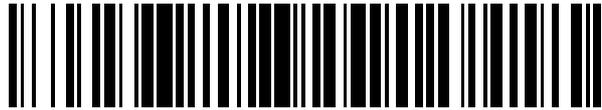


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 660 131**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/50** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.05.2013 PCT/EP2013/001575**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.12.2013 WO13185884**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.05.2013 E 13725576 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.11.2017 EP 2861985**

54 Título: **Análisis de la expresión proteica para identificar compuestos genotóxicos**

30 Prioridad:

**13.06.2012 US 201261659024 P**

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

**20.03.2018**

73 Titular/es:

**MERCK PATENT GMBH (100.0%)  
Frankfurter Strasse 250  
64293 Darmstadt, DE**

72 Inventor/es:

**MUELLER, STEFAN OTTO y  
DIETZ, YASMIN**

74 Agente/Representante:

**CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel**

ES 2 660 131 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

Análisis de la expresión proteica para identificar compuestos genotóxicos

5 La invención se relaciona con un método para seleccionar compuestos con actividad (pro)genotóxica que comprende proveer un sistema capaz de expresar un panel de proteínas definidas, incubar por lo menos una porción del sistema con los compuestos a seleccionar y comparar la expresión de las proteínas en el sistema con la expresión proteica en un sistema control, para así detectar la actividad (pro)genotóxica. Otro objeto de la invención se refiere a un método para monitorear la probabilidad de desarrollar una condición fisiológica y/o patológica que es causada, que está mediada y/o que es propagada por la desregulación genética de la proliferación, diferenciación y/o reparación de daños, como respuesta a un compuesto administrado a un mamífero que necesita de dicho tratamiento mediante la determinación de un nivel de expresión de proteínas definidas en una muestra biológica tomada de dicho mamífero. La invención también se relaciona con el uso de un kit para seleccionar compuestos con actividad (pro)genotóxica que comprende anticuerpos que se unen específicamente a proteínas marcadoras.

15 La evaluación exhaustiva del potencial genotóxico de un compuesto es una parte importante durante la evaluación del riesgo químico y el desarrollo farmacéutica (véase, Fox et al., 2012). La batería actual de pruebas estándar comprende pruebas in vitro e in vivo diseñados para detectar compuestos que inducen en el ADN mediante una variedad de mecanismos de acción diferentes. Se requiere un ensayo de mutación reversa bacteriana así como una prueba de genotoxicidad con células de mamífero in vitro y/o in vivo. Los sistemas de pruebas de genotoxicidad son cada vez más importantes debido al hecho que los compuestos positivos en estas pruebas son potenciales carcinógenos humanos. Sin embargo, las baterías de pruebas estándar tienen un rendimiento bajo y requieren de cantidades comparativamente grandes del compuesto. Por este motivo, estos ensayos son menos adecuados en la fase de descubrimiento temprana de fármacos (Westerink et al., 2011, Mutat. Res., 724, 7-21).

25 Con frecuencia, los compuestos químicos que no resultan ser genotoxinas in vivo, o que no inducen tumores por medio de un mecanismo mutagénico o que reaccionan con ADN, dan resultados falsos positivos en pruebas de células de mamífero, lo cual complica la extrapolación de riesgo en humanos. Adicionalmente, en términos de la caracterización química en la legislación EU REACH y la evaluación de riesgo moderna, los análisis mecanicistas se volvían cada vez más importante.

30 Ahora las dificultades están forzando el desarrollo de nuevas herramientas in vitro. Se necesitan nuevos sistemas de pruebas de genotoxicidad con una especificidad mejorada (es decir, menos resultados falsos positivos) sin pérdida de la sensibilidad (es decir, detección de carcinógenos que reaccionan con ADN y genotoxinas in vivo) (Kirkland et al., 2005, Mutat. Res., 584, 1-256; Kirkland et al., 2006, Mutat. Res., 608, 29-42; Kirkland et al., 2008, Mutat. Res., 653, 99-108).

35 Por ello, el problema técnico que constituye la base de la presente invención consiste en proporcionar un método para seleccionar compuestos que permitan efectivamente la identificación y caracterización de sus propiedades genotóxicas y/o progenotóxicas. Otro problema de la invención comprende proporcionar el uso de un kit para detectar la actividad genotóxica y/o progenotóxica. La presente invención resuelve el problema al proporcionar un método para seleccionar compuestos con actividad genotóxica y/o progenotóxica que comprende el paso de determinar los niveles de expresión de las formas activas de las proteínas p-p53 (Ser15), p21, p-H2A.X (Ser139), p-ATM (Ser1981), p-Chk1 (Ser345), en un sistema incubado con uno o más compuestos en comparación con los niveles de expresión de dichas proteínas en el sistema sustancialmente no incubado con los compuestos o la misma concentración de los compuestos.

45 Los inventores han demostrado sorprendentemente que la combinación de por lo menos cinco de dichas proteínas se correlaciona con la genotoxicidad. En consecuencia, la pluralidad de proteínas marcadoras mencionada precedentemente representa nuevos marcadores de genotoxicidad, que son adecuados para diferenciar la etapa de genotoxicidad. Las proteínas subyacentes se seleccionan como resultado de un análisis de expresión diferencial. Todas las expresiones proteicas se caracterizan por una diferencia distintiva con respecto a las células no tratadas, en donde las células tratadas muestran la diferencia por una regulación positiva. Las proteínas determinadas ya están descritas en el arte según su secuencia y otras características, pero carecen de una relación con la genotoxicidad en la combinación definida de la invención. Se puede utilizar cualquiera de las combinaciones de pares de proteínas marcadoras, opcionalmente suplementadas con otras proteínas marcadoras, para la mayor confiabilidad de la prueba. Las proteínas se pueden nombrar de otra manera, pero se definen de manera inequívoca por el número de acceso, que está aceptado en general y registrado en numerosas bases de datos, tales como UniProt, SwissProt y semejantes (véase la Tabla 1; Zhou y Bartek, 2004, Nat Rev Cancer 4, 216-25).

55 Aunque las nueve proteínas identificadas están involucradas en la red de transducción de señales de respuesta de daño al ADN, no se asocian inevitablemente según su función o ubicación en su entidad conocida al presente, pero no se excluye que dichas relaciones puedan aparecer entre un solo miembro o más miembros del grupo.

- La red de transducción de señales de respuesta de daño al ADN está compuesta por al menos dos vías diferentes: la vía de la ataxia telangiectasia quinasa mutada (ATM) y ataxia telangiectasia mutada y la vía relacionada con Rad3 (ATR). La vía ATM se inicia, como respuesta al ADN dañado, por autofosforilación de ATM en la Ser1981. La ATM regula los puntos de control del ciclo celular y la reparación del ADN a través de la fosforilación de un par de proteínas. La vía ATR responde a las rupturas de hebra doble del ADN (DSB) – si bien de manera más lenta que la vía ATM - y a los compuestos químicos que interfieren con la horquilla de replicación del ADN. Hay dos sitios de fosforilación (p-ATR (Ser428) y p-ATR (Thr1989)) que pueden conducir a la activación de ATR. Los sensores que reconocen inicialmente la estructura de ADN aberrante y activan la red de respuesta de daño del ADN aún no son claros.
- 5
- 10 Un evento muy temprano de la respuesta al daño del ADN es la fosforilación de la histona H2A.X a través de ATM en la Ser139. La H2A.X fosforilada se acumula en los sitios del daño del ADN y recluta una variedad de señales de respuesta al daño del ADN y de reparación del ADN.
- Las rupturas de hebra doble de ADN inducen fosforilación de la Chk2 en la Thr68 y en otros sitios en esta región por ATM lo cual conduce a un arresto del ciclo celular y/o apoptosis dependiente de p53 o independiente de p53.
- 15 La fosforilación de p53 en la posición Ser15 en particular a través de ATM impide la capacidad de mdm2 de unirse y detiene su degradación. La p53 fosforilada, y por ende activada, actúa como un factor de transcripción para un par de genes que incluyen el gen de la proteína p21 y de la proteína de arresto del crecimiento e inducible por daño del ADN a (Gadd45a). La P21 inhibe diferentes quinasas dependientes de ciclina que conduce al arresto del ciclo celular en la fase G1. Aún más, la p21 se une a PCNA e interrumpe la replicación del ADN. La Gadd45a nuclear inducida interactúa con la quinasa dependiente de ciclina 2 (cdc2) y conduce a su disociación del complejo cdc2/ciclina B1. La ciclina libre B1 es exportada hacia el citoplasma y degradada por ubiquitinación. Por ende, la Gadd45a inhibe la actividad cdc2 quinasa y la célula permanece en la transición hacia la mitosis.
- 20
- Además de la inhibición mediada por Gadd45a de la cdc2 quinasa, también tiene lugar una mediación a través de la Chk1. La Chk1 puede ser activada por las ATM y ATR quinasas, pero la fosforilación de Chk1 en la Ser345 y la Ser317 son realizadas por ATR. La Chk1 puede fosforilar la fosfatasa Cdc25C en la Ser216 que desactiva la pérdida de la fosforilación inhibitoria de cdc2 en Thr14 y Tyr15 y la célula permanece en la transición de fases G2/M.
- 25
- El análisis de las proteínas y las moléculas asociadas, como se describió antes, demuestra la regulación compleja de la muerte y supervivencia celulares, por ejemplo, como respuesta a la exposición de las células HepG2 a agentes (pro)genotóxicos. Los procesos que son afectados fundamentalmente comprenden regulación del ciclo celular, proliferación celular y apoptosis. Las proteínas que según se observó eran reguladas diferencialmente se pueden asignar predominantemente a funciones proapoptóticas y antiproliferativas. Los datos indican la inducción del arresto del ciclo celular y la muerte celular programada como respuesta a un daño del ADN inducido por compuestos.
- 30
- El vínculo de la genotoxicidad con distintas proteínas se utiliza para la detección in vitro de mutágenos y promutágenos, que pueden interferir con la señalización en la proliferación, diferenciación o reparación de daños. La construcción de un perfil de expresión de proteínas específico de un compuesto, que se basa en la pluralidad de proteínas de la invención, resulta en un beneficio inesperado para establecer un mecanismo de acción genotóxico y, por ello, favorece la evaluación de los riesgos o beneficios potenciales de los compuestos nuevos, ya sea como una alternativa o como un suplemento de los métodos de selección clásicos. El principio de invención subyacente al método de la presente comprende detectar las proteínas definidas. El producto genético se elige con respecto a su cantidad absoluta y relativa, así como a la especificidad por un determinado tipo celular.
- 35
- 40 Una "proteína" se refiere a un compuesto bioquímico que comprende uno o más polipéptidos. Un polipéptido es una cadena polimérica lineal simple de aminoácidos unidos entre sí por medio de enlaces peptídicos entre los grupos carboxilo y amino de residuos de aminoácidos adyacentes. Típicamente se pliega en una forma globular o fibrosa para facilitar una función biológica. Una "forma activa" de una proteína se refiere al hecho que los residuos de una proteína a menudo son modificados químicamente mediante una modificación de postraducción, que altera las propiedades físicas y químicas, el plegamiento, la estabilidad, la actividad y, en última instancia, la función de la proteína. Por ejemplo, la actividad del factor de transcripción p53 está regulada crucialmente por medio de una fosforilación de la proteína que puede ser inducida por múltiples señales, incluyendo un estrés celular general, daño del ADN o interferones.
- 45
- 50 Una "pluralidad de proteínas", según se usa en la presente, se refiere a un grupo de proteínas identificadas o aisladas, cuyos niveles de expresión varían en diferentes tejidos, células o bajo condiciones o estados biológicos diferentes. Las diferentes condiciones pueden ser causadas por exposición a determinados agentes – ya sean exógenos o endógenos – que incluyen hormonas, ligandos de receptores, compuestos químicos y semejantes. La expresión de una pluralidad de proteínas presenta ciertos patrones. Es decir, cada proteína de la pluralidad es expresada de manera diferente en distintas condiciones, o con o sin exposición a determinados agentes endógenos o exógenos. La extensión o el nivel de expresión diferencial de cada proteína varían en la pluralidad y se puede determinar cualitativamente y/o cuantitativamente de acuerdo con esta invención. Un perfil de expresión de
- 55

proteínas, según se usa en la presente, se refiere a una pluralidad de proteínas que se expresan diferencialmente a diferentes niveles, lo cual constituye un "patrón" o un "perfil." Según se usa en la presente, los términos "perfil de expresión", "perfil", "patrón de expresión", "patrón", "perfil de expresión de proteínas" y "patrón de expresión de proteínas" se utilizan indistintamente.

5 Según se usa en la presente, un "compuesto con actividad genotóxica", también conocido como "mutágeno", es un agente físico o químico que cambia el material genético, habitualmente ADN, de un organismo y por consiguiente aumenta la frecuencia de mutaciones por encima de un nivel basal natural. El especialista sabría que, por ejemplo, uno de los efectos biológicos de los mutágenos consiste en promover el desarrollo de cáncer. Otros efectos biológicos de los mutágenos están bien documentados y descritos. Los cambios en las secuencias de ácidos nucleicos por mutaciones comprenden la sustitución de pares de bases de nucleótidos y las inserciones y supresiones de uno o más nucleótidos en las secuencias de ADN.

15 Primero, se provee un sistema y se incuba en su totalidad o en partes. El sistema también se denomina sistema de prueba de aquí en adelante. Aunque se prefiere un sistema celular, como alternativa se puede usar un sistema de traducción in vitro que se basa en la síntesis de proteínas sin células vivas. El sistema celular se define como cualquier sujeto siempre que dicho sujeto comprenda células. Por ende, el sistema celular se puede seleccionar del grupo de células individuales, cultivos de células, tejidos, órganos, plantas y animales. El alcance del sistema celular también comprende partes de dichas entidades biológicas, es decir, muestras de tejidos, órganos, plantas y animales. Salvo las plantas, se comprenderá que cada sistema celular en el orden mencionado precedentemente podría representar una muestra del siguiente sistema respectivo. Las muestras de células, animales no humanos, mamíferos o mamíferos no humanos constituyen formas de realización preferidas del sistema celular de acuerdo con la invención. Una muestra de células se refiere a cualquier tipo de célula primaria o células modificadas genéticamente, ya sea en estado aislado, en cultivo o como una línea celular. En particular, la muestra de células se toma in vivo o in situ de un mamífero a evaluar. La toma de la muestra de células se realiza según una buena práctica médica. Las muestras biológicas se pueden tomar de cualquier tipo de especie biológica, pero la muestra se toma especialmente de un ser humano, una rata o un ratón. El sistema celular también puede comprender un fluido biológico, en donde la muestra del fluido corporal preferiblemente consiste en sangre, suero, plasma, saliva u orina. También se prefiere recolectar una muestra de tejido mediante una biopsia, especialmente tomada cerca de la ubicación de la enfermedad. Las muestras biológicas pueden ser originarias de cualquier tejido, incluyendo hígado, riñón, intestino, médula espinal, etc. En formas de realización preferidas, las muestras biológicas son de riñón, hígado e intestino. La muestra se puede purificar para eliminar sustancias perturbadoras, tales como inhibidores de la formación de puentes de hidrógeno.

35 El sistema tiene la capacidad para expresar, o expresa, varias proteínas entre p53, p21, H2A.X, ATM, Chk1, ATR, cdc2, Gadd45a o Chk2. Adicionalmente, el sistema tiene la capacidad para expresar, o expresa, MDM2. El sistema también tiene la capacidad para activar, o activa, varias proteínas entre p-p53 (Ser15), p21, p-H2A.X (Ser139), p-ATM (Ser1981), p-Chk1 (Ser345), p-ATR (Ser428), p-cdc2 (Thr14/Tyr15), Gadd45a y p-Chk2 (Thr68). El sistema preferiblemente tiene la capacidad para expresar, o expresa, formas activas de por lo menos dos proteínas seleccionadas del grupo de p-p53 (Ser15), p21, p-H2A.X (Ser139), p-ATM (Ser1981), p-Chk1 (Ser345), p-ATR (Ser428), p-cdc2 (Thr14/Tyr15), Gadd45a y p-Chk2 (Thr68). Más preferiblemente, el sistema tiene la capacidad para expresar, o expresa, formas activas de por lo menos dos proteínas seleccionadas del grupo de p-p53 (Ser15), p21, p-H2A.X (Ser139) y p-Chk1 (Ser345). Más preferiblemente, el sistema tiene la capacidad para expresar, o expresa, formas activas de por lo menos dos proteínas seleccionadas del grupo de p-p53 (Ser15), p21, p-H2A.X (Ser139), p-ATM (Ser1981) y p-Chk1 (Ser345).

45 Se comprenderá que las variantes, mutantes, partes u homólogos de secuencias de proteínas que cumplen la misma función están incluidos en la descripción. Preferiblemente, la homología alcanza por lo menos un 85%. Las alteraciones posibles comprenden la supresión, inserción, sustitución, modificación y adición de por lo menos un aminoácido, o la fusión con otro péptido o proteína. Las células modificadas pueden expresar estas proteínas después de una transfección con los vectores apropiados que contienen la secuencia de ácido nucleico subyacente o partes de la misma. Preferiblemente, las células recombinantes son de origen eucariota.

50 En una forma de realización más preferida de la presente invención, se proveen células HepG2 para el método de selección. La dosis de S9 usada tiene efecto sobre el resultado experimental a pesar de dar negativo en las evaluaciones de citotoxicidad. Se debe notar que la dosis es comparable a la dosis usada en las pruebas reguladoras estándar de genotoxicidad. Los genes regulados significativamente por S9 difieren de aquellos que fueron inducidos por los agentes (pro)genotóxicos y se puede ajustar el efecto de S9 por comparación con los controles apropiados. En cualquier caso, un sistema celular que tiene una actividad metabólica intrínseca suficiente ciertamente sería apropiado, pero actualmente no existe tal sistema celular metabólicamente competente para evaluar la genotoxicidad. Los hepatocitos primarios constituyen el estándar de oro actual para los estudios de metabolismo de fármacos y de inducción/inhibición por CYP in vitro. Aún cuando los hepatocitos adultos diferenciados carecen de proliferación la competencia las vuelve un modelo inadecuado para las investigaciones de genotoxicidad, y también presentan cambios significativos en la morfología así como en la expresión de proteínas y genes durante el cultivo, una disponibilidad limitada de hepatocitos humanos y a menudo una marcada variabilidad

ente donantes/lotos lo cual complica la normalización de tales sistemas, un gran ventaja de las células HepG2 son sus características moleculares humanas. Por ejemplo, se expresan blancos específicos tales como topoisomerasas y enzimas de reparación eucariotas e impiden una sobreestimación de la genotoxicidad y por ello contribuyen en la reducción de falsos positivos.

5 La muestra de células se guarda, tal como congelada, se cultiva por un determinado período o es sometida inmediatamente al paso siguiente. Antes de incubarla con los compuestos a examinar y seleccionar, la muestra de células se podría dividir en múltiples porciones. Si se divide, se proveen por lo menos dos porciones; una se usa para la selección en tanto la otra sirve como control. Preferiblemente, la cantidad de porciones para la selección excede la cantidad de porciones control. Habitualmente, se someten numerosas porciones a una selección de alto  
10 rendimiento.

Los compuestos están formados por estructuras biológica y/o químicas capaces de interactuar con una molécula blanco. En la presente, cualquier componente de la señalización genómica o proteómica será considerado como una "molécula blanco", que no se limita a genes, o una proteína reguladora o un producto genético del mismo, o un  
15 componente de una vía de transducción de señales que comprende un gen o productos genéticos del mismo. En consecuencia, la interacción específica de los compuestos puede comprender ya sea el mero direccionamiento o bien, la inducción de alteraciones en la función celular, o hasta puede incluir ambos efectos simultáneamente.

Los compuestos que serán seleccionados con el método de la invención no están restringidos en modo alguno. En particular, los compuestos se seleccionan del grupo de ácido nucleicos, péptidos, carbohidratos, polímeros, moléculas pequeñas que tienen un peso molecular entre 50 y 1.000 Da y proteínas. Estos compuestos a menudo se  
20 encuentran disponibles en bibliotecas. Se prefiere incubar un solo compuesto con una porción distinta de la muestra de células. Sin embargo, también es posible investigar el efecto cooperativo de los compuestos mediante incubación de por lo menos dos compuestos en una porción. Mientras que una fracción del sistema celular se incuba con uno o más de los compuestos (pro)genotóxicos a analizar, otra porción de células se incuba en la ausencia de los compuestos y esta fracción adicional no tratada del sistema se usa como un control negativo. También es posible  
25 que el sistema pueda actuar simultáneamente como sistema de prueba y de control mediante determinación del estado antes de la exposición al estrés genotóxico y su comparación con el estado tras el estrés genotóxico. Más adelante se indican otros sistemas de control.

El término "incubación" indica el contacto de los compuestos con las células por distintos períodos, que dependen del tipo de compuesto y/o del blanco. El proceso de incubación también depende de varios otros parámetros, por  
30 ejemplo del tipo celular y la sensibilidad de detección, cuya optimización sigue los procedimientos de rutina conocidos por los especialistas en el arte. El procedimiento de incubación se puede realizar sin una conversión química de los mutágenos o puede involucrar una conversión metabólica de promutágenos. La adición de soluciones químicas y/o la aplicación de procedimientos físicos, por ejemplo el impacto de calor, puede mejorar la accesibilidad de las estructuras blanco en la muestra. Se forman productos de incubación específicos como resultado de la  
35 incubación.

La identificación de los compuestos efectivos en el sentido de la invención se efectúa indirectamente mediante determinación del patrón de expresión de por lo menos cinco proteínas definidas, que el sistema tiene la capacidad para expresar. La determinación se efectúa en un momento específico y se correlaciona con la fuerza de la señal al  
40 comienzo del experimento y el control. Por ejemplo, el sistema control no se incuba con los compuestos (control negativo) o el sistema control se incuba con un compuesto estándar que no tiene actividad genotóxica (control negativo). El sistema control también se puede incubar con un compuesto estándar que tiene actividad (pro)genotóxica (control positivo). La actividad queda revelada por un cambio en la expresión. Preferiblemente, las proteínas expresadas en células con exposición a mutágenos se comparan con las proteínas expresadas en células que no estuvieron expuestas a mutágenos. Se efectúan comparaciones apareadas entre cada uno de los  
45 tratamientos. Una comparación apareada implica que los datos de la expresión para una proteína dada bajo una condición de tratamiento dada se comparan con los datos de la expresión de esta proteína bajo una segunda condición de tratamiento. La comparación se efectúa usando una técnica estadística adecuada con la ayuda de programas conocidos y disponibles comercialmente.

Otro aspecto preferido de la invención comprende el hecho que la actividad (pro)genotóxica inherente se detecta si  
50 la expresión de proteínas está regulada positivamente en el sistema en comparación con un sistema control negativo, positivo o negativo, o si la expresión de proteínas es sustancialmente idéntica en el sistema y en un sistema control positivo. Con mayor detalle, (i) una mayor expresión proteica en el sistema de prueba en comparación con un sistema control negativo, que no se incuba con ningún compuesto, es indicativa de dicha actividad o (ii) una expresión proteica sustancialmente idéntica o mayor en el sistema de prueba en comparación con  
55 un sistema control positivo, que se incuba con un compuesto estándar que tiene actividad genotóxica y/o progenotóxica, es indicativa de dicha actividad o (iii) una mayor expresión proteica en un sistema de control relativo, que se incuba con compuestos que tienen una concentración distinta de aquella en el sistema de prueba siempre que se asigne una concentración más baja al sistema de control relativo, es indicativa de dicha actividad. Se comprenderá que no se requiere determinar la expresión mediante cinco o todas las comparaciones indicadas antes,

pero la indicación de actividad (pro)genotóxica que resulta de cualquier comparación de los niveles de expresión según (i), (ii) o (iii) implica inevitablemente la presencia de dicha actividad en cualquier otra determinación comparativa (ya sea si se efectúa o no).

5 Resulta aún más preferido que un aumento de los niveles de expresión de por lo menos una de dichas proteínas en el sistema incubado con los compuestos en comparación con el sistema que no se incubó con los compuestos sea indicativo de dicha actividad. En una forma de realización más preferida de la invención, están aumentados los niveles de expresión de por lo menos cinco, seis, siete, ocho o nueve de dichas proteínas. Muy preferiblemente, la actividad existente se detecta mediante un análisis diferencial de la expresión de proteínas con el sistema de control negativo.

10 En otro aspecto preferido de la invención, los niveles de expresión están aumentados en un factor de por lo menos 1,5, más preferiblemente por lo menos 1,6, preferiblemente aún de por lo menos 1,8, muy preferiblemente por lo menos 1,9 y con particular preferencia de por lo menos 2,1.

15 En otro aspecto muy particular se administra una concentración reducida de los compuestos para proporcionar niveles de expresión que tienen un factor entre 1 y 1,1 en comparación con los del sistema control. Una concentración de compuesto reducida se refiere a una reducción de por lo menos un 10%, preferiblemente por lo menos 20%, más preferiblemente por lo menos 30%, más preferiblemente aún por lo menos 40%, con mayor preferencia por lo menos 50%, con mayor preferencia en particular por lo menos 60%.

20 En otro aspecto más preferido, los niveles de expresión sustancialmente idénticos de por lo menos una de dichas proteínas en el sistema incubado con los compuestos en comparación con el sistema incubado con un compuesto estándar que tiene actividad genotóxica y/o progenotóxica son indicativos de dicha actividad.

25 Las pruebas adecuadas para monitorear la expresión proteica, determinación y análisis de variantes de secuencias de aminoácidos son conocidas por los especialistas en el arte o se pueden diseñar fácilmente como una cuestión de rutina. El ensayo de acuerdo con la invención puede ser cualquier ensayo adecuado para detectar y/o cuantificar la expresión de proteínas. En una forma de realización preferida de la invención los niveles de expresión se determinan mediante tinción de inmunofluorescencia.

30 Los marcadores seleccionados se pueden usar particularmente para establecer las herramientas de selección con un mayor rendimiento, preferiblemente la tecnología High Content Imaging (HCI) o Luminex xMAP. Se utilizan pequeñas esferas con códigos de colores Luminex, denominadas microesferas, en 500 juegos distintos. Cada juego de esferas se puede recubrir con un reactivo específico de un bioensayo particular, permitiendo así la captura y detección de analitos específicos presentes en la muestra. La tecnología Luminex combina en particular un ELISA en sándwich inmovilizado sobre esferas de micropartículas y citometría de flujo. Permite una medición cuantitativa simultánea de varias proteínas en una sola muestra. Dentro del analizador Luminex, hay una fuente de luz que excita los colorantes internos que identifican cada partícula de microesfera, y también cualquier colorante informante que fuera capturado durante el ensayo. Se emplean láseres dobles para detectar la identidad de las esferas (basado en las propiedades espectrales de las esferas específicas de cada analito) y la cantidad de fluorescencia por ficoeritrina (PE) asociada (Hoffmann et al, 2010, Toxicology 277, 49-58). Las plataformas de diagnóstico por imágenes automáticas que combinan microscopia de fluorescencia con algoritmos de análisis de imágenes y herramientas de informática permiten el análisis de imágenes fluorescentes de millones de células con examen de gran resolución de la localización de los componentes celulares, las estructuras celulares macromoleculares y la dinámica temporal de las funciones celulares. La aplicación de la tecnología HCI para la toxicológica evaluación muestra que las predicciones in vitro pueden fortalecer el rendimiento de las pruebas preclínicas tradicionales mediante la identificación de agentes hepatotóxicos humanos (Xu et al., 2008, Toxicol Sci 105, 97-105). Aún más, la tecnología HCI se puede usar para la evaluación de la genotoxicidad mediante detección de micronúcleos (MN). La prueba de MN in vitro detecta los efectos clastogénicos (daño de cromosomas) y aneugénicos (pérdida de cromosomas) inducidos por el compuesto, mediante conteo de fragmentos cromosómicos denominados micronúcleos en el citoplasma de las células. Un ensayo basado en HCI puede detectar el potencial genotóxico con un puntaje de gran rendimiento y también permite la diferenciación entre compuestos aneugénicos y clastogénicos (Westerink et al., 2011, Mutat. Res., 724, 7-21).

50 Aún más, la tecnología permite combinar varios puntos de valoración finales seleccionados, conservando la complejidad biológica y las interacciones moleculares hasta un determinado grado. La tecnología HCI ofrece la posibilidad de combinar los clásicos puntos de valoración finales genotóxicos (por ejemplo, inducción de MN) y el análisis de marcadores celulares con la adquisición simultánea de la viabilidad/citotoxicidad celular. La viabilidad celular es un parámetro importante a considerar para las pruebas de genotoxicidad porque se pueden generar falsos positivos en los ensayos estándar, entre otros, a través de la citotoxicidad. Lo mismo vale para la medición de marcadores moleculares, tal como p53. Aunque p53 reacciona de manera extremadamente sensible al daño del ADN, la privación de nutrientes y la hipoxia también podrían inducir activación. La consideración de la citotoxicidad para seleccionar la dosis, junto con mediciones de múltiples puntos de valoración finales, pueden prevenir o reducir los falsos positivos.

En consecuencia, esta invención se relaciona con un método para predecir el efecto celular de un compuesto que tiene actividad genotóxica que comprende preparar una muestra de proteínas de una célula a evaluar, poner la muestra de proteínas en contacto con un anticuerpo, detectar la unión de la proteína al anticuerpo, y comparar el resultado detectado con un resultado detectado usando una muestra de proteínas preparada a partir de una célula control.

La detección se puede efectuar mediante aplicación de la célula intacta a un método de detección de elección. Se prefiere, sin embargo, proveer primero extractos celulares. La lisis celular se puede llevar a cabo en soluciones amortiguadoras de lisis bien conocidas, adecuadas, que pueden causar un shock osmótico y perforar la membrana celular. La estabilidad de la estructura celular también se puede destruir mediante fuerzas mecánicas, tal como con un molino de bolas, una prensa French, ultrasonido, etc., mediante degradación enzimática de la pared celular y la membrana celular, respectivamente, y/o mediante la acción de tensioactivos. Los biomarcadores se pueden purificar adicionalmente para eliminar sustancias perturbadoras o los biomarcadores se pueden concentrar en la muestra. El procesamiento y/o la concentración corriente abajo preferiblemente se realizan mediante el método de precipitación, diálisis, filtración por gel, elución de gel o cromatografía, tal como HPLC o cromatografía de intercambio iónico. Se recomienda combinar varios métodos para obtener mejores rendimientos.

Las pruebas adecuadas para detectar la genotoxicidad son conocidas por los especialistas en el arte o se pueden diseñar fácilmente de manera rutinaria. Se conocen muchos tipos de ensayos diferentes, y más adelante se ofrecen ejemplos de los mismos. Aunque el ensayo de acuerdo con la invención puede ser cualquier ensayo adecuado para detectar y/o cuantificar la expresión genética, la genotoxicidad preferiblemente se determina por medio de sustancias que interactúan específicamente con las proteínas p-p53 (Ser15), p21, p-H2A.X (Ser139), p- ATM (Ser1981), p-Chk1 (Ser345), p-ATR (Ser428), p-cdc2 (Thr14/Tyr15), Gadd45a y p-Chk2 (Thr68).

El término "sustancias específicas", según se usa en la presente, comprende estructuras biológica y/o químicas capaces de interactuar con las proteínas de la invención de una manera tal que permitirá el reconocimiento, la unión y la interacción. En particular, las sustancias se seleccionan del grupo de ácido nucleicos, péptidos, carbohidratos, polímeros, moléculas pequeñas que tienen un peso molecular entre 50 y 1.000 Da y proteínas, preferiblemente ácido nucleicos y proteínas. Las sustancias específicas expresan una sensibilidad y especificidad suficientes con el fin de asegurar una unión y detección confiables. Otras biomoléculas presentes en la muestra no se unen significativamente a la sustancia específica para el marcador proteico de la invención. Preferiblemente, el nivel de unión a una biomolécula distinta de la proteína marcadora da como resultado una afinidad de unión de tan solo un 10% de la afinidad de la proteína marcadora, más preferiblemente solo un 5% o menos. Una sustancia específica tiene por lo menos una afinidad de  $10^{-7}$  M por la correspondiente proteína marcadora. La sustancia específica preferiblemente tiene una afinidad de  $10^{-8}$  M o aún más preferiblemente de  $10^{-9}$  M por la proteína marcadora. Una sustancia específica muy preferida cumplirá con ambos criterios mínimos precedentes para la afinidad así como para la especificidad.

Preferiblemente, las sustancias son específicas de partes de la proteína. Dichas partes representan una restricción para aquellas regiones que son suficientes para la expresión de una función específica, es decir, la provisión de un determinante estructural para el reconocimiento. Todos los truncamientos están limitados inevitablemente por el requisito de preservar la función, por ejemplo un reconocimiento único. Sin embargo, los fragmentos de proteína pueden ser muy pequeños. Preferiblemente, las sustancias son monoespecíficas con el fin de garantizar una interacción exclusiva y dirigida del único blanco elegido.

El reconocimiento de las proteínas de acuerdo con la invención se puede llevar a cabo mediante una interacción específica con sustancias al nivel de estructura primaria, secundaria y/o terciaria de una secuencia de aminoácidos. En el contexto de la presente invención, el término "reconocimiento" - sin limitaciones al mismo - se relaciona con cualquier tipo de interacción entre los compuestos específicos y el blanco, en particular una unión o asociación covalente o no covalente, tal como un enlace covalente, interacciones hidrofóbicas/hidrofílicas, fuerzas de van der Waals, pares de iones, puentes de hidrógeno, interacciones de ligando-receptor, interacciones entre el epítopo y el sitio de unión al anticuerpo, apareamiento de bases nucleotídicas y semejantes. Dicha asociación también puede abarcar la presencia de otras moléculas tales como péptidos, proteínas u otras secuencias de nucleótidos.

Las sustancias específicas preferiblemente se seleccionan del grupo que consiste en anticuerpos, citoquinas, lipocalinas, receptores, lectinas, avidinas, lipoproteínas, glicoproteínas, oligopéptidos, ligandos peptídicos y hormonas peptídicas. Más preferiblemente, los anticuerpos se usan como una sustancia específica. Un "anticuerpo" se refiere a un polipéptido codificado esencialmente por un gen de inmunoglobulina o fragmentos del mismo. De acuerdo con la invención, los anticuerpos están presentes como inmunoglobulinas intactas o numerosos fragmentos bien caracterizados. Los fragmentos preferiblemente se seleccionan del grupo que consiste en fragmentos Fab, fragmentos Fc, anticuerpos de cadena simple (scFv), regiones variables, regiones constantes, cadena H (VH) y cadena L (VL), más preferiblemente fragmentos Fab y scFv. Los fragmentos, tales como fragmentos Fab y fragmentos Fc, se pueden producir por clivaje usando varias peptidasas. Aún más, los fragmentos se pueden modificar y expresar de manera recombinante, preferiblemente scFv.

Se ha encontrado que los aptámeros de ADN y los aptámeros de ARN expresan una gran afinidad por una amplia variedad de moléculas blanco. Las estructuras blanco pueden comprender proteínas, péptidos y moléculas pequeñas, tales como colorantes orgánicos, nucleótidos, aminoácidos, vitaminas, alcaloides, etc. Más preferidos son los aptámeros de ARN dado que el grupo 2'-hidroxilo disponible en el ARN promueve algunos contactos intramoleculares e intermoleculares, siendo estas últimas entre moléculas de la misma secuencia, secuencias diferentes o entre ARN y cualquier otra molécula que no está compuesta por ARN. Estos ligandos de ácido nucleico se pueden identificar mediante un procedimiento de selección in vitro eficiente – el denominado proceso SELEX (evolución sistemática de ligandos por enriquecimiento exponencial). Dado que el ARN es muy susceptible a una degradación nucleolítica en soluciones biológicas, los aptámeros de ARN se deberían modificar químicamente usando fosforotioatos, ácido nucleicos bloqueados o Spiegelmers, como ejemplos. Las versiones de L-ARN de los aptámeros denominados Spiegelmers son de vida especialmente larga ya que son esencialmente refractarios a los procesos de degradación naturales. Debido a su gran afinidad por un amplio espectro de blancos estructurales, los aptámeros actúan de manera muy similar a los anticuerpos. Los aptámeros se pueden sintetizar usando la química de fosforamidita estándar. Además, los aptámeros de ARN que tienen más de aproximadamente 30 nucleótidos se pueden sintetizar favorablemente en grandes cantidades mediante transcripción in vitro. La selección, síntesis y purificación de aptámeros son bien conocidas por los especialistas en el arte.

Las sustancias específicas se pueden marcar, y al hacerlo la marcación depende de sus características inherentes y el método de detección que se aplicará, es decir la sensibilidad requerida, la facilidad de conjugación, los requerimientos de estabilidad y la instrumentación disponible y las provisiones de eliminación. Para la detección de productos de incubación específicos, los métodos aplicados dependen de los productos de incubación específicos a monitorear y son bien conocidos por el especialista. Los ejemplos preferidos de métodos de detección adecuados de acuerdo con la presente invención comprenden luminiscencia, en particular fluorescencia, además de la coloración VIS y/o emisión radioactiva.

La luminiscencia se refiere a la emisión de luz como resultado de una quimioluminiscencia, bioluminiscencia o fotoluminiscencia. La quimioluminiscencia comprende la emisión de luz visible como resultado de una reacción química, en tanto la bioluminiscencia necesita la actividad de la luciferasa. La fotoluminiscencia preferida en la presente, que también se conoce como estimulación de fluorescencia, es causada por la absorción de fotones, preferiblemente provistos por radiación, que es liberada nuevamente como fotones con un cambio en la longitud de onda de 30 a 50 nm y dentro de un período de aproximadamente 10-8 segundos. Los instrumentos para detectar fluorescencia incluyen, pero en un sentido no taxativo, los típicos fluorómetros de mesada, lectores de placa de múltiples pocillos para fluorescencia, fluorómetros de fibras ópticas, microscopios de fluorescencia y sistemas de microchips/microfluidos acoplados con detección de fluorescencia.

La coloración VIS indica la visualización de cualquier sustancia acromática para que sea visible a simple vista. Preferiblemente, la intensidad de color se mide con un fotómetro.

La radiación radioactiva de los isótopos se mide mediante centelleo. El proceso de centelleo líquido comprende la detección del decaimiento beta en una muestra por medio de la captura de emisiones beta en un sistema de solventes y solutos orgánicos conocido como cóctel de centelleo. El electrón de decaimiento beta emitido por los isótopos radioactivos, tales como  $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{33}\text{P}$  y  $^{35}\text{S}$ , en la muestra excita la molécula de solvente, lo cual a su vez transfiere la energía al soluto. La emisión de energía del soluto (el fotón de luz) es convertida en una señal eléctrica por un tubo fotomultiplicador en un contador de centelleo. El cóctel también debe actuar como un agente solubilizante que mantiene una suspensión uniforme de la muestra. A menudo surgen fotones de rayos gamma como resultado de otros procesos de decaimiento (decaimiento en serie) para liberar el exceso de energía del núcleo recién formado. No tienen masa y producen poca, si alguna, ionización directa por colisión a lo largo de su vía. Los fotones gamma son absorbidos para la detección y cuantificación por uno o más de tres mecanismos: el efecto Compton, el efecto fotoeléctrico y la producción de pares. Un isótopo de decaimiento gamma favorable de la presente invención es  $^{125}\text{I}$ .

El método de marcación no está particularmente limitado siempre que la marca sea fácil de detectar. Una "sustancia específica marcada" es aquella que se une, ya sea de manera covalente a través de un conector o un enlace químico, o de manera no covalente a través de interacciones iónicas, de van der Waals, electrostáticas, hidrofóbicas o puentes de hidrógeno, a una marca de modo que la presencia de las proteínas marcadoras se puede detectar mediante detección de la presencia de la marca unida a las mismas.

El enlace covalente de un anticuerpo a una enzima se puede efectuar mediante métodos diferentes, tal como el acoplamiento con glutaraldehído. Ambos, la enzima y el anticuerpo están interconectados con glutaraldehído por medio de grupos amino libres, y los productos secundarios de las enzimas y anticuerpos de la red se eliminan. En otro método, la enzima está acoplada al anticuerpo por medio de residuos de azúcar si se trata de una glicoproteína, tal como la peroxidasa. La enzima es oxidada por periodato de sodio y está interconectada directamente con los grupos amino del anticuerpo. También se puede acoplar otra enzima que contiene carbohidratos al anticuerpo de esta manera, sin embargo a veces se observa una pérdida de actividad debido a la oxidación, por ejemplo, una actividad disminuida de la fosfatasa alcalina. El acoplamiento de la enzima también se puede efectuar por

interconexión de los grupos amino del anticuerpo con los grupos tiol libres de una enzima, tal como  $\beta$ -galactosidasa, usando un conector heterobifuncional, tal como 6-(N-maleimido)hexanoato de succinimidilo.

La unión inmunológica específica de un anticuerpo a una proteína se puede detectar de manera directa o indirecta. Las marcas directas incluyen marcas fluorescentes o luminiscentes, metales, colorantes, radionúclidos y semejantes, unidas al anticuerpo. Se puede usar un anticuerpo marcado con iodo-125 (125I). Un ensayo de quimioluminiscencia que emplea un anticuerpo quimioluminiscente específico para el marcador proteico es adecuado para una detección sensible, no radioactiva, de los niveles de proteína. También es adecuado un anticuerpo marcado con un fluoróforo. Los ejemplos de fluoróforos incluyen, sin limitaciones, DAPI, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína (FITC), verde Oregon, Hoechst 33258, R-ficocianina, proteína fluorescente verde (GFP), B-ficoeritrina, R-ficoeritrina, rodamina, rojo Texas, isotiocianato de tetra rodamina (TRITC), Cy3, Cy5 y lisamina. Las marcas indirectas incluyen varias enzimas bien conocidas en el arte, tales como peroxidasa de rábano picante (HRP), fosfatasa alcalina (AP),  $\beta$ -galactosidasa, ureasa y semejantes. Se puede usar un sistema de detección de peroxidasa de rábano picante, por ejemplo, con el sustrato cromogénico tetrametilbencidina (TMB), quede da como resultado un producto soluble en la presencia de peróxido de hidrógeno que es detectable a 450 nm. Se puede usar un sistema de detección de fosfatasa alcalina con el sustrato cromogénico fosfato de p-nitrofenilo, por ejemplo, que da como resultado un producto soluble fácilmente detectable a 405 nm. De manera similar, se puede usar un sistema de detección de  $\beta$ -galactosidasa con el sustrato cromogénico o-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosido (ONPG), que da como resultado un producto soluble detectable a 410 nm. Se puede usar un sistema de detección de ureasa con un sustrato, tal como púrpura de urea-bromocresol. Los compuestos fluorescentes autoapagados se activan con las proteasas asociadas a tumores, enzimas, como por ejemplo luciferasa, nanopartículas, biotina, digoxigenina y semejantes.

En otra forma de realización preferida de la presente invención, los aptámeros se marcan con digoxigenina, biotina, sustancias de quimioluminiscencia, colorantes fluorescentes, esferas magnéticas, esferas metálicas, partículas coloidales, reactivos electrodensos, enzimas, todos los cuales son bien conocidos en el arte, o isótopos radioactivos. Los isótopos preferidos para marcar ácidos nucleicos en el alcance de la invención son 3H, 14C, 32P, 33P, 35S o 125I, los más preferidos son 32P, 33P o 125I.

Se puede usar una variedad de técnicas de inmunoensayos, que incluyen inmunoensayos competitivos y no competitivos. El término "inmunoensayo" abarca técnicas que incluyen, sin limitaciones, inmunoensayos con enzimas (EIA), tal como la técnica de inmunoensayo de enzimas multiplicadas (EMIT), ensayo de inmunoabsorción ligada a enzimas (ELISA), ELISA de captura con anticuerpo IgM (MAC ELISA) y un inmunoensayo con enzima de micropartículas (MEIA), además inmunoensayos con electroforesis capilar (CEIA), radioinmunoensayos (RIA); ensayos inmunoradiométricos (IRMA), inmunoensayos de polarización con fluorescencia (FPFA) y ensayos de quimioluminiscencia (CL). Si se desea, dichos inmunoensayos pueden ser automatizados. Los inmunoensayos también se pueden usar junto con fluorescencia inducida por láser, tal como la tecnología Luminex. Los inmunoensayos con liposomas, tales como inmunoensayos con liposomas por inyección de flujo e inmunosensores con liposomas, son asimismo adecuados para su uso en la presente invención. Además, son adecuados los ensayos de nefelometría, en los cuales la formación de complejos de proteína/anticuerpo da como resultado una mayor dispersión de luz que es convertida en una señal de índice pico en función de la concentración del marcador, para su uso en los métodos de la presente invención.

En una forma de realización de la presente invención, se usan anticuerpos como sustancias específicas y los productos de la incubación se detectan marcando los anticuerpos, preferiblemente mediante un ELISA, RIA, fluoroinmunoensayo (FIA), un ensayo inmunológico con partículas solubles (SPIA) o transferencia Western.

En una forma de realización preferida de la invención, se usa un ELISA para la detección de los productos de la incubación. Los componentes del ELISA son enzimas que están unidas a un miembro de la reacción inmunológica. El antígeno trazador (derivado del analito) de una proteína marcadora preferiblemente está marcado en el ELISA competitivo usando un solo anticuerpo de captura (denominado primario más adelante en la presente), en tanto el anticuerpo preferiblemente está marcado en el ELISA no competitivo que preferiblemente comprende la precipitación del complejo de antígeno-anticuerpo por un segundo anticuerpo (denominado secundario más adelante en la presente) que está dirigida a otro epítipo de dicha proteína marcadora que el anticuerpo primario. Los complejos que consisten en el antígeno y dos anticuerpos también se conocen como complejos sándwich. La detección comprende la subsiguiente conversión enzimática de un sustrato en un producto, preferiblemente un producto coloreado, que es reconocido por coloración visual, bioluminiscencia, fluorescencia o la medición de señales eléctricas (electrodo de enzima). Las enzimas favorables para la marcación en la presente invención son conocidas por el especialista, tal como peroxidasa (por ejemplo HRP), cloranfenicol acetil transferasa (CAT), proteína fluorescente verde (GFP), glutatión S-transferasa (GST), luciferasa,  $\beta$ -galactosidasa y AP.

Además son preferidos los inmunoensayos radioactivos que utilizan isótopos radioactivos que están incorporados en un reactivo inmune durante la síntesis o que subsiguientemente se acopla a un reactivo inmune del ensayo, preferiblemente a un anticuerpo. Los isótopos radioactivos preferidos en el método de la invención son: 3H, 14C, 32P, 33P, 35S y 125I, y más preferidos son 14C, 35S y 125I. Un método favorito sigue el principio de unión

competitiva. Una cantidad constante del marcador proteico radioactivo y una cantidad variable de dicho marcador de la muestra a analizar compiten por una cantidad de anticuerpo definida que está presente en exceso. El desplazamiento del trazador es directamente proporcional a la concentración del marcador que puede ser evaluado mediante una curva de calibración.

5 En los FIA se usan antígenos o anticuerpos, respectivamente, que se marcan favorablemente con fluoróforos.

El SPIA utiliza el cambio de color de partículas de plata como resultado de una aglutinación. No se requiere un anticuerpo secundario ni una reacción indicadora lo cual lo vuelve particularmente útil en el alcance de la presente invención. De manera similar, favorablemente se trata de una prueba de aglutinación de látex usando anticuerpos que están unidos a partículas de látex coloreadas.

10 Otro método de detección favorito para productos de incubación específicos de la invención es la transferencia Western. En primer lugar, se mezcla un gel y se moldea, se cargan las muestras preparadas previamente sobre el gel y se fracciona mediante electroforesis. Las proteínas presentes en el gel de poliacrilamida se transfieren sobre una membrana de nitrocelulosa sobre la cual se pueden aplicar los anticuerpos para detectar la proteína específica de interés. La transferencia Western se lleva a cabo de manera simple y ventajosa cuando no es imprescindible una  
15 determinación exacta de la concentración.

Existe una cantidad de anticuerpos específicos contra los marcadores proteicos de la invención. Habitualmente, los anticuerpos se producen en organismos de mamífero cuando se genera una respuesta inmunológica por antígenos  
20 extraños para el organismo y que tienen un peso molecular que excede 3.000 g/mol. Las especies huésped favorables para la producción de anticuerpos comprenden cabras, conejos y ratones. Se pueden seleccionar otros anticuerpos policlonales y monoclonales que sean originarios de especies diferentes y fragmentos de los mismos. Hay técnicas populares, tal como la tecnología de hibridoma, que son bien conocidas por el especialista. Los anticuerpos se aplican como sustancias específicas en el método de la invención.

Los anticuerpos se pueden inmovilizar sobre una variedad de soportes sólidos, tales como partículas de matriz magnética o cromatográfica, la superficie de una placa de ensayo (por ejemplo pocillos de microtitulación), piezas de un material de sustrato sólido o membrana (por ejemplo, de plástico, nylon, papel) y semejantes. Se puede preparar una tira de ensayo mediante recubrimiento con el anticuerpo o una pluralidad de anticuerpos en un ordenamiento sobre un soporte sólido. Esta tira se puede sumergir en la muestra de prueba y procesar rápidamente mediante  
25 pasos de lavado y detección para generar una señal medible, tal como un punto coloreado.

El análisis se puede llevar a cabo según una variedad de formatos físicos. Por ejemplo, el uso de placas de microtitulación o automatización se podría emplear para facilitar el procesamiento de grandes cantidades de muestras de prueba. Como alternativa, se podrían desarrollar formatos de muestras individuales para facilitar el diagnóstico o pronóstico en un tiempo razonable. Los formatos físicos que son de utilidad comprenden superficies que tienen una pluralidad de ubicaciones discretas, accesibles, para la detección de una pluralidad de biomarcadores diferentes. Dichos formatos incluyen microordenamientos para proteínas o chips para proteínas. En estas formas de realización, cada ubicación sobre una superficie discreta puede comprender anticuerpos que se pueden unir a uno o más marcadores proteicos para su detección en cada ubicación. Como alternativa, las superficies pueden comprender una o más partículas discretas (por ejemplo, micropartículas o nanopartículas) inmovilizadas en ubicaciones discretas de una superficie, donde dichas micropartículas comprenden anticuerpos para inmovilizar uno o más marcadores proteicos para la detección. En una forma de realización, se provee una matriz, en la cual cada posición representa un sitio de unión discreto para una proteína, y en donde hay sitios de unión para todas las proteínas p-p53 (Ser15), p21, p-H2A.X (Ser139), p-ATM (Ser1981), p-Chk1 (Ser345), p-ATR (Ser428), p-cdc2 (Thr14/Tyr15), Gadd45a y p-Chk2 (Thr68).

Se puede analizar una señal de la marca directa o indirecta, por ejemplo, usando un espectrofotómetro para detectar el color de un sustrato cromogénico, usando un contador de radiación para detectar radiación, tal como un contador gamma para la detección de <sup>125</sup>I o usando un fluorómetro para detectar fluorescencia en la presencia de luz de una determinada longitud de onda. Para la detección de anticuerpos ligados a enzimas, se puede efectuar un análisis cuantitativo usando un espectrofotómetro, tal como un lector de microplacas EMAX (Molecular Devices; Menlo Park, CA) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Si se desea, se pueden automatizar los ensayos de la presente invención o se pueden realizar con la ayuda de sistemas robóticos, y así se puede detectar la señal de múltiples muestras de manera simultánea. Con mayor detalle, las proteínas se pueden detectar mediante fluorescencia que se registra, por ejemplo, con un microscopio láser de fluorescencia y una cámara CCD, y luego se analiza la intensidad de fluorescencia por computadora. Las imágenes ópticas que se ven y opcionalmente se registran mediante una cámara u otro dispositivo de registro (por ejemplo, un fotodiodo y dispositivo de almacenamiento de datos) opcionalmente se procesan adicionalmente en cualquiera de las formas de realización de la presente, por ejemplo, digitalizando la imagen y/o almacenando y analizando la imagen en una computadora. Hay una variedad de equipos periféricos y software disponible comercialmente para digitalizar, guardar y analizar un video digitalizado o una imagen óptica digitalizada. Un sistema convencional lleva la luz del campo de muestra a una cámara con un dispositivo de carga acoplada (CCD) enfriado, de uso común en el arte. Una cámara CCD incluye un ordenamiento

de elementos de imagen (píxeles). La luz de la muestra se proyecta en el CCD. Se toman muestras de píxeles particulares correspondientes a las regiones de la muestra para obtener lecturas de la intensidad de luz para cada posición. Se procesan múltiples píxeles en paralelo para aumentar la velocidad. El aparato y los métodos de la invención se emplean fácilmente para visualizar cualquier muestra, por ejemplo, mediante técnicas de microscopía de campo oscuro o fluorescente.

5  
10  
15  
20  
25  
30

En otra forma de realización del método de selección, se puede refinar adicionalmente la detección de actividad mutagénica y/o promutagénica. Para tal fin, la expresión proteica se determina mediante detección de varias proteínas seleccionadas del grupo de p-p53 (Ser15), p21, p-H2A.X (Ser139), p-ATM (Ser1981), p-Chk1 (Ser345), p-ATR (Ser428), p-cdc2 (Thr14/Tyr15), Gadd45a y p-Chk2 (Thr68), y correlación de una cantidad de señal, o cambio en la señal, con la expresión proteica en el sistema. En otras palabras, los niveles de expresión de las formas activas de las proteínas se correlacionan con una cantidad de una señal física emitida, o con un cambio en la señal física emitida. El sistema celular de la invención se incubaba con varias concentraciones de un compuesto (pro)genotóxico identificado. La cantidad de señal emitida, o de cambio de la señal, observada en la presencia del compuesto mutagénico es indicativo del cambio en la expresión proteica experimentado debido al compuesto. Luego se puede relacionar el cambio con la concentración del mutágeno en la muestra, es decir, la curva de calibración permite una lectura del contador de una concentración correspondiente. Preferiblemente, la curva de calibración se basa en la ecuación de Lambert-Beer si se usa coloración o luminiscencia UV/VIS. La genotoxicidad de los compuestos se diagnostica por comparación de la concentración de la proteína en la muestra con los niveles de concentración conocidos de proteína de células tratadas y/o no tratadas con mutágenos. Se comprenderá que las concentraciones conocidas están demostradas estadísticamente, por ello representan un cierto nivel o rango, respectivamente. La dirección y fuerza de la expresión proteica también se han resuelto mediante el análisis de expresión diferencial de las proteínas marcadoras de la invención de manera tal que se ha reconocido una regulación positiva distintiva con un factor determinado. Cualquier concentración medida, que difiere del nivel de concentración de la proteína en células no estimuladas, indica una anomalía en la muestra de células evaluada, mientras que un compuesto no se puede clasificar como un mutágeno a una concentración proteica que sea comparable al nivel de concentración de las células no estimuladas. Se prefiere medir las concentraciones, que son más altas que el nivel de concentración de la proteína en células no estimuladas, para detectar la genotoxicidad. El uso de este método ha permitido a los inventores demostrar sensibilidad a concentraciones submicromolares o aún nanomolares. El trazado de calibración revela que el método se puede aplicar en un rango dinámico que abarca más de un par de órdenes de magnitud.

35  
40

Por ello, el método de la invención incluye seleccionar un nivel de actividad genotóxica y/o progenotóxica por comparación del nivel de expresión proteica en el sistema de prueba con el nivel de expresión proteica en el sistema control. Aunque el panel de biomarcadores de la invención presenta una sensibilidad que permite utilizar tan solo cinco proteínas marcadoras en el alcance del método de selección, se prefiere aplicar más que estas proteínas marcadoras para detectar la genotoxicidad. Los inventores han ilustrado que el análisis de múltiples proteínas que responden al mutágeno aumenta la estabilidad de la selección y reduce los índices de error ya que abarca un espectro más amplio de respuestas genotóxicas que los ensayos informantes con una pluralidad más baja de proteínas. En una forma de realización preferida de la presente invención, se determinan los niveles de expresión de por lo menos cinco, seis, siete, ocho o nueve de dichas proteínas, más preferiblemente por lo menos cinco proteínas, más preferiblemente aún nueve proteínas. Se determinan al menos las proteínas p53 (Ser15), p21, p-H2A.X (Ser139), p-ATM (Ser1981) y p-Chk1 (Ser345). Además de la expresión de dichas cinco proteínas, se pueden determinar los niveles de expresión de una o más proteínas seleccionadas del grupo de p-ATR (Ser428), p-cdc2 (Thr14/Tyr15) y p-Chk2 (Thr68), en particular seleccionadas del grupo de p-ATR (Ser428), p-cdc2 (Thr14/Tyr15), Gadd45a y p-Chk2 (Thr68).

45

En otra forma de realización más preferida de la invención, se determinan los niveles de expresión de al menos las proteínas p-p53 (Ser15), p21, p-H2A.X (Ser139), p-Chk1 (Ser345), p-ATR (Ser428), p-Chk2 (Thr68) y opcionalmente MDM2. En aún otra forma de realización más preferida de la invención, se determinan los niveles de expresión de al menos las proteínas p-p53 (Ser15), p-H2A.X (Ser139), p-Chk1 (Ser345) y p-Chk2 (Thr68) así como los niveles de proteínas totales de p21 y opcionalmente ATR y MDM2.

50

Se prefiere especialmente determinar los niveles de expresión de las proteínas p-p53 (Ser15), p21, p-H2A.X (Ser139), p-ATM (Ser1981), p-Chk1 (Ser345), p-ATR (Ser428), p-cdc2 (Thr14/Tyr15), Gadd45a y p-Chk2 (Thr68).

Demás está decir que la expresión de dichas respectivas proteínas marcadoras preferidas de cualquier forma de realización preferida se compara con la expresión proteica en el sistema control.

55

Si el sistema o la muestra del mismo tiene la capacidad para expresar múltiples proteínas y se compara un patrón de expresión de múltiples proteínas con el patrón de expresión en el sistema control, la genotoxicidad se puede caracterizar de manera específica del compuesto. En particular, el patrón de expresión se determina mediante una correlación de las proteínas múltiples y/o una magnitud de regulación alterada. El método de selección de esta invención no solo evalúa el efecto de sustancias químicas que tienen actividad genotóxica sobre las células a evaluar, sino que también indica los detalles de este efecto. Al evaluar individualmente el nivel de expresión de las

proteínas clasificadas, es posible distinguir la manera en que los compuestos químicos que tienen actividad genotóxica afectan a las células a evaluar.

5 La invención también describe una forma de realización del método de selección en donde se determinan los niveles de expresión en una muestra biológica tomada de un mamífero, preferiblemente un mamífero de laboratorio, a quien se le administró uno o más de los compuestos a seleccionar, en comparación con un mamífero que muestra efectos no genotóxicos, en donde un aumento en los niveles de expresión indica un aumento de la probabilidad que el compuesto tiene un efecto terapéutico en una condición patológica susceptible a la genotoxicidad. El efecto terapéutico conduce a la incorporación del nivel cualitativo. Un "efecto terapéutico" alivia hasta un cierto grado uno o más síntomas de una enfermedad o vuelve a la normalidad, ya sea de manera parcial o completa, uno o más parámetros fisiológicos o bioquímicos asociados o causales de la enfermedad o las condiciones patológicas. Además, la expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad que, en comparación con un sujeto correspondiente que no ha recibido esta cantidad, tiene las siguientes consecuencias: tratamiento mejorado, cura, prevención o eliminación de una enfermedad, un síndrome, una condición, un malestar, un trastorno o efectos secundarios o también una reducción del avance de una enfermedad, una afección o un trastorno. La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" también abarca las cantidades que son eficaces para aumentar una función fisiológica normal. La evaluación de varios compuestos permite la selección de aquel compuesto que sea más adecuado para el tratamiento del sujeto mamífero. El índice de dosis in vivo del compuesto elegido se puede preajustar ventajosamente a las células específicas con respecto a sus datos in vitro. Por ello, la eficacia terapéutica mejora notablemente.

20 En otro aspecto de la invención, se identifica al compuesto menos (pro)genotóxico o un compuesto no (pro)genotóxico, por ejemplo en una serie de compuestos, en donde el menor aumento o ningún aumento en los niveles de expresión indica si dicho compuesto es adecuado para el uso pretendido. El uso podría ser terapéutico o no terapéutico y no se limita a ningún propósito particular pero que cumpla con el uso pretendido conocido en el arte (por ejemplo, manual, papel, etc.). En un aspecto preferido de la invención, se provee un método para administrar un compuesto terapéutico a un paciente, que comprende conducir el método de selección de la invención con una serie de compuestos, identificar el compuesto que no tiene actividad genotóxica y progenotóxica y administrar dicho compuesto a un paciente que necesita del uso pretendido del compuesto. Se comprenderá que el método no tiene por objeto identificar cualquier uso y/o el compuesto más activo para dicho uso sino la eliminación de los efectos (pro)genotóxicos adversos en el transcurso del uso pretendido.

30 La invención también se relaciona con un método para monitorear la probabilidad de desarrollar cáncer, tumores, metástasis y/o un trastorno de angiogénesis, causados, mediados y/o propagados mediante una desregulación de la proliferación, diferenciación y/o reparación de daños, como respuesta a un tratamiento con un compuesto, en donde se determinan los niveles de expresión de por lo menos cinco proteínas seleccionadas del grupo de p-p53 (Ser15), p21, p-H2A.X (Ser139), p-ATM (Ser1981), p-Chk1 (Ser345), p-ATR (Ser428), p-cdc2 (Thr14/Tyr15), Gadd45a y p-Chk2 (Thr68) en una muestra biológica tomada de un mamífero que necesita de dicho tratamiento con dicho compuesto administrado a dicho mamífero, en donde un aumento en los niveles de expresión de por lo menos cinco de dichas proteínas indica que dicho compuesto tiene actividad genotóxica y/o progenotóxica y dicha probabilidad aumenta. El compuesto preferiblemente se obtiene mediante el método de selección de la invención detallado precedentemente. Por consiguiente, la descripción anterior de la presente Memoria descriptiva con respecto al método de selección es válida y aplicable sin restricciones al método de monitoreo si fuera necesario.

40 La identificación de la pluralidad de genes descrita precedentemente provee una herramienta poderosa para evaluar el progreso de un estado, una condición o un tratamiento. Específicamente, se puede identificar una pluralidad de genes en un paciente antes de un evento, tal como cirugía, antes del inicio de un régimen terapéutico o de completar un régimen terapéutico, para proporcionar un resultado basal. Este valor basal se puede comparar luego con el resultado obtenido usando métodos idénticos ya sea durante o después de dicho evento. Esta información se puede usar con ambos fines de diagnóstico y pronóstico.

50 El método de la invención de monitoreo se puede emplear en la medicina humana y veterinaria. El mamífero preferiblemente es un animal de laboratorio y/o un organismo no humano. En la presente, los compuestos se pueden administrar antes o después del comienzo de una enfermedad una vez o varias veces al actuar como una terapia. Los términos "cantidad eficaz" o "dosis eficaz" o "dosis" se usan indistintamente en la presente y significan una cantidad del compuesto farmacéutico que tiene un efecto profilácticamente o terapéuticamente relevante sobre la enfermedad o condiciones patológicas, es decir, que causa una respuesta biológica o médica en un tejido, sistema, animal o humano que es buscada o deseada, por ejemplo, por un investigador o médico.

55 Los productos médicos mencionados previamente para el uso de la invención se emplean particularmente para un tratamiento terapéutico. El monitoreo se considera como un tipo de tratamiento en el cual los compuestos preferiblemente se administran a intervalos distintos, por ejemplo, con el fin de reforzar la respuesta y erradicar por completo los patógenos y/o síntomas de la enfermedad mediada por genotoxicidad. Se puede aplicar ya sean compuestos idénticos o compuestos diferentes. El medicamento también se puede usar para reducir la probabilidad de desarrollar una enfermedad o aún para prevenir con anterioridad el inicio de dichas enfermedades que están

asociadas con la proliferación, diferenciación y/o reparación de daños debido a un impacto genotóxico, o para tratar los síntomas que aparecen y continúan. Según el significado que tiene en la invención, un tratamiento profiláctico es aconsejable si el sujeto presenta cualquier condición previa para las condiciones fisiológicas o patológicas mencionadas previamente, tal como una predisposición familiar, un defecto genético o una enfermedad padecida previamente. Las enfermedades a las cuales está dirigida la invención preferiblemente comprenden cáncer, tumores, metástasis y/o trastornos de angiogénesis.

Los compuestos mencionados de acuerdo con la invención se pueden usar en su forma final no salina. Por otro lado, la presente invención también abarca el uso de estos compuestos en la forma de sus sales farmacéuticamente aceptables, que pueden derivar de diversos ácidos y bases orgánicas e inorgánicas mediante procedimientos conocidos en el arte. Las expresiones "sal farmacéuticamente aceptable" y "sal fisiológicamente aceptable", que se usan indistintamente en la presente, en el presente contexto se referirá a un ingrediente activo que comprende un compuesto de acuerdo con la invención en la forma de una de sus sales, en particular si esta forma de sal imparte propiedades farmacocinéticas mejoradas al ingrediente activo en comparación con la forma libre del ingrediente activo o cualquier otra forma salina del ingrediente activo usado con anterioridad. La forma de sal farmacéuticamente aceptable del ingrediente activo también puede proveer este ingrediente activo por primera vez con una propiedad farmacocinética deseada que no tenía con anterioridad y aún puede tener un efecto positivo sobre la farmacodinámica de este ingrediente activo con respecto a su eficacia terapéutica en el cuerpo.

Aún más, la invención se relaciona con un método in vitro para predecir la probabilidad que un paciente sufrirá de un tumor como respuesta a un tratamiento terapéutico con un fármaco, que comprende los pasos de (i) medir en una muestra de biopsia del tejido o plasma de dicho paciente los niveles de expresión de por lo menos las cinco proteínas p-p53 (Ser15), p21, p-H2A.X (Ser139), p-ATM (Ser1981), p-Chk1 (Ser345), (ii) exponer ex vivo una muestra de tejido del tejido o plasma de dicho paciente a dicho fármaco y (iii) medir en dicha muestra expuesta del paso (ii) los niveles de expresión de dichas proteínas especificadas en el paso (i) junto con el cálculo de las diferencias en los niveles de expresión medidos en los pasos (i) y (iii), en donde un aumento en los niveles de expresión de por lo menos cinco de dichas proteínas obtenido en este paso (iii) en comparación con el paso (i) indica que dicho fármaco tiene actividad genotóxica y/o progenotóxica y dicha probabilidad aumenta.

Un objeto de la invención también es el uso de dichas por lo menos cinco proteínas p-p53 (Ser15), p21, p-H2A.X (Ser139), p-ATM (Ser1981), p-Chk1 como proteínas marcadoras para seleccionar compuestos con actividad genotóxica y/o progenotóxica. La descripción anterior de la presente Memoria descriptiva con respecto al método de selección es válida y aplicable sin restricciones a dichos usos si fuera necesario.

Aún otro objeto de la presente invención comprende usar sustancias que interactúan específicamente con por lo menos una proteína marcadora para detectar la actividad genotóxica o progenotóxica. Un aspecto preferido de la presente invención comprende usar por lo menos cinco anticuerpos, cada uno con una unión específica a una proteína diferente que se selecciona del grupo de p-p53 (Ser15), p21, p-H2A.X (Ser139), p-ATM (Ser1981), p-Chk1 (Ser345), para detectar la actividad genotóxica y/o progenotóxica. Los anticuerpos preferiblemente se marcan de manera directa con isótopos, por ejemplo cromóforos, luminóforos o cromógenos, o de manera indirecta con biotina a la cual se puede unir un complejo de estreptavidina. Al evaluar la presencia o ausencia de los anticuerpos, uno puede detectar la presencia o ausencia de una proteína marcadora de interés. La descripción anterior de la presente memoria descriptiva referida al método de selección se considera como válida y aplicable sin restricciones a dicho uso de dichos anticuerpos anti-marcador, si fuera necesario.

La invención también se puede practicar como el uso de un kit en la detección de la actividad genotóxica y/o progenotóxica que comprende nueve anticuerpos, cada uno con una unión específica a una proteína diferente que se selecciona del grupo de p-p53 (Ser15), p21, p-H2A.X (Ser139), p-ATM (Ser1981), p-Chk1 (Ser345), p-ATR (Ser428), p-cdc2 (Thr14/Tyr15), Gadd45a y p-Chk2 (Thr68). El kit está diseñado particularmente para conducir el método de la invención para seleccionar compuestos con actividad genotóxica y/o progenotóxica. El kit de la invención puede incluir un artículo que comprende instrucciones escritas o instruye al usuario mediante instrucciones escritas sobre la manera de practicar el método de la invención. La descripción anterior de la presente Memoria descriptiva con respecto al método de selección se considera válida y aplicable sin restricciones al kit, si fuera necesario. En el alcance de la presente invención, se provee por primera vez un método para seleccionar compuestos con actividad genotóxica, que aplica patrones de expresión proteica únicas de hasta nueve proteínas. La presente invención divulga huellas digitales de expresión características de las proteínas marcadoras que están asociadas con la genotoxicidad. Los datos soportan que la determinación del perfil mecanicista in vitro es una herramienta poderosa en comparación con las detecciones de un solo punto de valoración final para predecir la genotoxicidad. La determinación del perfil mecanicista ofrece un beneficio durante la interpretación de dichos datos, y las investigaciones mecanicistas constituyen una herramienta poderosa que facilita la clasificación de los compuestos genotóxicos. Aún más, los datos mecanicistas mejorarán la caracterización química y la evaluación de riesgo para los compuestos genotóxicos. La aplicación de la determinación del perfil proteico en una selección temprana durante el desarrollo de fármacos ayuda a clasificar moléculas diferentes y destacar compuestos con características genotóxicas en un momento temprano del desarrollo, y así ahorrar costos y animales al prevenir las pruebas de seguimiento in vivo.

Las nueve proteínas marcadoras putativas halladas se pueden usar para seleccionar compuestos desconocidos, que permiten de manera efectiva una identificación específica y sensible, y la caracterización de su potencial genotóxico y/o progenotóxico en la fase temprana del desarrollo de fármacos. El estrés genotóxico del sistema celular, que puede expresar funcionalmente hasta nueve proteínas marcadoras, conduce a una expresión y activación aumentadas de estas proteínas marcadoras en comparación con un control de este sistema celular. Las proteínas mencionadas precedentemente, combinadas, tienen un efecto sinérgico y por ello permiten detectar genotoxinas con un gran rendimiento. El análisis de las proteínas expresadas de manera diferencial es particularmente adecuado para sistemas de prueba de alto rendimiento. El análisis de la expresión proteica basado en High Content Imaging (HCI) se puede aplicar favorablemente a los agentes genotóxicos que presentan un modo de acción desconocido y predecir su potencial para ejercer efectos genotóxicos en una etapa temprana del proceso de descubrimiento de fármacos. Además de ello, un modelo basado células que emplea HCI ofrece la ventaja de generar datos rápidamente con pocas necesidades de compuesto. El método de detección, así como el método de monitoreo planteado en la invención, se pueden conducir de una manera simple, eficiente en cuanto al costo y confiable. Los compuestos que tienen actividad (pro)genotóxica se seleccionan con una sensibilidad y/o especificidad de por lo menos 75%, más preferiblemente por lo menos 80%, más preferiblemente aún por lo menos 90%. En la presente, la "sensibilidad" se refiere al número de compuestos evaluados correctamente como positivos con relación a todos los compuestos evaluados como positivos, y la "especificidad" indica la cantidad de compuestos evaluados como negativos con relación a todos los compuestos negativos. Este conjunto de marcadores específicos se puede combinar con otros puntos de valoración finales para genotoxicidad tal como el ensayo del micronúcleo para generar un sistema de selección altamente predictivo para un amplio rango de compuestos potencialmente genotóxicos.

Se comprenderá que esta invención no se limita a los métodos, sustancias específicas, usos y arreglos particulares que se describen en la presente, dado que pueden variar. También se debe tener en cuenta que la terminología usada en la presente solamente sirve para describir las formas de realización particulares, y no pretende limitar el alcance de la presente invención que solamente se definirá por las reivindicaciones adjuntas. Según se usa en la presente, inclusive las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular de palabras tales como "un", "una", "la" y "el" incluyen sus referentes correspondientes en plural a menos que el contexto claramente indique lo contrario. Así, por ejemplo, la referencia a "un compuesto" incluye uno solo o varios compuestos diferentes, y la referencia a "un método" incluye la referencia a pasos y métodos equivalentes conocidos por un especialista en el arte, y así sucesivamente. A menos que se los defina de otro modo, todos los términos científicos y técnicos usados en la presente tienen el mismo significado que le dan los especialistas en el arte al que concierne esta invención.

Las técnicas que son esenciales de acuerdo con la invención se describen con detalle en la descripción. Otras técnicas que no se describen con detalle corresponden a métodos estándar conocidos que son bien conocidos por un especialista en el arte, o las técnicas se describen con más detalle en las referencias citadas, en las solicitudes de patente o en la literatura estándar. Aunque se pueden usar métodos y materiales similares o equivalentes de aquellos que se describen en la presente en la práctica o evaluación de la presente invención, más adelante se describirán ejemplos adecuados. Los siguientes ejemplos se proveen con fines ilustrativos, y no en un sentido limitante. En los ejemplos se usan reactivos y soluciones amortiguadoras estándar que están libres de actividades contaminantes (cuando fuera práctico). Los ejemplos deben considerarse particularmente como no limitados a las combinaciones de características demostradas explícitamente, pero las características ejemplificadas se pueden volver a combinar nuevamente sin restricciones si se resuelve el problema técnico de la invención.

En la Tabla 1 se enumeran las cinco proteínas analizadas y los cuatro marcadores suplementarios con sus modificaciones de postraducción, nombres de proteínas (alternativos), nombres de genes (alternativos) y los números de accesos, que son únicos para cada proteína.

En la Tabla 2 se enumeran los resultados para los nueve marcadores proteicos (p-p53 (Ser15), p21, p-H2A.X (Ser139), p-ATM (Ser1981), p-Chk1 (Ser345), p-ATR (Ser428), p-cdc2 (Thr14/Tyr15), Gadd45a y p-Chk2 (Thr68)) evaluados con (pro)genotoxinas (ciclofosfamida, 7,12-dimetilbenzantraceno, aflatoxina B1, 2-acetilaminofluoreno, actinomicina D, metansulfonato de metilo, etopósido) y no genotoxinas (D-manitol, fenformina HCl, progesterona). Los resultados positivos/negativos se muestran con los colores rojo/verde, respectivamente.

En la Tabla 3 se muestran las sustancias químicas del grupo 1 ("genotoxinas in vivo que se deberían detectar como positivas en pruebas de genotoxicidad en células de mamífero in vitro") recomendadas por el Centro Europeo para la Validación de Métodos Alternativos (ECVAM, por sus siglas en inglés) a fin de juzgar el rendimiento de las pruebas de genotoxicidad in vitro (Kirkland et al., 2008, Mutat. Res., 653, 99-108).

En la Tabla 4 se muestran las sustancias químicas del grupo 2 ("sustancias químicas no reactivas con ADN, que incluyen carcinógenos no genotóxicos, que deberían dar resultados negativos en pruebas de genotoxicidad en células de mamífero in vitro") recomendadas por el Centro Europeo para la Validación de Métodos Alternativos (ECVAM, por sus siglas en inglés) a fin de juzgar el rendimiento de las pruebas de genotoxicidad in vitro (Kirkland et al., 2008, Mutat. Res., 653, 99-108).

5 En la Tabla 5 se enumeran las sustancias químicas del grupo 3 ("sustancias químicas que deberían dar resultados negativos en pruebas de genotoxicidad en células de mamífero in vitro pero se ha informado que inducen aberraciones cromosómicas o mutaciones tk en células de linfoma de ratón, a menudo a concentraciones altas o a niveles altos de citotoxicidad") recomendadas por el Centro Europeo para la Validación de Métodos Alternativos (ECVAM, por sus siglas en inglés) a fin de juzgar el rendimiento de las pruebas de genotoxicidad in vitro (Kirkland et al., 2008, Mutat. Res., 653, 99-108).

10 En la Tabla 6 se enumeran las sustancias químicas del grupo 1 ("genotoxinas in vivo que se deberían detectar como positivas en pruebas de genotoxicidad en células de mamífero in vitro") recomendadas por ECVAM y su concentración más alta evaluada está limitada por autofluorescencia (AF), citotoxicidad basada en experimentos previos (Cyto) y precipitaciones (Prec) así como la mayor concentración <50% para los dos parámetros de citotoxicidad de cuenta de células seleccionada por campo válido (SCC) e intensidad CMFDA promedio en citoplasma (CMFDA).

15 En la Tabla 7 se enumeran las sustancias químicas del grupo 2 ("sustancias químicas no reactivas con ADN, que incluyen carcinógenos no genotóxicos, que deberían dar resultados negativos en pruebas de genotoxicidad en células de mamífero in vitro") recomendadas por ECVAM y su concentración más alta evaluada está limitada por autofluorescencia (AF), citotoxicidad basada en experimentos previos (Cyto) y precipitaciones (Prec) así como la mayor concentración <50% para los dos parámetros de citotoxicidad de cuenta de células seleccionada por campo válido (SCC) e intensidad CMFDA promedio en citoplasma (CMFDA).

20 En la Tabla 8 se enumeran las sustancias químicas del grupo 3 ("sustancias químicas que deberían dar resultados negativos en pruebas de genotoxicidad en células de mamífero in vitro pero se ha informado que inducen aberraciones cromosómicas o mutaciones tk en células de linfoma de ratón, a menudo a concentraciones altas o a niveles altos de citotoxicidad") recomendadas por ECVAM y su concentración más alta evaluada está limitada por autofluorescencia (AF), citotoxicidad basada en experimentos previos (Cyto) y precipitaciones (Prec) así como la mayor concentración <50% para los dos parámetros de citotoxicidad de cuenta de células seleccionada por campo válido (SCC) e intensidad CMFDA promedio en citoplasma (CMFDA).

30 En la Tabla 9 se enumeran los resultados para los cinco marcadores proteicos (p-p53 (Ser15), p21, p-H2A.X (Ser139), p-ATM (Ser1981), p-Chk1 (Ser345)) evaluados con las sustancias químicas del grupo 1 ("genotoxinas in vivo que se deberían detectar como positivas en pruebas de genotoxicidad in vitro en células de mamífero") recomendadas por ECVAM. Los resultados positivos/negativos se muestran con los colores rojo/verde, respectivamente.

35 En la Tabla 9 se enumeran los resultados para los cinco marcadores proteicos (p-p53 (Ser15), p21, p-H2A.X(Ser139), p-ATM (Ser1981), p-Chk1 (Ser345)) evaluados con las sustancias químicas del grupo 2 ("sustancias químicas no reactivas con ADN, incluyendo carcinógenos no genotóxicos, que deberían dar resultados negativos en pruebas de genotoxicidad en células de mamífero in vitro") recomendadas por ECVAM. Los resultados positivos/negativos se muestran con los colores rojo/verde, respectivamente.

40 En la Tabla 11 se enumeran los resultados para los cinco marcadores proteicos (p-p53 (Ser15), p21, p-H2A.X(Ser139), p-ATM (Ser1981), p-Chk1 (Ser345)) evaluados con las sustancias químicas del grupo 3 ("sustancias químicas que deberían dar resultados negativos en pruebas de genotoxicidad en células de mamífero in vitro pero se ha informado que inducen aberraciones cromosómicas o mutaciones tk en células de linfoma de ratón, a menudo a concentraciones altas o a niveles altos de citotoxicidad.") recomendadas por ECVAM. Los resultados positivos/negativos se muestran con los colores rojo/verde, respectivamente.

En la Tabla 12 se enumeran los resultados de los cambios en la p53 fosforilada (Ser15) y el nivel de proteínas totales de p21 en lisados celulares usando un kit de Esferas Magnéticas MILLIPLEX MAP y el sistema Luminex.

#### EJEMPLO

45 • Sustancias químicas y suplementos de medios de cultivo celular

50 El conjunto de compuestos evaluado es recomendado por el Centro Europeo para la Validación de Métodos Alternativos (ECVAM) a fin de juzgar el rendimiento de las pruebas de genotoxicidad in vitro: Dos de los tres grupos de compuestos que ya se habían evaluado están enumerados (Tablas 3, 4 y 5) (Kirkland et al., 2008, Mutat. Res., 653, 99-108). Todos los compuestos evaluados se obtuvieron con una pureza mínima del 97%. La mayoría de los compuestos se obtuvieron de Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Alemania) excepto la ciclofosfamida que era de Calbiochem (Darmstadt, Alemania); 2-acetilaminofluoreno y taxol eran de Acros Organics (Geel, Bélgica), dimetilnitrosamina y flometurón eran del Dr. Ehrenstorfer GmbH (Augsburg, Alemania), 2-amino-3-metilimidazo[4,5-f]quinolona y 2-amino-1-metil-6-fenilimidazo[4,5-f] piridina eran de Apollo Scientific Ltd. (Bredbury, RU), N,N-diciclohexiltiourea y amitrol eran de TCI Europe (Zwijndrecht, Bélgica) y el sulfato de efedrina era de LGC

(Teddington, RU). Los compuestos DMEM/F12, gentamicina y piruvato de sodio se obtuvieron de Invitrogen Corp. (Karlsruhe, Alemania). El suero fetal bovino (FBS) se obtuvo de HyClone (N° Orden SV30160,03, Lote N° RSJ30856, HyClone RU Ltd., Cramlington, RU). B-naftoflavona/S9 de hígado de rata inducido por fenobarbital (N° Orden R1081.S9, Lote No. 0710507) se ordenó de Tebu-bio (Offenbach, Alemania). Los compuestos tripsina, β-nicotinamida adenina dinucleótido 2'-fosfato reducida sal hidrata (NADPH) y la solución de penicilina/estreptomicina se obtuvieron de Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Alemania). Los compuestos cloruro de magnesio, cloruro de potasio, fosfato de sodio monobásico monohidrato y fosfato de sodio dibásico heptahidrato se obtuvieron de Merck KGaA (Darmstadt, Alemania).

• Cultivos celulares

Se cultivaron células HepG2 (N° Orden HB-8065, Lote 58483209, ATCC, Manassas, EEUU) en DMEM/F12 con L-glutamina y Hepes 15 mM suplementado con 10% (v/v) FBS, solución al 1% (v/v) de penicilina (10 kU/ml)/estreptomicina (10 mg/ml), 0,1% (v/v) de gentamicina (50 mg/ml) y piruvato de sodio 1 mM a 37 °C y 5% de CO2 en frascos de cultivo. Según el experimento, se sembró una cantidad apropiada de células sobre las placas después de desprender las células usando tripsina y las células se cultivaron a 37 °C y 5% de CO2 durante 24 h antes del tratamiento. Todos los experimentos se repitieron tres veces con células de los pasajes 4-20.

Evaluación de las nueve proteínas marcadoras putativas

• Tratamiento de las células y selección de la dosis

Las células se sembraron sobre placas negras de 96 pocillos recubiertos con Poli-D-Lisina (BD Biocoat, Franklin Lakes, EEUU) (0,02 x 106 células/pocillo) y se dejaron por 24 h para la adherencia y luego se trataron con los compuestos de prueba. Para cada compuesto se evaluaron siete concentraciones con diluciones en serie al medio. Se usó DMSO 1% (v/v) como control de vehículo en los experimentos. El procedimiento del tratamiento fue diferente para los compuestos genotóxicos directos y progenotóxicos. El tratamiento para los compuestos genotóxicos directos era continuo y se repitió diariamente sobre un período de 48 h. Los compuestos progenotóxicos se incubaron durante 6 h junto con un sistema de activación metabólica (para limitar el efecto citotóxico de la mezcla S9). Después de este período, las células se lavaron con medio celular seguido por 18 repeticiones diarias sobre un período de 48 h. El sistema de activación metabólica usado consistía en los siguientes componentes y concentraciones: MgCl2 8 mM, KCl 32,8 mM, NADPH 12 mM, solución amortiguadora de fosfato 124 mM y citocromo P450 (CYP) 2500 pmol/ml contenido en la premezcla correspondiente a MgCl2 2,4 mM, KCl 9,8 mM, NADPH 3,6 mM, solución amortiguadora de fosfato 37,2 mM y CYP 750 pmol/ml como concentraciones finales después de una dilución de 1:3,33 con medio de cultivo celular.

• Tinción de inmunofluorescencia

- Protocolo de tinción para los parámetros de citotoxicidad:

Después del tratamiento, las células se lavaron con PBS (Gibco Invitrogen, Karlsruhe, Alemania), y luego se tiñeron con diacetato de 5-clorometilfluoresceína verde CellTracker (CMFDA) 10 μM (Invitrogen, Karlsruhe, Alemania) en medio de cultivo celular. El CMFDA no es fluorescente per se y se hidrolizó con esterasa en células viables en un colorante fluorescente. La reacción con grupos tiol permite obtener un aducto de colorante fluorescente impermeable para células. La actividad esterasa se puede usar como un indicador de la viabilidad de las células (Papadopoulos et al., 1994, J Immunol Methods 177, 101-111). Después de un período de incubación de 30 min a 37 °C, las células se lavaron con PBS y luego se fijaron con 3,7% de formaldehído (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Alemania) en PBS durante 20 min. A continuación, se aplicaron dos pasos de lavado adicionales con 0,05% de Tween 20, luego las células se lavaron con PBS y finalmente se agregó PBS y se cuantificaron las células.

- Protocolo de tinción para las proteínas marcadoras putativas:

Después del tratamiento, las células se lavaron con PBS (Gibco Invitrogen, Karlsruhe, Alemania), y luego se fijaron con 3,7% de formaldehído (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Alemania) en PBS durante 20 min. Después de lavar dos veces con PBS, las células se bloquearon y se permeabilizaron con 7,5% de suero de cabra (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Alemania) y 0,3% de Triton X-100 (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Alemania) en PBS durante 30 min. Cada uno de los anticuerpos primarios se diluyó por separado hasta una concentración final de 10 μg/ml del anticuerpo monoclonal IgG anti-Gadd45α de conejo (Cell Signaling, Danvers, EEUU), 10 μg/ml del anticuerpo monoclonal IgG anti-p21 de conejo (Cell Signaling, Danvers, EEUU); 5 μg/ml del anticuerpo monoclonal IgG anti-p-ATM (Ser1981) de conejo (Cell Signaling, Danvers, EEUU); 10 μg/ml del anticuerpo monoclonal IgG anti-p-ATR (Ser428) de conejo (Cell Signaling, Danvers, EEUU); 4 μg/ml del anticuerpo policlonal IgG anti-p-cdc2 (Tyr15/Thr14) de conejo (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, EEUU); 20 μg/ml del anticuerpo monoclonal IgG anti-p-Chk1 (Ser345) de conejo (Cell Signaling, Danvers, EEUU); 20 μg/ml del anticuerpo monoclonal IgG anti-p-Chk2 (Thr68) de conejo (Cell Signaling, Danvers, EEUU); 2,5 μg/ml del anticuerpo monoclonal IgG1 anti-p-Histona H2A.X (Ser139) de

- 5 conejo (Cell Signaling, Danvers, EEUU) o 2 µg/ml del anticuerpo monoclonal IgG anti-p-p53 (Ser15) de conejo (Invitrogen, Karlsruhe, Alemania) en solución de bloqueo/permeabilización que se agregó después. Después de incubar durante 16-18 h, las células se lavaron dos veces con 0,05% de Tween 20 (Calbiochem, Darmstadt, Alemania) en PBS y se agregó el anticuerpo secundario/solución colorante de Hoechst 16 µM en solución de bloqueo/permeabilización. El anticuerpo secundario (anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo con Alexa Fluor 488, Invitrogen, Karlsruhe, Alemania) se diluyó hasta una concentración final de 2 µg/ml. Después de una incubación de 1 h, seguido por dos pasos de lavado adicionales con 0,05% de Tween 20, las células se lavaron con PBS y finalmente se agregó PBS y se cuantificaron las células.
- Adquisición de imágenes y análisis para los parámetros de citotoxicidad:
- 10 La adquisición de imágenes se efectuó con el lector ArrayScan VTI HCS (Cellomics, Pittsburgh, EEUU) usando un objetivo 10x. Para detectar suficientes células, se recolectaron 20 imágenes comenzando en la mitad de cada pocillo.
- El filtro se seleccionó de acuerdo con las longitudes de onda de excitación/emisión para cada colorante:
- Protocolo para los parámetros de citotoxicidad:
- 15 Canal 1: 365 ± 25 y 515 ± 10 nm (XF93-Hoechst) para Hoescht 33342
- Canal 2: 475 ± 20 y 515 ± 10 nm (XF93-FITC) para CMFDA
- Adquisición de imágenes y análisis para las proteínas marcadoras putativas:
- 20 La adquisición de imágenes se efectuó con el lector ArrayScan VTI HCS (Cellomics, Pittsburgh, EEUU) usando un objetivo 20x. Para detectar suficientes células, se recolectaron 20 imágenes comenzando en la mitad de cada pocillo.
- El filtro se seleccionó de acuerdo con las longitudes de onda de excitación/emisión para cada colorante:
- Protocolo para las proteínas marcadoras putativas:
- Canal 1: 365 ± 25 y 515 ± 10 nm (XF93-Hoechst) para Hoescht 33342
- Canal 2: 475 ± 20 y 515 ± 10 nm (XF93- FITC) para el anticuerpo de cabra anti-conejo con Alexa Fluor 488
- 25 El análisis de las imágenes se efectuó con el software iDev y el programa Bioapplication Versión 4 (Cellomics, Pittsburgh, EEUU). Los núcleos teñidos se usaron para la localización del núcleo y el citoplasma (anillo alrededor del núcleo).
- Se generaron los siguientes parámetros de lectura:
- Protocolo para los parámetros de citotoxicidad:
- 30 Canal 1: cuenta celular seleccionada por campo válido
- Canal 2: intensidad CMFDA promedio en citoplasma
- Protocolo para las proteínas marcadoras putativas:
- Canal 2:
- intensidad promedio nuclear de proteínas
- 35 • Análisis de e interpretación de los datos
- 40 La magnitud de regulaciones de las muestras tratadas contra el control de vehículo se calculó para cada compuesto y concentración. La significancia estadística (valor  $p < 0,05$ ) se determinó usando la prueba t de Student. Los umbrales para cada parámetro se seleccionaron basado en el valor del control y la adición de tres veces la desviación estándar en comparación con el valor de control. Para p-p53 (Ser15), p-H2A.X (Ser139) y p-ATM (Ser1981) los umbrales se definieron en 1,5, para p21, p-Chk1 (Ser345), p-ATR (Ser428), p-cdc2 (Tyr15/Thr14) y

Gadd45 $\alpha$  en 1,6 y para p-Chk2 (Thr68) en 1,9. Se excluyeron las concentraciones con precipitación o autofluorescencia, así como las concentraciones que mostraban en por lo menos uno de los dos parámetros de citotoxicidad (cuenta celular seleccionada por campo válido e intensidad de CMFDA en el citoplasma) un efecto citotóxico  $\geq 50\%$ .

## 5 Evaluación de cinco proteínas marcadoras

### • Tratamiento de las células y selección de la dosis

Las células se sembraron sobre placas negras de 96 pocillos recubiertos con Poli-D-Lisina (BD Biocoat, Franklin Lakes, EEUU) (0,02 x 10<sup>6</sup> células/pocillo) y se dejaron por 24 h para la adherencia y luego se trataron con los compuestos de prueba a una concentración máxima de 1 mM que es recomendada por el lineamiento (EMA, 2011) de ICH S2(R1). Para cada compuesto se evaluaron nueve concentraciones con diluciones en serie al medio. Se usó DMSO 1% (v/v) como control de vehículo en los experimentos. El procedimiento del tratamiento fue diferente para los compuestos genotóxicos directos y progenotóxicos. El tratamiento para los compuestos genotóxicos directos era continuo y se repitió diariamente sobre un período de 48 h. Los compuestos progenotóxicos se incubaron durante 6 h junto con un sistema de activación metabólica (para limitar el efecto citotóxico de la mezcla S9). Después de este período, las células se lavaron con medio celular seguido por 18 repeticiones diarias sobre un período de 48 h. El sistema de activación metabólica usado consistía en los siguientes componentes y concentraciones: MgCl<sub>2</sub> 8 mM, KCl 32,8 mM, NADPH 12 mM, solución amortiguadora de fosfato 124 mM y citocromo P450 (CYP) 2500 pmol/ml contenido en la premezcla correspondiente a MgCl<sub>2</sub> 2,4 mM, KCl 9,8 mM, NADPH 3,6 mM, solución amortiguadora de fosfato 37,2 mM y CYP 750 pmol/ml como concentraciones finales después de una dilución de 1:3,33 con medio de cultivo celular.

### • Tinción de inmunofluorescencia

Se realizaron dos procedimientos de tinción diferentes para cada compuesto con y sin un sistema de activación metabólica:

#### - Protocolo de tinción 1:

Después del tratamiento, las células se lavaron con PBS (Gibco Invitrogen, Karlsruhe, Alemania), y luego se fijaron con 3,7% de formaldehído (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Alemania) en PBS durante 20 min. Después de un paso de lavado adicional con PBS, las células se bloquearon y permeabilizaron con 2% de suero de burro (Millipore, Schwalbach, Alemania) y 0,25% de Triton X- 100 (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Alemania) en PBS durante 30 min. Los anticuerpos primarios se diluyeron hasta concentraciones finales de 2  $\mu$ g/ml de anticuerpo monoclonal IgG anti-p-p53 (Ser15) de conejo (Invitrogen, Karlsruhe, Alemania), 0,8  $\mu$ g/ml de anticuerpo policlonal IgG anti-p21 de cabra, (R&D Systems, Miniápolis, EEUU); 4  $\mu$ g/ml de anticuerpo monoclonal IgG1 anti-p-Histona H2A.X (Ser139) de ratón (Millipore, Schwalbach, Alemania) agregándose después solución de bloqueo/permeabilización. Después de incubar durante 16-18 h, las células se lavaron con 0,05% de Tween 20 (Calbiochem, Darmstadt, Alemania) en PBS y se agregó el anticuerpo secundario/solución colorante de Hoechst 16  $\mu$ M en solución de bloqueo/permeabilización. Los anticuerpos secundarios se diluyeron 1:400 (anticuerpo de burro anti-conejo con Alexa Fluor 488, anticuerpo de burro anti-cabra con Alexa Fluor 555, anticuerpo de burro anti-ratón con Alexa Fluor 647, Invitrogen, Karlsruhe, Alemania). Después de una incubación de 1 h, seguido por dos pasos de lavado adicionales con 0,05% de Tween 20, las células se lavaron con PBS y finalmente se agregó PBS y se cuantificaron las células.

#### - Protocolo de tinción 2:

Después del tratamiento, las células se lavaron con PBS (Gibco Invitrogen, Karlsruhe, Alemania), y luego se tiñeron con diacetato de 5-clorometilfluoresceína verde CellTracker (CMFDA) 10  $\mu$ M (Invitrogen, Karlsruhe, Alemania) en medio de cultivo celular durante 30 min. El CMFDA no es fluorescente per se y se hidrolizó con esterasa en células viables en un colorante fluorescente. La reacción con grupos tiol permite obtener un aducto de colorante fluorescente impermeable para células. La actividad esterasa se puede usar como un indicador de la viabilidad de las células (Papadopoulos et al., 1994, J Immunol Methods 177, 101-11). A continuación, las células se lavaron con PBS y se fijaron con 3,7% de formaldehído (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Alemania) en PBS durante 20 min. Después de ello, las células se lavaron con PBS, se bloquearon y se permeabilizaron con 2% de suero de burro (Millipore, Schwalbach, Alemania) y 0,25% de Triton X- -100 (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Alemania) en PBS durante 30 min. Se diluyeron anticuerpos primarios en solución de bloqueo/permeabilización hasta concentraciones finales de 4  $\mu$ g/ml del anticuerpo policlonal IgG anti-p-Chk1 (Ser345) de cabra (santa cruz, Santa Cruz, EEUU), 4  $\mu$ g/ml del anticuerpo monoclonal IgG1K anti-p-ATM (Ser1981) de ratón (Millipore, Schwalbach, Alemania) y se agregaron a las células. Después de incubar durante 16-18 h, las células se lavaron con 0,05% de Tween 20 (Calbiochem, Darmstadt, Alemania) en PBS y se agregó el anticuerpo secundario/solución colorante de Hoechst 16  $\mu$ M en solución de bloqueo/permeabilización. Los anticuerpos secundarios se diluyeron 1:400 (anticuerpo de burro anti-cabra con Alexa Fluor 555, anticuerpo de burro anti-ratón con Alexa Fluor 647, Invitrogen, Karlsruhe, Alemania).

Después de una incubación de 1 h, seguido por dos pasos de lavado adicionales con 0,05% de Tween 20, las células se lavaron con PBS y finalmente se agregó PBS y se cuantificaron las células.

- Adquisición de imágenes y análisis

5 La adquisición de imágenes se efectuó con el lector ArrayScan VTI HCS (Cellomics, Pittsburgh, EEUU) usando un objetivo 20x. Para detectar suficientes células, se recolectaron 50 imágenes comenzando en la mitad de cada pocillo.

El filtro se seleccionó de acuerdo con las longitudes de onda de excitación/emisión para cada colorante:

- Protocolo 1:

Canal 1:  $365 \pm 25$  y  $515 \pm 10$  nm (XF93-Hoechst) para Hoescht 33342

10 Canal 2:  $475 \pm 20$  y  $515 \pm 10$  nm (XF93- FITC) para el anticuerpo de burro anti-conejo con Alexa Fluor 488

Canal 3:  $549 \pm 4$  y  $600 \pm 12,5$  nm (XF93-TRITC) para el anticuerpo de burro anti-cabra con Alexa Fluor 555

Canal 4:  $655 \pm 15$  y  $730 \pm 25$  nm (XF110-Cy5 (sensible)) para el anticuerpo de burro anti-ratón con Alexa Fluor 647

- Protocolo 2:

Canal 1:  $365 \pm 25$  y  $515 \pm 10$  nm (XF93-Hoechst) para Hoescht 33342

15 Canal 2:  $475 \pm 20$  y  $515 \pm 10$  nm (XF93-FITC) para CMFDA

Canal 3:  $549 \pm 4$  y  $600 \pm 12,5$  nm (XF93-TRITC) para el anticuerpo de burro anti-cabra con Alexa Fluor 555

Canal 4:  $655 \pm 15$  y  $730 \pm 25$  nm (XF110-Cy5 (sensible)) para el anticuerpo de burro anti-ratón con Alexa Fluor 647

20 El análisis de las imágenes se efectuó con el software iDev y el programa Bioapplication Versión 4 (Cellomics, Pittsburgh, EEUU). Los núcleos teñidos en ambos ensayos se usaron para la localización del núcleo y el citoplasma (anillo alrededor del núcleo).

Se generaron los siguientes parámetros de lectura para cada pocillo:

- Protocolo 1:

Canal 2: intensidad promedio nuclear de p-p53 (Ser15)

Canal 3: intensidad promedio nuclear de p21

25 Canal 4: intensidad promedio nuclear de p-H2A.X (Ser139)

- Protocolo 2:

Canal 1: cuenta celular seleccionada por campo válido

Canal 2: intensidad CMFDA promedio en citoplasma

Canal 3: intensidad promedio nuclear de p-Chk1 (Ser345)

30 Canal 4: intensidad promedio nuclear de p-ATM (Ser1981)

- Análisis de e interpretación de los datos

35 La magnitud de regulaciones de las muestras tratadas contra el control de vehículo se calculó para cada compuesto y concentración. La significancia estadística (valor  $p < 0,05$ ) se determinó usando la prueba t de Student. Los umbrales para cada parámetro se seleccionaron basado en el valor del control y la adición de tres veces la desviación estándar en comparación con el valor de control. Para p-Chk1 (Ser345) y p-H2A.X (Ser139), los umbrales se definieron en 2,1; para p21, p-ATM (Ser1981) en 1,8 y p-p53 (Ser15) en 1,9. Si por lo menos una de las cinco

5 proteínas mostraban una magnitud de cambio por encima de este umbral, el compuesto se establecía como positivo. De lo contrario, el compuesto se establecía como negativo. Se excluyeron las concentraciones con precipitación o inmunofluorescencia, así como las concentraciones que mostraban en por lo menos uno de los dos parámetros de citotoxicidad (cuenta celular seleccionada por campo válido e intensidad de CMFDA en el citoplasma) un efecto citotóxico  $\geq 50\%$ .

10 El estudio buscaba desarrollar un nuevo sistema de prueba basado en High Content Imaging, específico y sensible, para los mutágenos y promutágenos in vitro usando células HepG2. Debido a su capacidad metabólica limitada, se estableció un sistema combinado de células HepG2 y un sistema de activación metabólica (MAS - S9 de hígado de rata) para las pruebas con promutágenos. Hasta nueve proteínas diferentes involucradas en la respuesta al daño del ADN sirvieron como marcadores putativos para la genotoxicidad inducida por compuestos. Los cambios en la expresión proteica y la activación se cuantificaron 48 h después del tratamiento con (pro)genotoxinas (ciclofosfamida, 7,12-dimetilbenzantraceno, aflatoxina B1, 2-acetilaminofluoreno, actinomicina D, metansulfonato de metilo, etopósido) y no genotoxinas (D-manitol, fenformina HCl, progesterona) usando la tecnología HCl.

15 La mejor clasificación se logró usando cinco de las nueve proteínas marcadoras putativas. Se seleccionaron los cinco marcadores más predictivos entre los nueve marcadores mencionados precedentemente (p-p53 (Ser15), p21, p-H2A.X (Ser139), p-ATM (Ser1981), p-Chk1 (Ser345), p-ATR (Ser428), p-cdc2 (Thr14/ Tyr15), Gadd45a, p-Chk2 (Thr68)). Aunque los experimentos se basaban en los cinco marcadores p-p53 (Ser15), p21, p-H2A.X(Ser139), p-ATM (Ser1981), p-Chk1 (Ser345), un análisis adicional de p-ATR (Ser428), p-cdc2 (Thr14/Tyr15), Gadd45a, p-Chk2 (Thr68) permitió una caracterización más detallada del modo de acción del compuesto y se usaron como marcadores suplementarios.

20 El análisis de los nueve marcadores putativos p-p53 (Ser15), p21, p-H2A.X (Ser139), p-ATM (Ser1981), p-Chk1 (Ser345), p-ATR (Ser428), p-cdc2 (Thr14/Tyr15), Gadd45a y p-Chk2 (Thr68) se cuantificó 48 h después del tratamiento con (pro)genotoxinas (ciclofosfamida, 7,12-dimetilbenzantraceno, aflatoxina B1, 2-acetilaminofluoreno, actinomicina D, metansulfonato de metilo, etopósido) y no genotoxinas (D-manitol, fenformina HCl, progesterona) usando la tecnología HCl. La mejor clasificación se logró usando los cinco marcadores (p-p53 (Ser15), p21, p-H2A.X (Ser139), p-ATM (Ser1981) y p-Chk1 (Ser345)) de las nueve proteínas marcadoras putativas (Tabla 2).

25 El análisis de las sustancias químicas del grupo 1 ("genotoxinas in vivo que se deberían detectar como positivas en pruebas de genotoxicidad en células de mamífero in vitro") recomendadas por ECVAM condujo a cuatro compuestos falsos negativos. Los compuestos etilnitrosourea, dimetilnitrosamina, 2,4-diaminotolueno y cloruro de cadmio no condujeron a resultados positivos para ninguno de los marcadores proteicos evaluados. Por ello, la sensibilidad de este sistema de prueba, donde 18 compuestos clasificaron como positivos entre las 20 genotoxinas evaluadas in vivo, es del 80% (Tablas 6 y 9).

30 Las sustancias químicas del grupo 2 ("sustancias químicas no reactivas con ADN, incluyendo carcinógenos no genotóxicos, que deberían dar resultados negativos en pruebas de genotoxicidad en células de mamífero in vitro") condujeron a dos compuestos evaluados falsos positivos. Ambos progesterona y fenantraceno dieron resultados positivos para p-ATM (Ser1981) que resultaron en dos compuestos evaluados falsos positivos de los 23 compuestos evaluados. En consecuencia, se pudo calcular una especificidad del 91,3% (Tablas 7 y 10).

35 Las sustancias químicas del grupo 3 ("sustancias químicas no reactivas con ADN, incluyendo carcinógenos no genotóxicos, venenos metabólicos y otras que deberían dar resultados negativos in vitro en las pruebas de genotoxicidad en células de mamífero, pero que se informó que inducen aberraciones cromosómicas o mutaciones tk en células de linfoma de ratón, a menudo a concentraciones altas o a niveles altos de citotoxicidad") condujeron a cuatro compuestos evaluados falsos positivos. Los compuestos galato de propilo, p-nitrofenol, eugenol y 2,4-diclorofenol dieron resultados positivos que resultaron en cuatro compuestos evaluados falsos positivos en los 19 compuestos evaluados. En consecuencia, se pudo calcular una especificidad del 78,9% (Tablas 8 y 11).

40 Estas cinco proteínas eran candidatos potenciales para la identificación de potenciales agentes genotóxicos en una etapa temprana del proceso de descubrimiento de fármacos.

#### • Análisis con Luminex

45 Se usó un kit de esferas magnéticas (Milliplex MAP) para detectar cambios en la p53 fosforilada (Ser15), así como en el nivel de proteínas totales de p21, en lisados celulares usando el sistema Luminex.

50 MILLIPLEX MAP se basa en la tecnología Luminex xMAP. Luminex emplea técnicas propias para asignar internamente códigos de colores a microesferas con dos colorantes fluorescentes. Las concentraciones precisas de estos colorantes permiten crear 100 conjuntos de esferas coloreadas claramente, cada una de las cuales está recubierta con un anticuerpo de captura específico. Después que la esfera capturó un analito de una muestra de prueba, se introduce un anticuerpo de detección biotinilado. La mezcla de reacción se incuba luego con el conjugado

de estreptavidina-ficoeritrina (SAPE), la molécula informante, para completar la reacción sobre la superficie de cada microesfera. Las microesferas se iluminan, y los colorantes internos fluorescen, marcando los conjuntos de microesferas usados en un ensayo particular. Una segunda fuente de iluminación excita a PE, el colorante fluorescente sobre la molécula informante. Finalmente, se emplean procesadores de señales digitales de gran velocidad para identificar cada microesfera individual y cuantificar el resultado del bioensayo con señales informantes fluorescentes.

El rendimiento del ensayo se obtuvo como se describirá a continuación y se usaron los reactivos de los conjuntos de elementos MILLIPLEX MAP (EMD Millipore, N° Cat. 46-662 y 46-621).

- Protocolo de lisis celular

Se trataron células adherentes o no adherentes cultivadas en placas de grado cultivo tisular de 96 pocillos, estériles, se lavaron y se lisaron en la misma placa, pero se debieron filtrar en una placa filtrante de 96 pocillos separada. Los pasos del protocolo fueron: Para las células no adherentes, la placa de cultivo tisular se centrifugó durante 2 minutos a 500 x g para obtener pélets de células. Si se usaron células adherentes, se comenzó con el paso siguiente. El medio se retiró mediante aspiración, y se agregaron 100 ml de PBS o TBS helado. Para las células no adherentes, se repitió el primer paso. El medio de lavado se retiró mediante aspiración. Se agregaron 35 µl/pocillo de solución amortiguadora de lisis MILLIPLEX MAP 1X helada que contiene inhibidores de fosfatasa (incluyendo ortovanadato de sodio 1 mM (Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>)) e inhibidores de proteasas recién preparadas. La placa se colocó sobre un agitador orbital (600-800 rpm) durante 10-15 minutos a 4 °C. El lisado se guardó a -70 °C hasta el momento del uso.

- Protocolo de inmunoensayo

Los lisados filtrados se diluyeron por lo menos 1:1 en solución amortiguadora de ensayo MILLIPLEX® MAP. El rango de trabajo sugerido de concentraciones proteicas para el ensayo era de entre 1 y 25 µg de proteínas totales/pocillo (25 µl/pocillo a razón de entre 40 y 1000 µg/ml). Se agregaron 50 µl de solución amortiguadora de ensayo a cada pocillo de la placa y se cubrió y mezcló sobre un agitador de placas durante 10 minutos a temperatura ambiente (20-25 °C). Se decantó la solución amortiguadora de ensayo, y se retiró la cantidad residual de todos los pocillos por inversión de la placa y golpeándola rápidamente varias veces sobre toallas absorbentes. La suspensión de esferas 1X se agitó mediante vortexeo durante 10 segundos, y se agregaron 25 µl de suspensión de esferas 1X a cada pocillo. Los 25 µl de solución amortiguadora de ensayo, lisados celulares control reconstituidos y lisados de muestras se agregaron a los pocillos apropiados y se incubaron durante la noche (16-20 horas) a 2-8 °C sobre un agitador de placas (600-800 rpm) protegidos contra la luz. Se fijó un bloque de separación magnética manual a la placa, y se dejó que las esferas se asentaran por 60 segundos antes de decantar las muestras y los controles. La placa se retiró del bloque de separación magnética, y se lavó con 100 µl de solución amortiguadora de ensayo por pocillo. Se repitió para un total de dos lavados. Se agregaron 25 µl/pocillo de anticuerpo de detección MILLIPLEX MAP 1X. La placa se selló, se cubrió con una tapa y se incubó con agitación sobre un agitador de placas durante 1 hora a temperatura ambiente (20-25 °C). Se fijó el bloque de separación magnética y se dejó en reposo durante 60 segundos antes de decantar el anticuerpo de detección. Se agregaron 25 µl de estreptavidina-ficoeritrina (SAPE) MILLIPLEX MAP 1X. La placa se selló, se cubrió con una tapa y se incubó con agitación sobre un agitador de placas durante 15 minutos a temperatura ambiente (20-25 °C). Se agregaron 25 µl de solución amortiguadora de amplificación MILLIPLEX MAP a cada pocillo. La placa se selló, se cubrió con una tapa y se incubó con agitación sobre un agitador de placas durante 15 minutos a temperatura ambiente (20-25 °C). Se fijó el bloque de separación magnética y se dejó en reposo durante 60 segundos antes de decantar la solución amortiguadora/SAPE. Las esferas se suspendieron en 150 µl de solución amortiguadora de ensayo MILLIPLEX MAP y se mezclaron sobre un agitador de placas durante 5 minutos antes del análisis usando el sistema Luminex.

- Análisis de e interpretación de los datos

La magnitud de regulaciones de las muestras tratadas contra el control de vehículo se calculó para cada compuesto y concentración. Los umbrales para cada parámetro se seleccionaron basado en el valor del control y la adición de tres veces la desviación estándar en comparación con el valor de control. Para p-p53 (Ser 15) y p21 el umbral se estableció en 1,5. Si por lo menos una de las proteínas mostraba una magnitud de cambio por encima de este umbral, el compuesto se establecía como positivo. De lo contrario, el compuesto se establecía como negativo.

Los resultados con el kit de esferas magnéticas MILLIPLEX MAP, que se usó para detectar cambios en la p53 fosforilada (Ser15) así como el nivel de proteínas totales de p21 en lisados celulares usando el sistema Luminex como se muestra en la Tabla 12. Se evaluaron los compuestos genotóxicos sulfonato de metilmetano y etopósido, así como el D-manitol no genotóxico.

ES 2 660 131 T3

Tabla 1

Proteína modificación postraducción) (con de	Nombre de la proteína (nombre alternativo)	Nombre del gen (nombre alternativo)	Número de acceso
p-p53 (Ser15)	Antígeno de tumor celular p53, (Nombre/s alternativo/s: Antígeno NY-CO-13 fosfoproteína p53 supresor tumoral p53)	TP53 (P53)	P04637
p21	inhibidor de quinasa dependiente de ciclina 1, (proteína de interacción con CDK 1 proteína asociada con diferenciación de melanoma 6, p21)	CDKN1A, (CAP20, CDKN1, CIP1, MDA6, PIC1, SDI1, WAF1)	P38936
H2A.X (Ser139)	Histona H2A.X	H2AFX, (H2AX)	P16104
p-Chk1 (Ser345)	Serina/treonina-proteína quinasa Chk1, (CHK1 quinasa homóloga del punto de control; quinasa del punto de control 1)	CHEK1, (CHK1)	014757
p-ATM(Ser1981)	ATM serina-proteína quinasa, (Ataxia telangiectasia mutado)	ATM	Q13315
Marcador suplementario			
p-ATR (Ser428)	ATR serina/treonina-proteína quinasa, (ataxia telangiectasia y proteína relacionada con Rad3; proteína relacionada con FRAP 1)	ATR, (FRP1)	Q13535
p-cdc2 (Thr14/Tyr15)	Quinasa dependiente de ciclina 1, (homólogo de la proteína control de la división celular 2; proteína quinasa de la división celular 1; proteína quinasa p34)	CDK1, (CDC2, CDC28A, CDKN1, P34CDC2)	P06493
Marcador suplementario			
Gadd45a	Proteína de arresto del crecimiento y inducible por daño del ADN GADD45 alfa, (proteína del transcripto inducible por daño del ADN 1)	GADD45A, (DDIT1, GADD45)	P24522
p-Chk2 (Thr68)	Chk2 serina/treonina-proteína quinasa, (CHK2 homólogo del punto de control homólogo de Cds1, punto de control quinasa 2)	CHEK2, (CDS1, CHK2, RAD53)	096017

Tabla 2

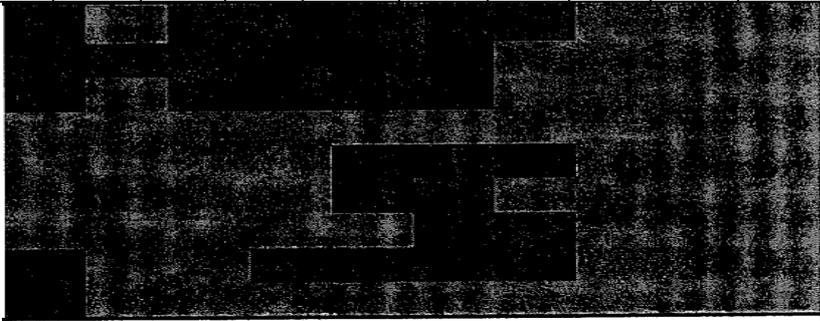
Punto de valoración final		I. genotóxica directa			II. progenotóxica+MAS				III. no genotóxica		
		Et o	ActD	MM S	CP A	DMB A	AFB 1	AAF	D-Man	Prog	Fen
Concentración de prueba más alta (µM)		2	0,2	1000	200	400	200	1000	1000	1000	1000
Concentración más alta evaluada	SCC	2	0,013	250	100	400	200	1000	1000	15,63	125
<50% de citotoxicidad (µM)	CMFDA	2	0,2	500	50	400	200	1000	1000	31,25	1000
p-p53 (Ser15)	Clasificación										
p21											
p-Histona H2A.X (Ser139)											
Gadd45a											
p-ATM (SER1981)											
p-ATR (Ser428)											
p-cdc2 (Thr14/Tyr15)											
p-Chk1 (Ser345)											
p-Chk2 (Thr68)											

Tabla 3

Compuesto	abreviatura	N° CAS
I. Genotoxinas positivas en Ames in vivo		
(i) Alquilantes de O6 y N7		
Ciclofosfamida	CPA	6055-19-2
Etilnitrosourea	ENU	759-73-9
Sulfonato de metilmetano	MMS	66-27-3
(ii) Hidrocarburos aromáticos policíclicos		
Benzo[a]pireno	BaP	50-32-8

ES 2 660 131 T3

7,12-dimetilbenz[a]antraceno	DMBA	57-97-6
(iii) Aminas aromáticas		
Dimetilnitrosamina	DMN	62-75-9
2-acetilaminofluoreno	AAF	53-96-3
2,4-diaminotolueno	DAT	95-80-7
IQ (2-amino-3-metilimidazo[4,5-f]quinolina)	IQ	76180-96-6
PhIP.HCl (2-amino-1-metil-6-fenilimidazo[4,5-f]piridina)	PhIP	105650-23-5
(iv) Otros		
Aflatoxina B1	AFB1	1162-65-8
Cloruro de cadmio	CC	10108-64-2
Cisplatino	CP	15663-27-1
p-cloroanilina	CA	106-47-8
II. Genotoxinas in vivo negativas o equívocas en Ames		
Etopósido	Eto	33419-42-0
Hidroquinona	HQ	123-31-9
Azidotimidina	AZT	30516-87-1
Arsenito de sodio	SA	7784-46-5
Taxol	T	33069-62-4
Cloranfenicol	CIA	56-75-7

Tabla 4

Compuesto	abreviatura	N° CAS
(i) No carcinógenos con datos de genotoxicidad negativos in vivo		
Ampicilina trihidrato	AmpT	7177-48-2
D-manitol	D-Man	69-65-8
(ii) No carcinógenos sin datos de genotoxicidad in vivo		
Fenformina HCl	Fen	834-28-6
cloruro de n-butilo	n-BCl	109-69-3
cloruro de (2-cloroetil)trimetil-amonio	TAC	999-81-5
Ciclohexanona	CyH	108-94-1

ES 2 660 131 T3

(ii) No carcinógenos sin datos de genotoxicidad in vivo		
N,N-diciclohexiltiourea	DCHT	1212-29-9
EDTA trisódico trihidrato	TET	150-38-9
Sulfato de efedrina	EpS	134-72-5
Estearato de eritromicina	EyS	643-22-1
Fluometrón	FM	2164-17-2
Fenantreno	PhA	85-01-8
(iii) Carcinógenos no genotóxicos		
D-limoneno	DL	5989-27-5
Di-(2-etilhexil)ftalato	DEPh	117-81-7
Amitrol	AT	61-82-5
Alcohol ter-butílico	TBA	75-65-0
Dietanolamina	DA	111-42-2
Melamina	Mel	108-78-1
Carbamato de metilo	MetC	598-55-0
Progesterona	Pro	57-83-0
Piridina	Pir	110-86-1
Tris(2-etilhexil)fosfato	TEP	78-42-2
Hexacloroetano	HCE	67-72-1

Tabla 5

(i) No carcinógenos que son negativos o equívocos para la genotoxicidad in vivo		
D,L-mentol	Men	15356-70-4
Anhídrido ftálico	PhAh	85-44-9
Ter-butilhidroquinona	TBHQ	1948-33-0
Ácido o-antranílico	AA	118-92-3
1,3-dihidroxibenceno (resorcinol)	DB	108-46-3
2-etil-1,3-hexandiol	EH	94-96-2
Sulfisoxazol	SO	127-69-5
(ii) No carcinógenos sin datos de genotoxicidad in vivo		

ES 2 660 131 T3

Etionamida	EtAm	536-33-4
Curcumina	Cu	458-37-7
Alcohol bencílico	BA	100-51-6
Urea	U	57-13-6
(iii) Carcinógenos no genotóxicos o carcinogénicos de mecanismo irrelevante (para humanos)		
Sacarina sódica	Ssa	128-44-9
(iv) Listado suplementario (predicción de los resultados de genotoxicidad in vitro menos clara)		
Galato de propilo	PG	121-79-9
p-Nitrofenol	NPh	100-02-7
Xilensulfonato de sodio	SXS	1300-72-7
Acrilato de etilo	EtAc	140-88-5
(iv) Listado suplementario (predicción de los resultados de genotoxicidad in vitro menos clara)		
Eugenol	Eu	97-53-0
Isobutiraldehído	IBA	78-84-2
2,4-diclorofenol	DP	120-83-2

Tabla 6

			SCC		CMFDA	
			-S9	+S9	-S9	+S9
I. Genotoxinas positivas en Ames in vivo	conc. más alta		conc. más alta <50%			
(i) Alquilantes de O6 y N7	mM	límite	citotox. sobre el control [mM]			
Ciclofosfamida	1,00	mM	1000	1000	1000	62,5
Etilnitrosourea	1,00	mM	1000	1000	1000	1000
Sulfonato de metilmetano	1,00	mM	250	500	500	250
(ii) Hidrocarburos aromáticos policíclicos						
Benzo[a]pireno	0,125	AF	3,91	125	125	125
7,12-dimetilbenz[a]antraceno	1,00	mM	125	500	250	1000
(iii) Aminas aromáticas						
Dimetilnitrosamina	1,00	mM	1000	1000	1000	1000
2-acetilaminofluoreno	1,00	mM	1000	1000	1000	1000

ES 2 660 131 T3

2,4-diaminotolueno	1,00	mM	1000	1000	1000	1000
IQ (2-amino-3-metilimidazo[4,5-f]quinolina)	1,00	mM	1000	125	1000	125
PhIP.HCl (2-amino-1-metil-6-fenilimidazo[4,5-f]piridina)	1,00	mM	500	1000	500	1000
(iv) Otros						
Aflatoxina B1	1,00	mM	31,25	500	500	500
Cloruro de cadmio	1,00	mM	31,25	125	62,5	62,5
Cisplatino	1,00	mM	1000	1000	1000	1000
p-cloroanilina	1,00	mM	1000	1000	1000	1000
II. Genotoxinas in vivo negativas o equívocas en Ames						
Etopósido	1/0,005	mM	-/2,5	1000/5	1000/5	1000/5
Hidroquinona	1,00	mM	250	1000	250	1000
Azidotimidina	1,00	mM	1000	1000	1000	1000
Arsenito de sodio	1,00	mM	7,81	125	62,5	125
Taxol	1,00	mM	1000	500	1000	1000
Cloranfenicol	1,00	mM	1000	1000	1000	1000

Tabla 7

			SCC		CMFDA	
			-S9	+S9	-S9	+S9
(i) No carcinógenos con datos de genotoxicidad negativos in vivo	conc. más alta		conc. más alta <50%			
	mM	límite	citotox. sobre el control [mM]			
Ampicilina trihidrato	1,00	mM	1000	1000	1000	1000
D-manitol	1,00	mM	1000	1000	1000	1000
(ii) No carcinógenos sin datos de genotoxicidad in vivo						
Fenformina HCl	1,00	mM	500	1000	1000	1000
(ii) No carcinógenos sin datos de genotoxicidad in vivo						
cloruro de n-butilo	1,00	mM	1000	1000	1000	1000
cloruro de (2-cloroetil)trimetil-amonio	1,00	mM	1000	1000	1000	1000
Ciclohexanona	1,00	mM	1000	1000	1000	1000

ES 2 660 131 T3

N,N-diciclohexiltiourea	1,00	mM	500	1000	1000	500
EDTA trisódico trihidrato	1,00	mM	500	1000	1000	1000
Sulfato de efedrina	1,00	mM	1000	1000	1000	1000
Estearato de eritromicina	1,00	mM	31,25	125	62,5	125
Fluometrón	1,00	mM	500	1000	1000	1000
Fenantreno	1,00	mM	1000	1000	1000	1000
(iii) Carcinógenos no genotóxicos						
D-limoneno	1,00	mM	1000	1000	1000	1000
Di-(2-etilhexil)ftalato	1,00	mM	1000	1000	1000	1000
Amitrol	1,00	mM	1000	1000	1000	1000
Alcohol ter-butílico	1,00	mM	1000	1000	1000	1000
Dietanolamina	1,00	mM	1000	1000	1000	1000
Melamina	1,00	mM	1000	1000	1000	1000
Carbamato de metilo	1,00	mM	1000	1000	1000	1000
Progesterona	1,00	mM	125	500	62,5	250
Piridina	1,00	mM	1000	1000	1000	1000
Tris(2-etilhexil)fosfato	1,00	mM	500	1000	7,813	1000
Hexacloroetano	1,00	mM	1000	1000	1000	1000

Tabla 8

		SCC		CMFDA		
		-S9	+S9	-S9	+S9	
(i) No carcinógenos que son negativos o equívocos para la genotoxicidad in vivo	conc. más alta	conc. más alta <50%				
	mM	límite	citotox. sobre el control [mM]			
D,L-mentol	1,00	mM	1000	1000	1000	1000
Anhídrido ftálico	1,00	mM	1000	1000	1000	1000
Ter-butylhidroquinona	1,00	mM	125	1000	125	1000
Ácido o-antranílico	1,00	mM	1000	1000	1000	1000
1,3-dihidroxibenceno (resorcinol)	1,00	mM	1000	1000	1000	500

ES 2 660 131 T3

2-etil-1,3-hexandiol	1,00	mM	1000	1000	1000	1000
Sulfisoxazol	1,00	mM	1000	1000	1000	1000
(ii) No carcinógenos sin datos de genotoxicidad in vivo						
Etionamida	1,00	mM	1000	1000	1000	1000
Curcumina	0,125	AF	31,25	125	31,25	125
Alcohol bencílico	1,00	mM	1000	1000	1000	1000
Urea	1,00	mM	1000	1000	1000	1000
(iii) Carcinógenos no genotóxicos o carcinogénicos de mecanismo irrelevante (para humanos)						
Sacarina sódica	1,00	mM	1000	1000	1000	1000
(iv) Listado suplementario (predicción de los resultados de genotoxicidad in vitro menos clara)						
Galato de propilo	1,00	mM	500	1000	1000	1000
p-Nitrofenol	1,00	mM	500	1000	500	1000
Xilensulfonato de sodio	1,00	mM	1000	1000	1000	1000
(iv) Listado suplementario (predicción de los resultados de genotoxicidad in vitro menos clara)						
Acrilato de etilo	1,00	mM	1000	1000	1000	1000
Eugenol	1,00	mM	1000	125	1000	125
Isobutiraldehído	1,00	mM	1000	1000	1000	1000
2,4-diclorofenol	1,00	mM	250	500	1000	1000

Tabla 9

I. Genotoxinas positivas en Ames in vivo	p-p53 (Ser15)		p21		p-H2A.X (Ser139)		p-Chk1 (Ser345)		p-ATM (Ser1981)	
	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9
(i) Alquilantes de O6 y N7										
Ciclofosfamida										
Etilnitrosourea										
Sulfonato de metilmetano										
(ii) Hidrocarburos aromáticos policíclicos										
Benzo[a]pireno										
7,12-dimetilbenz[a]antraceno										
(iii) Aromático aminas										

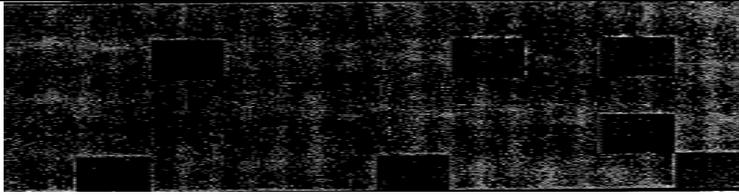
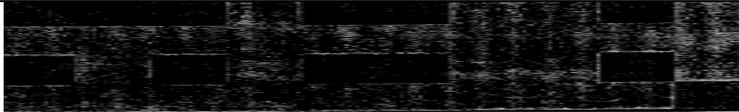
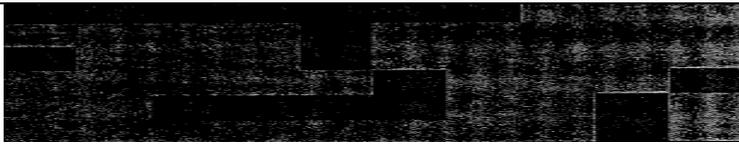
Dimetilnitrosamina	
2-acetilaminofluoreno	
2,4-diaminotolueno	
IC (2-amino-3-metilimidazo[4,5-f]quinolina)	
PhIP.HCl (2-amino-1-metil-6-fenilimidazo[4,5-f]piridina)	
(iv) Otros	
Aflatoxina B1	
Cloruro de cadmio	
Cisplatino	
p-cloroanilina	
II. Genotoxinas in vivo negativas o equívocas en Ames	
Etopósido	
Hidroquinona	
Azidotimidina	
Arsenito de sodio	
Taxol	
Cloranfenicol	

Tabla 10

	p-p53 (Ser15)		p21		p-H2A.X (Ser139)		p-Chk1 (Ser345)		p-ATM (Ser1981)	
	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9
(i) No carcinógenos con datos de genotoxicidad negativos in vivo										
Ampicilina trihidrato										
D-manitol										
(ii) No carcinógenos sin datos de genotoxicidad in vivo										
Fenformina HCl										
cloruro de n-butilo										
cloruro de (2-cloroetil)trimetil-amonio										
Ciclohexanona										

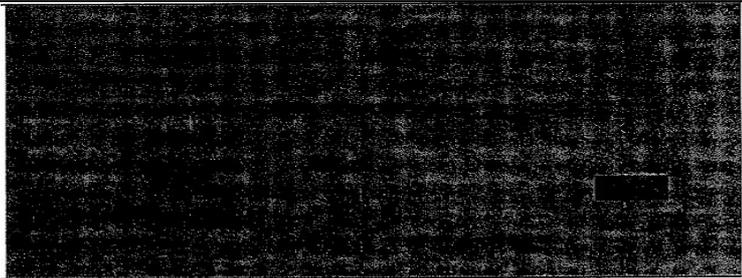
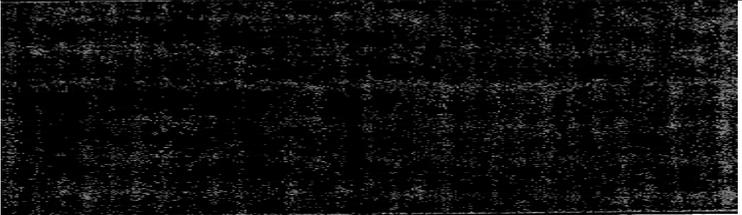
N,N-diciclohexiltiourea	
EDTA trisódico trihidrato	
Sulfato de efedrina	
Estearato de eritromicina	
Fluometrón	
Fenantreno	
(iii) Carcinógenos no genotóxicos	
D-limoneno	
Di-(2-etilhexil)ftalato	
Amitrol	
Alcohol ter-butílico	
Dietanolamina	
Melamina	
Carbamato de metilo	
Progesterona	
Piridina	
Tris(2-etilhexil)fosfato	
Hexacloroetano	

Tabla 11

	p-p53 (Ser15)		p21		p-H2A.X (Ser139)		p-Chk1 (Ser345)		p-ATM (Ser1981)	
	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9
(i) No carcinógenos que son negativos o equívocos para la genotoxicidad in vivo										
D,L-mentol										
Anhídrido ftálico										
Ter-butylhidroquinona										
Ácido o-antranílico										
1,3-dihidroxibenceno (resorcinol)										
2-etil-1,3-hexandiol										

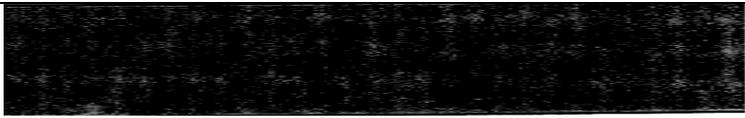
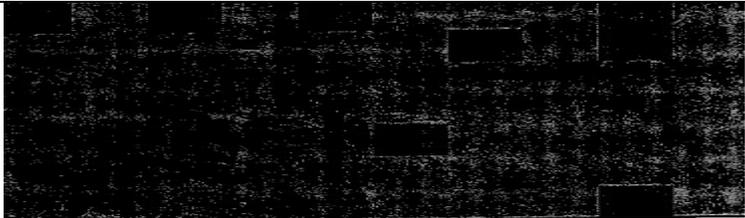
Sulfisoxazol	
(ii) No carcinógenos sin datos de genotoxicidad in vivo	
Etionamida	
Curcumina	
Alcohol bencílico	
Urea	
(iii) Carcinógenos no genotóxicos o carcinogénicos de mecanismo irrelevante (para humanos)	
Sacarina sódica	
(iv) Listado suplementario (predicción de los resultados de genotoxicidad in vitro menos clara)	
Galato de propilo	
p-Nitrofenol	
Xilensulfonato de sodio	
Acrilato de etilo	
Eugenol	
Isobutiraldehído	
2,4-diclorofenol	

Tabla 12

Punto de valoración final	p-p53 (Ser15)	P21
Compuesto de prueba genotóxico		
Sulfonato de metilmetano		
Etopósido		
Compuesto de prueba no genotóxico		
D-manitol		

**REIVINDICACIONES**

1. Un método de selección de alto rendimiento de compuestos por su actividad genotóxica y/o progenotóxica que comprende el paso de determina los niveles de expresión de formas activas de por lo menos las proteínas de: antígeno de tumores celulares p53 (p-p53 (Ser15)), inhibidor de quinasa dependiente de ciclina 1 (p21), histona H2A.X (p-H2A.X (Ser139)), ataxia telangiectasia mutado serina-proteína quinasa (p-ATM (Ser1981)) y serina/treonina proteína del punto de control quinasa 1 (p-Chk1 (Ser345)) en un sistema incubado con los compuestos en comparación con los niveles de expresión en un sistema que no fue incubado con los compuestos, en donde un aumento en un factor de por lo menos 1,5 en los niveles de expresión de dichas proteínas en el sistema incubado con los compuestos en comparación con el sistema no incubado con los compuestos es indicativo de dicha actividad con una sensibilidad y/o especificidad de por lo menos un 80%.
 

5

10
2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde se determinan los niveles de expresión de las proteínas p-p53 (Ser15), p21, p-H2A.X (Ser139), p-ATM (Ser1981), p-Chk1 (Ser345), ataxia telangiectasia mutado serina/treonina proteína quinasa y relacionada con Rad3 (p-ATR (Ser428)), quinasa dependiente de ciclina 1 (p-cdc2 (Thr14/Tyr15)), proteína de arresto del crecimiento e inducible por daño del ADN GADD45 alfa (Gadd45a) y serina/treonina proteína quinasa del punto de control 2 (p-Chk2 (Thr68)).
 

15
3. El método de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, en donde los niveles de expresión se determinan mediante tinción inmunofluorescente o tecnología Luminex.
4. El método de acuerdo con cualquier de las reivindicaciones 1 a 3, en donde se administra una concentración reducida de los compuestos para proveer los niveles de expresión con un factor entre 1 y 1,1.
5. El método de acuerdo con cualquier de las reivindicaciones 1 a 4, en donde se identifica el compuesto menos (pro)genotóxica o un compuesto no (pro)genotóxico, y en donde el menor aumento o ningún aumento en los niveles de expresión es indicativo de dicho compuesto.
 

20
6. Un método para monitorear la probabilidad de desarrollar cáncer, tumores, metástasis y/o trastornos de angiogénesis, que son causados, mediados y/o propagados por una desregulación de la reparación de daños como respuesta a un tratamiento con un compuesto, en donde se determinan los niveles de expresión de por lo menos las proteínas p-p53 (Ser15), p21, p-H2A.X (Ser139), p-ATM (Ser1981) y p-Chk1 (Ser345) en una muestra biológica tomada de un mamífero que necesita de dicho tratamiento con dicho compuesto administrado a dicho mamífero, en donde un aumento en un factor de por lo menos 1,5 en los niveles de expresión de dichas proteínas indica que dicho compuesto tiene actividad genotóxica y/o progenotóxica con una sensibilidad y/o especificidad de por lo menos 80% y dicha probabilidad aumenta.
 

25

30
7. Un método in vitro para predecir la probabilidad que un paciente sufrirá de un tumor como respuesta a un tratamiento terapéutico con un fármaco, que comprende los pasos de (i) medir en una muestra de biopsia del tejido o plasma de dicho paciente los niveles de expresión de por lo menos las proteínas p-p53 (Ser15), p21, p-H2A.X (Ser139), p-ATM (Ser1981) y p-Chk1 (Ser345), (ii) exponer ex vivo una muestra de tejido o plasma de dicho paciente a dicho fármaco, y (iii) medir en dicha muestra expuesta del paso (ii) los niveles de expresión de dichas proteínas especificadas en el paso (i) junto con el cálculo de las diferencias en los niveles de expresión medidos en los pasos (i) y (iii), en donde un aumento en un factor de por lo menos 1,5 en los niveles de expresión de dichas proteínas obtenido en este paso (iii) en comparación con el paso (i) indica que dicho fármaco tiene actividad genotóxica y/o progenotóxica con una sensibilidad y/o especificidad de por lo menos 80% y dicha probabilidad aumenta.
 

35
8. Uso de por lo menos las proteínas p-p53 (Ser15), p21, p-H2A.X (Ser139), p-ATM (Ser1981) y p-Chk1 (Ser345) como proteínas marcadoras para la selección de alto rendimiento de los compuestos por su actividad genotóxica y/o progenotóxica con una sensibilidad y/o especificidad de por lo menos una 80%.
 

40
9. Uso de un kit de acuerdo con los métodos y usos de cualquiera de las reivindicaciones 1-8 en la detección de la actividad genotóxica y/o progenotóxica que comprende nueve anticuerpos, cada uno con una unión específica a una proteína diferente seleccionada del grupo de p-p53 (Ser15), p21, p-H2A.X (Ser139), p-ATM (Ser1981), p-Chk1 (Ser345), p-ATR (Ser428), p-cdc2 (Thr14/Tyr15), Gadd45a y p-Chk2 (Thr68).
 

45