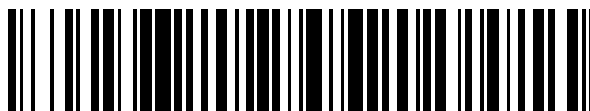


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 627 832**

51 Int. Cl.:

G01N 33/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.09.2012 E 12184575 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.03.2017 EP 2708891**

54 Título: **Método in vitro para determinar la inmunotoxicidad de un compuesto**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
31.07.2017

73 Titular/es:

**UNIVERSITEIT MAASTRICHT (50.0%)
Minderbroedersberg 4-6
6211 LK Maastricht, NL y
ACADEMISCH ZIEKENHUIS MAASTRICHT
(50.0%)**

72 Inventor/es:

**VOLGER, OSCAR LEONARD;
SHAO, JIA;
PEIJNENBURG, ADRIANUS ANTONIUS
CORNELIS MARIA y
VAN LOVEREN, HENDRIK**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 627 832 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

Método in vitro para determinar la inmunotoxicidad de un compuesto.

Campo de la invención

5 La invención es en el campo del diagnóstico molecular. Más en particular, proporciona genes marcadores para la detección sistemática en compuestos de inmunotoxicidad directa. Un método como se describe en la presente memoria emplea muestras obtenidas de una célula expuesta a un compuesto de interés y determina los niveles de expresión de una serie de genes marcadores para determinar si el compuesto es o no inmunotóxico.

Antecedentes de la invención

10 Durante los procedimientos de registro de productos químicos y fármacos, dentro de la Unión Europea, los Estados Unidos de América y Japón, los métodos de identificación sistemática actuales que se aplican para inmunotoxicidad directa son parte del ensayo de toxicidad general. Estos ensayos de toxicidad se basan en modelos animales, que consisten principalmente en ratas, ratones y conejos. El uso de estos modelos animales presenta tres desventajas principales, que son principalmente ética, económica y que la traducción requerida a la situación humana puede conducir a resultados falsos positivos y falsos negativos. Primero, estos ensayos producen sufrimiento a los
15 animales implicados, lo que conduce a preocupaciones sociales. Segundo, en la actualidad en la UE aproximadamente 40 mil productos químicos están a la espera de procedimiento de registro, evaluación y autorización (REACH). La UE no tiene la infraestructura ni los medios económicos para ensayar todos estos productos químicos en modelos animales. Tercero, el poder predictivo limitado de estos modelos animales para toxicidad humana complica los procedimientos de evaluación de riesgo de los productos químicos y el ensayo de la
20 seguridad de los fármacos. Se ha demostrado en muchos casos que los ensayos en animales no predicen con precisión la inmunotoxicidad en seres humanos.

Los ensayos de falsos positivos evitan que muchos fármacos potencialmente útiles lleguen al mercado. Los falsos negativos producen toxicidad en seres humanos, durante las fases clínica (I-III) y mercado posventa (IV) de ensayo de fármacos o incluso más adelante. En estas fases, ya se han invertido en vano varios millones de euros. De
25 promedio, el procedimiento de ensayar en un producto químico o fármaco su toxicidad o seguridad lleva años. Esto es producido parcialmente por el tiempo que requieren por naturaleza los ensayos en animales.

Johansson et al., (BMC Genomics 12 (2.011) 399) describe una prueba basada en células para la predicción de productos químicos sensibilizantes por análisis del transcriptoma de la estirpe celular humana MUTZ-3 después de estimulación de la estirpe celular con productos químicos sensibilizantes. En ese contexto se identificó una firma de
30 200 marcadores genéticos.

Baken et al., (A companion to methods in enzymology, Academic Press Inc., Nueva York, NY, EE.UU. 41; (2.006) 132-141) describen el análisis de micromatrices para la medición de la expresión de cientos de genes en una muestra. La micromatriz se adaptó a estudiar los cambios de la expresión de genes asociados a procedimientos
inmunotóxicos.

35 Gil et al., (J. Applied Toxicol. 21 (2.001) 245-255) explican un método para cuantificar la interacción con xenobióticos y su potencial impacto sobre organismos vivos, incluyendo el ser humano. El método consiste en controlar la expresión de biomarcadores.

La patente de EE.UU. 2003/040025 se refiere a un método in vitro para evaluar la inmunotoxicidad de una sustancia de ensayo.

40 Por lo tanto, en las autoridades y las industrias implicadas en el ensayo de toxicidad de productos químicos y fármacos, hay una necesidad de ensayos de toxicidad que, idealmente, sean más precisos, asequibles, más rápidos y presenten menos preocupaciones éticas.

Resumen de la invención

45 Ahora se ha encontrado que un ensayo in vitro fiable puede distinguir entre compuestos inmunotóxicos y no inmunotóxicos. Este método evita la necesidad de experimentos en animales y proporciona un resultado 100% preciso. Una ventaja adicional es que el método puede realizarse en unos días.

De acuerdo con esto, la invención se refiere a un método in vitro para determinar si un compuesto es inmunotóxico, en el que el nivel de expresión de al menos un gen marcador se determina en una muestra obtenida a partir de una célula Jurkat cultivada in vitro, que se expone al compuesto en el cultivo in vitro, en el que el gen marcador es
50 ABCA1 y en el que se concluye que el compuesto es inmunotóxico si el nivel de expresión del gen marcador ABCA1 está por debajo de, o por encima de, un valor de referencia predeterminado.

Descripción detallada de la invención

Se expuso una estirpe celular humana en un cultivo in vitro a una serie de compuestos inmunotóxicos (N=26, tabla 1) y compuestos de control (N=11, tabla 2). Se determinaron después los niveles de expresión de 4 genes marcadores (tabla 3) usando una prueba de PCR cuantitativa.

5 Cada uno de los genes marcadores por sí mismo pudo predecir la inmunotoxicidad de un compuesto con un nivel de precisión aceptable (tabla 4). La descripción, por lo tanto, proporciona un método in vitro para determinar si un compuesto es inmunotóxico, en el que el nivel de expresión de al menos un gen marcador se determina en una muestra obtenida a partir de una célula nucleada expuesta al compuesto, en el que al menos un gen marcador se selecciona del grupo que consiste en ABCA1, CHAC1, CRIM1 y HMGCS1 y en el que se concluye que el compuesto es inmunotóxico si el nivel de expresión de al menos dicho gen marcador está por debajo de, o por encima de, un valor de referencia predeterminado.

También se encontró que la fiabilidad del método mejoraba cuando se determinaba el nivel de expresión de más de un gen. A la descripción también se proporciona un método como se escribió anteriormente en el que al menos un gen marcador es al menos dos genes marcadores, tal como al menos 3 genes marcadores, tal como al menos 4 genes marcadores.

15 Sorprendentemente, se encontró que se podía hacer una predicción de 100% de precisión de inmunotoxicidad basándose en sólo estos 4 genes marcadores. Una precisión del 100% con respecto a esto significa que todos los compuestos inmunotóxicos se predecían correctamente y que ninguno de los controles proporcionaba un resultado positivo.

20 A la descripción también se proporciona un método como se describió anteriormente, en el que se determina el nivel de expresión de los 4 genes marcadores y en el que se concluye que el compuesto es inmunotóxico si el nivel de expresión de al menos uno de los genes marcadores está por debajo de, o por encima de, un valor de referencia predeterminado.

25 Se debería observar que no todos los genes marcadores reaccionaban de la misma manera en la exposición de compuestos inmunotóxicos. Incluso dentro de un único gen se observó regulación hacia abajo de un compuesto inmunotóxico y regulación hacia arriba en la exposición a otro compuesto (tabla 4).

30 Se encontró que el método como se describe en la presente memoria era muy robusto. Esta robustez podía incluso ser mejorada cuando se concluye que el compuesto es inmunotóxico si el nivel de expresión de al menos dos de los genes marcadores si el nivel de expresión de al menos dos de los genes marcadores está por debajo de, o por encima de, un valor de referencia predeterminado. Esto compromete la sensibilidad, pero puede ser ventajoso cuando la especificidad es importante.

El método podía incluso ser mejorado más cuando se concluye que el compuesto es inmunotóxico si el nivel de expresión de al menos tres de los genes marcadores está por debajo de, o por encima de, un valor de referencia predeterminado.

35 Los niveles de expresión de un gen marcador se tienen que comparar con un valor de referencia, también referido con frecuencia como valor límite. Dicho valor de referencia puede determinarse de manera empírica o elegirse de manera arbitraria para conseguir una especificidad y/o sensibilidad del método apropiada. Un experto sabe perfectamente cómo elegir un valor de referencia apropiado. Dicho valor de referencia puede basarse ventajosamente en un valor de expresión obtenido con un compuesto de control. Un experto conocerá cómo modificar el valor de referencia predeterminado para obtener la especificidad y sensibilidad del método deseadas.

40 El valor de referencia predeterminado puede ser ventajosamente un valor obtenido de la expresión de un gen de referencia. En la presente memoria, se usan 3 genes como genes de referencia; beta-2-macroglobulina (B2M), proteína 4 de tráfico de Golgi a RE (GET4) y clase G1 de biosíntesis de ancla de fosfatidilinositolglicano (PIGG).

45 En el contexto de la presente invención, el término "expuesto" significa "puesto en contacto" en el sentido más amplio de la palabra. Exposición significa poner en contacto de manera física la célula con el compuesto de manera que, por ejemplo, se disuelva el compuesto en el medio de cultivo de la célula. Es importante que la célula se exponga al compuesto a niveles y dosis subcitotóxicas.

50 El término "Relación de expresión genética" o "Relación" como se usa en la presente memoria se refiere a un número que describe cuánto cambia una cantidad que va desde un valor inicial a un valor final. Por ejemplo, un valor inicial de 30 y un valor final de 60 corresponde a una relación de 2, o en términos comunes, un aumento de dos veces. La relación de expresión genética se calcula simplemente como la relación del valor final al valor inicial, es decir, el valor de expresión de control. Si el valor inicial es A y el valor final es B, la Relación es B/A. Como otro ejemplo, un cambio de 80 a 20 sería una Relación de 0,25, mientras que un cambio de 20 a 80 sería una Relación de 4. En la presente memoria, se reemplaza una relación que sea menor que 1 por el negativo de su inversa, por ejemplo, un cambio de de 80 a 20 sería un cambio de veces de -4 (o en términos comunes, una disminución de cuatro veces). Esto se refiere en la presente memoria como "Cambio de veces". En las tablas presentadas en la presente memoria se muestran los Cambios de veces de genes sobreexpresados como valores por encima de 1,0 y la subexpresión como la inversa negativa de la Relación, es decir, valores por debajo de -1,0.

5 Los niveles de expresión genética pueden determinarse con cualquier método conocido la técnica para detectar niveles de expresión de ácidos nucleicos. Se prefieren en particular métodos tales como PCR cuantitativa, NASBA cuantitativa, secuenciación genética tal como secuenciación de la siguiente generación, secuenciación de ARN, pruebas de genes indicadores o análisis de micromatrices. Los niveles de expresión genética también pueden determinarse examinando la proteína expresada por genes marcadores descritos en la presente memoria, por ejemplo, por técnicas ELISA.

10 Cuando se elige el umbral para positividad en 2,0 veces el valor de referencia (o 0,5 veces cuando se regula hacia abajo, el cambio de veces es entonces -2) se podía alcanzar una precisión del 100%. Por lo tanto, la descripción proporciona un método como se describió anteriormente en el que se concluye que el compuesto es inmunotóxico si el nivel de expresión de los genes marcadores es al menos 2 veces por debajo de, o por encima de, un valor de referencia predeterminado.

15 El término "célula" en este contexto se tiene que interpretar como cualquier célula, aislada o en una estructura de tejido. Se prefiere usar células que puedan ser cultivadas in vitro. Esto es ventajoso debido a que la célula puede ponerse en contacto entonces con el compuesto en el medio de cultivo a fin de asegurar una puesta en contacto uniforme y reproducible.

Ventajosamente, la célula es una célula humana puesto que puede reflejar la inmunotoxicidad de los compuestos hacia los seres humanos mejor. Se encuentra que la célula puede ser ventajosamente una célula linfoblástica humana, preferiblemente una célula Jurkat.

20 Se encontró que el tiempo de exposición no es crítico, las células pueden exponerse a los compuestos durante varias horas a varios días, se elige un tiempo de exposición de 6 horas.

Los métodos como se describió anteriormente pueden mejorarse usando múltiples muestras individuales, obtenidas a partir de células expuestas de manera independiente. De esta manera, el nivel de expresión de un gen puede ser el promedio de una serie de niveles de expresión obtenidos para cada gen individual.

Tabla 1. Lista de compuestos inmunotóxicos.

nombre químico	Abreviatura	Número CAS	Pubchem CID	conc. exposición (uM)
1-Nitropireno	1-NPR	5522-43-0	21.694	50
6-mercaptapurina	6MP	6112-76-1	24.888.330	0,1
trióxido arsénico	As2O3	1327-53-3	261.004	3
benzo[a]pireno	BaP S9	50-32-8	2.336	5
dicloruro de cadmio	CdCl2	10108-64-2	24.947	20
ciclofosfamida	CP S9	6055-19-2	24.278.292	3.000
ciclosporina A	CsA	59865-13-3	5.280.754	8
dexametasona	DEX	50-02-2	5.743	10
deoxinivalenol	DON	51481-10-8	40.024	0,25
O-[4-metil-6-(propan-2-il)pirimidin-2-il]fosforotioato de O,O-dietilo (Diazinón)	DZN	333-41-5	3.017	200
Etanol	EtOH	64-17-5	702	343
fingolimod	FTY720	162359-55-9	107.969	4

ES 2 627 832 T3

nombre químico	Abreviatura	Número CAS	Pubchem CID	conc. exposición (uM)
Gamma-hexaclorociclohexano (Lindano)	LIN	58-89-9	727	2.000
Ftalato de mono-(2-etilhexilo)	MEHP	4376-20-9	20.393	300
Ácido micofenólico	MPA	24280-93-1	446.541	10
metotrexato	MTX	133073-73-1	4.112	0,01
nivalenol	NIV	23282-20-4	430.146	0,2
ocratoxina A	OTA	303-47-9	442.530	8
ocratoxina A, S9-tratada	OTA S9	303-47-9	442.530	10
Bifenilo policlorado 153	PCB153	35065-27-1	37.034	20
PFOS	PFOS	1763-23-1	74.483	20
2-amino-1-metil-6-fenilimidazo[4.5-b]piridina	PhIP	105650-23-5	1.530	50
prednisolona	PRD	50-24-8	5.755	500
N-(3,4-Diclorofenil)propanamida (Propanilo)	PROP	709-98-8	4.933	100
Cloruro de tributilestaño	TBTC	1461-22-9	15.096	0,1
Óxido de tributilestaño	TBTO	56-35-9	16.682.746	0,1

Tabla 2, lista de compuestos de control.

Controles				
Nitrato de plata	AgNO3	7761-88-8	24.470	1,35
ampicilina	AMP	69-53-4	6.249	850
azatioprina	AZA	446-86-6	2.265	0,1
Ftalato de bis(2-etilhexilo)	DEHP	117-81-7	8.343	300
Citrato trisódico	Citrato Na	8055-55-8	71.474	2.000
dimetilnitrosamina	DMNA	62-75-9	6.124	34
furosemida	FURO	54-31-9	3.440	100
2-amino-3-metil-3H-imidazo[4.5-F]quinolina	IQ	76180-96-6	53.462	50

Controles				
MANITOL	MANITOL	69-65-8	6.251	2.000
N,N'-metilenbisacrilamida	MBA	110-26-9	8.041	200
uretano	uretano	51-79-6	5.641	20.000

Tabla 3 Lista de genes marcadores

Símbolo del gen	Nombre del gen	Acceso ARNm
HMGCS1	3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA sintasa 1 (soluble)	NM_001098272
CHAC1	ChaC, homólogo 1 regulador de transporte de cationes (E. coli)	NM_001142776
CRIM1	regulador 1 BMP transmembrana rica en cisteina (tipo cordina)	NM_016441
ABCA1	Casete de unión de ATP, sub-familia A (ABC1), miembro 1	NM_005502

Tabla 4: Niveles de expresión de genes marcadores en la exposición a compuestos inmunotóxicos.

compuestos inmunotóxicos	Genes			
	HMGCS1	ABCA1	CRIM1	CHAC1
1-NPR	-2,4 ± 1,1	1,3 ± 1,2	1,3 ± 1,6	-1,2 ± 1,4
PFOS	-1,1 ± 0,2	-4,3 ± 0,2	-1,5 ± 0,4	1,8 ± 1,5
PRD	1,7 ± 0,1	1,0 ± 0,6	3,9 ± 0,6	2,7 ± 1,9
6MP	-1,2 ± 0,0	-3,2 ± 0,4	1,0 ± 0,6	1,8 ± 1,1
CsA	2,3 ± 0,5	-1,8 ± 0,3	1,1 ± 0,7	3,1 ± 3,1
DEX	1,0 ± 0,1	-2,0 ± 0,1	1,4 ± 0,6	-1,2 ± 0,5
DON	-1,5 ± 0,3	-1,9 ± 0,2	1,4 ± 0,4	-1,4 ± 0,4
PCB153	2,0 ± 1,2	1,1 ± 1,4	-1,2 ± 2,2	1,2 ± 3
PhIP	-1,4 ± 1,1	-2,2 ± 2,5	-1,7 ± 2,5	-1,1 ± 2,4
MPA	-2,4 ± 0,0	1,1 ± 0,7	-1,2 ± 0,1	1,5 ± 0,9
MTX	-1,3 ± 0,2	-1,8 ± 0,3	1,4 ± 1,1	-1,1 ± 0,2
NIV	1,0 ± 1,2	1,1 ± 1,7	1 ± 1,9	-1,5 ± 2,5
PROP	-3,4 ± 0,1	1,3 ± 1	1,4 ± 0,1	-1,1 ± 0,5

ES 2 627 832 T3

compuestos inmunotóxicos	Genes			
	HMGCS1	ABCA1	CRIM1	CHAC1
BaP S9	1,1 ± 0,7	1,2 ± 1,5	1,0 ± 0,4	-30,2 ± 0,0
EtOH	-1,5 ± 1,1	1,2 ± 1,0	-1,2 ± 1,2	34,3 ± 2,3
FTY720	2,7 ± 0,5	-2,8 ± 0,3	-1,4 ± 0,3	-1,6 ± 0,3
MEHP	1,6 ± 0,9	-1,2 ± 0,1	-1 ± 0,6	3,5 ± 2,1
TBTC	-1,4 ± 0	40,8 ± 29,7	1,0 ± 0,1	1,3 ± 0,7
TBTO	-1,5 ± 0,1	30,9 ± 8,5	-1,1 ± 0,8	-1,1 ± 0,4
CP S9	2,0 ± 1	1,9 ± 1,6	1,1 ± 0,3	-22,6 ± 0,0
DZN	-1,9 ± 0,1	2,7 ± 2,8	4,0 ± 1,9	4,3 ± 3,8
CdCl2	2,2 ± 1,3	1,3 ± 1,3	4,3 ± 2,0	7,0 ± 1,5
OTA	-2,5 ± 0,1	-2,2 ± 0,1	-1,3 ± 0,1	32,9 ± 14,5
As2O3	-1,1 ± 0,2	1,4 ± 0,3	2,4 ± 1,1	41,2 ± 32,5
OTA S9	2,0 ± 1,0	1,3 ± 1,8	-1,1 ± 0,5	-13,8 ± 0,0
LIN	-2,4 ± 0	3,4 ± 3,6	2,3 ± 0,1	10,2 ± 7,6
CONTROLES No inmunotóxicos				
AgNO3	1,6 ± 0,9	1,5 ± 1,2	1,1 ± 0,3	-1,1 ± 0,5
AMP	1,4 ± 0,3	-1,7 ± 0,2	1,2 ± 1,1	-1,5 ± 0,7
AZA	1,1 ± 0,2	-1,9 ± 0,3	1,8 ± 1,0	2,3 ± 2,1
DEHP	1,2 ± 0,1	-1,2 ± 0,3	1,9 ± 1,5	-1,1 ± 0,4
Citrato de Na	-1,4 ± 0,4	-2,0 ± 0,2	1 ± 0,2	1,1 ± 0,2
DMNA	1,2 ± 1,1	-1,8 ±	-1,2 ± 1,5	-1,5 ± 1,5
FURO	1,1 ± 0,2	-1,4 ± 0,4	1,4 ± 0,5	1,6 ± 1,6
IQ	-1,3 ± 1,1	1,0 ± 2,2	1,1 ± 1,8	-1,1 ± 2,2
MANITOL	1,2 ± 0,3	-1,4 ± 0,3	1,1 ± 0,7	-1,2 ± 0,2

Compuestos inmunotóxicos	Genes			
	HMGCS1	ABCA1	CRIM1	CHAC1
MBA	1,0 ± 1,1	-2,3 ± 2,1	1,1 ± 1,9	1,5 ± 2,1
uretano	1,2 ± 0,3	-1,4 ± 0,1	1,1 ± 0,5	1,2 ± 0,4

Ejemplos

Ejemplo 1 Cultivo de células.

5 Se obtuvo estirpe celular T linfoblástica humana (Jurkat) de la colección americana de cultivos tipo (clon E6-1 Jurkat, N° cat. TIB-152TM, ATCC). Las células Jurkat se cultivaron en medio RPMI-1640 (Invitrogen) enriquecido con suero fetal bovino (SFB) inactivado por calor al 10%, glutamina 2 mM, piruvato de sodio 1 mM, aminoácido no esencial 1 mM, 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina. Se cultivaron las células a 37°C con CO₂ al 5% en una atmósfera humidificada. Los cultivos de células Jurkat se mantuvieron en frascos T-75 (GIBCO), a un volumen de 30 ml y se refrescó el medio cada 2 días.

10 Ejemplo 2: Compuestos

Se ensayó una serie de compuestos inmunotóxicos conocidos en el método como se describe en la presente memoria. Esos compuestos se enumeran en la tabla A. Como control, se ensayaron once compuestos con el mismo método. Estos compuestos de control y sus particulares se enumeran en la tabla B. Las disoluciones de reserva de todos los productos químicos se prepararon disolviendo las sustancias en dimetilsulfóxido (DMSO; Merck, Darmstadt, Alemania). benzo[a]pireno (BaP), ocratoxina A (OTA) y ciclofosfamida (CP) necesarios para ser bioactivados antes de ejercer sus efectos inmunomoduladores (Carlson et al., Mar Environ Res. Agosto - Diciembre de 2.004; 58 (2-5): 731-4.; Ekhardt et al. Cancer Treat Rev. Feb 2.009; 35 (1): 18-31, Manderville, Chem Res Toxicol. Jul. 2.005; 18 (7): 1.091-7). Por lo tanto, se sometieron estos compuestos a un sistema de activación metabólica in vitro usando fracciones S9 mezcladas de hígados humanos conteniendo enzimas hepáticas. Las mezclas de reacción S9, con un volumen total de 1 ml, consistieron en 570 µl de H₂O (MQ), 200 µl de tampón de fosfato de potasio 0,5 M (pH 7,4), 100 µl de disolución A de sistema de regeneración NADPH (BD Bioscience, Breda, Países Bajos), 20 µl de disolución B de sistema de regeneración NADPH (BD Bioscience, Breda, Países Bajos), 10 µl de stock de compuesto en DMSO y 100 µl de mezcla S9 (BD Bioscience, Breda, Países Bajos). Después de incubar durante 1, 6 y 24 horas, respectivamente, se inactivaron por calor las mezclas de reacción química S9 (5 minutos a 56°C) y se mezclaron en volúmenes iguales.

Ejemplo 3: Selección de concentraciones de exposición de los compuestos.

Se determinaron curvas de respuesta dosis - viabilidad para cada compuesto, en exposiciones químicas de 24 h en un formato de placa de 96 pozos, en al menos N=3 experimentos independientes. Se usaron dos pruebas diferentes como métodos de lectura para la viabilidad, siendo la prueba ATPLite la que determina el contenido en ATP intracelular y la prueba WST-1 la que determina la actividad de la deshidrogenasa mitocondrial.

También se estableció el valor 24 h ≤ CV80 para cada compuesto. Esto significa que para cada compuesto se determinó la concentración más alta que proporcionaba un valor de viabilidad de ≥ 80% en la exposición de células Jurkat durante 24 horas. Estos valores se determinaron por separado para las pruebas ATPLite y WST-1. Estos valores ≤CV80 se usaron como concentraciones de exposición final de 6 h para los experimentos de elaboración de perfiles de expresión de ARNm que siguen. Si las pruebas ATPLite y WST-1 proporcionaban diferentes valores de CV80, se eligió el valor más bajo como concentración de exposición final.

Ejemplo 4: Prueba WST-1.

WST-1 (4-[3-(4-yodofenil)-2-(4-nitrofenil)-2H-5-tetrazolio]-1,3-bencenodisulfonato, Roche Diagnostic Ned BV, Almere, Países Bajos) es una sal de tetrazonio soluble en agua que es escindida por deshidrogenasas mitocondriales para formar un complejo de formazán coloreado y la cantidad de formazán se correlaciona con la viabilidad de las células. Las células Jurkat (11.000 por pozo) se pusieron en placas 20 horas por adelantado en placas de 96 pozos, así en el punto de partida de la exposición hubo aproximadamente 20.000 células por pozo. Se realizó la exposición por triplicado en 100 µl de medio durante 24 horas para aumentar las concentraciones de los compuestos o para los controles de vehículo. En las últimas 2 horas de exposición, se añadió 10 µl de reactivo WST-1. Se midió la absorbancia a 450 nm en una lectora de microplacas (BioTek, Winooski Vermont, EE.UU.).

Ejemplo 5: Prueba ATPlite

La prueba ATPlite (Perkin Elmer, Oosterhout, Países Bajos) se basa en la producción de luz producida por la reacción de ATP con luciferasa y D-luciferina añadidas. La luz emitida es proporcional a la cantidad de ATP, que es un marcador para viabilidad celular. Las células Jurkat (11.000 por pozo) se pusieron en placas 20 horas por adelantado en placas de 96 pozos, así en el punto de partida de la exposición hubo ~20.000 células por pozo. Se realizó la exposición por triplicado en 100 µl de medio en placas de 96 pozos durante 24 horas para aumentar las concentraciones de los compuestos o para los controles de vehículo. Después de la exposición, se realizó la prueba según el protocolo del fabricante.

Ejemplo 6: Exposiciones químicas

Se usaron células Jurkat entre los pases 16 a 20 en los experimentos de exposición de 6 horas. Se sembraron 750.000 células en 2,7 ml de medio por pozo en placas de 6 pozos (GIBCO). Después de cultivar las células durante 20 horas, se añadieron a cada pozo 0,3 ml de disoluciones madre de compuesto concentrado x 10 (37 grados C con CO₂ al 5% en una atmósfera humidificada), que habían sido diluidas previamente x 100 en medio de cultivo de células Jurkat, conteniendo 2,7 ml de medio con las células. Durante las exposiciones, se mantuvieron las concentraciones finales de DMSO a 0,1% para todas las muestras. Se realizaron los N=3 experimentos en días diferentes usando células Jurkat de diferentes pases, respectivamente.

Ejemplo 7: Aislamientos de ARN total y síntesis de ADNc.

Después de haber sido expuestas a los compuestos o controles de vehículo durante 6 horas, se transfirieron las células a viales de 15 ml (Greiner), seguido por centrifugación (5 min a 300 g, 4°C). Después, se retiró el medio, y se volvieron a suspender los gránulos en SFB enfriado con hielo, seguido por centrifugación (5 min a 300 g, 4°C). Después, se volvieron a suspender las células en tampón RLT que contenía 10% de β-mercaptoetanol, se congelaron instantáneamente en nitrógeno líquido (>5 minutos) y se almacenaron a -80°C. Se aisló el ARN total usando el estuche QIAshredder (Qiagen, cat. #79656), según el protocolo del fabricante. Se realizó purificación de ARN posterior según el protocolo del fabricante, usando el estuche miRNeasy Mini (Qiagen, cat. #217004) incluyendo un tratamiento de DNasa-1 en columna (Qiagen, cat. 79254). Se valoró el rendimiento de ARN de manera espectrofotométrica (NanoDrop 2000, Thermoscientific, vía Isogen-lifescience, De Meern, Países Bajos). Se determinó la calidad de ARN total aplicando 250 nanograma de ARN total para electroforesis en gel automatizada usando chips Experion (cat#700-7103, Experion, Biorad, Veenendaal, Países Bajos). Se consideró que las muestras con Números de índice de calidad de ARN (ICA) > 8 eran de suficiente calidad. Se sintetizaron muestras de ADNc de muestras de ARN total usando estuche de transcripción inversa miScript según el protocolo del fabricante, usando 250 nanograma de ARN total como entrada de muestra (cat# 218161, Qiagen, Venlo, Países Bajos).

Ejemplo 8: Experimentos de PCR cuantitativa en tiempo real Multiplex de Fluidigm.

Se sometieron las muestras de ADNc a 14 ciclos de multiplicación de objetivo específico (MOE), usando una mezcla x 0,2 de todas las pruebas de expresión de genes Taqman combinadas (cebadores/sonda) y la mezcla Taqman PreAmp Master (Applied Biosystems), seguido por diluciones de 5 veces. Se incluyó agua como control sin plantilla (CSP).

Los CSP también se incluyeron en la reacción STA, para servir como un control negativo verdadero para el procedimiento completo. Después de la dilución de 5 veces, se mezclaron las muestras STA con las pruebas Taqman. Entonces cada muestra se dispensó sobre la matriz BioMark 96.96 Dynamic (Fluidigm, Sur de San Francisco, CA 94080, EE.UU., distribuidor Bioké, Leiden, Países Bajos). Se llenaron las posiciones vacías de la prueba con no controles de prueba (NCP, en los que la mezcla de pruebas x20 se sustituyó con agua.

Se llenó la matriz Biomark Dynamic usando el controlador de circuito fluido integrado Biomark (Fluidigm, Sur de San Francisco, CA 94080, EE.UU.). Después se puso la matriz BioMark 96.96 Dynamic cargada en el sistema PCR de tiempo real Biomark (Fluidigm, Sur de San Francisco, CA 94080, EE.UU.) donde se realizaron las reacciones de ciclos térmicas y se detectó fluorescencia usando una cámara CCD. Se usó el protocolo de PCR Taqman por defecto en el instrumento BioMark con una temperatura de hibridación de 60°C y un total de 35 ciclos de PCR. Las comparaciones por pares de todas las muestras se realizaron con cada una de las pruebas por duplicado en la matriz.

Ejemplo 9: Análisis de datos Q-RT-PCR.

Al final de cada ciclo de PCR se recogieron datos de las cámaras de reacción en cada serie y se extrajeron valores Ct usando el programa de análisis PCR de tiempo real BioMark, versión 3.0.2. Se fijó el umbral de calidad en 0,65 (valor por defecto).

Se calcularon los niveles de expresión de ARNm relativos para cada muestra individual aplicando el método delta-delta-CT. Delta (1) fue la corrección para abundancia de ARNm usando genes de referencia y Delta (2) fue la corrección para los controles de vehículo (en su mayoría DMSO). Cuando se usaron N=3 genes de referencia que habían demostrado expresarse de manera constante sin estar influenciados por exposiciones del compuesto (las mayores correlaciones de Pearson con una relación de expresión de ARNm (compuesto / control de portador) de 1,0), en la expresión de ARNm de micromatriz "compendio" conjunto de datos que consistía en N=256 muestras. Los

tres genes de referencia fueron beta-2-macroglobulina (B2M, muy abundante), proteína 4 de tráfico de golgi a RE (GET4) y clase G1 de biosíntesis de ancla de fosfatidilinositolglicano (PIGG), respectivamente.

Ejemplo 10: Criterios de genes clasificadores de niveles de ARNm cambiados.

- 5 En el contexto de seleccionar genes clasificadores para inmunotoxicidad, se define un nivel de ARNm cambiado como sigue:

En 6 horas de exposición a un nivel sub-citotóxico de un compuesto inmunotóxico el nivel de ARNm de un gen clasificador se aumenta, o se disminuye por $\geq 2,0$ veces, cuando se compara con 6 horas de exposición a un control de vehículo (tal como 0,1% (v/v) de DMSO, o medio), en al menos dos de tres experimentos de exposición independientes.

- 10 Se define un nivel sub-citotóxico en la sección denominada Selección de concentraciones de exposición de los compuestos. En resumen, se define un nivel sub-citotóxico como la concentración más alta que presenta, en 24 horas de exposición, un efecto $< 20\%$ sobre la viabilidad de células Jurkat, cuando se determina por dos pruebas separadas (WST-1, Roche y ATPLite, Perkin Elmer) y se corrigieron para diferencias en densidad celular entre compuesto de ensayo y control de vehículo.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Método *in vitro* para determinar si un compuesto es inmunotóxico, en el que el nivel de expresión de al menos un gen marcador se determina en una muestra obtenida a partir de una célula Jurkat cultivada *in vitro*, que se expone al compuesto en el cultivo *in vitro*, en el que el gen marcador es *ABCA1* y en el que se concluye que el compuesto es inmunotóxico si el nivel de expresión del gen marcador *ABCA1* está por debajo de, o por encima de, un valor de referencia predeterminado.
- 10 2. Método según la reivindicación 1, en el que el nivel de expresión de tres genes marcadores adicionales se determina en la muestra obtenida a partir de la célula Jurkat cultivada *in vitro*, en el que se concluye que el compuesto es inmunotóxico si el nivel de expresión de al menos un gen marcador adicional está por debajo de, o por encima de, un valor de referencia predeterminado, en el que los genes marcadores adicionales son *CHAC1*, *CRIM1* y *HMGCS1*.
- 15 3. Método según la reivindicación 1, en el que se concluye que el compuesto es inmunotóxico si el nivel de expresión del gen marcador *ABCA1* está al menos 2 veces por debajo de, o por encima de, un valor de referencia predeterminado.
4. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 3, en el que la célula Jurkat se expone al compuesto durante un periodo de tiempo que oscila de varias horas a varios días.
5. Método según la reivindicación 4, en el que el periodo de tiempo es 6 horas.
6. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 – 5, en el que el valor de referencia predeterminado es un valor obtenido de la expresión de un gen de referencia.
- 20 7. Método según la reivindicación 6, en el que el gen de referencia se selecciona del grupo que consiste en: beta-2-macroglobulina, proteína 4 de tráfico de Golgi a RE y clase G1 de biosíntesis de ancla de fosfatidilinositolglicano.