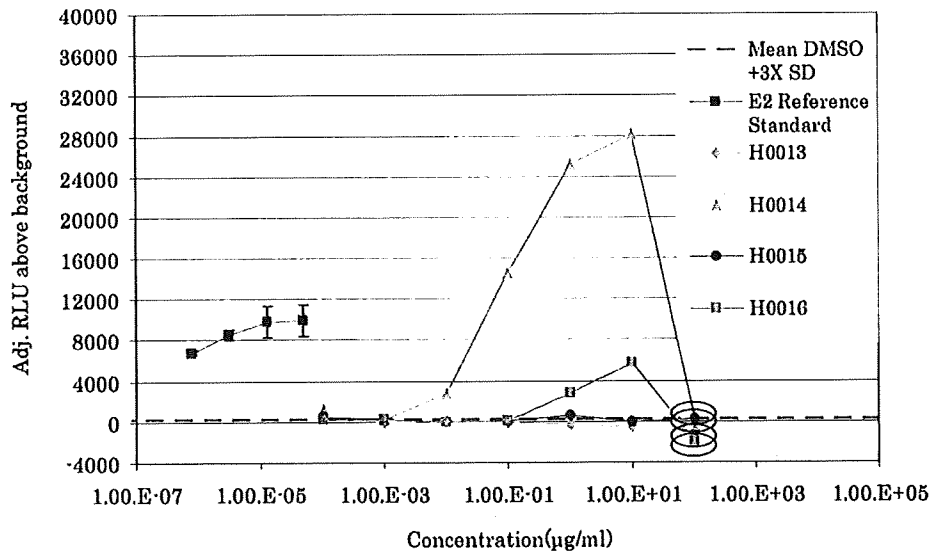
Figure 1.1 Agonist Range Finder Results Graph 1



○ ; Starting Concentration used for Comprehensive Testing

H0009, H0010, H0011, H0012 is Half-Log Serial Dilution

Figure 1.2 Agonist Range Finder Results Graph 2



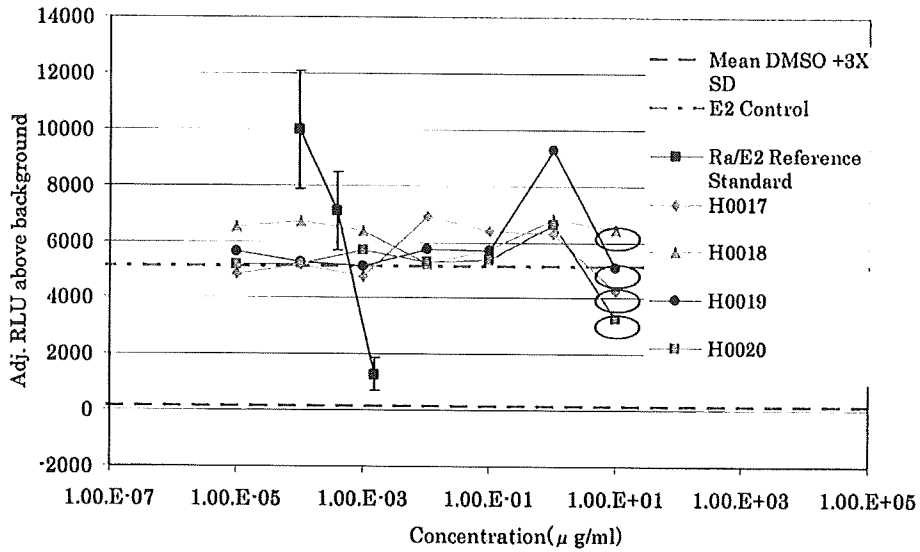
○ ; Starting Concentration used for Comprehensive Testing

H0013, H0015, H0016 is Double Serial Dilution

H0014 is Half-Log Serial Dilution

25 Jan 2009

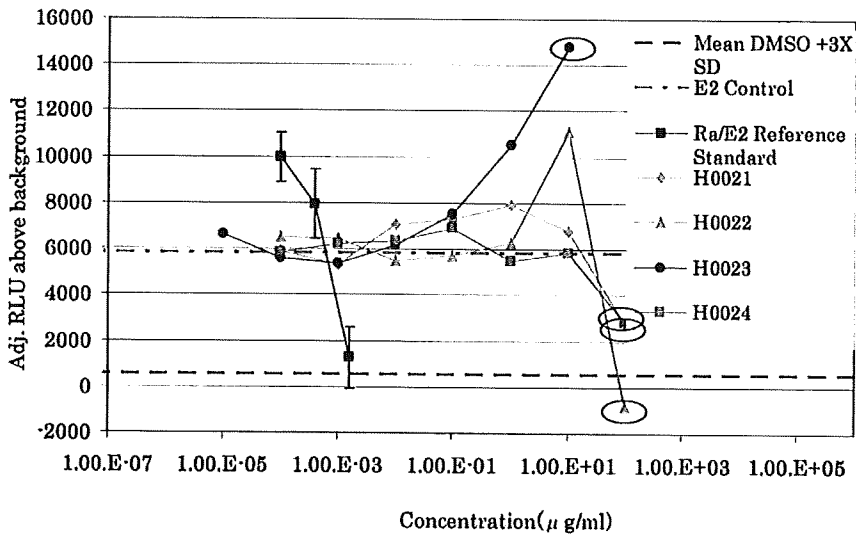
Figure 2.1 Agonist Range Finder Results Graph 1



○ ; Starting Concentration used for Comprehensive Testing

H0017~H0020 is Double Serial Dilution

Figure 2.2 Antagonist Range Finder Results Graph 2



○ ; Starting Concentration used for Comprehensive Testing

H0021~H0024 is Double Serial Dilution