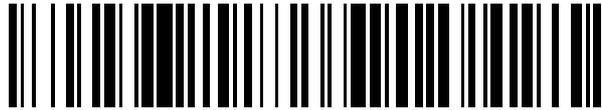


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 435 401**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68**

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.05.2005 E 05744681 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.10.2013 EP 1747287**

54 Título: **Ensayos genotóxicos**

30 Prioridad:

**20.05.2004 GB 0411198**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**19.12.2013**

73 Titular/es:

**GENTRONIX LIMITED (100.0%)  
CTF Building 46 Grafton Street  
Manchester M13 9NT , GB**

72 Inventor/es:

**HASTWELL, PAUL y  
WALMSLEY, RICHARD**

74 Agente/Representante:

**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

**ES 2 435 401 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

## Ensayos genotóxicos

5 La presente invención se refiere a métodos para detectar agentes que provocan o potencian el daño de ADN, y a moléculas y líneas celulares transfectadas que puedan emplearse en dichos métodos. En particular, la invención se refiere a biosensores para detectar daño de ADN en cultivos celulares humanos.

10 El daño de ADN se induce por una diversidad de agentes tales como luz ultravioleta, rayos X, radicales libres, agentes metilantes y otros compuestos mutagénicos. El daño de ADN también puede causarse indirectamente por agentes que afecten a enzimas y proteínas que interaccionen con ADN (incluyendo polimerasas y topoisomerasas) o por promutágenos (agentes que pueden metabolizarse para hacerse mutagénicos). Cualquiera de estos agentes puede provocar daño al ADN que comprende el código genético de un organismo y provocar mutaciones en los genes. En animales, dichas mutaciones pueden conducir a carcinogénesis o pueden dañar los gametos para dar lugar a defectos congénitos en la descendencia. Dichos agentes perjudiciales para el ADN pueden llamarse colectivamente genotoxinas.

20 Estos agentes perjudiciales para el ADN pueden modificar químicamente los nucleótidos que componen el ADN y también pueden romper los enlaces fosfodiéster que unen los nucleótidos o alterar la asociación entre bases (T-A o C-G). Para contrarrestar el efecto de estos agentes perjudiciales para el ADN las células han desarrollado varios mecanismos. Por ejemplo, la respuesta SOS en *E. coli* es una respuesta celular bien caracterizada inducida por daño de ADN en la que se expresa una serie de proteínas, incluyendo enzimas de reparación de ADN, que reparan el ADN dañado. En mamíferos, los mecanismos de reparación de escisión de nucleótidos y reparación de escisión de bases desempeñan un papel prominente en la reparación del daño de ADN, y son el mecanismo principal para la retirada de aductos de ADN voluminosos y bases modificadas.

30 Hay numerosas circunstancias en las que es importante identificar qué agentes pueden provocar o potenciar el daño de ADN. Es particularmente importante detectar agentes que provoquen daño de ADN cuando se evalúe si es seguro exponer a una persona a estos agentes. Por ejemplo, puede usarse un método para detectar estos agentes como un ensayo de genotoxicidad para explorar compuestos que son medicamentos candidatos, aditivos alimentarios o cosméticos para evaluar si o el compuesto de interés induce o no daño de ADN. Como alternativa, pueden usarse métodos de detección de agentes perjudiciales para el ADN para supervisar con respecto a contaminación de suministros de agua con contaminantes que contengan compuestos mutagénicos.

35 Se conocen diversos métodos, tales como el ensayo de Ames, el ensayo de micronúcleo *in vitro* y el ensayo de linfoma de ratón (MLA), para determinar la toxicidad de un agente, pero son insatisfactorios por varias razones. Por ejemplo la incubación de muestras puede tardar muchas semanas, cuando es con frecuencia deseable obtener datos genotóxicos en un periodo de tiempo más corto. Además, muchos métodos conocidos para detectar daño de ADN (incluyendo el ensayo de Ames y métodos relacionados) ensayan daños de ADN duraderos, como un criterio de valoración, bien en forma de ADN reparado de forma errónea (mutaciones y recombinaciones) o daño no reparado en forma de ADN fragmentado. Sin embargo, la mayor parte del daño de ADN se repara antes de que pueda medirse dicho criterio de valoración y el daño de ADN duradero solo se produce si las condiciones son tan graves que los mecanismos de reparación se han saturado.

45 Se desvela un ensayo genotóxico mejorado en el documento WO 98/44149, que se refiere a moléculas de ADN recombinantes que comprenden un elemento regulador de *Saccharomyces cerevisiae* que activa la expresión génica en respuesta a daño de ADN unido operativamente a una secuencia de ADN que codifica una proteína indicadora emisora de luz, tal como Proteína Verde Fluorescente (GFP). Dichas moléculas de ADN pueden usarse para transformar una célula de levadura para su uso en un ensayo genotóxico para detectar la presencia de un agente que provoque o potencie el daño de ADN. Las células pueden someterse a un agente y la expresión de la proteína indicadora emisora de luz (GFP) de la célula indica que el agente provoca daño de ADN. Los ensayos genotóxicos descritos en el documento WO 98/44149 detectan la inducción de actividad de reparación que puede evitar que se alcance un criterio de valoración. El método descrito en el documento WO 98/44149 puede por lo tanto usarse para detectar la presencia de agentes perjudiciales para el ADN.

55 El documento US 6.344.324 desvela una molécula de ADN recombinante que comprende el elemento regulador de la región promotora cadena arriba *GADD153* de hámster que activa la expresión génica en respuesta a una amplia serie de condiciones de tensión celular, ligada a una secuencia de ADN que codifica GFP. Este sistema indicador se lleva a cabo en una línea celular de carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello humana. Sin embargo, son problemas asociados con este sistema indicador que requiere al menos un periodo de tratamiento de cuatro días a concentraciones de agente de ensayo que dan como resultado menos del 10 % de supervivencia celular, seguido de análisis de fluorescencia por citometría de flujo. Además, la relevancia biológica de cualquier inducción génica cuando se ensaya con agentes a este nivel de toxicidad es cuestionable. Además, este desarrollo no desvela un medio para controlar específicamente la presencia de agentes que puedan provocar o potenciar el daño de ADN, y el mecanismo de inducción de *GADD153* sigue sin estar claro. Por lo tanto, este sistema es de uso muy limitado como un biosensor de daño de ADN humano.

Por lo tanto, es un objetivo de las realizaciones de la presente invención abordar problemas asociados con la técnica anterior y proporcionar un biosensor mejorado para detectar daño de ADN en cultivos celulares humanos.

5 De acuerdo con un primer aspecto de la presente invención, se proporciona un casete de expresión que comprende una secuencia de ADN que codifica una proteína indicadora, estando dicha secuencia de ADN unida operativamente a un promotor del gen GADD45 $\alpha$  humano y un elemento regulador del gen GADD45 $\alpha$  humano dispuesto para activar la expresión de la secuencia de ADN en respuesta a daño de ADN.

10 Por la expresión "elemento regulador", los inventores entienden una secuencia de ADN que regula la transcripción de un gen con el que está asociada, es decir, la secuencia de ADN que codifica la proteína indicadora.

Por la expresión "unido operativamente", los inventores entienden que el elemento regulador es capaz de inducir la expresión de la proteína indicadora.

15 De acuerdo con un segundo aspecto de la invención, se proporciona un vector recombinante que comprende un casete de expresión de acuerdo con el primer aspecto.

20 De acuerdo con un tercer aspecto de la invención, se proporciona una célula que contiene un vector recombinante de acuerdo con el segundo aspecto de la presente invención.

De acuerdo con un cuarto aspecto de la presente invención, se proporciona un método para detectar la presencia de un agente que provoque o potencie el daño de ADN que comprende someter a una célula de acuerdo con el tercer aspecto de la presente invención a un agente; y controlar la expresión de la proteína indicadora de la célula.

25 El método del cuarto aspecto de la invención representa una nueva exploración de genotoxicidad rentable que puede usarse para proporcionar un ensayo de exploración pre-regulador para su uso por la industria farmacéutica y en otras aplicaciones en las que es necesario ensayar números significativos de agentes o compuestos. Proporciona un mayor rendimiento y un menor consumo de compuesto que los ensayos de genotoxicidad de mamíferos *in vitro* e *in vivo* existentes, y es sensible a un amplio espectro de mutágenos.

30 El método del cuarto aspecto de la invención es adecuado para evaluar si un agente puede provocar o no daño de ADN. Es particularmente útil para detectar agentes que provocan daño de ADN cuando se evalúa si es seguro exponer a una persona a agentes perjudiciales para el ADN. Por ejemplo, el método puede usarse como un ensayo de genotoxicidad para explorar si los agentes conocidos, tales como medicamentos candidatos, productos químicos farmacéuticos e industriales, pesticidas, fungicidas, productos alimentarios o cosméticos, inducen o no daño de ADN. Como alternativa, el método de la invención puede usarse para controlar la contaminación de suministros de agua, lixiviados y efluentes con contaminantes que contienen agentes perjudiciales para el ADN.

35 El método del cuarto aspecto de la invención también puede usarse para evaluar si un agente puede potenciar el daño de ADN. Por ejemplo, ciertos agentes pueden provocar la acumulación de daño de ADN inhibiendo la reparación de ADN (por ejemplo evitando la expresión o función de una proteína de reparación) sin infligir directamente daño de ADN.

40 Sorprendentemente, el uso de un elemento regulador del gen GADD45 $\alpha$  humano además del promotor del gen GADD45 $\alpha$  humano en el casete de expresión de acuerdo con el primer aspecto de la invención potencia radicalmente la respuesta del casete a tensión genotóxica y, de este modo, el daño de ADN en la célula de acuerdo con el tercer aspecto. Provechosamente, el casete puede analizarse con respecto a la expresión de la proteína indicadora en un periodo de o después de solamente 24 horas simplemente ensayando con respecto a la proteína en un cultivo de ensayo. Las células pueden someterse al agente o compuesto de ensayo, y la expresión de la proteína indicadora en la célula indica si el agente de ensayo provoca daño de ADN.

45 Los inventores han descubierto que el ADN que codifica un promotor del gen GADD45 $\alpha$  humano y un elemento regulador del gen GADD45 $\alpha$  humano pueden unirse operativamente a una proteína indicadora para formar un casete de acuerdo con el primer aspecto de la invención y después usarse provechosamente en un ensayo genotóxico de acuerdo con el cuarto aspecto de la invención. Dichos casetes pueden comprender la totalidad del gen GADD45 $\alpha$  (incluyendo secuencias codificantes) siempre que estén unidos operativamente a ADN que codifica un indicador emisor de luz. Por ejemplo, pueden realizarse casetes de acuerdo con el primer aspecto de la invención que comprendan la totalidad de, o sustancialmente todo, el gen GADD45 $\alpha$  (que comprende elementos reguladores y promotor) con ADN que codifique un indicador insertado 3' del promotor de GADD45 $\alpha$  (por ejemplo, dentro de la secuencia codificante de GADD45 $\alpha$  o en el extremo 3' de la secuencia codificante) dispuesto para activar la expresión de la secuencia de ADN en respuesta a daño de ADN.

50 Preferentemente, la secuencia promotora del gen GADD45 $\alpha$  humano induce que la ARN polimerasa se una a la molécula de ADN y comience a transcribir el ADN que codifica la proteína indicadora. Se prefiere que la secuencia promotora comprenda la secuencia promotora del gen GADD45 $\alpha$  humano y la región no traducida 5'. La secuencia

promotora puede obtenerse del plásmido pHG45-HC, que se ilustra en la Figura 3. La secuencia promotora puede verse en cada uno de los casetes de expresión de acuerdo con la invención en la Figura 9, y la secuencia de nucleótidos del promotor del gen *GADD45α* se muestra como las bases 4-2254 en las SEC ID N° 1, 2, 3, 4 y 5 en la lista de secuencias. Se apreciará que el promotor puede comprender cada una de las bases 4-2254 o como alternativa puede ser un derivado funcional o fragmento funcional de las mismas. Pueden identificarse fácilmente derivados funcionales y fragmentos funcionales evaluando si la transcriptasa se une o no a una región promotora potencial y conduce después a la transcripción de la proteína marcadora. Como alternativa dichos derivados y fragmentos funcionales pueden examinarse realizando mutagénesis en el promotor de *GADD45α*, cuando esté en asociación natural con el gen *GADD45α*, y evaluando si puede producirse o no expresión de *GADD45α*.

El elemento regulador en el casete de expresión de acuerdo con la invención puede comprender secuencias cadena abajo de la secuencia promotora del gen *GADD45α*. El elemento regulador puede comprender secuencias de ADN funcionales tales como las que codifican secuencias de inicio de la traducción para unión a ribosoma o secuencias de ADN que se unen a factores de transcripción que promueven la expresión génica después del daño de ADN. El elemento regulador en el casete de expresión de acuerdo con la invención puede comprender al menos un exón del gen *GADD45α*. Por ejemplo, el elemento regulador puede comprender el exón 1, exón 2, exón 3 y/o exón 4 del gen *GADD45α*, o al menos una región de los mismos, o cualquier combinación de los mismos. Por lo tanto, el elemento regulador puede comprender cualquier combinación de los cuatro exones del gen *GADD45α*, o al menos una región de los mismos.

En una realización preferida, el elemento regulador comprende al menos una región de exón 1 del gen *GADD45α* y preferentemente al menos una región del exón 3 del gen *GADD45α*, y más preferentemente, al menos una región del exón 4 del gen *GADD45α*. Se prefiere especialmente que el elemento regulador comprenda todo el exón 1 del gen *GADD45α*, y preferentemente al menos una región del exón 3 del gen *GADD45α*, y más preferentemente, todo el exón 4 del gen *GADD45α*.

Se ilustran elementos reguladores preferidos en cada uno de los casetes de expresión de acuerdo con la invención en la Figura 9. La secuencia de nucleótidos del exón 3 del gen *GADD45α* se muestra como las bases 3405-3642 en la SEC ID N° 2, 3 y 4 en el listado de secuencias. La secuencia de nucleótidos de la región preferida del exón 3 del gen *GADD45α* se muestra como las bases 3503-3642 en la SEC ID N° 4. La secuencia de nucleótidos del exón 4 del gen *GADD45α* se muestra como las bases 4716-5391 en la SEC ID N° 2, 3 y 4 en el listado de secuencias.

Como alternativa, o adicionalmente, el elemento regulador puede comprender una secuencia de ADN no codificante, por ejemplo, al menos un intrón del gen *GADD45α*. Por ejemplo, el elemento regulador puede comprender el intrón 1, intrón 2 y/o intrón 3 del gen *GADD45α*, o al menos una región de los mismos, o cualquier combinación de los mismos. Por lo tanto, el elemento regulador puede comprender cualquier combinación de los tres intrones del gen *GADD45α*, o al menos una región de los mismos.

En una realización preferida, el elemento regulador en el casete de expresión de acuerdo con la invención comprende al menos una región del intrón 3 del gen *GADD45α*. El intrón 3 de *GADD45α* se ilustra en la Figura 9, y la secuencia de nucleótidos del intrón 3 del gen *GADD45α* se muestra como las bases 3643-4715 en las SEC ID N° 2, 3 y 4 en el listado de secuencias.

En una realización preferida, el casete de expresión de acuerdo con la invención comprende la secuencia promotora del gen *GADD45α* y también los elementos reguladores génicos hallados dentro del intrón 3 de la secuencia genómica del gen *GADD45α* en sí misma. Aunque los inventores no desean quedar ligados a ninguna hipótesis, creen que el intrón 3 del gen *GADD45α* contiene un motivo de unión a p53 potencial, y que es este motivo de p53 el que potencia sorprendentemente la respuesta del casete de expresión a la tensión genotóxica. El motivo de unión a p53 potencial se muestra como las bases de nucleótidos 3830-3849 de la SEC ID N° 2, 3 y 4.

Los inventores también creen que el intrón 3 del gen *GADD45α* puede contener un motivo TRE potencial, que puede codificar un sitio de unión a AP-1. El motivo TRE potencial se muestra como las bases de nucleótidos 3879-3885 de la SEC ID N° 2, 3 y 4. Por lo tanto, aunque los inventores no desean quedar ligados a ninguna hipótesis, postulan que este sitio de unión a AP-1 potencial también puede contribuir a la respuesta mejorada a agentes genotóxicos.

Se prefiere que el casete de expresión comprenda al menos el motivo de unión a p53 y/o el motivo de unión a AP-1 del intrón 3 del gen *GADD45α*.

El elemento regulador puede comprender una región no traducida (UTR) 3' del gen *GADD45α*, cuya secuencia de nucleótidos se muestra como las bases 4830-5391 en las SEC ID N° 2, 3, y 4. Aunque los inventores no desean quedar ligados a ninguna hipótesis, creen que esta UTR 3' puede estar implicada en la estabilización del casete de ARNm, y de este modo puede ser sorprendentemente importante cuando se use con el resto del elemento regulador, tal como intrón 3.

Por la expresión "proteína indicadora" los inventores entienden una proteína que cuando se expresa en respuesta al

elemento regulador de la molécula de ADN de la invención, es detectable por medio de un procedimiento de ensayo adecuado. Preferentemente, la proteína indicadora comprende una proteína indicadora emisora de luz. La secuencia de ADN que codifica una proteína indicadora emisora de luz puede codificar cualquier proteína emisora de luz, por ejemplo, luciferasa o proteína verde fluorescente. Sin embargo, se prefiere que la secuencia de ADN codifique una

5

proteína que sea sustancialmente fluorescente.

Las secuencias de ADN preferidas que codifican una proteína indicadora emisora de luz codifican proteína verde fluorescente (GFP) y derivados emisores de luz de la misma. La GFP es de la medusa *Aequorea victoria* y es capaz de absorber luz azul y reemitir una luz verde fácilmente detectable y es por lo tanto adecuada como una proteína

10

indicadora. La GFP puede usarse provechosamente como una proteína indicadora porque su medición es sencilla y sin reactivos y la proteína no es tóxica.

Los derivados de GFP incluyen secuencias de ADN que codifican análogos polipeptídicos o fragmentos polipeptídicos de GFP, que son capaces de emitir luz. Muchos de estos derivados absorben y reemiten luz a

15

longitudes de onda diferentes a la GFP hallada de forma endógena en *Aequorea victoria*.

Por ejemplo, los casetes de expresión preferidos de acuerdo con el primer aspecto de la invención comprenden una secuencia de ADN que codifica la GFP potenciada humana (hEGFP), también conocido como variante GFPmut1 de GFP. Esta consiste en la GFP natural que contiene una sustitución de doble aminoácido de Phe-64 a Leu y Ser-65 a Thr. La secuencia codificante del gen de hEGFP también contiene más de 190 cambios de bases silenciosos, que corresponden a preferencias de uso codónico humano en relación con la secuencia de *Aequorea victoria* nativa. Esta es particularmente ventajosa para su uso en un sistema indicador de daño de ADN humano. La secuencia de hEGFP puede obtenerse del plásmido pEGFP-N1 (por ejemplo, obtenido de Clontech), que se muestra en la Figura

20

25

1. La secuencia de hEGFP puede verse en cada uno de los casetes de expresión de acuerdo con la invención en la Figura 9, y la secuencia de nucleótidos de la hEGFP se muestra como las bases 2550-3278 en la SEC ID N° 1, 2, 3, 4 y 5 en el listado de secuencias.

La GFP produce un buen rendimiento cuántico de fluorescencia y equipara el rendimiento de láseres iónicos de argón usados en separadores celulares activados por fluorescencia. Las células de acuerdo con el tercer aspecto de

30

la invención, que contienen moléculas de ADN que codifican hEGFP, pueden usarse de acuerdo con el método del cuarto aspecto de la invención.

Por lo tanto, los casetes de expresión preferidos de acuerdo con la invención comprenden un elemento regulador del gen GADD45 $\alpha$  humano y promotor del gen GADD45 $\alpha$  humano unido operativamente a una secuencia de ADN que codifica una GFP, o derivado emisor de luz o análogos de los mismos (por ejemplo, YFP, etc.). La mayoría de los casetes de expresión preferidos comprenden un promotor del gen GADD45 $\alpha$  humano unido operativamente a una

35

secuencia de ADN que codifica una GFP o derivado emisor de luz de la misma, y el intrón 3 del gen GADD45 $\alpha$ .

En una primera realización, el casete de expresión de acuerdo con el primer aspecto es preferentemente 5-31, (el casete ilustrado en la Figura 9 como GD531). La secuencia de nucleótidos del casete de expresión 5-31 se muestra en el listado de secuencias como SEC ID N° 2.

40

En una segunda realización, el casete de expresión de acuerdo con el primer aspecto es preferentemente 5-32 (el casete ilustrado en la Figura 9 como GD532). La secuencia de nucleótidos del casete de expresión 5-32 se muestra en el listado de secuencias como SEC ID N° 3.

45

En una tercera realización, el casete de expresión de acuerdo con el primer aspecto es preferentemente 5-33 (el casete ilustrado en la Figura 9 como GD533). La secuencia de nucleótidos del casete de expresión 5-33 se muestra en el listado de secuencias como SEC ID N° 4.

50

El vector recombinante de acuerdo con el segundo aspecto de la presente invención puede ser por ejemplo un plásmido, cósmido o fago. Dichos vectores recombinantes son muy útiles cuando se replica el casete de expresión. Además, los vectores recombinantes son altamente útiles para transfectar células con el casete de expresión y también pueden promover la expresión de la proteína indicadora.

55

Pueden diseñarse vectores recombinantes de modo que el vector se replique de forma autónoma en el citosol de la célula o pueden usarse para integrarse en el genoma. En este caso, pueden requerirse elementos que induzcan replicación de ADN en el vector recombinante. Se conocen bien en la técnica elementos adecuados y, por ejemplo, pueden derivar de pCEP4 (Invitrogen, 3 Fountain Drive, Inchinnan Business Park, Paisley, PA4 9RF, Reino Unido) pEGFP-N1 (BD Biosciences Clontech Reino Unido, 21 In Between Towns Road, Cowley, Oxford, OX4 LY, Reino Unido) o PCI y PSI (Promega Reino Unido Ltd, Delta House, Chilworth Science Park, Southampton SO16 7NS, Reino Unido).

60

Dichos vectores de replicación pueden dar lugar a múltiples copias de la molécula de ADN en un transformante y son por lo tanto útiles cuando se requiere sobreexpresión (y por lo tanto aumento de la emisión de luz) de la proteína indicadora. Además, es preferible que el vector pueda replicarse en células humanas, de primate y/o caninas. Se

65

prefiere que el vector comprenda un origen de replicación y, preferentemente, al menos un marcador seleccionable. El marcador seleccionable puede conferir resistencia a un antibiótico, por ejemplo, higromicina o neomicina. Por lo tanto, un elemento adecuado deriva del plásmido pCEP4 (Invitrogen, 3 Fountain Drive, Inchinnan Business Park, Paisley, PA4 9RF, Reino Unido), que se ilustra en la Figura 2.

5 En una primera realización, el vector recombinante de acuerdo con el segundo aspecto es preferentemente pEP-GD531, como se ilustra en la Figura 5.

10 En una segunda realización, el vector recombinante de acuerdo con el segundo aspecto es preferentemente pEP-GD532, como se ilustra en la Figura 6.

En una tercera realización, el vector recombinante de acuerdo con el segundo aspecto es preferentemente pEP-GD533, como se ilustra en la Figura 7.

15 De acuerdo con el segundo aspecto de la invención, el vector recombinante se incorpora dentro de una célula. Se prefiere que la célula sea eucariota. Dichas células hospedadoras pueden ser células y líneas celulares derivadas de mamífero. Las células de mamífero preferidas incluyen células humanas, de primate, murinas o caninas. Las células hospedadoras pueden ser células o líneas celulares de linfoma, tales como células de linfoma de ratón. Las células hospedadoras pueden estar inmortalizadas, por ejemplo, linfocitos.

20 Son células hospedadoras preferidas las líneas celulares humanas. Preferentemente, las células hospedadoras son líneas celulares humanas que tienen un p53 completamente funcional, por ejemplo, ML-1 (una línea celular de leucemia mieloide humana con p53 natural), TK6 (una línea celular linfoblastoide humana con p53 natural). Sin embargo, también se prevén líneas celulares hospedadoras de WI-L2-NS y WTK1 (ambas de las cuales son líneas hermanas de TK6 y tienen proteínas p53 mutantes). Estas líneas celulares pueden encontrarse todas en la Colección Europea de Cultivos Celulares (ECACC General Office, CAMR, Porton Down, Salisbury, Wiltshire, SP4 OJG, Reino Unido).

30 Los inventores han descubierto que las células humanas TK6 son líneas celulares particularmente preferidas para su uso de acuerdo con el método de la invención. Aunque los inventores no desean quedar ligados a ninguna hipótesis, creen que las células TK6 son más útiles debido a que tienen un p53 completamente funcional.

35 Las células hospedadoras usadas para expresión de la proteína codificada por la molécula de ADN idealmente se transfectan de forma estable, aunque el uso de células transfectadas de forma inestable (transitorias) no se excluye.

Pueden formarse células transfectadas de acuerdo con el tercer aspecto de la invención por los siguientes procedimientos descritos en el Ejemplo. La célula es idealmente una línea celular humana, por ejemplo TK6. Dichas células transfectadas pueden usarse de acuerdo con el método del cuarto aspecto de la invención para evaluar si los agentes inducen o potencian o no el daño de ADN. La expresión de GFP se induce en respuesta a daño de ADN y la luz emitida por GFP puede medirse fácilmente usando técnicas apropiadas conocidas.

40 La mayoría de las células preferidas de acuerdo con el tercer aspecto de la invención son células TK6 transformadas con el vector pEP-GAD532. Estas células se denominan en el presente documento GenTK-T01.

45 También se prevé que el casete de expresión de acuerdo con la invención pueda integrarse en el genoma de una célula hospedadora. El técnico experto en la materia apreciará métodos adecuados para integrar el casete en el genoma. Por ejemplo, el casete de expresión puede albergarse en un vector retroviral, que en combinación con una línea celular de empaquetamiento puede producir retrovirus recombinante sin auxiliar, que pueden después introducirse en la célula hospedadora. El casete puede después integrarse en sí mismo en el genoma. Los ejemplos de sistemas de vectores retrovirales sin auxiliares adecuados incluyen el plásmido pBabePuro con la línea celular de empaquetamiento retroviral BING [Kinsella y Nolan, 1996. Episomal Vectors Rapidly and Stably Produce High-Titer Recombinant Retroviruses, Human Gene Therapy. 7:1405-1413.]

55 El método del cuarto aspecto de la invención es particularmente útil para detectar agentes que inducen daño de ADN a concentraciones bajas. Los métodos pueden usarse para explorar compuestos, tales como medicamentos candidatos, aditivos alimentarios o cosméticos, para evaluar si es seguro exponer un organismo vivo, particularmente personas, a dichos compuestos. Como alternativa, el método del cuarto aspecto de la invención puede emplearse para detectar si los suministros de agua están contaminados o no por agentes perjudiciales para el ADN o agentes que potencian el daño de ADN. Por ejemplo, los métodos pueden usarse para controlar los efluyentes industriales con respecto a la presencia de contaminantes que puedan conducir a aumento del daño de ADN en personas u otros organismos expuestos a la polución.

65 El método de la invención se realiza preferentemente cultivando células transfectadas con un vector recombinante de acuerdo con el segundo aspecto de la invención (tales como pEP-GD531, pEP-GD532 o pEP-GD533), incubando las células con el agente que provoca potencialmente daño de ADN durante un tiempo predeterminado y controlando la expresión de la proteína indicadora emisora de luz directamente de una muestra de las células.

Las células se cultivan preferentemente en un medio de cultivo de fluorescencia baja. Esto puede obviar la necesidad de lavar las células antes de que se realicen mediciones y de este modo reducir el número de etapas en el método posterior. Por ejemplo, pueden cultivarse células humanas preferidas de acuerdo con el tercer aspecto de la invención en un medio de baja fluorescencia. Los medios adecuados pueden ser un medio RPMI 1640 modificado y más preferentemente contiene concentraciones bajas de, o preferentemente, nada de riboflavina o rojo fenol. Los inventores han descubierto que el uso de dichos medios es sorprendentemente útil en ensayos de marcadores fluorescentes tales como GFP. El uso de dicho medio reduce la "relación de señal y ruido" cuando se mide la fluorescencia. Por lo tanto, de acuerdo con un quinto aspecto de la invención se proporciona un medio que no contiene, o contiene niveles reducidos (en relación con el medio de cultivo celular convencional) de riboflavina o rojo fenol para uso en ensayos fluorescentes. Más preferentemente el medio no contiene riboflavina ni rojo fenol.

Se prefiere que el medio se modifique de tal modo que no contenga riboflavina. El uso de dicho medio modificado sería contrario al sentido común para un experto en la materia debido a que se entendería que la riboflavina normalmente se requiere en el medio. Esto se debe a que la mayoría de las células requieren riboflavina para poder crecer y sobrevivir. Los inventores se han dado cuenta de que las células, que se han cultivado en medio de cultivo convencional que contiene riboflavina, pueden retirarse de dicho medio; colocarse en un medio sin riboflavina; y seguirán siendo viables para los fines de realizar un ensayo de fluorescencia fiable. Las células dejadas en medio convencional (que contenga riboflavina y/o rojo fenol) tienden a proporcionar valores de fluorescencia menos satisfactorios cuando se ensayan de acuerdo con el método del cuarto aspecto de la invención (particularmente cuando la proteína indicadora es GFP o un derivado de la misma).

Se prefiere que el medio se use de acuerdo con el quinto aspecto de la invención cuando se realicen ensayos de acuerdo con el cuarto aspecto de la invención. Se prefiere que dicho medio se use cuando se realice un ensayo genotóxico con GFP como el indicador.

Un medio preferido con autofluorescencia baja es un medio RPMI 1640 modificado que no contiene riboflavina o rojo fenol. Se desvela un medio más preferido en la Tabla 1 del Ejemplo 1.

Otros medios que podrían modificarse para autofluorescencia baja incluyen Medio de Eagle modificado por Dulbecco (D-MEM), mezcla de nutrientes F-10 (Ham), mezcla de nutrientes F-12 (Ham) y medio de Fischer (Gibco, Invitrogen, Paisley, Reino Unido). El medio más apropiado puede usarse para diferentes tipos celulares que podrían usarse como un hospedador para vectores indicadores recombinantes.

De acuerdo con una realización preferida del método de la invención pueden transfectarse células TK6 con pEP-GD531, pEP-GD532 o pEP-GD533, y cultivarse en medio RPMI que no contiene riboflavina. Después puede añadirse un agente perjudicial para el ADN potencial (por ejemplo, un aditivo alimentario o un medicamento potencial o un agente contenido dentro de una muestra de agua o muestra de efluente) al medio que contiene las células. Después se permite que las células crezcan durante un periodo definido de tiempo después del cual se retira una muestra de las células y se mide la fluorescencia de las mismas.

Los métodos adecuados de detección y cuantificación de fluorescencia se conocerán por el experto en la materia, y se describe un método en los Ejemplos. Se describe un método preferido de detección de fluorescencia en el documento US 6.509.161. Este método es particularmente útil cuando el indicador emisor de luz es GFP o un derivado del mismo.

De acuerdo con una realización preferida del método de la invención, pueden registrarse lecturas de fluorescencia y absorbancia de células TK6 transfectadas con pEP-GD531, pEP-GD532 o pEP-GD533, por ejemplo, del pocillo de una microplaca. Un ejemplo de una microplaca adecuada es una microplaca de fondo transparente, negra de 96 pocillos, fabricada por Matrix ScreenMates Matrix, Cat. N° 4929, Apogent, Discoveries, Estados Unidos, o Corning (BV, Países Bajos: Cat. N° 3651). Pueden registrarse mediciones de fluorescencia y absorbancia usando un lector de microplacas adecuado, por ejemplo, el lector de microplacas Tecan Ultra-384 (Tecan Reino Unido Ltd.): excitación 485 nm/emisión 535 nm con un espejo dicróico adicional (reflectancia 320 nm - 500 nm, transmisión 520 nm - 800 nm). La absorbancia puede medirse a través de un filtro adecuado, por ejemplo, un filtro de 620 nm.

La mayoría de los protocolos preferidos para realizar el método del cuarto aspecto de la invención se describen en los Ejemplos 1, 3 y 4.

A partir de las mediciones de fluorescencia y absorbancia, pueden realizarse "valores de brillo" y relaciones de inducción de fluorescencia con respecto a células de acuerdo con el tercer aspecto de la invención como se describe en los ejemplos.

Hay expresión de fondo ("constitutiva") de GFP de las construcciones de GADD45 $\alpha$ -EGFP, por lo tanto cuanto mayor sea la densidad celular, más fluorescente será el cultivo. Para corregir con respecto a aumento de fluorescencia que es consecuencia del crecimiento, los datos de fluorescencia (GFP) se dividen por los datos de absorbancia (densidad celular) para proporcionar "unidades de brillo", es decir, la medida de la fluorescencia media por célula. Esto es independiente de la densidad de cultivo. En consecuencia, la medición de absorbancia puede

usarse principalmente para la normalización de señales de fluorescencia en lugar de una medición de la toxicidad del agente perjudicial para el ADN. En consecuencia, se prevé que pueda usarse un ensayo secundario junto con la medición de absorbancia para determinar la toxicidad mediante viabilidad celular y apoptosis. Por ejemplo, usando el ensayo de citotoxicidad de bioluminiscencia Biovision Bioluminescence Cytotoxicity Assay (Biovision Incorporated, 2455-D Old Middlefield Way, Mountain View, California 94043, Estados Unidos), o el kit de ensayo de apoptosis Vybrant® (Molecular Probes Inc., 29851 Willow Creek Road, Eugene, OR 97402, Estados Unidos).

Ocasionalmente, los compuestos muestran fluorescencia por sí mismos o inducen autofluorescencia celular. En consecuencia, cuando se evalúa la expresión de GFP aumentada los valores de brillo de una línea celular de control se restan de los valores de brillo de una línea celular indicadora. Esto retira la interferencia de los datos. Se prefiere por lo tanto que los métodos de acuerdo con el cuarto aspecto de la invención empleen células que contengan vectores de control basándose en vectores indicadores de acuerdo con el segundo aspecto de la invención. Dichos vectores de control pueden corresponder al vector indicador, pero con una mutación sin sentido introducida en el gen indicador emisor de luz.

El vector de control recombinante puede ser preferentemente los vectores descritos como pEP-GD500C o pEP-GD532C, como se ilustra en las Figuras 18 y 19, respectivamente.

Los métodos preferidos de acuerdo con el cuarto aspecto de la invención utilizarán células de acuerdo con el tercer aspecto de la invención (por ejemplo, GenTK-T01) y una línea celular de control basada en células TK6 transformadas con el vector pEP-GD532C (denominado en el presente documento aGenTK-C01).

Se apreciará que algunos compuestos no genotóxicos pueden alterarse químicamente por el metabolismo celular. En mamíferos este proceso se llama con frecuencia activación metabólica (AM). La AM puede convertir ciertos compuestos no genotóxicos (por ejemplo promutágenos) en compuestos genotóxicos. Más frecuentemente la AM se produce en el hígado. Por esta razón se prefiere con frecuencia que los ensayos de genotoxicidad se adapten de modo que se lleven a cabo ensayos del compuesto de ensayo en presencia y ausencia de extractos del hígado que sean capaces de metabolizar un compuesto si se estuviera metabolizando *in vivo*. El Ejemplo 4 ilustra un método preferido de acuerdo con el cuarto aspecto de la invención que utiliza un extracto de hígado (conocido por el experto en la materia) llamado S9. La inclusión de dicho extracto permite que los ensayos detecten compuestos que solamente se hacen genotóxicos después del paso a través del hígado.

Todos los elementos descritos en el presente documento (incluyendo cualquier reivindicación adjunta, el resumen y los dibujos), y/o todas las etapas de cualquier método o proceso desvelado de este modo, pueden combinarse con cualquiera de los aspectos anteriores en cualquier combinación, excepto combinaciones en las que al menos algunos de dichos elementos y/o etapas sean mutuamente exclusivos.

Se describirán ahora adicionalmente realizaciones de la invención, solamente como ejemplo, con referencia a los siguientes ejemplos y figuras en las que:

La Figura 1 muestra un mapa de restricción del vector pEGFP-N1;

La Figura 2 muestra un mapa de restricción del vector pCEP4;

La Figura 3 muestra un mapa de restricción del vector pHG45-HC;

La Figura 4 muestra un mapa de restricción del vector pEP-GD500;

La Figura 5 muestra un mapa de restricción del vector pEP-GD531, un vector recombinante preferido de acuerdo con la presente invención;

La Figura 6 muestra un mapa de restricción del vector pEP-GD532, un vector recombinante preferido de acuerdo con la presente invención;

La Figura 7 muestra un mapa de restricción del vector pEP-GD533, un vector recombinante preferido de acuerdo con la presente invención;

La Figura 8 muestra un mapa de restricción del vector pEP-GD534;

La Figura 9 muestra realizaciones de casetes de expresión indicadores de acuerdo con la invención;

La Figura 10 muestra el efecto de la inducción de MMS en líneas celulares indicadoras de *GADD45α*;

La Figura 11 muestra el efecto sobre el brillo por inducción de MMS en líneas celulares indicadoras de *GADD45α*;

La Figura 12 muestra fluorescencia inducida por metil metanosulfonato medida directamente de una línea celular indicadora cultivada en RPMI 1640 con suero (A) o medio de autofluorescencia baja modificado con suero (B) como se analiza en el Ejemplo 2;

5 La Figura 13 muestra el crecimiento de una línea celular linfoblastoide humana en RPMI 1640 o medio de autofluorescencia baja modificado en el Ejemplo 2;

La Figura 14 muestra el efecto de MMS en la densidad celular relativa en un ensayo de placas de 96 pocillos después de 48 horas de incubación en el Ejemplo 3;

10 La Figura 15 muestra el efecto de MMS en las relaciones de inducción de fluorescencia en un ensayo de placa de 96 pocillos en el Ejemplo 3;

15 La Figura 16 muestra el efecto de ciclofosfamida con y sin S9 en las densidades celulares relativas de las células GenTK-C01 en el Ejemplo 4;

La Figura 17 muestra el efecto de ciclofosfamida con y sin S9 en la inducción de fluorescencia en células GenTK-C01 en el Ejemplo 4;

20 La Figura 18 muestra un mapa de restricción de un vector de control llamado pEP-GD500C; y

La Figura 19 muestra un mapa de restricción de un vector de control llamado pEP-GD532C.

### **Ejemplo 1**

25 El siguiente Ejemplo perfila los componentes que se han usado en la construcción de una serie de indicadores/biosensores del daño de ADN de cultivo celular humano *GADD45α-EGFP* de acuerdo con el primer y segundo aspectos de la invención. Además, este ejemplo describe la construcción de los biosensores (células de acuerdo con el tercer aspecto de la invención), e ilustra cómo responden a un agente genotóxico, por ejemplo, metil éster de ácido metanosulfónico (MMS) cuando se utiliza en un método de acuerdo con el cuarto aspecto de la invención.

#### **1.1 Componentes del sistema: -**

35 **(i) El promotor – de *GADD45α***

La fuente del promotor de *GADD45α* es el plásmido pHG45-HC de Albert J. Fornace Jr., M.D. (Instituto Nacional del Cáncer, Edificio: 37, Sala: 6144, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland 20892, Estados Unidos), que se ilustra en la Figura 3.

40 **(ii) La proteína fluorescente - *EGFP* de Clontech**

La fuente de la proteína verde fluorescente es el plásmido de Clontech pEGFP-N1 (BD Biosciences Clontech Reino Unido, 21 in Between Towns Road, Cowley, Oxford, OX4 LY, Reino Unido), que se ilustra en la Figura 1. pEGFP-N1 codifica una variante desplazada al rojo de *GFP* natural que se ha optimizado para fluorescencia más brillante y mayor expresión en células de mamífero. (Máximo de excitación = 488 nm; máximo de emisión = 507 nm). El plásmido pEGFP-N1 codifica la variante GFPmut1, que contiene la sustitución de doble aminoácido de Phe 64 a Leu y Ser-65 a Thr. La secuencia codificante del gen de EGFP contiene más de 190 cambios de bases silenciosos, que corresponden a preferencias de uso codónico humano.

#### **1.2 Construcción de casetes indicadores de biosensor**

La construcción de un conjunto de vectores recombinantes que contienen cada uno un casete indicador de *GADD45α-EGFP* se llevó a cabo en varios estadios usando el plásmido pCEP4 de Invitrogen como una cadena principal, que se ilustra en la Figura 2. El plásmido pCEP4 es un vector de expresión de mamífero episómico que usa el promotor/potenciador temprano inmediato de citomegalovirus (CMV) para alto nivel de transcripción de genes recombinantes insertados en el sitio de clonación múltiple. El origen de replicación (oriP) y antígeno nuclear (codificado por el gen EBNA-1) del virus de Epstein-Barr se porta por este plásmido para permitir la replicación extracromosómica en células humanas, de primate y caninas. pCEP4 también porta el gen de resistencia a higromicina B para selección estable en células transfectadas.

65 Etapa 1: (Inserción de un módulo de *EGFP* en pCEP4) - un módulo de *EGFP* (que consiste en la proteína verde fluorescente optimizada para ser humano y la señal de poliadenilación de SV40) se amplificó por PCR a partir del plásmido de Clontech pEGFP -N1 (BD Biosciences Clontech Reino Unido, 21 In Between Towns Road, Cowley, Oxford, OX4 LY, Reino Unido), que se muestra en la Figura 1. El gen *EGFP* está flanqueado por sitios *Bgl* II-Asc I (5') y *Pac* I- *Xho* I (3'). Este se insertó en pCEP4 cortado con *Bgl* II-*Xho* I (Invitrogen), que se muestra en la

Figura 2. Esta etapa también dio como resultado la retirada del promotor de CMV de pCEP4.

Etapa 2: (Inserción del promotor de *GADD45α*) – la secuencia del promotor 5' de *GADD45α* se amplificó por PCR (a partir de un plásmido pHG45-HC, donado amablemente por Albert J. Fornace Jr., M.D. (Instituto Nacional del Cáncer, Edificio: 37, Sala: 6144, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland 20892, Estados Unidos), ilustrado en la Figura 3, de -2253 pb hasta e incluyendo la UTR (región no traducida) 5' y codón de inicio (+298 pb) con sitios *Bgl* II (5') y *Asc* I (3') flanqueantes. Este se insertó en el plásmido resultante de la etapa 1. El plásmido resultante se nombró pEP-GD500, que se muestra en la Figura 4.

Etapa 3: (Inserción de secuencia del gen *GADD45α*) – Se amplificaron diversas secuencias del gen *GADD45α* (extremo 3' del gen) con sitios de clonación por PCR y se clonaron en el plásmido resultante de la etapa 2 (pEP-GD500) para proporcionar cuatro plásmidos indicadores adicionales.

Estos plásmidos se nombraron: -

- (i) pEP-GD531 (secuencia 3' de +1034 a +3149), como se muestra en la Figura 5. Este plásmido incluye todo el intrón 3 del gen *GADD45α* humano, incluyendo el motivo de unión a p53;
- (ii) pEP-GD532 (secuencia 3' de +1147 a +3149), como se muestra en la Figura 6. Este plásmido incluye todo el intrón 3 del gen *GADD45α* humano, incluyendo el motivo de unión a p53;
- (iii) pEP-GD533 (secuencia 3' de +1248 a +3149) como se muestra en la Figura 7. Este plásmido incluye todo el intrón 3 del gen *GADD45α* humano, incluyendo el motivo de unión a p53; y
- (iv) pEP-GD534 (secuencia 3' de +3155 a +3149), como se muestra en la Figura 8. Este plásmido no incluye todo el intrón 3 del gen *GADD45α* humano, y no incluye el motivo de unión a p53. Este plásmido incluye la región no traducida 3' de *GADD45α*.

Sitios de clonación usados para la etapa 3: -

**pEP-GD531:** producto de PCR flanqueado por *Not* I (5') y *Xho* I (3'). Clonado en pEP-GD500 cortado con *Not* I - *Xho* I.

**pEP-GD532:** producto de PCR flanqueado por *Eco* RV (5') y *Xho* I (3'). Clonado en pEP-GD500 cortado con *Hpa* I - *Xho* I.

**pEP-GD533:** producto de PCR flanqueado por *Pac* I (5') y *Xho* I (3'). Clonado en pEP-GD500 cortado con *Pac* I - *Xho* I.

**pEP-GD534:** producto de PCR flanqueado por *Not* I (5') y *Xho* I (3'). Clonado en pEP-GD500 cortado con *Not* I - *Xho* I.

**Etapa 4:** (creación de vectores de control) – Se digirieron plásmidos indicadores con *Asc* I y los salientes 5' se rellenaron con enzima Klenow. Después los fragmentos de ADN modificados se recircularon. Esto introdujo un desplazamiento de fase de 4 pb en el gen de EGFP. La proteína resultante no es funcional. Los plásmidos de control resultantes tienen un sufijo con la letra C y se ilustran en las Figuras 18 y 19.

Las secuencias de ADN de cada uno de los casetes de expresión en los plásmidos pEP-GD500, pEP-GD531, pEP-GD532, pEP-GD533 y pEP-GD534 se muestran en el listado de secuencias como SEC ID N° 1, SEC ID N° 2, SEC ID N° 3, SEC ID N° 4 y SEC ID N° 5, respectivamente.

En referencia a la Figura 9, se muestra la serie de casetes indicadores de acuerdo con la invención cada uno alineado bajo el gen *GADD45α* humano. Las fusiones de gen indicador *GADD45α-EGFP* de los plásmidos pEP-GD531, pEP-GD532 y pEP-GD533 se construyeron de tal modo que la longitud global de la fusión *GADD45α-EGFP* es idéntica al gen *GADD45α* nativo, como se muestra en la Figura 9. En los plásmidos pEP-GD531 y pEP-GD532, el ADN de *GADD45α* cadena abajo de la hEGFP se transcribe a ARNm así como la hEGFP en sí misma, y se somete a corte y empalme. En el plásmido pEP-GD533, solamente el gen de hEGFP se transcribe a ARNm. La transcripción se detiene en la señal de poliadenilación de SV40 antes de la secuencia del gen *GADD45α*. Estos plásmidos están de acuerdo con el primer aspecto de la invención. El casete de pEP-GD534 es mucho más corto y no incluye el motivo de p53 en el intrón 3 del gen *GADD45α*.

### 1.3 Selección y transfección de líneas celulares

Cuando se considera una línea celular como un huésped para un nuevo sistema indicador de daño de ADN de mamífero, era importante considerar la capacidad de la línea celular seleccionada para responder al daño genotóxico de una manera que permitiera la respuesta requerida del indicador. El estado de p53 y los efectos en genes cadena abajo de dos líneas celulares usadas habitualmente en biología molecular y/o toxicología genética se exploraron y este trabajo se describe en el presente documento. Estas líneas celulares fueron: - (i) TK6, una línea

celular linfoblastoide humana (p53 wt); y una línea hermana de TK6, (ii) WI-L2-NS (proteína p53 mutante).

Una proteína p53 disfuncional puede conducir a radiorresistencia aumentada (es decir, aumento de la supervivencia) y una sensibilidad aumentada a los efectos mutagénicos y clastogénicos de la radiación. Aunque estas propiedades hacen una línea celular adecuada para detectar criterios de valoración de mutación, las mismas propiedades implican que la inducción de biomarcadores sustitutos para daño de ADN en una línea celular con un estado de p53 mutante sería en el mejor de los casos escasa. Para este fin, se eligió la línea celular TK6 para el biosensor (es decir, una célula de acuerdo con el tercer aspecto de la invención). Se cree que pueden obtenerse datos adicionales de interés científico del uso de sus líneas celulares hermanas con el vector indicador *GADD45α-EGFP* recombinante.

Las células TK6 se transfectan con los vectores por electroporación usando un método adaptado de Xia y Liber [Methods in Molecular Biology, Vol.48: Animal Cell Electroporation and Electrofusion Protocols, 1995. Editado por J.A. Nickoloff. Humana Press Inc., Totowa, NJ, Estados Unidos, páginas 151-160], y se seleccionan clones que porten los plásmidos indicadores durante dos semanas con higromicina B.

Las células TK6 transformadas con pEP-GAD532 se denominan en el presente documento GenTK-T01. También se produjo una línea celular de control equivalente, denominada GenTK-C01, en la que el gen indicador de GFP se colocó deliberadamente fuera de fase. En consecuencia no podía expresarse GFP a partir de esta línea celular de control.

#### **1.4 El medio de ensayo - RPMI modificado**

Puede usarse medio convencional en los métodos de la invención. Sin embargo los inventores han descubierto que muchos medios de cultivo celular tradicionales son autofluorescentes a las longitudes de onda asociadas con excitación de *EGFP* (488 nm máximo) y emisión (520 nm máximo). En el presente trabajo, se descubrió que el principal factor que contribuía a esta fluorescencia era la vitamina riboflavina. Se prefiere por lo tanto que se use un medio de baja autofluorescencia modificado.

Pueden producirse varios de dichos medios y, por ejemplo, los inventores desarrollaron un medio RPMI 1640 de baja autofluorescencia modificado (véase Tabla 1). Este medio representa un medio preferido para su uso de acuerdo con el quinto aspecto de la invención que no contiene ninguna riboflavina, y puede usarse con el biosensor, para facilitar la lectura de fluorescencia directa de cultivos biosensores.

Tabla 1: Concentraciones de trabajo de componentes de un medio de cultivo celular de mamífero con baja autofluorescencia.

Componente	mg/l
<b>Sales inorgánicas:</b>	
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> • 4H <sub>2</sub> O	100,00
KCl	400,00
MgSO <sub>4</sub> (anhid.)	48,84
NaCl	6.000,00
NaHCO <sub>3</sub>	2.000,00
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (anhid.)	800,00
<b>Otros componentes:</b>	
D-glucosa	2.000,00
Glutación (reducido)	1,00
<b>Aminoácidos:</b>	
L-Arginina HCl	241,86
L-Asparagina (base libre)	50,00
L-Ácido aspártico	20,00
L-cistina • 2HCl	65,20
L-Ácido glutámico	20,00
Glicina	10,00
L-Histidina (base libre)	15,00
L-Hidroxiprolina	20,00
L-Isoleucina	50,00
L-Leucina	50,00
L-Lisina • HCl	40,00
L-Metionina	15,00

Componente	mg/l
L-Fenilalanina	15,00
L-Prolina	20,00
L-Serina	30,00
L-Treonina	20,00
L-Triptófano	5,00
L-Tirosina (sal disódica)	28,83
L-Valina	20,00
<b>VITAMINAS:</b>	
D-Biotina	0,20
D-Pantotenato de Ca	0,25
Cloruro de colina	3,00
Ácido Fólico	1,00
i-inositol	35,00
Nicotinamida	1,00
Acido para-aminobenzoico	1,00
Piridoxal HCl	1,00
Tiamina HCl	1,00
Vitamina B <sub>12</sub>	0,005

### **1.5 El método de análisis - Lector de microplacas**

Se recogieron datos de fluorescencia y absorbancia de microplacas usando el lector de microplacas Tecan Ultra-384 (Tecan UK Ltd.): excitación 485 nm/emisión 535 nm con un espejo dicróico adicional (reflectancia 320 nm - 500 nm, transmisión 520 nm - 800 nm). La absorbancia se midió a través de un filtro de 620 nm. Los datos se transportaron a una hoja de cálculo de Microsoft Excel, y se convirtieron a datos gráficos. Los datos de absorbancia dan una indicación de la reducción en el potencial proliferativo y estos datos se normalizaron para el control no tratado (= 100 % de crecimiento). Los datos de fluorescencia se dividieron por los datos de absorbancia para proporcionar las "unidades de brillo", la medida de la inducción de GFP media por célula. Estos datos se normalizaron para el control no tratado (= 1). De este modo, se puede distinguir entre un número pequeño de células altamente fluorescentes y un número grande de células débilmente fluorescentes. Para corregir con respecto a auto-fluorescencia celular inducida y fluorescencia de compuestos intrínseca, se restaron los valores de brillo para la línea celular TK6 no transfectada de las cinco líneas celulares que portaban un plásmido indicador. Esto hace la evaluación visual de los datos más fiable. Todos los datos se comprobaron con y sin esta corrección. A partir de estos datos de "brillo" se calcularon las relaciones de inducción de fluorescencia.

### **1.6 Inducción de MMS del biosensor**

Como un ejemplo de inducción indicadora, se trataron seis líneas celulares (TK6, sin un plásmido, y que portaban uno de los cinco plásmidos indicadores) con diversas concentraciones de MMS. MMS se conoce por los expertos en la materia como un agente genotóxico y citotóxico y puede usarse como un control positivo cuando se usa el método de la invención.

Se incubaron  $1 \times 10^6$  células en 1 ml de medio RPMI 1640 modificado (véase 1.4 anterior) + suero de caballo 10 % durante una noche (37 °C, CO<sub>2</sub> 5 %, humedad del 100 %) con MMS 0 µg/ml, 6,25 µg/ml, 12,5 µg/ml y 25 µg/ml.

Después de la incubación, las células se lavaron en PBS, se resuspendieron en 300 µl de PBS y después se dividieron en dos pocillos de una microplaca de fondo transparente, negra, de 96 pocillos. Por ejemplo Matrix ScreenMates, Cat. N° 4929, Apogent Discoveries, Estados Unidos o Corning (BV, Países Bajos: Cat N° 3651). Se registraron las lecturas de fluorescencia y absorbancia y se calcularon las relaciones de inducción de fluorescencia.

Esto se repitió tres veces y se calcularon las inducciones medias y los errores típicos. Los resultados se ilustran en la Figura 10.

Con referencia a la Figura 11, se muestran los valores de brillo no procesados de las cinco líneas celulares indicadoras y la línea celular no transfectada parental TK6. Se calcularon los valores de brillo para cada combinación de línea celular-MMS midiendo la fluorescencia de GFP total y normalizando después esta con la absorbancia a 620 nm. De este modo, se apreciará que cada uno de los plásmidos pEP-GD531, pEP-GD532 y pEP-GD533 muestra un aumento de la fluorescencia de fondo en comparación con la línea celular parental no transfectada TK6, y estas líneas celulares mostraron un grado sustancial de aumento dependiente de dosis de la fluorescencia en la línea celular humana TK6 cuando se trataron con MMS. Por el contrario aunque las líneas celulares que portan el

plásmido pEP-GD500 o pEP-GD534 muestran un aumento de la fluorescencia de fondo en comparación con TK6, esta fluorescencia no se induce adicionalmente por el tratamiento con MMS. Aunque los inventores no desean quedar ligados a ninguna hipótesis, creen que la adición de la región no traducida 3' de GADD45 $\alpha$  en el plásmido pEP-GD534 estabiliza el ARNm resultante, que conduce a un nivel de fluorescencia de fondo mayor en líneas celulares que porten este plásmido en comparación con líneas celulares que porten el plásmido pEP-GD500.

En conclusión, la presente invención usa las secuencias reguladoras del gen inducible por daño de ADN humano GADD45 $\alpha$  para controlar la producción de EGFP en la línea celular linfoblastoide humana natural para p53 TK6. El gen humano GADD45 $\alpha$  estimula la reparación de escisión de ADN *in vitro* e inhibe la entrada de células en la fase S. Los indicadores de acuerdo con la invención no solamente usan el promotor cadena arriba del gen GADD45 $\alpha$  sino que también incorporan los elementos reguladores génicos hallados dentro de la secuencia genómica del gen en sí misma. Esta incluye un sitio de unión a p53 potencial en el tercer intrón del gen GADD45 $\alpha$ . Sorprendentemente, el uso de estas secuencias potencia la respuesta de los biosensores a tensión genotóxica. Este sistema indicador puede analizarse con respecto a inducción de fluorescencia después de solamente 24 horas simplemente midiendo la fluorescencia del cultivo de ensayo. Las células pueden someterse a un agente, y la expresión de la proteína indicadora emisora de luz (GFP) de la célula indica que los agentes provocan daño de ADN. Se cree que este biosensor tiene aplicaciones en exploración farmacológica pre-reguladora a corto plazo.

### **Ejemplo 2**

Se realizaron experimentos adicionales para evaluar los efectos de la auto-fluorescencia provocada por medios convencionales para que puedan desarrollarse medios preferidos para su uso en el método de acuerdo con el cuarto aspecto de la invención.

Se usaron las construcciones, células y protocolos descritos en el Ejemplo 1 a no ser que se indique lo contrario.

Además de riboflavina (véase 1.4) los inventores establecieron que un segundo factor de contribución importante a la auto-fluorescencia del medio de cultivo celular fue rojo fenol (un colorante indicador de pH usado habitualmente en el medio de cultivo). La fluorescencia del rojo de fenol también varía con el pH. Por lo tanto se prefiere que el medio usado de acuerdo con la invención se formule como un medio de auto-fluorescencia baja modificado, por lo que se omita rojo fenol o riboflavina, pero preferentemente tanto rojo fenol como riboflavina (véase Tabla 1).

En referencia a la Figura 12, el uso de medio RPMI 1640 convencional redujo las relaciones de señal de fluorescencia y ruido, y aumentó la variabilidad de las mediciones de fluorescencia. En consecuencia el uso de medio RPMI 1640 normal no fue óptimo para lecturas de fluorescencia directas. Por el contrario, el uso de un medio de cultivo celular de baja auto-fluorescencia modificado (correspondiente a medio normal excepto que se omitió riboflavina y rojo fenol) facilitó la medición directa de lecturas de fluorescencia inducida por genotoxina.

En referencia a la Figura 13, se descubrió que la omisión tanto de riboflavina como de rojo fenol del medio dio como resultado un medio de auto-fluorescencia baja que no afectó al crecimiento celular durante 96 horas, y cuatro divisiones celulares. En consecuencia dicho medio es un medio preferido para uso de acuerdo con el quinto aspecto de la invención.

Se apreciará por lo tanto que se prefiere que el medio usado en el método de acuerdo con el cuarto aspecto de la invención pueda comprender medio convencional (por ejemplo, RPMI 1640) pero esté preferentemente modificado, de acuerdo con el quinto aspecto de la invención, de modo que no contenga rojo fenol o riboflavina.

### **Ejemplo 3**

Se realizó trabajo de desarrollo adicional para desarrollar un protocolo más preferido para realizar el método de acuerdo con el cuarto aspecto de la invención en placas de 96 pocillos.

Se usaron las construcciones, células y protocolos descritos en el Ejemplo 1 a no ser que se indique lo contrario.

Un método preferido para ensayar con respecto a daño de ADN de acuerdo con el cuarto aspecto de la invención comprende las etapas de: (1) preparar una microplaca para su uso en un ensayo; (2) realizar el ensayo en las microplacas; (3) recoger y analizar los datos; y (4) realizar una valoración sobre el daño de ADN y las consecuencias.

Se proporcionan a continuación detalles de las etapas (1) - (4) para realizar un ensayo más preferido con respecto a daño de ADN.

#### **3.1 Preparación de microplacas.**

Se llevaron a cabo ensayos en placas de fondo transparente, negras, de 96 pocillos. Por ejemplo Matrix

ScreenMates, Cat. N° 4929, Apogent Discoveries, Estados Unidos o Corning (BV, Países Bajos: Cat. N° 3651). Se evaluaron varias microplacas alternativas, aunque se descubrió que la absorbancia y fluorescencia de fondo variable tanto dentro de como entre las placas de fabricantes individuales eran variables y en varios casos inaceptables. Se apreciará por lo tanto que las microplacas usadas de acuerdo con la invención tienen preferentemente absorbancia y fluorescencia uniformes entre placas y lotes de las mismas. Se apreciará que un experto en la materia debería considerarlo cuidadosamente cuando seleccione una microplaca adecuada.

Las placas de ensayo pueden llenarse usando un robot de manipulación de líquidos. Por ejemplo la sonda individual MicroLabS, de Hamilton GB Ltd, Birmingham o un robot de 8 sondas Genesis (Tecan Reino Unido Ltd. Theale. Reino Unido). Las microplacas también pueden cargarse rápida y eficazmente usando una pipeta multicanal.

### **3.2 Ensayo**

Puede seguirse el siguiente protocolo convencional. Se preparó una reserva de 2 mM o 1000 µg/ml (lo que sea menor) de un producto químico de ensayo, o muestra que contuviera un agente que potencialmente provoque daño de ADN, en DMSO acuoso 2 % v/v, y se usó para realizar 2 series de diluciones idénticas a través de una microplaca de 96 pocillos y un "control" (véase posteriormente). Para conseguir esto, se pusieron 150 microlitros de la solución química de ensayo en 2 pocillos de microplacas. Cada muestra se diluyó en serie transfiriendo 75 microlitros a 75 microlitros de DMSO 2 %, mezclando y después sacando 75 microlitros y pasándolos al siguiente pocillo. Esto produjo 9 diluciones en serie de 75 microlitros cada una. La concentración superior final de producto químico de ensayo/muestra es 1 mM o 500 µg/ml en la microplaca.

Se añadieron controles como sigue:

- a. Compuesto de ensayo/agente que contiene muestra en medio de ensayo solamente, para proporcionar información sobre la absorbancia/fluorescencia del compuesto.
- b. Cultivos celulares humanos diluidos con DMSO 1 % solamente, para proporcionar una medida del potencial proliferativo máximo.
- c. MMS como un control de genotoxicidad y citotoxicidad: "alto" = 50 µg/ml, "bajo" = 10 µg/ml v/v
- d. Diluyente de DMSO 2 % solamente, para confirmar la falta de absorbancia/fluorescencia del diluyente.
- e. Medio de cultivo solamente, para confirmar la esterilidad/falta de contaminación.

Se lavaron cultivos en crecimiento exponencial de líneas celulares de acuerdo con la invención (por ejemplo, GenTK-C01 y GenTK-T01) en D-PBS y se suspendieron a una densidad de  $2 \times 10^6$  células/ml en medio de ensayo de baja autofluorescencia de doble fuerza de acuerdo con la invención. Se añadieron 75 microlitros de la suspensión celular a cada pocillo del producto químico diluido: GenTK-C01 a una serie y GenTK-T01 a la segunda, y a patrones y controles apropiados. Después de llenarse las placas, se sellaron usando una membrana permeable al gas (por ejemplo Breath-easy, Diversified Biotech, Estados Unidos) o una tapa de plástico, y después se incubó sin agitación, durante 24 horas a 37 °C, CO<sub>2</sub> 5 %, humedad del 95%.

### **3.3 Recogida y manipulación de datos.**

Después de 24 horas de incubación, se recogieron datos de fluorescencia y absorbancia de las microplacas. Se han usado dos lectores de microplacas diferentes que combinan funcionalidad de fluorescencia y de absorbancia, y se obtuvieron datos comparables. Estos fueron un Tecan Ultra-384 (Tecan Reino Unido Ltd.): excitación 485 nm/emisión 535 nm con un espejo dicróico adicional (reflectancia 320 nm - 500 nm, transmisión 520 nm - 800 nm) y un Wallac Victor2 (PerkinElmer Life and Analytical Sciences, Monza, Italia): excitación 485 nm/emisión 535 nm. La absorbancia se midió a través de un filtro de 620 nm en ambos instrumentos. Las microplacas se volvieron a sellar usando una membrana permeable al gas (por ejemplo Breath-easy, Diversified Biotech, Estados Unidos) o una tapa de plástico, y después se incubaron sin agitación, durante 24 horas adicionales a 37 °C, CO<sub>2</sub> 5 %, humedad del 95 %. Se recogieron después mediciones de absorbancia y fluorescencia adicionales. Los datos se transportaron a una hoja de cálculo de Microsoft Excel, y se convirtieron a datos gráficos (véase datos típicos en las Figuras 14 y 15 para el Ejemplo 2). El procesamiento de datos es mínimo: los datos de absorbancia proporcionan una indicación de la reducción del potencial proliferativo y estos datos se normalizaron para el control no tratado (= 100 % de crecimiento). Los datos de fluorescencia se dividieron por los datos de absorbancia para proporcionar "unidades de brillo", la medida de la inducción de GFP media por célula. Estos datos se normalizaron para el control no tratado (= 1). De este modo, se puede distinguir entre un número pequeño de células altamente fluorescentes y un gran número de células débilmente fluorescentes. Para corregir con respecto a auto-fluorescencia celular inducida y fluorescencia de compuesto intrínseca, se restaron los valores de brillo para la línea celular GenTK-C01 de las de GenTK-T01. Esto hace la evaluación visual de los datos más fiable. Todos los datos se comprobaron con y sin esta corrección, y la decisión (véase posteriormente), de si un compuesto se clasificaba o no como genotóxico, no se vio afectada.

### **3.4 Umbrales de decisión.**

Es útil tener claras definiciones de los resultados positivos y negativos de los ensayos rutinarios y dichas

definiciones se han derivado, teniendo en cuenta el ruido máximo en el sistema y los datos de los productos químicos donde hay un claro consenso sobre la genotoxicidad y el mecanismo de acción. Naturalmente también es posible para los usuarios inspeccionar los datos numéricos y gráficos y extraer sus propias conclusiones. Por ejemplo una tendencia al alza en los datos de genotoxicidad que no cruce el umbral podría distinguir aún dos compuestos. El umbral de decisión se estableció como sigue:

El umbral de citotoxicidad se estableció a 80 % de la densidad celular alcanzada por las células de control no tratadas. Esto es más de 3 veces la desviación típica del fondo. Se concluye un resultado de citotoxicidad positivo (+) si 1 o 2 diluciones del compuesto producen una densidad celular final menor del umbral del 80 %. Se concluye un resultado de citotoxicidad positivo fuerte (++) cuando (i) tres o más diluciones del compuesto producen una densidad celular final menor del umbral del 80 % o (ii) al menos una dilución de compuesto produce una densidad celular final menor de un umbral del 60 %. Se concluye un resultado negativo (-) cuando ninguna dilución del compuesto produce una densidad celular final menor del umbral del 80 %. La menor concentración eficaz (LEC) es la menor concentración de compuesto de ensayo que produce una densidad celular final por debajo del umbral del 80 %.

El control de absorbancia del compuesto permite que se genere una advertencia si un compuesto de ensayo es significativamente absorbente. Si la relación de la absorbancia del pocillo de control del compuesto y un pocillo cargado con medio solamente es  $> 2$ , hay un riesgo de interferencia con la interpretación. Los controles de citotoxicidad indican que las líneas celulares se comportan normalmente. El patrón de MMS "alto" debería reducir la densidad celular final a menos del umbral del 80 %, y debería ser un valor menor que el patrón "bajo".

El umbral genotóxico se establece a una inducción de GFP relativa de 1,5 (es decir, un aumento del 50 %). Esto es más de 3 veces la desviación típica del fondo. Se concluye un resultado de genotoxicidad positivo (+) si 1 o 2 diluciones del compuesto producen una inducción de GFP relativa mayor del umbral de 1,5. Se concluye un resultado de genotoxicidad positivo fuerte (++) si (i) tres o más diluciones de compuesto producen una inducción de GFP relativa mayor del umbral de 1,5 o (ii) al menos una dilución de compuesto produce una inducción de GFP relativa mayor de un umbral de 1,8. Se concluye un resultado de genotoxicidad negativa (-) cuando ninguna dilución de compuesto produce una inducción de GFP relativa mayor del umbral de 1,5. La LEC es la menor concentración de compuesto de ensayo que produce una inducción de GFP relativa mayor del umbral de 1,5. Los controles genotóxicos demuestran que las líneas celulares responden de forma normal al daño de ADN. El patrón de MMS "alto" debe producir una inducción de fluorescencia  $> 2$ , y ser un valor mayor que el patrón de MMS "bajo". Se generan datos de brillo anómalos cuando la toxicidad conduce a una densidad celular final menor del 30 % de la del blanco. No se calculan datos de genotoxicidad por encima de este umbral de toxicidad. Los compuestos que dieron resultado negativo para genotoxicidad, se volvieron a ensayar hasta 10 mM o 5000  $\mu\text{g/ml}$ , o hasta el límite de solubilidad o citotoxicidad.

El control de fluorescencia del compuesto permite que se genere una advertencia cuando un compuesto es altamente auto-fluorescente. Si la relación de la fluorescencia del pocillo de control del compuesto y un pocillo cargado con medio es  $> 5$ , hay un riesgo de interferencia con la interpretación. En estos casos, puede usarse polarización de fluorescencia para distinguir GFP de otras fuentes de fluorescencia (Knight *et al.*, 2000, 2002). El instrumento Tecan tiene esta función. Ocasionalmente, los compuestos aunque no sean fluorescentes en sí mismos, inducen autofluorescencia celular. Esto resulta evidente a partir del brillo creciente en la línea celular de control (GenTK-C01) en ausencia de fluorescencia del control solamente de productos químicos. La resta rutinaria de GenTK-C01 de los datos GenTK-T01 elimina esta interferencia de los datos.

#### Ejemplo 4

Se realizó trabajo de desarrollo adicional para desarrollar otro protocolo más preferido para realizar el método de acuerdo con el cuarto aspecto de la invención en placas de 24 pocillos con y sin activación metabólica de S9.

S9 es un extracto de hígado (conocido por los expertos en la materia) que hace posible diferenciar entre compuestos genotóxicos y algunos compuestos no genotóxicos que pueden alterarse químicamente por el metabolismo de los hepatocitos para generar un compuesto genotóxico *in vivo*.

Se usaron las construcciones, células y protocolos descritos en el Ejemplo 1 a no ser que se indique lo contrario.

Un método preferido para ensayar con respecto al daño de ADN de acuerdo con el cuarto aspecto de la invención comprende las etapas de: (1) preparar una placa de 24 pocillos para su uso en un ensayo con activación metabólica; (2) realizar el ensayo en placas de 24 pocillos y procesar las muestras a placas de 96 pocillos, (3) recoger y analizar los datos; y (4) realizar una valoración sobre el daño de ADN y las consecuencias.

Se proporcionan a continuación detalles de las etapas (1) - (4) para realizar un ensayo más preferido para el daño de ADN.

**4.1 Preparación de microplacas.**

Se llevaron a cabo ensayos en placas de 24 pocillos (Corning BV, Schiphol-Rijk Países Bajos) y microplacas de fondo transparente, negras, de 96 pocillos. Por ejemplo Matrix ScreenMates, Cat. N° 4929, Apogent Discoveries, Estados Unidos o Corning (BV, Países Bajos: Cat. N° 3651). Se evaluaron varias microplacas alternativas, aunque la absorbancia y fluorescencia de fondo variables tanto dentro de como entre las placas de fabricantes individuales fueron generalmente inaceptables, lo que condujo a la elección preferida actualmente. Se apreciará por lo tanto que las microplacas usadas de acuerdo con la invención tienen preferentemente absorbancia y fluorescencia uniformes entre placas y lotes de las mismas.

Las placas de ensayo pueden cargarse usando un robot de manipulación de líquidos. Por ejemplo, la sonda individual MicroLabS, de Hamilton GB Ltd, Birmingham o un robot de 8 sondas Genesis (Tecan Reino Unido Ltd. Theale. Reino Unido). Las microplacas también pueden cargarse rápida y eficazmente usando una pipeta multicanal.

**4.2 Ensayo**

Puede seguirse el siguiente protocolo convencional. En cada fila de una placa de 24 pocillos se añadió 1 ml de las siguientes combinaciones de medios de líneas celulares a cada pocillo:

- i)  $1 \times 10^6$  células/ml de GenTK-C01 en medio RPMI 1640
- ii)  $1 \times 10^6$  células/ml de GenTK-T01 en medio RPMI 1640
- iii)  $1 \times 10^6$  células/ml de GenTK-C01 en medio RPMI 1640 + mezcla de S9 10 %
- iv)  $1 \times 10^6$  células/ml de GenTK-T01 en medio RPMI 1640 + mezcla S9 10 %

El medio RPMI 1640 es preferentemente un medio modificado como se define por el quinto aspecto de la invención (por ejemplo, el medio desvelado en la Tabla 1).

Se preparó una reserva de 100 mg/ml de un producto químico de ensayo, o muestra, que contenía un agente que provocaba potencialmente daño de ADN en DMSO acuoso al 100 % v/v, y se usó para realizar 4 series de diluciones idénticas a través de una microplaca de 24 pocillos y un "control" (véase posteriormente). Para conseguir esto, se pusieron 200 microlitros de la solución química de ensayo en un frasco de vidrio de 7 ml estéril o tubo de microcentrifuga de 1,5 ml. Cada muestra se diluyó en serie transfiriendo 100 microlitros a 100 microlitros de DMSO 100 %, mezclando y después sacando 100 microlitros y pasándolos al siguiente pocillo. Esto produjo 3 diluciones en serie de 100 microlitros cada una. Para cada pocillo de una placa de 24 pocillos la concentración superior final de producto químico de ensayo/muestra es de 1 mg/ml en la placa de 24 pocillos.

Se añadieron controles como sigue:

- a. Cultivos celulares humanos diluidos con 10  $\mu$ l de DMSO 100 % solamente, para proporcionar una medida de potencial proliferativo máximo.
- b. Ciclofosfamida como un control de genotoxicidad y citotoxicidad positivo a 30  $\mu$ g/ml en presencia de S9.

Después de llenarse las placas, se sellaron usando una membrana permeable al gas (por ejemplo Breath-easy, Diversified Biotech, Estados Unidos) o una tapa de plástico, y después se incubaron sin agitación, durante 24 horas a 37 °C, CO<sub>2</sub> 5 %, humedad del 95 %. Después de 24 horas de incubación las células se transfirieron a tubos de microcentrifuga de 1,5 ml y se recogieron por centrifugación a 2.500 rcf durante 5 minutos. Las células se lavaron en 500  $\mu$ l de D-PBS precalentado (Sigma-Aldrich, Gillingham, Reino Unido) y se recogieron por centrifugación como antes. Las células se resuspendieron en 150  $\mu$ l de D-PBS, y las suspensiones celulares se transfirieron a un pocillo de una microplaca de 96 pocillos de poliestireno negra, de fondo ópticamente transparente (Matrix Technologies, Wilmslow, Reino Unido). Como blancos, se añadieron 150  $\mu$ l de D-PBS a 2 pocillos.

**4.3 Recogida y manipulación de datos.**

Después de transferir las suspensiones celulares a placas de 96 pocillos se recogieron datos de fluorescencia y absorbancia. Se han usado dos lectores de microplacas diferentes que combinan funcionalidad de fluorescencia y absorbancia, y se obtuvieron datos comparables. Estos fueron un Tecan Ultra-384 (Tecan Reino Unido Ltd.): excitación 485 nm/emisión 535 nm con un espejo dicróico adicional (reflectancia 320 nm - 500 nm, transmisión 520 nm - 800 nm), y un Wallac Victor2 (PerkinElmer Life and Analytical Sciences, Monza, Italia): excitación 485 nm/emisión 535 nm. Se midió la absorbancia a través de un filtro de 620 nm en ambos instrumentos. Los datos se transportaron a una hoja de cálculo de Microsoft Excel y se convierten a datos gráficos (véase datos típicos en las Figuras 16 y 17 para el Ejemplo 3). El procesamiento de datos es mínimo: los datos de absorbancia proporcionan una indicación de la reducción del potencial proliferativo y estos datos se normalizaron para el control no tratado (= 100 % de crecimiento). Los datos de fluorescencia se dividieron por los datos de absorbancia para proporcionar "unidades de brillo", la medida de la inducción de GFP media por célula. Estos datos se normalizaron para el control no tratado (= 1). De esta manera, se puede distinguir entre un número pequeño de células altamente fluorescentes y

un número grande de células débilmente fluorescentes. Para corregir con respecto a autofluorescencia celular inducida y fluorescencia de compuesto intrínseca, los valores del brillo para la línea celular GenTK-C01 se restaron de los de GenTK-T01. Esto hace la evaluación visual de los datos más fiable. Todos los datos se comprobaron con y sin esta corrección, y la decisión (véase posteriormente), sobre si un compuesto se clasificó o no como genotóxico, no se vio afectada.

#### 4.4 Umbrales de decisión

Es útil tener definiciones claras de resultados positivos y negativos de ensayos rutinarios y dichas definiciones se han derivado, teniendo en cuenta el ruido máximo en el sistema y los datos de productos químicos donde hay un claro consenso sobre genotoxicidad y mecanismo de acción. Naturalmente también es posible para los usuarios inspeccionar los datos numéricos y gráficos y extraer sus propias conclusiones. Por ejemplo una tendencia al alza en los datos de genotoxicidad que no cruzaron el umbral aún podría distinguir dos compuestos. Los umbrales de decisión se establecieron como sigue:

El umbral de citotoxicidad se establece al 80 % de la densidad celular alcanzada por las células de control no tratadas. Esto es más de 3 veces la desviación típica del fondo. Se concluye un resultado de citotoxicidad positivo (+) si 1 o 2 diluciones de compuesto producen una densidad celular final menor del umbral del 80 %. Se concluye un resultado de citotoxicidad positivo fuerte (++) cuando (i) tres o más diluciones de compuesto producen una densidad celular final menor del umbral de 80 % o (ii) al menos una dilución de compuesto produce una densidad celular final menor de un umbral del 60 %. Se concluye un resultado negativo (-) cuando ninguna dilución del compuesto produce una densidad celular final menor del umbral del 80 %. La menor concentración eficaz (LEC) es la menor concentración de compuesto de ensayo que produce una densidad celular final por debajo del umbral del 80 %.

El control de absorbancia del compuesto permite que se genere una advertencia si un compuesto de ensayo es significativamente absorbente. Si la relación de la absorbancia del pocillo de control del compuesto y un pocillo cargado solamente con medio es  $> 2$ , hay un riesgo de interferencia con la interpretación. Los controles de citotoxicidad indican que las líneas celulares se comportan de forma normal.

El umbral genotóxico se establece a una inducción de GFP relativa de 1,3 (es decir, un aumento del 30 %). Esto es más de 3 veces la desviación típica del fondo. Se concluye un resultado de genotoxicidad positivo (+) si 1 o 2 diluciones de compuesto producen una inducción de GFP relativa mayor del umbral de 1,3. Se concluye un resultado de genotoxicidad positivo fuerte (++) si (i) tres o más diluciones de compuesto producen una inducción de GFP relativa mayor del umbral de 1,3 o (ii) al menos una dilución de compuesto produce una inducción de GFP relativa mayor de un umbral de 1,6. Se concluye un resultado de genotoxicidad negativa (-) cuando ninguna dilución de compuesto produce una inducción de GFP relativa mayor del umbral de 1,3. La LEC es la menor concentración de compuesto de ensayo que produce una inducción de GFP relativa mayor del umbral de 1,3. Los controles genotóxicos demuestran que las líneas celulares responden de forma normal al daño de ADN. El patrón de ciclofosfamida debe producir una inducción de fluorescencia  $> 1,3$  con S9, y no produce una inducción de fluorescencia  $> 1,1$  sin S9. Se generan datos de brillo anómalos cuando la toxicidad conduce a una densidad celular final menor del 30 % de la del blanco. No se calculan datos de genotoxicidad por encima de este umbral de toxicidad. Los compuestos que dieron resultado negativo para genotoxicidad, se volvieron a ensayar hasta 10 mM o 5 µg/ml, o hasta el límite de solubilidad o citotoxicidad.

#### LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Gentronix Gentronix Ltd

<120> ENSAYOS GENOTÓXICOS

<130> PCB/AH/P89625PWO

<160> 5

<170> PatentIn versión 3.1

<210> 1

<211> 3516

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<220>

<221> Promotor de GADD45 alfa

<222> (4) .. (2254)

<223>

ES 2 435 401 T3

<220>  
 <221> UTR 5' de GADD45 alfa  
 <222> (2255) .. (2549)  
 <223>

5

<220>  
 <221> gen EGFP  
 <222> (2550) .. (3278)  
 <223>

10

<220>  
 <221> poli A de SV40  
 <222> (3432) .. (3482)  
 <223>

15

<400> 1

atcagatctt gggtagggca ctttaggact gtggttcatt tgaattgggtg taaacaatac	60
accggttcta ctgtectaca gcctccattc agatgactga agtcatggga ctttcagcat	120
agctagctga tgacagtgca tactatthttg tcccaaaatc cagttcaagc atggacatac	180
caataagagc ctaagctctt taaaggcaaa ggaccaggaa ttgtacagtt cttggtatag	240
aagaagacag gcaaaagtgt ttttgaacta acgttaaattg tgcaaatatgt tagaattcat	300
gcaatgcaca ggactgcagg attctgatat cttatttaac tctcaaattc tattcaactc	360
aataaacctt gactgtgctt ctactaaatg caggtattgt actaggagct gaggacacca	420
aactgatgaa gtccttctgt tcaagaaact cacatgattc cctaattctt tgtcagcttg	480
ctgtgatcac atthttcttc caagaacctc taagaaatgc ctagtggata gaaccttgga	540
gttccacgga acatattaac aatcgccaaa tgatgactca ggctagattg tgtaattcag	600
gttttgtctg caaaactgaa aatgcttcgg taacctacct aaatttcaat gttgaggaat	660
tctttaagaa agacatcaaa tgttaagatt taaggcatag atatgagata catagtcatg	720
cttaggtgaa ttatgcactg accatgacca thttctthtact caaatgttgt ccatggctga	780
caacacagtg aaaaaatgag tgcaaaatga caactcaaat aatgaacca gaaaacctat	840
cactthttctt thccacccaaa ttaagatcaa gagagctgga gaatatthttg tctagagtga	900
taaaaacata agggtagcaaa actthccaggt acctthtgag aaattacttc tgtgacctth	960
ggctgtacag caaccttaat aatgcaagca ctgthttgaa tgcaagcatg tgggagccat	1020
thttcaccact thtgatgact tcagttaggt taagaaatgt thttgcttht attgcataaa	1080
ccataaaaca aaggaagggga cthttgaaact actcagttag agtctatata thaaagthttg	1140

ES 2 435 401 T3

tttttcaaaa	atgtgtaact	accatttgca	gttttaaagg	tctgctttcc	acctacaagt	1200
tgccattatc	tcaaagggtga	aatttttagca	tatgactaaa	aacttcctat	agttacagct	1260
tcatgattca	gcatacaca	tcaataattc	acagtggagat	cataggaggc	tctctgtgga	1320
aggtaacgac	atacatacgt	taggaaagga	agcttagggc	atatcgagag	cattttgaat	1380
ttagacttgt	gggctgtgtg	ggtgtcagat	ggttgtctct	cagctgggtg	gcgtccagaa	1440
ggatccttgt	ttgggcaagg	ctctttgaga	aaggagaatc	tgggttgcca	gggattccca	1500
catgtggtca	ccagctcccc	acgcagacca	gctcacgatt	tcccagttac	accgggcagg	1560
tgggaaaccg	ttctgctttc	tgtggaaaag	attctaactt	ggttccttgc	catccctgaa	1620
tacaaacggg	ttggtttttc	ttttttcagc	ttccaaccct	tgcagctttc	caaaaataaa	1680
tcaaaccagc	catcagggca	ccgaaataat	actactgcta	ataagcagct	tgccttagac	1740
ttagataaac	aacacttctg	aggtaaactt	tgccccggag	gtctggagac	acttttttaa	1800
tgtaacctgc	ttactaataa	ttactagact	tcagtgcatt	aaccctggaa	atagatttta	1860
atagccacc	cttaaaacaa	aagacatgaa	aagataataa	gaaaaaagtg	ccgcaactat	1920
tatagaaaaa	cacttggcag	cctgcttcag	cccaagctga	ggccacctct	agcctctgct	1980
aaagcccccc	actcccaatg	gtccccgcca	accggataag	agtgcgcgcg	ggaccgcct	2040
tccccctctg	gcaccgcccc	cgcccccgcc	cctctggctc	gcctcccgcg	tggtcctcc	2100
cttttccgct	cctctcaacc	tgactccagg	agctggggtc	aaattgctgg	agcaggctga	2160
tttgcatagc	ccaatggcca	agctgcatgc	aatgaggcg	gaagggtggt	ggctgagggt	2220
tggcaggata	accccgagga	gccccgccc	ttgtcctcca	gtggctggta	ggcagtggct	2280
gggaggcagc	ggccccatta	gtgtcgtgcg	gcccgaggcg	aggcgaggtc	cggggagcga	2340
gagagcaagc	aaggcgggag	gggtggccgg	agctgcggcg	gctggcacag	gaggaggagc	2400
ccgggcgggc	gaggggcggc	cggagagcgc	cagggcctga	gctgccggag	cggcgcctgt	2460
gagtgagtgc	agaaagcagg	cgccccgcgc	ctagccgtgg	caggagcagc	ccgcacgccg	2520
cgctctctcc	ctgggcgacc	tgcagtttgc	aatatggcgc	gcctgggtgag	caagggcgag	2580
gagctgttca	ccgggggtgt	gcccactctg	gtcgagctgg	acggcgacgt	aaacggccac	2640
aagttcagcg	tgtccggcga	gggaggggc	gatgccacct	acggcaagct	gaccctgaag	2700
ttcatctgca	ccaccggcaa	gctgcccgtg	cctggccca	ccctcgtgac	caccctgacc	2760
tacggcgtgc	agtgtctcag	ccgctacccc	gaccacatga	agcagcacga	cttcttcaag	2820
tccgcatgca	ccgaaggcta	cgtccaggag	cgaccatct	tcttcaagga	cgacggcaac	2880
tacaagaccc	gcgcccagggt	gaagttcag	ggcgacaccc	tgggtgaaccg	catcgagctg	2940

ES 2 435 401 T3

```

aagggcatcg acttcaagga ggacggcaac atcctggggc acaagctgga gtacaactac 3000
aacagccaca acgtctatat catggccgac aagcagaaga acggcatcaa ggtgaacttc 3060
aagatccgcc acaacatcga ggacggcagc gtgcagctcg ccgaccacta ccagcagaac 3120
accccatcg gcgacggccc cgtgctgctg cccgacaacc actacctgag caccagtcc 3180
gccctgagca aagaccccaa cgagaagcgc gatcacatgg tctgctgga gttcgtgacc 3240
gccgcccggga tcaactctcg catggacgag ctgtacaagt aaagcggccg cgactctaga 3300
tcataatcag ccataccaca tttgtagagg ttttacttgc tttaaaaaac ctcccacacc 3360
tccccctgaa cctgaaacat aaaatgaatg caattgttgt tgttaacttg tttattgcag 3420
cttataatgg ttacaaataa agcaatagca tcacaaattt cacaaataaa gcattttttt 3480
cactgcattc tagttgtaa ttaatgcctc gagcgc 3516

```

- 5 <210> 2  
 <211> 5411  
 <212> ADN  
 <213> *Homo sapiens*
  
- 10 <220>  
 <221> promotor de GADD45 alfa  
 <222> (4) .. (2254)  
 <223>
  
- 15 <220>  
 <221> UTR 5' de GADD45 alfa  
 <222> (2255) .. (2549)  
 <223>
  
- 20 <220>  
 <221> Gen EGFP  
 <222> (2550) .. (3278)  
 <223>
  
- 25 <220>  
 <221> Exón 3 de GAD45 alfa  
 <222> (3405) .. (3642)  
 <223>
  
- 30 <220>  
 <221> Intrón 3 de GAD45 alfa  
 <222> (3643) .. (4715)  
 <223>
  
- 35 <220>  
 <221> motivo de p53  
 <222> (3830) .. (3849)  
 <223>
  
- 40 <220>  
 <221> motivo de AP-1  
 <222> (3879) .. (3885)  
 <223>
  
- 45 <220>  
 <221> Exón 4 de GAD45 alfa  
 <222> (4716) .. (5391)  
 <223>  
 <220>

ES 2 435 401 T3

<221> UTR 3' de GADD45 alfa  
 <222> (4830) .. (5391)  
 <223>

5 <400> 2

```

atcagatcctt ggggtggggca ctttaggact gtggttcatt tgaattggtg taaacaatac      60
accggttcta ctgtcctaca gcctccattc agatgactga agtcatggga ctttcagcat      120
agctagctga tgacagtgca tactattttg tcccaaatc cagttcaagc atggacatac      180
caataagagc ctaagctcct taaaggcaaa ggaccaggaa ttgtacagtt cttggtatag      240
aagaagacag gcaaaaagtgt ttttgaacta acgttaaattg tgcaatatgt tagaattcat      300
gcaatgcaca ggactgcagg attctgatat cttatttaac tctcaaattc tattcaactc      360
aataaacctt gactgtgctt ctactaaatg caggtattgt actaggagct gaggacacca      420
aactgatgaa gtccttgctg tcaagaaact cacatgattc cctaattcct tgtcagcttg      480
ctgtgatcac attttcttcc caagaacctc taagaaatgc ctagtggata gaaccttgga      540
gttccacgga acatattaac aatcgccaaa tgatgactca ggctagattg tgtaattcag      600
gttttgtctg caaaactgaa aatgcttcgg taacctacct aaatttcaat gttgaggaat      660
tctttaagaa agacatcaaa tgtaagatt taaggcatag atatgagata catagtcatg      720
cttaggtgaa ttatgcactg accatgacca tttctttact caaatgttgt ccatggctga      780
caacacagtg aaaaaatgag tgcaaaatga caactcaaat aatgaacca gaaaacctat      840
cacttttctt tccaccaaaa ttaagatcaa gagagctgga gaatattttg tctagagtga      900
taaaaacata aggggtgcaaa acttccaggt acctttgcag aaattacttc tgtgaccttt      960
ggctgtacag caaccttaat aatgcaagca ctgttttgaa tgcaagcatg tgggagccat     1020
tttcaccact tttgatgact tcagtaggtt taagaaatgt ttttgccttt attgcataaa     1080
ccataaaaca aaggaagga cttttgaact actcagtgag agtctatata ttaaagtttg     1140
tttttcaaaa atgtgtaact accatttgca gttttaaagg tctgctttcc acctacaagt     1200
tgccattatc tcaaaggtga aattttagca tatgactaaa aacttctat agttacagct     1260
tcatgattca gcatctaaca tcaataattc acagtgagat cataggaggc tctctgtgga     1320
aggtaacgac atacatacgt taggaaagga agcttagggc atatcgagag cattttgaat     1380
ttagacttgt gggctgtgtg ggtgtcagat ggttgtctct cagctggtgg gcgtccagaa     1440
ggatccttgt ttgggcaagg ctctttgaga aaggagaatc tgggttgcca gggattccca     1500
catgtggtca ccagctcccc acgcagacca gctcacgatt tcccagttac accgggcagg     1560
tgggaaaccg ttctgcttcc tgtggaaaag attctaactt ggttccttgc catccctgaa     1620
    
```

ES 2 435 401 T3

tacaaacggg ttggtttttc ttttttcagc ttccaaccct tgcagctttc caaaaataaa 1680  
tcaaaccagc catcagggca ccgaaataat actactgcta ataagcagct tcgcctagac 1740  
ttagataaac aacacttctg aggtaaactt tgccccggag gtctggagac acttttttaa 1800  
tgtaacctgc ttactaataa ttactagact tcagtgcatt aacctggaa atagatttta 1860  
atagccaccc cttaaaacaa aagacatgaa aagataataa gaaaaaagtg ccgcaactat 1920  
tatagaaaaa cacttggcag cctgcttcag cccaagctga ggccacctct agcctctgct 1980  
aaagccccc actoccaatg gtccccgcca accggataag agtgcgcgcg ggacccgcct 2040  
tcccctctcg gcaccgcccc cgcccccgcc cctcggctc gcctcccgcg tggctcctcc 2100  
ctttccgct cctctcaacc tgactccagg agctggggtc aaattgctgg agcaggctga 2160  
tttgcatagc ccaatggcca agctgcatgc aatgaggcg gaagggtggtt ggctgagggt 2220  
tggcaggata accccggaga gcggggccct ttgtcctcca gtggctggta ggcaagtggct 2280  
gggaggcagc ggcccaatta gtgtcgtgcg gcccggtggcg aggcgaggtc cggggagcga 2340  
gcgagcaagc aaggcgggag ggggtggccgg agctgcggcg gctggcacag gaggaggagc 2400  
ccgggcgggc gaggggcggc cggagagcgc cagggcctga gctgccggag cggcgccctgt 2460  
gagtgagtgc agaaagcagg cgcgcgcgcg ctagccgtgg caggagcagc ccgcacgccg 2520  
cgctctctcc ctgggcgacc tgcagtttgc aatatggcgc gcctggtgag caaggcgag 2580  
gagctgttca ccgggggtgt gcccatcctg gtcgagctgg acggcgacgt aaacggccac 2640  
aagttcagcg tgtccggcga gggcgagggc gatgccacct acggcaagct gaccctgaag 2700  
ttcatctgca ccaccggcaa gctgccctg ccttgccca cctcgtgac caccctgacc 2760  
tacggcgtgc agtgcttcag ccgctacccc gaccacatga agcagcacga cttcttcaag 2820  
tccgccatgc ccgaaggcta cgtccaggag cgcaccatct tcttcaagga cgacggcaac 2880  
tacaagaccc gcgccgaggt gaagtctgag ggcgacacc tgggtaaccg catcgagctg 2940  
aaggcatcg acttcaagga ggacggcaac atcctggggc acaagctgga gtacaactac 3000  
aacagccaca acgtctatat catggccgac aagcagaaga acggcatcaa ggtgaacttc 3060  
aagatccgcc acaacatcga ggacggcagc gtgcagctcg ccgaccacta ccagcagaac 3120  
accccatcg gcgacggccc cgtgctgctg ccgacaacc actacctgag caccctgctc 3180  
gccctgagca aagaccccaa cgagaagcgc gatcacatgg tctgctgga gttcgtgacc 3240  
gcccgggga tactctcgg catggacgag ctgtacaagt aaagcggccg cttctgcctg 3300  
tctcggaaag gaggggcga gcggggccgg cggcgacccc cagggacccg ggcagtgggt 3360  
gaggggccc gegcttctgc gctcactggc cccgcccgt gcccccagcg accccgataa 3420

ES 2 435 401 T3

cgtggtggtg tgcctgctgg cggcggacga ggacgacgac agagatgtgg ctctgcagat 3480  
 ccacttcacc ctgatccagg cgttttgctg cgagaacgac atcaacatcc tgcgcgtcag 3540  
 caaccggggc cggctggcgg agctcctgct cttggagacc gacgctggcc ccgcggcgag 3600  
 cgagggcgcc gagcagccc cggacctgca ctgogtgctg gtgacggtaa gggactgggg 3660  
 gactgcagcc tgcagggtag agccccgaa ggacgggagt cagggctggg ttgctgatt 3720  
 gtggatctgt ggtaggtggg ggtcaggagg gtggctgcct ttgtccgact agagtgtggc 3780  
 tggactttca gccgagatgt gctagtttca tcaccaggat tttctgtggt acagaacatg 3840  
 tctaagcatg ctggggactg ccagcagcgg aagagatccc tgtgagtcag cagtcagccc 3900  
 agctactccc tacctacatc tgcaactgct cccgtgacta attcctttag cagggcagat 3960  
 tagataaage caaatgaatt cctggctcac cctcattaa ggagtcagct tcattctctg 4020  
 ccagtcagag ctaaaaatag aaattgtgta ggagacaaac cttgttaatt ccctagaaat 4080  
 acattaagag gatagagtgg aatTTTTTTT ctctgcaatc ttgcattttt ttaatggctc 4140  
 TTTTTTTTTT tctgataaa aacctttggt aggtagggaa gttatgtttt caggggtaaa 4200  
 tgtgctactt ttgtcttcta aatTTTgctc tttttgact ggtctagtca agtgacagcc 4260  
 cgattatttt gctactcctt aaaagtacta ttctgtctct tggagtatgg ttgatggcaa 4320  
 ttccagttaa ctgctgtgca gctctcatct cattgtgcac acagcatgga aatctttctc 4380  
 aaaactgttt cactcaggtc agggtaacaa gtttggtaga gcaaaccggg gaatgatact 4440  
 ctcatgcaaa actgaacaga tatgcaaaac tatgtatgtg gttcagcttg ggttgcatgg 4500  
 gttcagactt tgcaatgtgt agtttaatag gtaattacc ttaacgcttt tgcagggaac 4560  
 ccaactacct tgaagaaact ttaatttttt tgtgcttcta atttgtctcc atgtcacata 4620  
 gccaaaatat agaatgttca agtgttttct cctcaaaagt ataattacta gaatatactg 4680  
 gtttttaaaa taagtttatt tttataaatt tgtttccaga atccacattc atctcaatgg 4740  
 aaggatcctg ccttaagtca acttatttgt ttttgccggg aaagtcgcta catggatcaa 4800  
 tgggttccag tgattaatct ccctgaacgg tgatggcatc tgaatgaaaa taactgaacc 4860  
 aaattgcact gaagtttttg aataccttt gtagtactc aagcagttac tocctacact 4920  
 gatgcaagga ttacagaaac tgatgccaaag gggctgagtg agttcaacta catgttctgg 4980  
 gggcccggag atagatgact ttgcagatgg aaagaggta aatgaagaa ggaagctgtg 5040  
 ttgaaacaga aaaataagtc aaaaggaaca aaaattacaa agaaccatgc aggaaggaaa 5100  
 actatgtatt aatttagaat ggttgagtta cattaaaata aaccaaatat gttaaagttt 5160

ES 2 435 401 T3

**aagtgtgcag ccatagtttg ggtatTTTTg gtttatatgc cctcaagtaa aagaaaagcc 5220**  
**gaaagggtta atcatatttg aaaaccatat tttattgtat ttgatgaga tattaattc 5280**  
**tcaaagtttt attataaatt ctactaagtt attttatgac atgaaaagtt atttatgcta 5340**  
**taaatTTTTt gaaacacaat acctacaata aactgggatg aataattgca tcatttctta 5400**  
**ttgtgtgctc g 5411**

5 <210> 3  
 <211> 5411  
 <212> ADN  
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>  
 <221> Promotor de GADD45 alfa  
 <222> (4) .. (2254)  
 <223>

15 <220>  
 <221> UTR 5' de GADD45 alfa  
 <222> (2255) .. (2549)  
 <223>

20 <220>  
 <221> Gen EGFP  
 <222> (2550) .. (3278)  
 <223>

25 <220>  
 <221> Exón 3 de GADD45 alfa  
 <222> (3405) .. (3642)  
 <223>

30 <220>  
 <221> Intrón 3 de GADD45 alfa  
 <222> (3643) .. (4715)  
 <223>

35 <220>  
 <221> motivo de p53  
 <222> (3830) .. (3849)  
 <223>

40 <220>  
 <221> Exón 4 de GAD45 alfa  
 <222> (4716) .. (5391)  
 <223>

45 <220>  
 <221> UTR 3' de GADD45 alfa  
 <222> (4830) .. (5391)  
 <223>

<400> 3

ES 2 435 401 T3

atcagatcct	gggtggggca	ctttaggact	gtggttcatt	tgaattggtg	taaacaatac	60
accggttcta	ctgtcctaca	gcctccattc	agatgactga	agtcatggga	ctttcagcat	120
agctagctga	tgacagtgca	tactatcttg	toccaaaatc	cagttcaagc	atggacatac	180
caataagagc	ctaagctcct	taaaggcaaa	ggaccaggaa	ttgtacagtt	cttggtatag	240
aagaagacag	gcaaaagtgt	ttttgaacta	acgttaaattg	tgcaatatgt	tagaattcat	300
gcaatgcaca	ggactgcagg	attctgatat	cttatttaac	tctcaaattc	tattcaactc	360
aataaacctt	gactgtgctt	ctactaaatg	caggtattgt	actaggagct	gaggacacca	420
aactgatgaa	gtccttgctg	tcaagaaact	cacatgattc	cctaattcct	tgtcagcttg	480

ES 2 435 401 T3

ctgtgatcac attttcttcc caagaacctc taagaaatgc ctagtggata gaaccttggg 540  
 gttccacgga acatattaac aatcgccaaa tgatgactca ggctagattg tgtaattcag 600  
 gttttgtctg caaaactgaa aatgcttcgg taacctacct aaatttcaat gttgaggaat 660  
 tctttaagaa agacatcaaa tgttaagatt taaggcatag atatgagata catagtcatg 720  
 cttaggtgaa ttatgcactg accatgacca tttctttact caaatgttgt ccatggctga 780  
 caacacagtg aaaaaatgag tgcaaatga caactcaaat aatgaacca gaaaacctat 840  
 cacttttctt ttccaccaa ttaagatcaa gagagctgga gaatattttg tctagagtga 900  
 taaaaacata agggtgcaaa acttccaggt acctttgcag aaattacttc tgtgacctt 960  
 ggctgtacag caaccttaat aatgcaagca ctgttttgaa tgcaagcatg tgggagccat 1020  
 tttcaccact tttgatgact tcagtaggtt taagaaatgt ttttgctttt attgcataaa 1080  
 ccataaaaca aaggaaggga cttttgaact actcagttag agtctatata ttaaagtttg 1140  
 tttttcaaaa atgtgtaact accatttgca gttttaaagg tctgctttcc acctacaagt 1200  
 tgccattatc tcaagggtga aattttagca tatgactaaa aacttccat agttacagct 1260  
 tcatgattca gcatctaaca tcaataattc acagttagat cataggaggc tctctgtgga 1320  
 aggtaacgac atacatacgt taggaaagga agcttagggc atatcgagag cattttgaat 1380  
 ttagacttgt gggctgtgtg ggtgtcagat ggttgtctct cagctgggtg gcgccagaa 1440  
 ggatccttgt ttgggcaagg ctctttgaga aaggagaatc tgggttgcca gggattccca 1500  
 catgtggtca ccagctcccc acgcagacca gctcacgatt tcccagttac accgggcagg 1560  
 tgggaaaccg ttctgctttc tgtggaaaag attctaactt ggttccctgc catccctgaa 1620  
 taaaaacggg ttggtttttc ttttttcagc ttccaacctc tgcagctttc caaaaataaa 1680  
 tcaaaccagc catcagggca cggaaataat actactgcta ataagcagct tgccttagac 1740  
 ttagataaac aacacttctg aggtaaactt tgccccggag gtctggagac acttttttaa 1800  
 tgtaacctgc ttactaataa ttactagact tcagtgcatt aaccttgga atagatttta 1860  
 atagccacc cttaaaacaa aagacatgaa aagataataa gaaaaaagtg ccgcaactat 1920  
 tatagaaaa cacttggcag cctgettcag cccaagctga ggccacctct agcctctgct 1980  
 aaagcccccc actcccaatg gtccccgcca accggataag agtgcgcgcg ggaccgcct 2040  
 tcccctctcg gcaaccgccc cgcctccgccc cctctggctc gcctcccgcg tggctcctcc 2100  
 cttttccgct cctctcaacc tgactccagg agctggggtc aaattgctgg agcaggctga 2160  
 tttgcatagc ccaatggcca agctgcatgc aatgaggcg gaagggtggt ggctgagggt 2220  
 tggcaggata accccggaga gcggggccct ttgtcctcca gtggctggta ggcagtggct 2280

ES 2 435 401 T3

gggaggcagc	ggcccaatta	gtgtcgtgcg	gcccgtggcg	aggcgaggtc	cggggagcga	2340
gcgagcaagc	aaggcgggag	gggtggcccg	agctgcggcg	gctggcacag	gaggaggagc	2400
ccgggcgggc	gaggggcggc	cggagagcgc	cagggcctga	gctgccggag	cggcgcctgt	2460
gagtgagtgc	agaaagcagg	cgccccgcgc	ctagccgtgg	caggagcagc	ccgcacgccg	2520
cgctctctcc	ctgggcgacc	tgcagtttgc	aatatggcgc	gcctggtgag	caagggcgag	2580
gagctgttca	ccggggtggt	gcccacctcg	gtcgagctgg	acggcgacgt	aaacggccac	2640
aagttcagcg	tgtccggcga	gggcgagggc	gatgccacct	acggcaagct	gaccctgaag	2700
ttcatctgca	ccaccggcaa	gctgcccgtg	ccctggccca	ccctcgtgac	caccctgacc	2760
tacggcgtgc	agtgtctcag	ccgtacccc	gaccacatga	agcagcacga	cttcttcaag	2820
tccgccatgc	ccgaaggcta	cgtccaggag	cgcaccatct	tcttcaagga	cgacggcaac	2880
tacaagacct	gcgccgaggt	gaagtctgag	ggcgacacct	tgggtaaccg	catcgagctg	2940
aagggcatcg	acttcaagga	ggacggcaac	atcctggggc	acaagctgga	gtacaactac	3000
aacagccaca	acgtctatat	catggccgac	aagcagaaga	acggcatcaa	ggtgaacttc	3060
aagatccgcc	acaacatcga	ggacggcagc	gtgcagctcg	ccgaccacta	ccagcagaac	3120
accccatcgc	gcgacggccc	cgtgctgctg	cccgacaacc	actacctgag	caccagctcc	3180
gccctgagca	aagaccccaa	cgagaagcgc	gatcacatgg	tcctgctgga	gttcgtgacc	3240
gccgccggga	tcactctcgg	catggacgag	ctgtacaagt	aaagcggccg	cgactctaga	3300
tcataatcag	ccataccaca	tttgtagagg	ttttacttgc	tttaaaaaac	ctccacacc	3360
tccccctgaa	cctgaaacat	aaaatgaatg	caattgttgt	tgttatcgcg	accccgataa	3420
cgtggtgttg	tgctgctggg	cggcggacga	ggacgacgac	agagatgtgg	ctctgcagat	3480
ccacttcacc	ctgatccagg	cgttttgctg	cgagaacgac	atcaacatcc	tgcgcgtcag	3540
caaccggggc	cggctggcgg	agctcctgct	cttgagacc	gacgctggcc	ccgcggcgag	3600
cgagggcgcc	gagcagcccc	cggacctgca	ctgcgtgctg	gtgacggtaa	gggactgggg	3660
gactgcagcc	tgcaaggtag	agccccggaa	ggacgggagt	cagggctggg	ttgcctgatt	3720
gtggatctgt	ggtaggtggg	ggtcaggagg	gtggctgcct	ttgtccgact	agagtgtggc	3780
tggactttca	gccgagatgt	gctagtttca	tcaccaggat	tttctgtggt	acagaacatg	3840
tctaagcatg	ctggggactg	ccagcagcgg	aagagatccc	tgtgagtcag	cagtcagccc	3900
agctactccc	tacctacatc	tgcaactgct	cccgtgacta	attcctttag	cagggcagat	3960
tagataaagc	caaatgaatt	cctggctcac	ccctcattaa	ggagtcagct	tcattctctg	4020

ccagtcagag ctaaaaatag aaattgtgta ggagacaaac cttgttaatt ccctagaaat 4080  
 acattaagag gatagagtgg aatktttttt ctctgcaatc ttgcattttt ttaatggctc 4140  
 tttttttttt tcctgataaa aaccttttgg aggtagggaa gttatgtttt caggggtaaa 4200  
 tgtgctactt ttgtcttcta aattttgctc ttttttgact ggtctagtca agtgacagcc 4260  
 cgattatfff gctactcctt aaaagtacta ttctgtctct tggagtatgg ttgatggcaa 4320  
 ttccagttaa ctgctgtgca gctctcatct cattgtgcac acagcatgga aatctttctc 4380  
 aaaactgfff cactcaggtc agggtaacaa gtttggtaga gcaaaccggt gaatgatact 4440  
 ctcatgcaaa actgaacaga tatgcaacaa tatgtatgtg gttcagcttg ggttgcattg 4500  
 gttcagactt tgcaatgtgt agtttaatag gtaattaccc ttaacgcttt tgcaggggaa 4560  
 ccaactacct tgaagaaact ttaatfffft tgtgcttcta atttgtctcc atgtcacata 4620  
 gccaaaatat agaatgttca agtgttttct cctcaaaagt ataattacta gaatatactg 4680  
 gtttttaaaa taagtttatt ttataaaatt tgtttccaga atccacattc atctcaatgg 4740  
 aaggatcctg ccttaagtca acttatttgt ttttgccggg aaagtcgcta catggatcaa 4800  
 tgggttcag tgattaatct ccctgaacgg tgatggcatc tgaatgaaaa taactgaacc 4860  
 aaattgcact gaagtttttg aaataccttt gtagttactc aagcagttac tccctacact 4920  
 gatgcaagga ttacagaaac tgatgccaag gggctgagtg agttcaacta catgttctgg 4980  
 gggcccggag atagatgact ttgcagatgg aaagaggtga aaatgaagaa ggaagctgtg 5040  
 ttgaaacaga aaaataagtc aaaaggaaca aaaattacaa agaaccatgc aggaaggaaa 5100  
 actatgtatt aatrtagaat ggtrgagtta cattaaata aaccaaatat gttaaagttt 5160  
 aagtgtgcag ccatagtttg ggtatfffft gtttatatgc cctcaagtaa aagaaaagcc 5220  
 gaaagggta atcatatrtg aaaaccatat tttattgtat tttgatgaga tattaaattc 5280  
 tcaaagtttt attataaaatt ctactaagtt attttatgac atgaaaagtt atttatgcta 5340  
 taaatfffft gaaacacaat acctacaata aactggatg aataattgca tcatttctta 5400  
 ttgtgtgctc g 5411

<210> 4  
 <211> 5413  
 <212> ADN  
 <213> *Homo sapiens*

5

<220>  
 <221> Promotor de GADD45 alfa  
 <222> (4) .. (2254)  
 <223>

10

<220>  
 <221> UTR 5' de GADD45 alfa  
 <222> (2255) .. (2549)  
 <223>

15

<220>

ES 2 435 401 T3

<221> Gen EGFP  
 <222> (2550) .. (3278)  
 <223>  
 5 <220>  
 <221> poli A de SV40  
 <222> (3432) .. (3482)  
 <223>  
 10 <220>  
 <221> Exón 3 de GADD45 alfa  
 <222> (3502) .. (3642)  
 <223>  
 15 <220>  
 <221> Intrón 3 de GADD45 alfa  
 <222> (3643) .. (4715)  
 <223>  
 20 <220>  
 <221> motivo de p53  
 <222> (3830) .. (3849)  
 <223>  
 <220>  
 25 <221> motivo de AP-1  
 <222> (3879) .. (3885)  
 <223>  
 <220>  
 30 <221> Exón 4 de GADD45 alfa  
 <222> (4716) .. (5391)  
 <223>  
 <220>  
 35 <221> UTR 3' de GADD45 alfa  
 <222> (4830) .. (5391)  
 <223>  
 <400> 4

<b>atcagatcctt</b>	<b>gggtggggca</b>	<b>ctttaggact</b>	<b>gtggttcatt</b>	<b>tgaattggtg</b>	<b>taaacaatac</b>	<b>60</b>
<b>accggttcta</b>	<b>ctgtcctaca</b>	<b>gcctccattc</b>	<b>agatgactga</b>	<b>agtcatggga</b>	<b>ctttcagcat</b>	<b>120</b>
<b>agctagctga</b>	<b>tgacagtgca</b>	<b>tactatcttg</b>	<b>tccc aaaatc</b>	<b>cagttcaagc</b>	<b>atggacatac</b>	<b>180</b>
<b>caataagagc</b>	<b>ctaagctcct</b>	<b>taaaggcaaa</b>	<b>ggaccaggaa</b>	<b>ttgtacagtt</b>	<b>cttggtatag</b>	<b>240</b>
<b>aagaagacag</b>	<b>gcaaaaagtgt</b>	<b>ttttgaacta</b>	<b>acgttaaatg</b>	<b>tgcaatatgt</b>	<b>tagaattcat</b>	<b>300</b>
<b>gcaatgcaca</b>	<b>ggactgcagg</b>	<b>attctgatat</b>	<b>cttattttaac</b>	<b>tctcaaattc</b>	<b>tattcaactc</b>	<b>360</b>
<b>aataaacctt</b>	<b>gactgtgctt</b>	<b>ctactaaatg</b>	<b>caggtattgt</b>	<b>actaggagct</b>	<b>gaggacacca</b>	<b>420</b>
<b>aactgatgaa</b>	<b>gtccttgctg</b>	<b>tcaagaaact</b>	<b>cacatgattc</b>	<b>cctaattcct</b>	<b>tgtcagcttg</b>	<b>480</b>

ctgtgatcac attttcttcc caagaacctc taagaaatgc ctagtggata gaaccttgga 540  
 gttccacgga acatattaac aatcgccaaa tgatgactca ggctagattg tgtaattcag 600  
 gttttgtctg caaaactgaa aatgcttcgg taacctacct aaatttcaat gttgaggaat 660  
 tctttaagaa agacatcaaa tgtaagatt taaggcatag atatgagata catagtcctg 720  
 cttaggtgaa ttatgcactg accatgacca tttctttact caaatgttgt ccatggctga 780  
 caacacagtg aaaaaatgag tgcaaatga caactcaaat aatgaacca gaaaacctat 840  
 cacttttctt tccaccaa ttaagatcaa gagagctgga gaatattttg tctagagtga 900  
 taaaaacata agggtgcaaa acttccaggt acctttgcag aaattacttc tgtgacctt 960  
 ggctgtacag caaccttaat aatgcaagca ctgttttgaa tgcaagcatg tgggagccat 1020  
 tttcaccact tttgatgact tcagtaggtt taagaaatgt ttttgctttt attgcataaa 1080  
 ccataaaaca aaggaagggga cttttgaact actcagtgag agtctatata ttaaagttg 1140  
 tttttcaaaa atgtgtaact accatttgca gttttaaagg tctgctttcc acctacaagt 1200  
 tgccattatc tcaaaggtga aattttagca tatgactaaa aacttcctat agttacagct 1260  
 tcatgattca gcatctaaca tcaataattc acagtgagat cataggaggc tctctgtgga 1320  
 aggtaacgac atacatacgt taggaaagga agcttagggc atatcgagag cattttgaat 1380  
 ttagacttgt gggctgtgtg ggtgtcagat ggttgtctct cagctgggtg gcgtccagaa 1440  
 ggatccttgt ttgggcaagg ctctttgaga aaggagaatc tgggttgcca gggattccca 1500  
 catgtggtca ccagctcccc acgcagacca gctcacgatt tcccagttac accgggcagg 1560  
 tgggaaaccg ttctgctttc tgtggaaaag attctaactt ggttccctgc catccctgaa 1620  
 taaaaacggg ttggttttcc ttttttcagc ttccaacctc tgcagctttc caaaaataaa 1680  
 tcaaaccagc catcagggca ccgaaataat actactgcta ataagcagct tgccttagac 1740  
 ttagataaac aacacttctg aggtaaactt tgccccggag gtctggagac acttttttaa 1800  
 tgtaacctgc ttactaataa ttactagact tcagtgcatt aaccctggaa atagatttta 1860  
 atagccacc cttaaaacaa aagacatgaa aagataataa gaaaaaagtg ccgcaactat 1920  
 tatagaaaaa cacttggcag cctgcttcag cccaagctga ggccacctct agcctctgct 1980  
 aaagcccccc actcccaatg gtccccgcca accggataag agtgccgcgcg ggaccgcct 2040  
 tcccctctcg gcaccgcccc cgtccccgcc cctcggctc gcctccccgcg tggctcctcc 2100  
~~cttttccgct cctctcaacc tgactccagg agctggggtc aaattgctgg agcaggctga 2160~~  
 tttgcatagc ccaatggcca agctgcatgc aatgaggcg gaagggtggt ggctgagggt 2220  
 tggcaggata accccggaga gggggccct ttgtctcca gtggctggta ggcagtggt 2280

gggaggcagc	ggcccaatta	gtgtcgtgcg	gcccgtggcg	aggcgaggtc	cggggagcga	2340
gcgagcaagc	aaggcgggag	gggtggccgg	agctgcggcg	gctggcacag	gaggaggagc	2400
ccgggcgggc	gaggggcggc	cggagagcgc	cagggcctga	gctgccggag	cggcgcctgt	2460
gagtgagtgc	agaaagcagg	cgcccgcgcg	ctagccgtgg	caggagcagc	ccgcacgccg	2520
cgetctctcc	ctgggcgacc	tgcagtttgc	aatatggcgc	gcctggtgag	caagggcgag	2580
gagctgttca	ccggggtggt	gcccatacctg	gtcgagctgg	acggcgacgt	aaacggccac	2640
aagttcagcg	tgtccggcga	gggcgagggc	gatgccacct	acggcaagct	gacctgaag	2700
ttcatctgca	ccaccggcaa	gctgcccgtg	ccctggccca	ccctcgtgac	cacctgacc	2760
tacggcgtgc	agtgcttcag	ccgctacccc	gaccacatga	agcagcacga	cttcttcaag	2820
tccgccatgc	ccgaaggcta	cgtccaggag	cgcaccatct	tcttcaagga	cgacggcaac	2880
tacaagacc	gcgccgaggt	gaagttcgag	ggcgacaccc	tggtgaaccg	catcgagctg	2940
aagggcatcg	acttcaagga	ggacggcaac	atcctggggc	acaagctgga	gtacaactac	3000
aacagccaca	acgtctatat	catggcccgc	aagcagaaga	acggcatcaa	ggtgaacttc	3060
aagatccgcc	acaacatcga	ggacggcagc	gtgcagctcg	ccgaccacta	ccagcagaac	3120
acccccatcg	gcgacggccc	cgtgctgctg	cccgacaacc	actacctgag	cacctagtcc	3180
gccctgagca	aagaccccaa	cgagaagcgc	gatcacatgg	tcctgctgga	gttcgtgacc	3240
gcccgcggga	tcactctcgg	catggacgag	ctgtacaagt	aaagcggccg	cgactctaga	3300
tcataatcag	ccataaccaca	tttgtagagg	ttttacttgc	tttaaaaaac	ctcccacacc	3360
tccccctgaa	cctgaaacat	aaaatgaatg	caattgttgt	tgtaacttg	tttattgcag	3420
cttataatgg	ttacaaataa	agcaatagca	tcacaaattt	cacaaataaa	gcattttttt	3480
cactgcattc	tagttgttaa	ttaattgctg	cgagaacgac	atcaacatcc	tgcgcgtcag	3540
caaccggggc	cggctggcgg	agctcctgct	cttggagacc	gacgctggcc	ccgcggcgag	3600
cgagggcgcc	gagcagcccc	cggacctgca	ctgcgtgctg	gtgacggtaa	gggactgggg	3660
gactgcagcc	tgcagggtag	agccccggaa	ggacgggagt	cagggctggg	ttgcctgatt	3720
gtggatctgt	ggtagggtgg	ggtcaggagg	gtggctgcct	ttgtccgact	agagtgtggc	3780
tggactttca	gccgagatgt	gctagtttca	tcaccaggat	tttctgtggt	acagaacatg	3840
tctaagcatg	ctggggactg	ccagcagcgg	aagagatccc	tgtgagtcag	cagtcagccc	3900
agctactccc	tacctacatc	tgcactgcct	cccgtgacta	attcctttag	cagggcagat	3960
tagataaagc	caaatgaatt	cctggctcac	ccctcattaa	ggagtcagct	tcattctctg	4020

ES 2 435 401 T3

ccagtcagag ctaaaaatag aaattgtgta ggagacaaac cttgtaatt ccctagaaat 4080  
 acattaagag gatagagtgg aatTTTTTTT ctctgcaatc ttgcattttt ttaatggctc 4140  
 TTTTTTTTTT tcctgataaa aacctttggt aggtagggaa gttatgTTTT caggggtaaa 4200  
 tgtgctactt ttgtcttcta aatTTTgctc tTTTTtgact ggtctagtca agtgacagcc 4260  
 cgattatttt gctactcctt aaaagtacta ttctgtctct tggagtatgg ttgatggcaa 4320  
 ttccagttaa ctgctgtgca gctctcatct cattgtgcac acagcatgga aatctttctc 4380  
 aaaactgttt cactcaggtc agggtaacaa gtttggtaga gcaaaccggt gaatgatact 4440  
 ctcatgcaaa actgaacaga tatgcaaca tatgtatgtg gttcagcttg ggttgcattg 4500  
 gttcagactt tgcaatgtgt agtttaatag gtaattacc ctaacgcttt tgcagggaac 4560  
 ccaactacct tgaagaaact ttaattTTTT tgtgcttcta atttgtctcc atgtcacata 4620  
 gccaaaatat agaatgttca agtgTTTTct cctcaaaagt ataattacta gaatatactg 4680  
 gTTTTtaaaa taagtttatt tttataaatt tgtttccaga atccacattc atctcaatgg 4740  
 aaggatcctg ccttaagtca acttatttgt ttttgccggg aaagtcgcta catggatcaa 4800  
 tgggttccag tgattaatct ccctgaacgg tgatggcatc tgaatgaaaa taactgaacc 4860  
 aaattgcact gaagTTTTtg aaataccttt gtagttactc aagcagttac tcctacact 4920  
 gatgcaagga ttacagaaac tgatgccaag gggctgagtg agttcaacta catgttcttg 4980  
 gggcccggag atagatgact ttgcagatgg aaagaggtga aatgaagaa ggaagctgtg 5040  
 ttgaaacaga aaaataagtc aaaaggaaca aaaattacaa agaaccatgc aggaaggaaa 5100  
 actatgtatt aatTTtagaat ggttgagtta cattaataa aaccaaatat gttaaagttt 5160  
 aagtgtgcag ccatagtttg ggtattTTTT gtttatatgc cctcaagtaa aagaaaagcc 5220  
 gaaagggta atcatatttg aaaaccatat tttattgtat tttgatgaga tattaatctc 5280  
 tcaagTTTT attataaatt ctactaagtt atTTtatgac atgaaaagtt atttatgcta 5340  
 taaatTTTT gaaacacaat acctacaata aactggtatg aataattgca tcatttctta 5400  
 ttgtgtgctc gag 5413

- 5 <210> 5
- <211> 3871
- <212> ADN
- <213> *Homo sapiens*
  
- 10 <220>
- <221> Promotor de GADD45 alfa
- <222> (4) .. (2254)
- <223>
  
- 15 <220>
- <221> UTR 5' de GADD45 alfa
- <222> (2255) .. (2549)
- <223>
  
- 20 <220>
- <221> Gen EGFP
- <222> (2550) .. (3278)

<223>

<220>

<221> UTR 3' de GADD45 alfa

<222> (3288) .. (3849)

<223>

5

<400> 5

atcagatcct	gggtggggca	ctttaggact	gtggttcatt	tgaattggtg	taaacaatac	60
accggttcta	ctgtcctaca	gcctccattc	agatgactga	agtcatggga	ctttcagcat	120
agctagctga	tgacagtgca	tactatthttg	tocccaaaatc	cagttcaagc	atggacatac	180
caataagagc	ctaagctcct	taaaggcaaa	ggaccaggaa	ttgtacagtt	cttggatatag	240
aagaagacag	gcaaaagtgt	ttttgaacta	acgttaaattg	tgcaatatgt	tagaattcat	300
gcaatgcaca	ggactgcagg	attctgatat	cttatttaac	tctcaaattc	tattcaactc	360
aataaacctt	gactgtgctt	ctactaaatg	caggtattgt	actaggagct	gaggacacca	420
<hr/>						
aactgatgaa	gtccttgctg	tcaagaaact	cacatgattc	cctaattctt	tgtcagcttg	480
ctgtgatcac	atthttcttc	caagaacctc	taagaaatgc	ctagtggata	gaaccttgga	540

10

ES 2 435 401 T3

gttccacgga acatattaac aatcgccaaa tgatgactca ggctagattg tgtaattcag 600  
 gttttgtctg caaaactgaa aatgcttcgg taacctacct aaatttcaat gttgaggaat 660  
 tctttaagaa agacatcaaa tgtaagatt taaggcatag atatgagata catagtcatg 720  
 cttaggtgaa ttatgcactg accatgacca tttctttact caaatgttgt ccatggctga 780  
 caacacagtg aaaaaatgag tgcaaaatga caactcaaat aatgaacca gaaaacctat 840  
 cacttttctt ttccaccaa ttaagatcaa gagagctgga gaatattttg tctagagtga 900  
 taaaaacata aggggtgcaaa acttccaggt acctttgcag aaattacttc tgtgacctt 960  
 ggctgtacag caaccttaat aatgcaagca ctgttttgaa tgcaagcatg tgggagccat 1020  
 tttcaccact tttgatgact tcagtaggtt taagaaatgt ttttgctttt attgcataaa 1080  
 ccataaaaca aaggaagga cttttgaact actcagtgag agtctatata ttaaagtttg 1140  
 tttttcaaaa atgtgtaact accatttgca gttttaaagg tctgctttcc acctacaagt 1200  
 tgccattatc tcaaaggtga aattttagca tatgactaaa aacttcctat agttacagct 1260  
 tcatgattca gcactaaca tcaataattc acagtgagat cataggaggc tctctgtgga 1320  
 aggtaacgac atacatacgt taggaaagga agcttagggc atatcgagag cattttgaat 1380  
 ttagacttgt gggctgtgtg ggtgtcagat ggttgtctct cagctggtgg gcgtccagaa 1440  
 ggatccttgt ttgggcaagg ctctttgaga aaggagaatc tgggttgcca gggattccca 1500  
 catgtggtca ccagctcccc acgcagacca gctcacgatt tcccagttac accgggcagg 1560  
 tgggaaaccg ttctgctttc tgtggaaaag attctaactt ggttccctgc catccctgaa 1620  
 taaaaacggg ttggttttcc ttttttcagc ttccaacctc tgcagcttcc caaaaataaa 1680  
 tcaaaccagc catcagggca ccgaaataat actactgcta ataagcagct tcgcctagac 1740  
 ttagataaac aacacttctg aggtaaactt tgccccggag gtctggagac acttttttaa 1800  
 tgtaacctgc ttactaataa ttactagact tcagtgcatt aaccctggaa atagatttta 1860  
 atagccacc cttaaaacaa aagacatgaa aagataataa gaaaaaagtg ccgcaactat 1920  
 tatagaaaaa cacttggcag cctgcttcag cccaagctga ggccacctct agcctctgct 1980  
 aaagccccc actcccaatg gtccccgcca accggataag agtgcgcgcg ggaccgcct 2040  
 tcccctctcg gcaccgcccc cggccccgce cctctggctc gcctcccggg tggctcctcc 2100  
 cttttccgct cctctcaacc tgactccagg agctggggtc aaattgctgg agcaggctga 2160  
~~tttgcatagc ccaatggcca agctgcatgc aatgaggcg gaagggtggtt ggctgagggt~~ 2220  
 tggcaggata accccggaga gcggggccct ttgtcctcca gtggctggta ggcagtggct 2280  
 gggaggcagc ggccaatta gtgtcgtgcg gcccggtggc aggcgaggtc cggggagcga 2340

ES 2 435 401 T3

gcgagcaagc aaggcgggag ggggtggccgg agctgcggcg gctggcacag gaggaggagc 2400  
 ccgggcgggc gaggggcggc cggagagcgc cagggcctga gctgccggag cggcgcctgt 2460  
 gagtgagtgc agaaagcagg cgcgccgcgc ctagccgtgg caggagcagc ccgcaagccg 2520  
 cgctctctcc ctgggcgacc tgcagtttgc aatatggcgc gcctggtgag caagggcgag 2580  
 gagctgttca ccggggtggt gcccatcctg gtcgagctgg acggcgacgt aaacggccac 2640  
 aagttcagcg tgtccggcga gggcgagggc gatgccacct acggcaagct gaccctgaag 2700  
 ttcatctgca ccaccggcaa gctgcccgtg ccctggccca ccctcgtgac caccctgacc 2760  
 tacggcgtgc agtgcttcag ccgctacccc gaccacatga agcagcacga cttcttcaag 2820  
 tccgccatgc ccgaaggcta cgtccaggag cgcaccatct tcttcaagga cgacggcaac 2880  
 tacaagaccg gcgccgaggt gaagttcgag ggcgacaccc tgggtaaccg catcgagctg 2940  
 aagggcatcg acttcaagga ggacggcaac atcctggggc acaagctgga gtacaactac 3000  
 aacagccaca acgtctatat catggccgac aagcagaaga acggcatcaa ggtgaacttc 3060  
 aagatccgcc acaacatcga ggacggcagc gtgcagctcg ccgaccacta ccagcagaac 3120  
 acccccatcg ggcacggccc cgtgctgctg cccgacaacc actacctgag caccagtc 3180  
 gccctgagca aagaccccaa cgagaagcgc gatcacatgg tcttctgga gttcgtgacc 3240  
 gccgccggga tcaactctcg catggacgag ctgtacaagt aaagcggccg ctggcatctg 3300  
 aatgaaaata actgaaccaa attgcaactga agtttttgaa atacctttgt agttactcaa 3360  
 gcagttactc cctacactga tgcaaggatt acagaaactg atgccaaggg gctgagtgag 3420  
 ttcaactaca tgttctgggg gcccgagat agatgacttt gcagatggaa agaggtgaaa 3480  
 atgaagaagg aagctgtggt gaaacagaaa aataagtcaa aaggaacaaa aattacaaag 3540  
 aaccatgcag gaaggaaaac tatgtattaa tttagaatgg ttgagttaca ttaaaataaa 3600  
 ccaaatatgt taaagtttaa gtgtgcagcc atagtttggg tatttttggg ttatatgccc 3660  
 tcaagtaaaa gaaaagccga aagggttaat catatttgaa aaccatattt tattgtattt 3720  
 tgatgagata ttaaattctc aaagttttat tataaattct actaagttat tttatgacat 3780  
 gaaaagttat ttatgctata aattttttga aacacaatac ctacaataaa ctggtatgaa 3840  
 taattgcac atttcttatt gtgtgctoga g 3871

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Un casete de expresión que comprende una secuencia de ADN que codifica una proteína indicadora, cuya secuencia de ADN está unida operativamente a un promotor del gen GADD45 $\alpha$  humano y un elemento regulador del gen GADD45 $\alpha$  humano adicional, estando la secuencia de ADN situada 3' del promotor del gen GADD45 $\alpha$  **caracterizado por que** el elemento regulador comprende una región del intrón 3 del gen GADD45 $\alpha$  que incluye motivo de unión a p53 potencial.
- 10 2. Un casete de expresión de acuerdo con la reivindicación 1, donde el elemento regulador comprende el exón 1, exón 2, exón 3 y/o exón 4 del gen GADD45 $\alpha$ , o una región de los mismos, o cualquier combinación de los mismos.
3. Un casete de expresión de acuerdo con la reivindicación 2, donde el elemento regulador comprende una región del exón 1 del gen GADD45 $\alpha$ , una región del exón 3 del gen GADD45 $\alpha$ , y una región del exón 4 del gen GADD45 $\alpha$ .
- 15 4. Un casete de expresión de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, donde el elemento regulador comprende adicionalmente el intrón y/o intrón 2 del gen GADD45 $\alpha$ , o una región de los mismos.
5. Un casete de expresión de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, donde el elemento regulador comprende el intrón 3 del gen GADD45 $\alpha$ .
- 20 6. Un casete de expresión de acuerdo con la reivindicación 5 donde el elemento regulador comprende un motivo de AP-1 potencial.
7. Un casete de expresión de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, donde la secuencia de ADN codifica una proteína indicadora emisora de luz.
- 25 8. Un casete de expresión de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, donde la secuencia de ADN codifica proteína verde fluorescente (GFP) y derivados emisores de luz de la misma.
- 30 9. Un casete de expresión de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, donde la secuencia de ADN codifica una GFP potenciada humana (hEGFP), que consiste en la GFP natural que contiene una sustitución de doble aminoácido de Phe-64 a Leu, y Ser-65 a Thr.
- 35 10. Un casete de expresión GD531, como se ilustra en la Figura 9, y como se proporciona en SEC ID N° 2.
11. Un casete de expresión GD532, como se ilustra en la Figura 9, y como se proporciona en SEC ID N° 3.
12. Un casete de expresión GD533, como se ilustra en la Figura 9, y como se proporciona en SEC ID N° 4.
- 40 13. Un vector recombinante que comprende un casete de expresión de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-12.
14. Un vector recombinante de acuerdo con la reivindicación 13, donde el vector comprende ADN del plásmido pCEP4.
- 45 15. Un vector recombinante pEP-GD531, como se ilustra en la Figura 5.
16. Un vector recombinante pEP-GD532, como se ilustra en la Figura 6.
- 50 17. Un vector recombinante pEP-GD422, como se ilustra en la Figura 7.
18. Una célula que contiene un vector recombinante de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 14 a 17.
- 55 19. Una célula de acuerdo con la reivindicación 18, donde la célula es una célula humana.
20. Una célula de acuerdo con la reivindicación 19, donde la célula es una célula humana que tiene un p53 completamente funcional.
- 60 21. Una célula de acuerdo con la reivindicación 20, donde la célula es una línea celular humana TK6.
22. Un método *in vitro* para detectar la presencia de un agente que provoque o potencie el daño de ADN que comprende someter a una célula de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 18 a 21 a un agente; y controlar la expresión de la proteína indicadora de la célula
- 65 23. El método de acuerdo con la reivindicación 22, donde el agente se explora adicionalmente para evaluar si es

seguro exponer a un organismo vivo al agente.

24. El método de acuerdo con la reivindicación 22 o la reivindicación 23, donde el agente es un medicamento candidato, aditivo alimentario o cosmético.

5 25. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 22 a 24, donde se controla la expresión de una proteína indicadora emisora de luz de la célula.

10 26. El método de acuerdo con la reivindicación 25, donde la proteína indicadora emisora de luz es proteína verde fluorescente.

15 27. El método de acuerdo con la reivindicación 26, que comprende cultivar células transfectadas con un vector recombinante de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 14-18, incubar las células con el agente durante un tiempo predeterminado y controlar la expresión de la proteína verde fluorescente directamente de una muestra de las células.

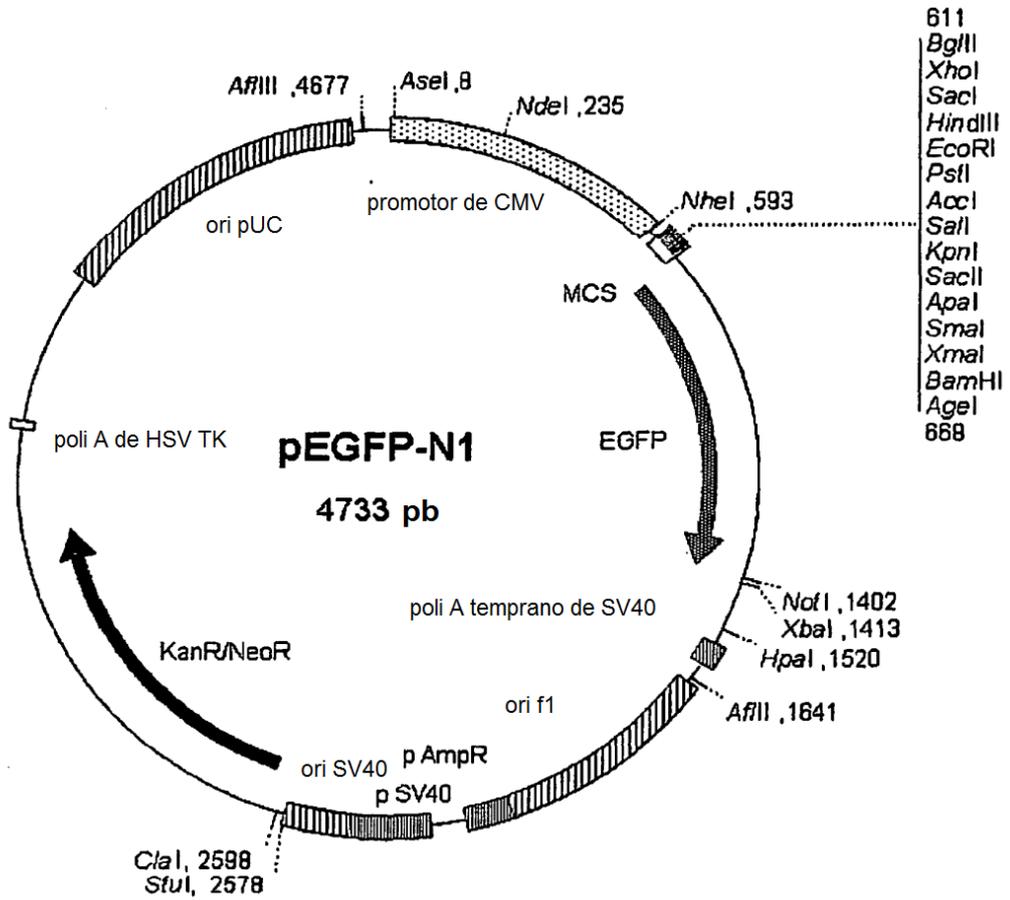
28. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 22 a 27, donde las células se cultivan en un medio de cultivo de baja fluorescencia.

20 29. El método de acuerdo con la reivindicación 28, donde el medio de cultivo de baja fluorescencia es un medio RPMI que no contiene riboflavina.

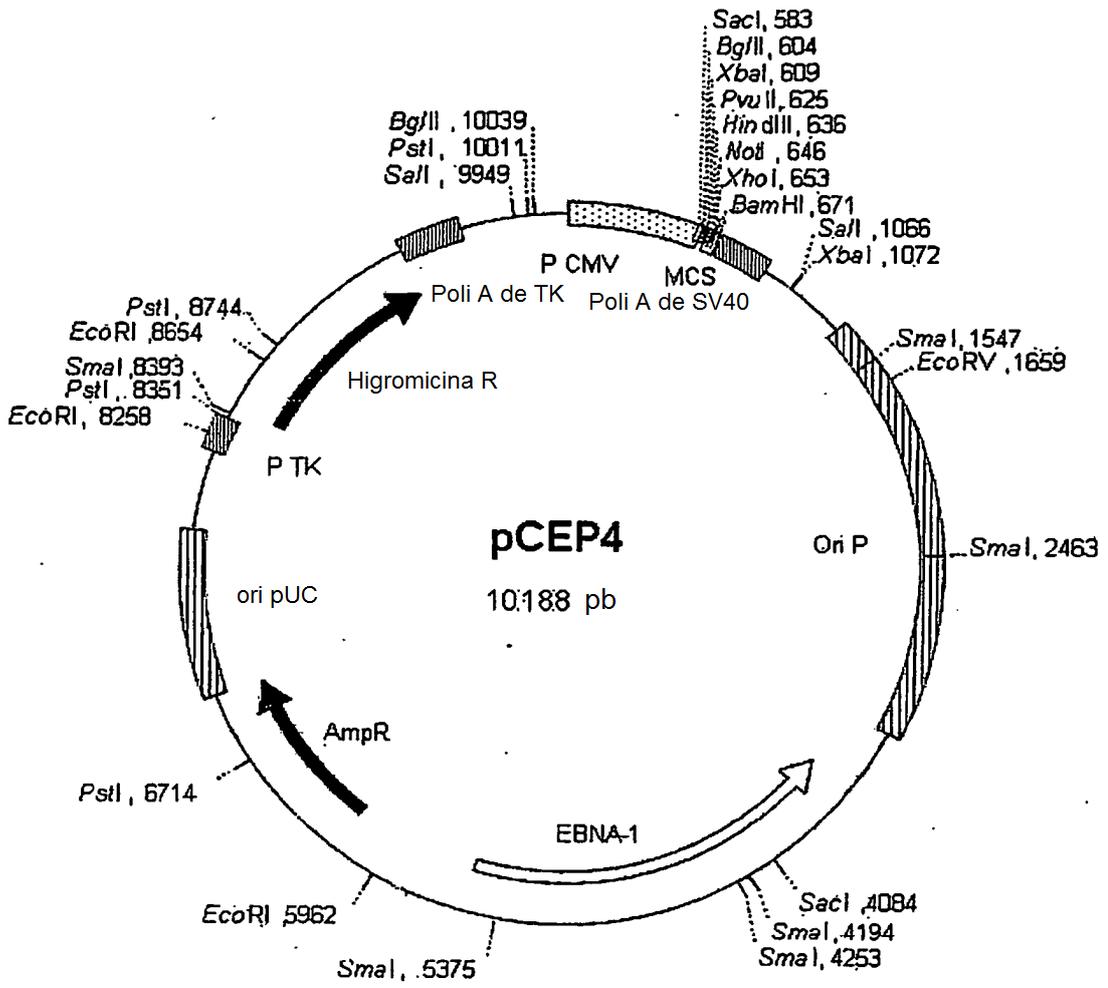
30. El método de acuerdo con la reivindicación 28 o 29, donde el medio de cultivo de baja fluorescencia es un medio RPMI que no contiene rojo fenol.

25 31. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 25 a 30, donde la fluorescencia se determina comparando la fluorescencia de una célula de acuerdo con las reivindicaciones 18 a 21 con la fluorescencia de una célula de control que comprende un vector en el que el ácido nucleico que codifica el indicador emisor de luz está situado fuera de fase.

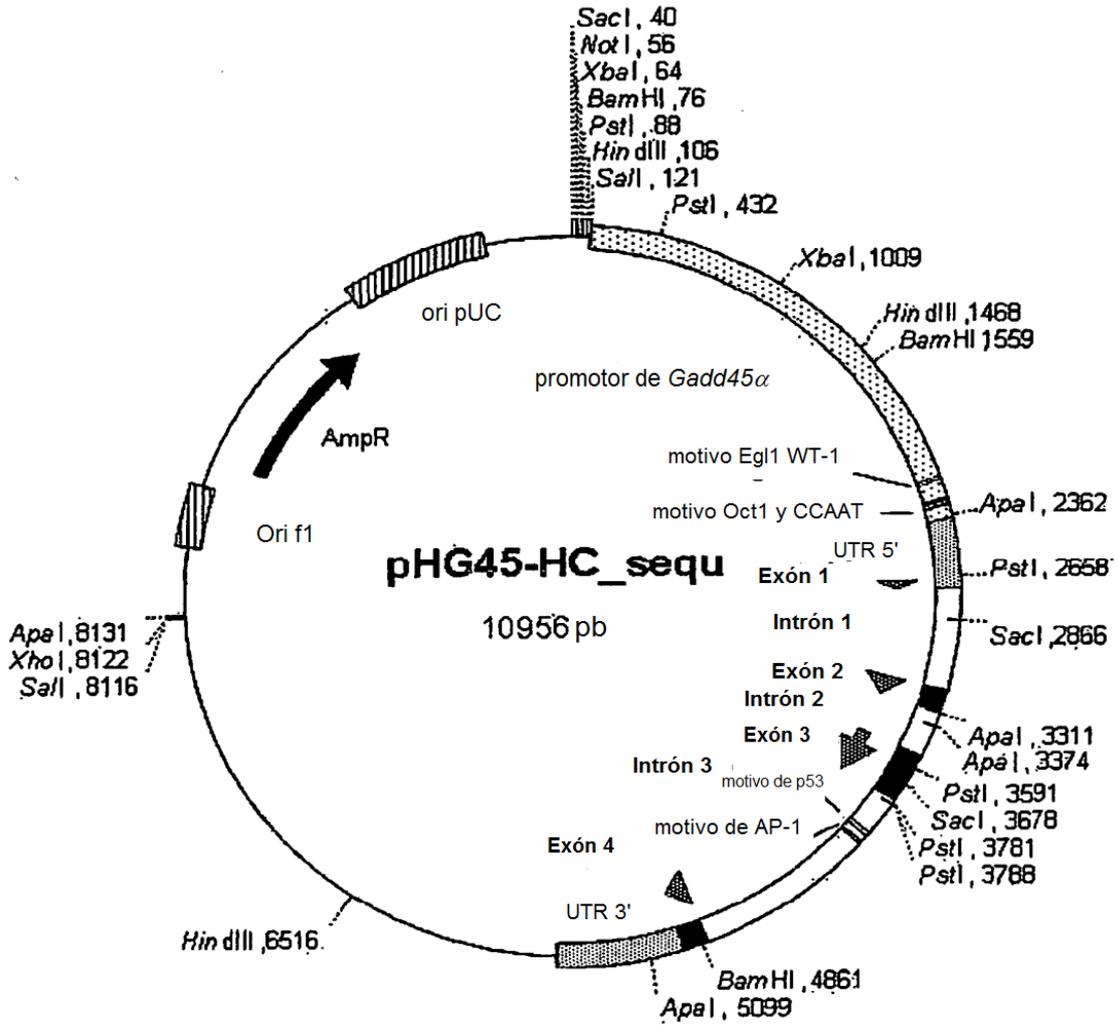
**Fig. 1**



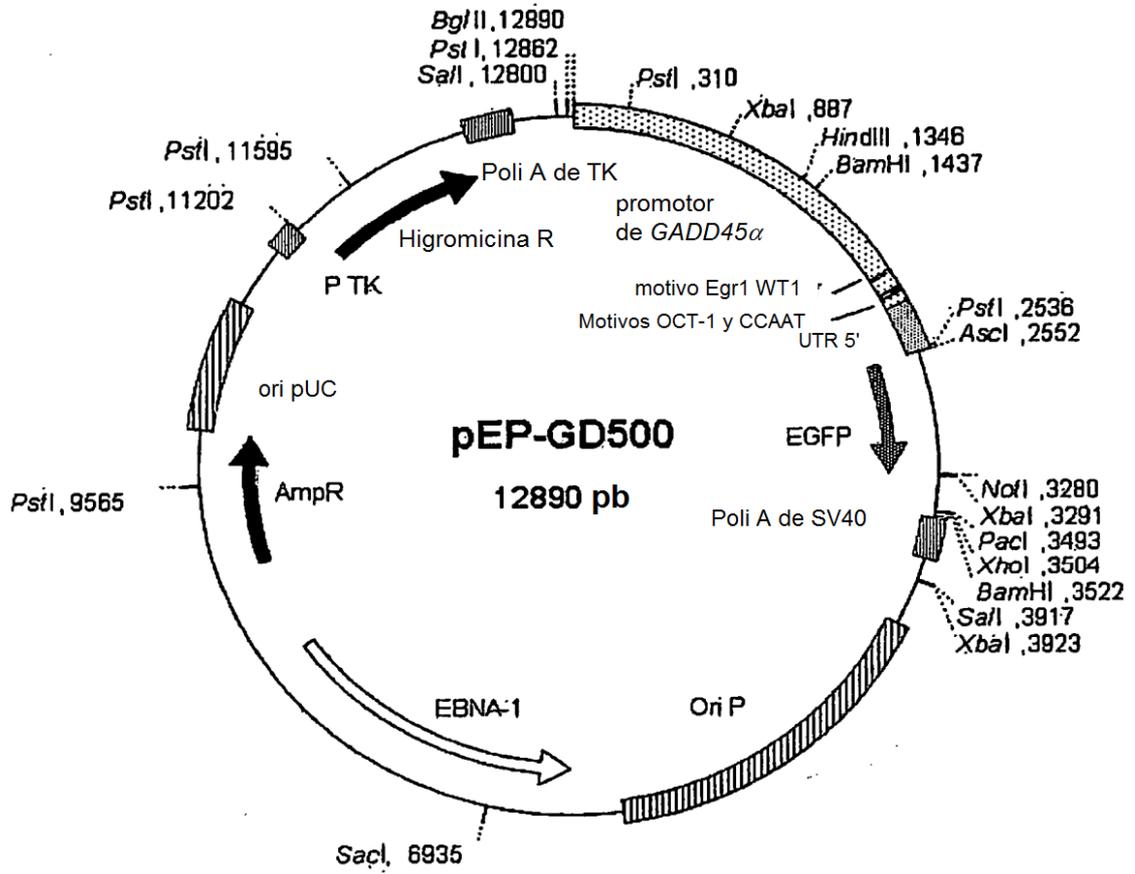
**Fig. 2**



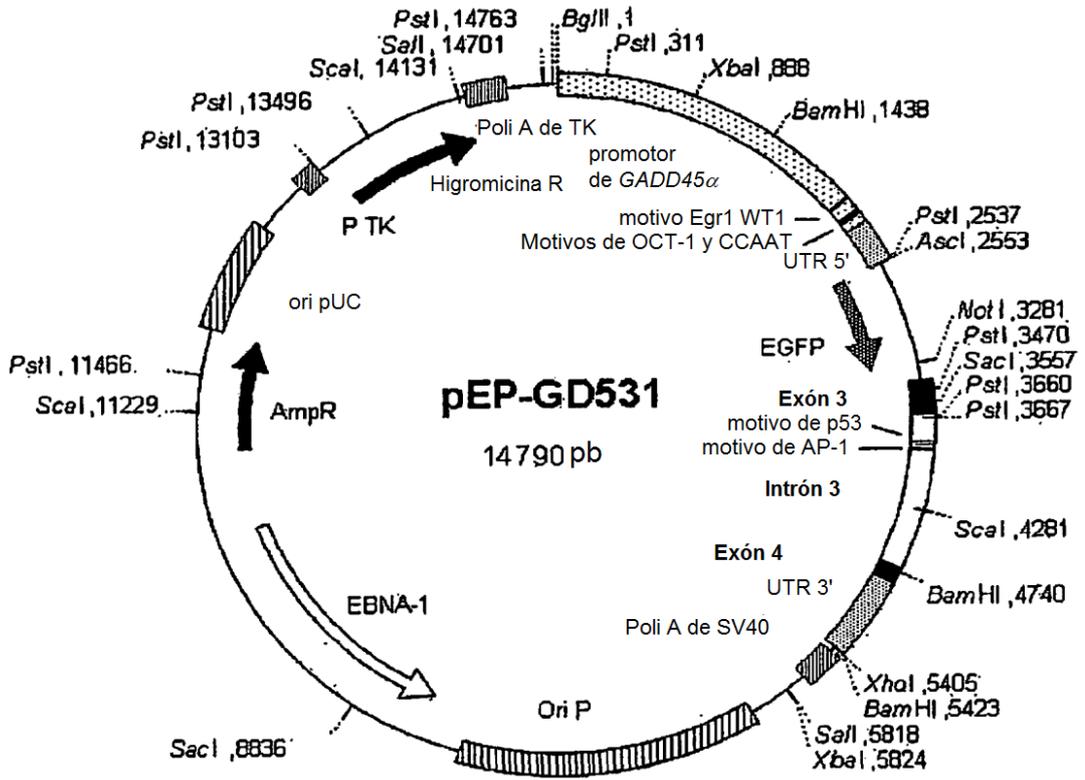
**Fig. 3**



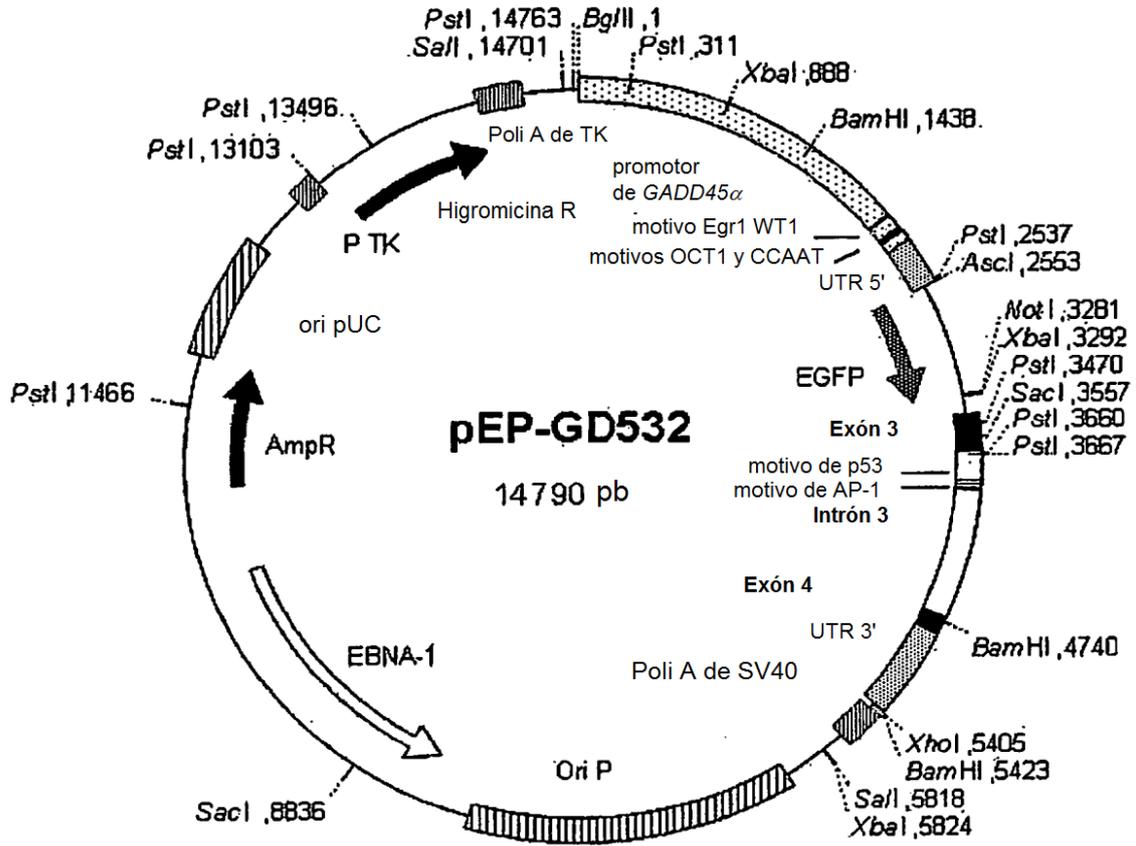
**Fig. 4**



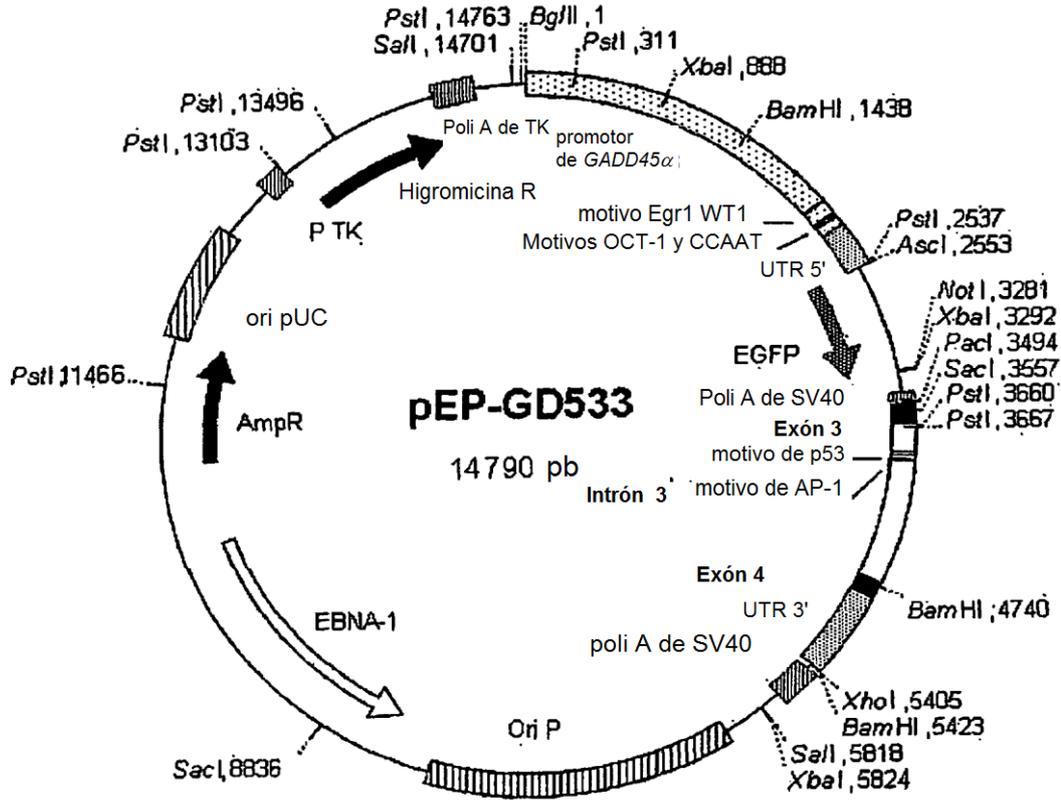
**Fig. 5**



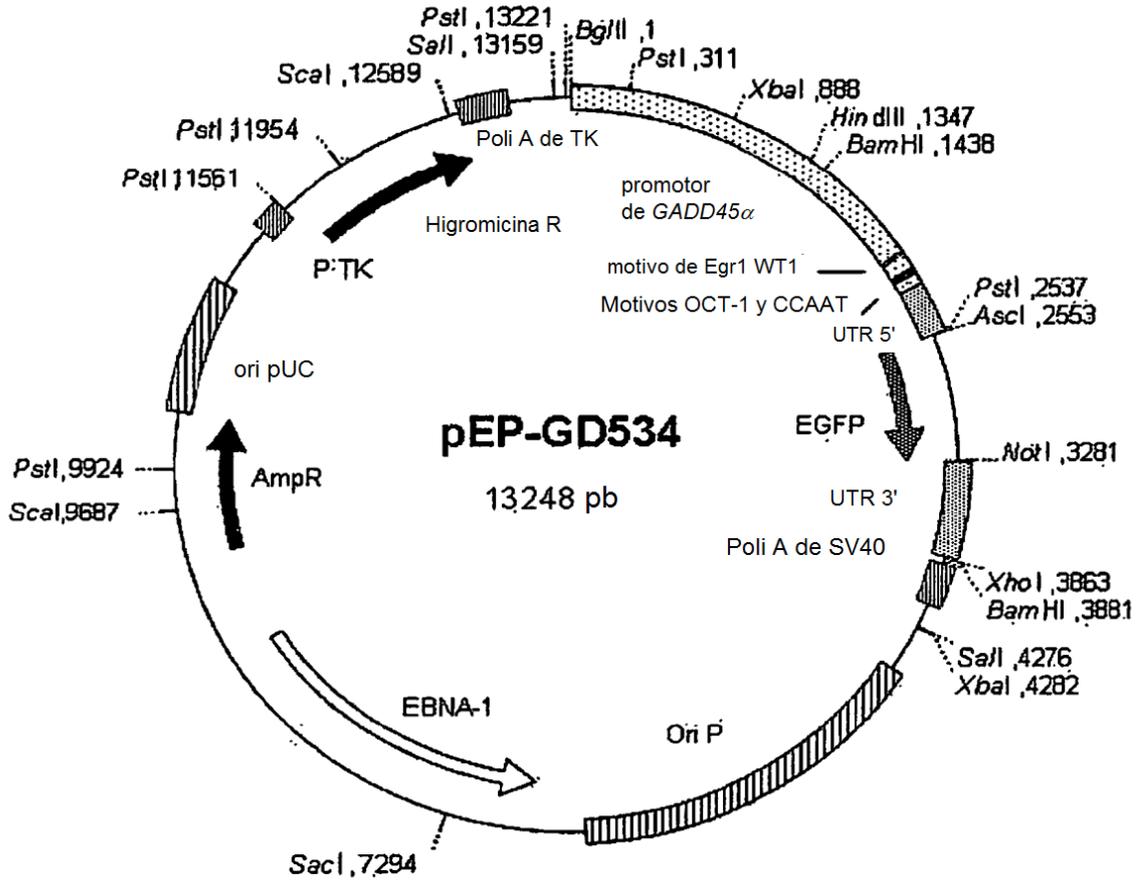
**Fig. 6**



**Fig. 7**

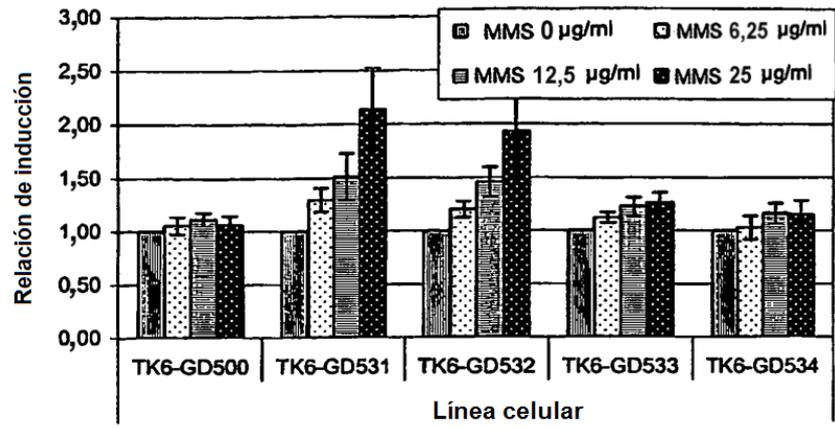


**Fig. 8**

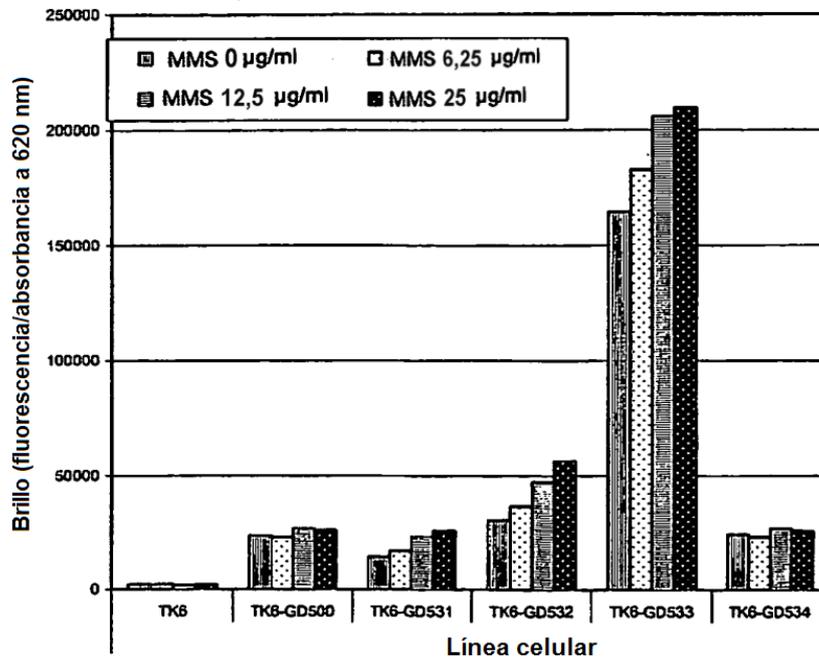




**Fig. 10**

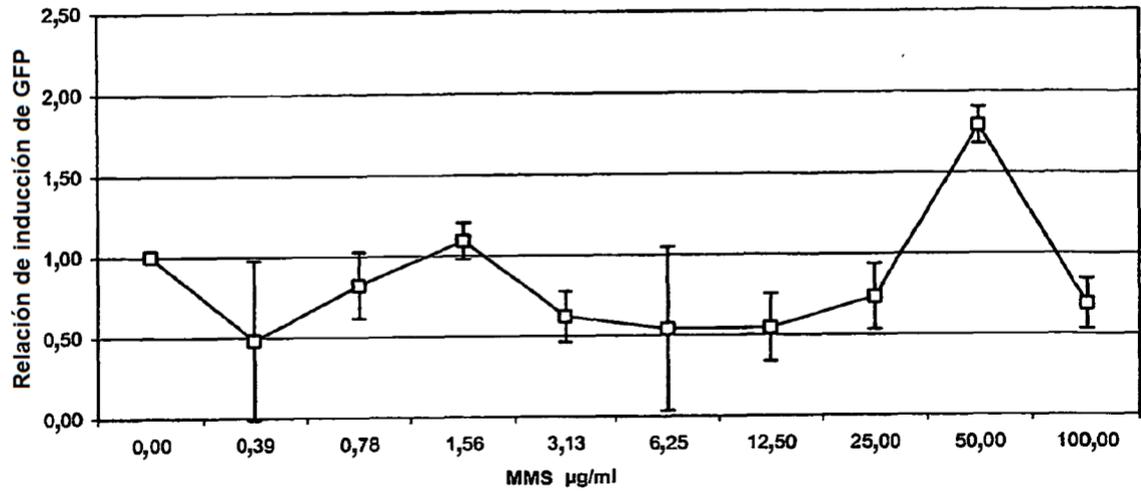


**Fig. 11**

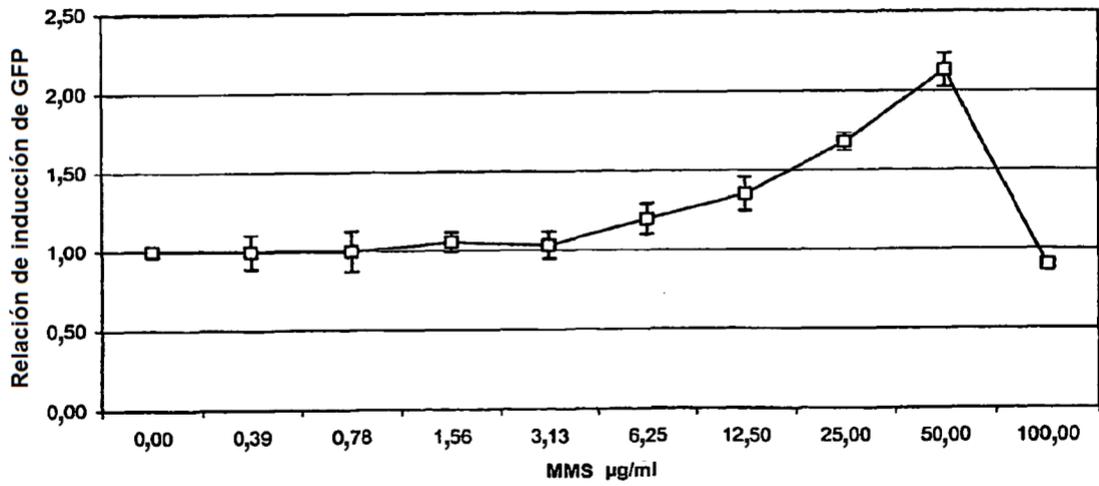


**Fig. 12**

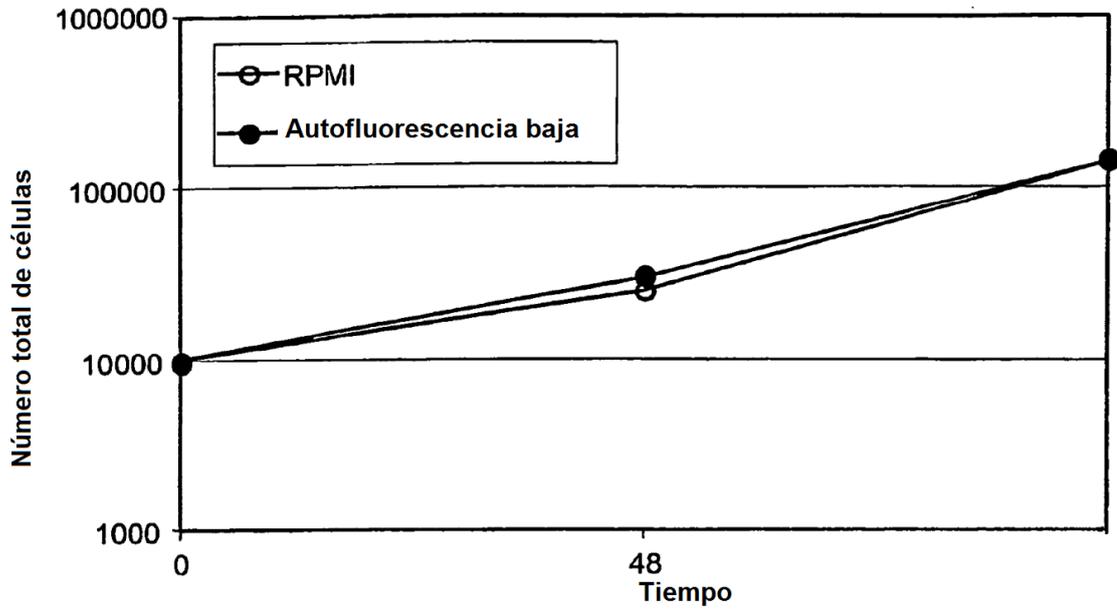
**A**



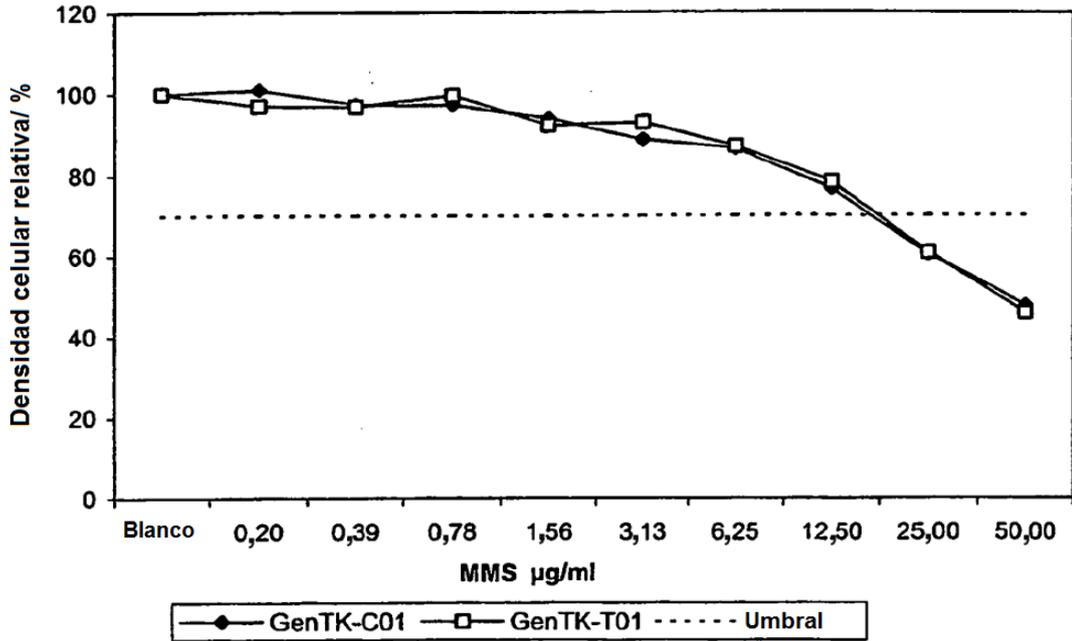
**B**



**Fig. 13**

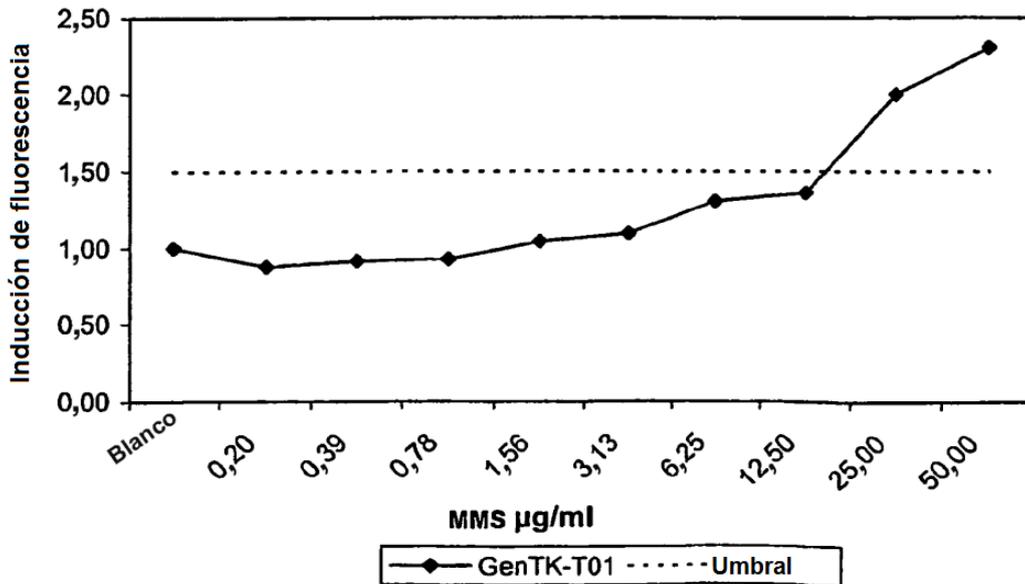


**Fig. 14**

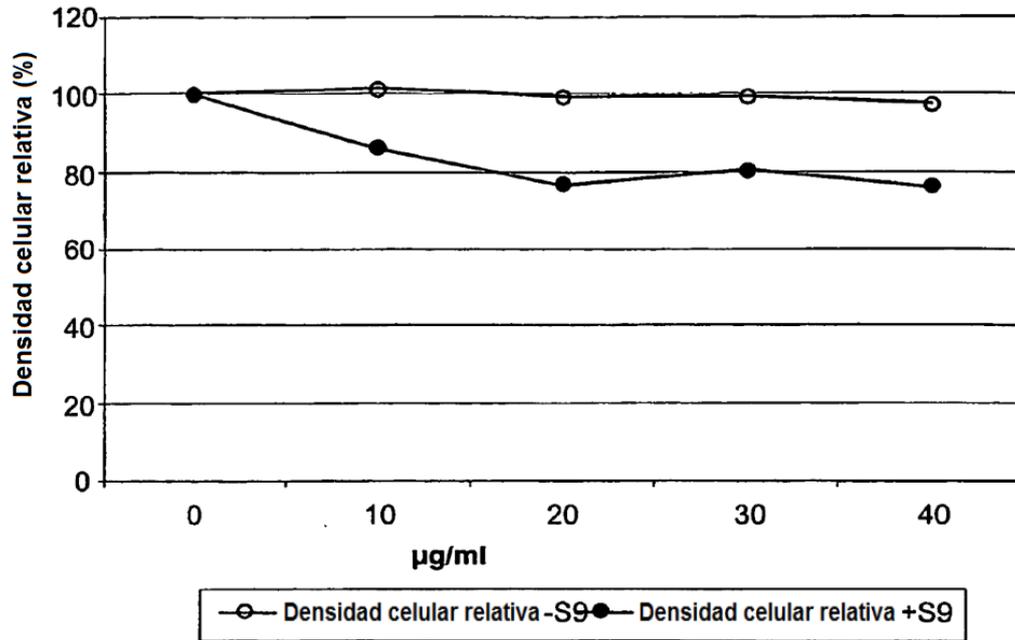


**Fig. 15**

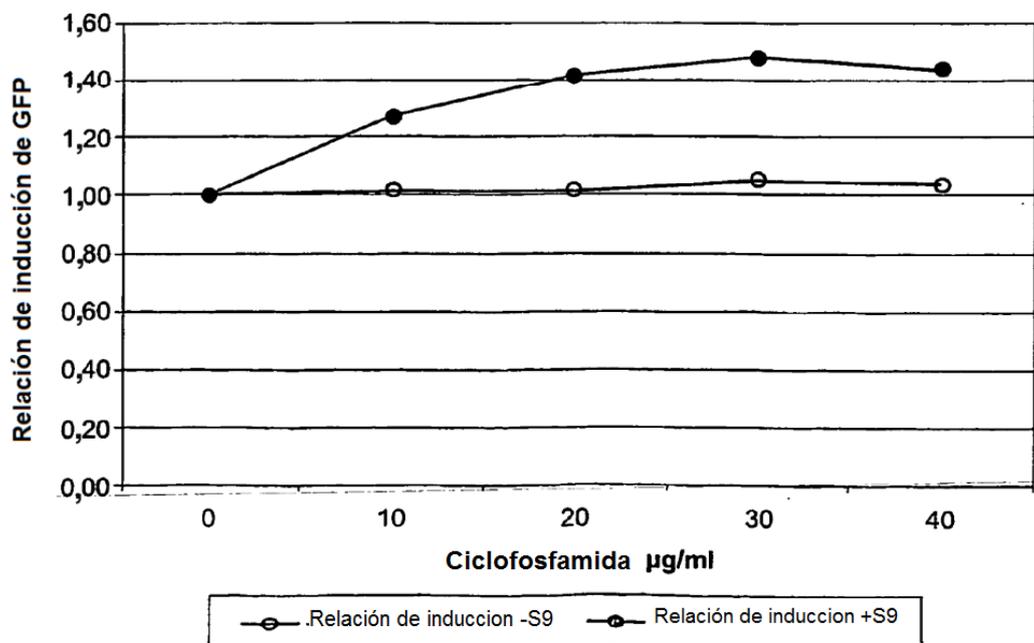
**EVALUACIÓN DE LA GENOTOXICIDAD**



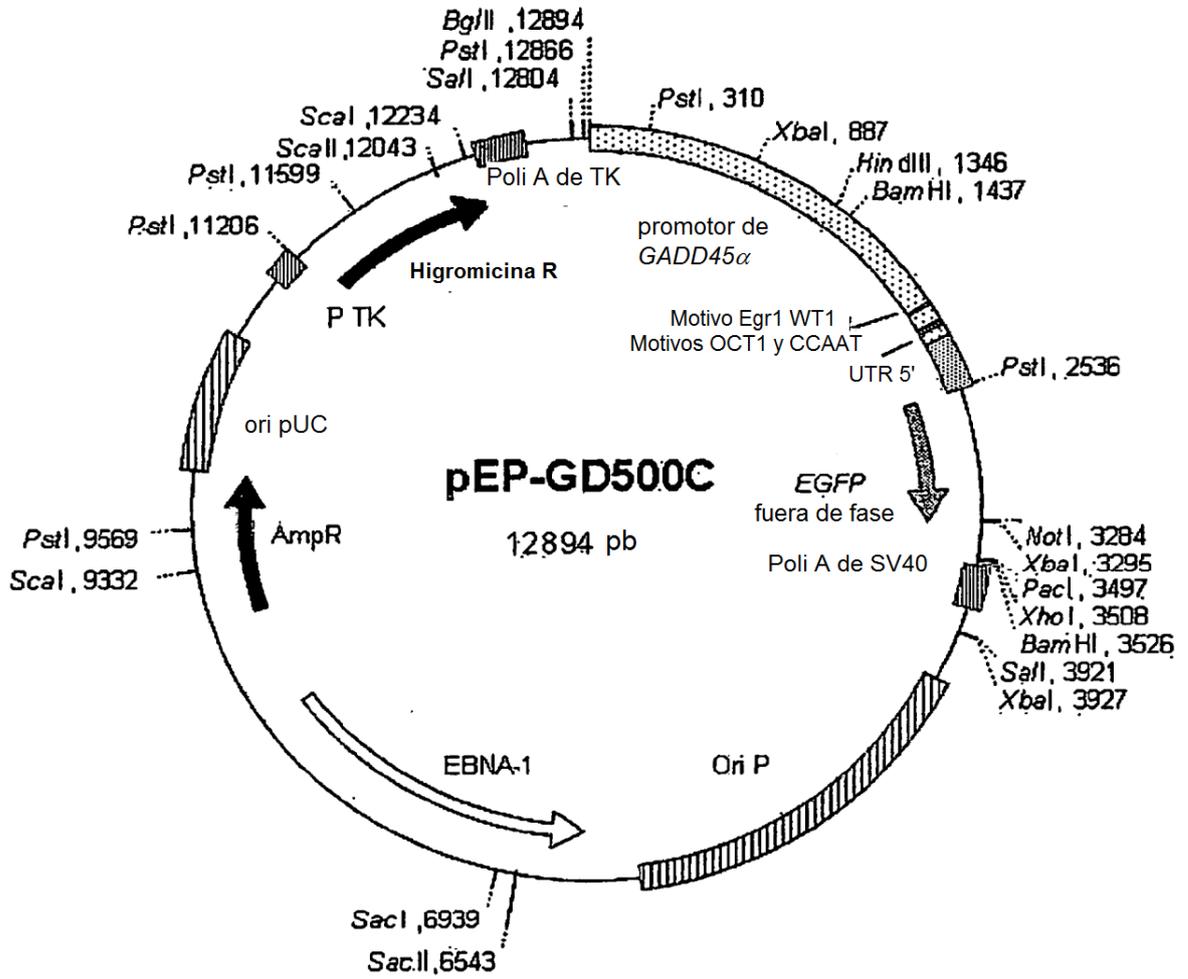
**Fig. 16**



**Fig. 17**



**Fig. 18**



**Fig. 19**

