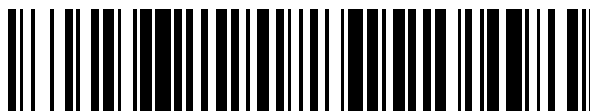


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 728 060**

51 Int. Cl.:

G01N 33/50

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.09.2012** **E 17158948 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.02.2019** **EP 3190414**

54 Título: **Procedimiento in vitro para la determinación de la inmunotoxicidad de un compuesto**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
22.10.2019

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 728 060 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

Procedimiento *in vitro* para la determinación de la inmunotoxicidad de un compuesto

Campo de la invención

5 La invención se encuentra en el campo del diagnóstico molecular. Más en particular, proporciona genes marcadores para la exploración de compuestos con el fin de detectar inmunotoxicidad directa. Un procedimiento de acuerdo con la invención emplea muestras obtenidas de una célula expuesta a un compuesto de interés y determina los niveles de expresión de un número de genes marcadores con el fin de determinar si el compuesto es o no inmunotóxico.

Antecedentes de la invención

10 Durante los procedimientos de registro de sustancias químicas y fármacos, en la Unión Europea, los Estados Unidos de América y Japón, los procedimientos de exploración actuales que se aplican para detectar inmunotoxicidad directa son parte de los ensayos de toxicidad generales. Estos ensayos de toxicidad se basan en modelos animales, que consisten principalmente en ratas, ratones y conejos. El uso de estos modelos animales tiene tres inconvenientes principales, principalmente éticos y económicos, y la traducción necesaria a la situación humana puede conducir a resultados falsos positivos y falsos negativos. En primer lugar, estos ensayos provocan el sufrimiento de los animales implicados, lo que conduce a inquietudes sociales. En segundo lugar, en la actualidad, dentro de la UE, aproximadamente 40 mil productos químicos están en espera del procedimiento de registro, evaluación y autorización (REACH, por sus siglas en inglés). La UE no tiene ni la infraestructura ni los medios económicos para someter a ensayo todos estos productos químicos en modelos animales. En tercer lugar, el poder predictivo limitado de estos modelos animales para la toxicidad humana complica los procedimientos de evaluación de riesgos de los productos químicos y los ensayos de seguridad de los fármacos. Se ha demostrado en muchos casos que los ensayos en animales no predicen con precisión la inmunotoxicidad en seres humano.

Los ensayos con resultados falsos positivos impiden que muchos fármacos potencialmente útiles lleguen al mercado. Los falsos negativos provocan toxicidad humana, durante las fases clínicas (I-III) y la fase posterior a la comercialización (IV) de los ensayos de fármacos o incluso más tarde. En estas etapas, ya pueden haberse invertido en vano varios millones de euros. En promedio, el procedimiento de ensayo de toxicidad o seguridad de un producto químico o fármaco lleva años. Esto se debe parcialmente a que los ensayos con animales llevan mucho tiempo.

Por tanto, en las autoridades y las industrias implicadas en los ensayos de toxicidad de productos químicos y fármacos, existe la necesidad de ensayos de toxicidad que sean, idealmente, más precisos, asequibles, más rápidos y que provoquen menos inquietudes éticas.

Sumario de la invención

Los inventores han descubierto ahora que un ensayo *in vitro* fiable puede distinguir entre compuestos inmunotóxicos y no inmunotóxicos. Este procedimiento evita la necesidad de experimentos con animales y proporciona un resultado 100 % preciso. La ventaja adicional es que el procedimiento puede realizarse en unos pocos días.

En consecuencia, la invención se refiere a un procedimiento *in vitro* para determinar si un compuesto es inmunotóxico, en el que se determina el nivel de expresión de al menos un gen marcador en una muestra obtenida de una célula nucleada expuesta al compuesto, en el que al menos un gen marcador se selecciona entre el grupo que consiste en ABCA1, CHAC1, CRIM1 y HMGCS1 y en el que se concluye que el compuesto es inmunotóxico si el nivel de expresión de dicho al menos un gen marcador está por debajo o por encima de un valor de referencia predeterminado.

Descripción detallada de la invención

Los inventores expusieron una estirpe celular humana en un cultivo *in vitro* a diversos compuestos inmunotóxicos (N = 26, tabla 1) y compuestos de control (N = 11, tabla 2). Después, los inventores determinaron los niveles de expresión de 4 genes marcadores (tabla 3) usando un ensayo de PCR cuantitativa.

45 Cada uno de los genes marcadores por sí mismo fue capaz de predecir la inmunotoxicidad de un compuesto con un nivel de precisión aceptable (tabla 4). Por tanto, la invención se refiere a un procedimiento *in vitro* para determinar si un compuesto es inmunotóxico, en el que el nivel de expresión de al menos un gen marcador se determina en una muestra obtenida de una célula nucleada expuesta al compuesto, en el que al menos un gen marcador se selecciona entre el grupo que consiste en ABCA1, CHAC1, CRIM1 y HMGCS1 y en el que se concluye que el compuesto es inmunotóxico si el nivel de expresión de dicho al menos un gen marcador está por debajo o por encima de un valor de referencia predeterminado.

Los inventores también descubrieron que la fiabilidad del procedimiento mejoró cuando se determinó el nivel de expresión de más de un gen. En una realización preferida, la invención se refiere, por tanto, a un procedimiento como se ha descrito anteriormente en el que el al menos un gen marcador es al menos dos genes marcadores, tal como al menos 3 genes marcadores, tal como al menos 4 genes marcadores.

Sorprendentemente, los inventores descubrieron que se podría hacer una predicción de inmunotoxicidad precisa al 100 % basándose solamente en estos 4 genes marcadores. Una precisión del 100 % a este respecto significa que todos los compuestos inmunotóxicos se predijeron correctamente y que ninguno de los controles proporcionó un resultado positivo.

- 5 En un procedimiento preferido adicional, la invención se refiere, por tanto, a un procedimiento como se ha descrito anteriormente en el que se determina el nivel de expresión de los 4 genes marcadores y en el que se concluye que el compuesto es inmunotóxico si el nivel de expresión de al menos uno de los genes marcadores está por debajo o por encima de un valor de referencia predeterminado.

- 10 Cabe señalar que no todos los genes marcadores reaccionaron de la misma manera tras la exposición a compuestos inmunotóxicos. Algunos genes responden con regulación positiva, otros con regulación negativa. Incluso dentro de un solo gen, los inventores observaron una regulación negativa tras la exposición a un compuesto inmunotóxico y una regulación positiva tras la exposición a otro compuesto (tabla 4).

- 15 Se descubrió que el procedimiento de acuerdo con la invención era muy robusto. Esta robustez podría incluso mejorarse cuando se concluye que el compuesto es inmunotóxico si el nivel de expresión de al menos dos de los genes marcadores está por debajo o por encima de un valor de referencia predeterminado. Esto compromete la sensibilidad, pero puede ser ventajoso cuando la especificidad es importante.

El procedimiento podría incluso mejorarse adicionalmente cuando se concluye que el compuesto es inmunotóxico si el nivel de expresión de al menos tres de los genes marcadores está por debajo o por encima de un valor de referencia predeterminado.

- 20 Los niveles de expresión de un gen marcador se han de comparar con un valor de referencia, también denominado con frecuencia valor de corte. Un valor de referencia de este tipo puede determinarse empíricamente o elegirse arbitrariamente con el fin de conseguir la especificidad y/o sensibilidad apropiadas del procedimiento. Un experto es plenamente consciente de cómo elegir un valor de referencia adecuado. Un valor de referencia de este tipo puede basarse ventajosamente en un valor de expresión obtenido con un compuesto de control. Un experto sabrá cómo
25 alterar el valor de referencia predeterminado con el fin de obtener la especificidad y sensibilidad deseadas del procedimiento.

- El valor de referencia predeterminado puede ser ventajosamente un valor obtenido de la expresión de un gen de referencia. En este caso los inventores usaron 3 genes como genes de referencia; la beta-2-macroglobulina (B2M), la proteína 4 de tráfico de Golgi a RE (GET4) y la clase G1 de biosíntesis de anclaje de fosfatidilinositol glucano (PIGG).
30

En el contexto de la presente invención, el término "expusieron" significa "pusieron en contacto" en el sentido más amplio de la expresión. Exposición significa poner en contacto físicamente la célula con el compuesto, tal como, por ejemplo, disolviendo el compuesto en el medio de cultivo de la célula. Es importante que la célula se exponga al compuesto a niveles y dosis subcitotóxicos.

- 35 La expresión "relación de expresión génica" o "relación" como se usa en el presente documento se refiere a un número que describe cuánto cambia una cantidad que va de un valor inicial a uno final. Por ejemplo, un valor inicial de 30 y un valor final de 60 corresponden a una relación de 2 o, en términos habituales, un aumento de dos veces. La relación de expresión génica se calcula simplemente como la relación del valor final con respecto al valor inicial, es decir, el valor de la expresión de control. Si el valor inicial es A y el valor final es B, la relación es B/A. Como otro
40 ejemplo, un cambio de 80 a 20 sería una relación de 0,25, mientras que un cambio de 20 a 80 sería una relación de 4. En el presente documento, los inventores reemplazan una relación que es inferior a 1 por el negativo de su inversa, por ejemplo, un cambio de 80 a 20 sería un cambio de -4 (o, en términos habituales, una disminución de cuatro veces). Esto se denomina en el presente documento "factor de cambio". En las tablas que se presentan en el presente documento, los inventores muestran los factores de cambio de los genes sobreexpresados como valores
45 por encima de 1,0 y la subexpresión como la inversa negativa de la relación, es decir, valores por debajo de -1,0.

- Los niveles de expresión génica pueden determinarse con cada procedimiento conocido en la técnica para detectar los niveles de expresión de ácido nucleico. Se prefieren en particular procedimientos tales como la PCR cuantitativa, la ABSAN cuantitativa, la secuenciación génica tal como la secuenciación de última generación, la secuenciación de ARN, los ensayos de genes indicadores o el análisis de micromatrices. Los niveles de expresión génica también
50 pueden determinarse examinando la proteína expresada por los genes marcadores que se desvelan en el presente documento, por ejemplo, mediante técnicas ELISA.

- Cuando se eligió el umbral de positividad a 2,0 veces el valor de referencia (o 0,5 veces cuando se regula negativamente, el factor de cambio es entonces de -2) pudo alcanzarse una precisión del 100 %. Por tanto, la invención se refiere a un procedimiento como se ha descrito anteriormente en el que se concluye que el compuesto
55 es inmunotóxico si el nivel de expresión de los genes marcadores está al menos 2 veces por debajo o por encima de un valor de referencia predeterminado.

El término "célula" en este contexto ha de interpretarse como cualquier célula, ya sea aislada o en una estructura

tisular. Se prefiere usar células que puedan cultivarse *in vitro*. Esto es ventajoso debido a que la célula puede ponerse en contacto entonces con el compuesto en el medio de cultivo de manera de garantizar un contacto uniforme y reproducible.

- 5 Ventajosamente, la célula es una célula humana puesto que puede reflejar la inmunotoxicidad de los compuestos en los seres humanos de la mejor manera. Los inventores descubrieron que la célula puede ser ventajosamente una célula linfoblástica humana, preferentemente una célula Jurkat.

Los inventores descubrieron que el tiempo de exposición no es crítico, las células pueden exponerse a los compuestos durante varias horas o varios días, los inventores eligieron un tiempo de exposición de 6 horas.

- 10 Los procedimientos como se han descrito anteriormente pueden mejorarse mediante el uso de múltiples muestras individuales, obtenidas de células expuestas independientemente. De esa manera, el nivel de expresión de un gen puede ser el promedio de un número de niveles de expresión obtenidos para cada gen individual.

Tabla 1. Lista de compuestos inmunotóxicos.

Nombre químico	Abreviatura	Número de CAS	IDC de Pubchem	Conc. de exposición (uM)
1-Nitropireno	1-NPR	5522-43-0	21694	50
6-mercaptopurina	6MP	6112-76-1	24888330	0,1
tríóxido de arsénico	As ₂ O ₃	1327-53-3	261004	3
benzo[a]pireno	BaP S9	50-32-8	2336	5
dicloruro de cadmio	CdCl ₂	10108-64-2	24947	20
ciclofosfamida	CP S9	6055-19-2	24278292	3000
ciclosporina A	CsA	59865-13-3	5280754	8
dexametasona	DEX	50-02-2	5743	10
desoxinivalenol	DON	51481-10-8	40024	0,25
O-[4-metil-6-(propan-2-il)pirimidin-2-il]fosforotioato de O,O-dietilo (Diazinón)	DZN	333-41-5	3017	200
etanol	EtOH	64-17-5	702	343
figolimid	FTY720	162359-55-9	107969	4
gamma-hexaclorociclohexano (Lindano)	LIN	58-89-9	727	2000
ftalato de mono-(2-etilhexilo)	MEHP	4376-20-9	20393	300
ácido micofenólico	MPA	24280-93-1	446541	10
metotrexato	MTX	133073-73-1	4112	0,01
nivalenol	NIV	23282-20-4	430146	0,2
ocratoxina A	OTA	303-47-9	442530	8
ocratoxina A, tratada con S9	OTA S9	303-47-9	442530	10
bifenilo policlorado 153	PCB153	35065-27-1	37034	20
PFOS	PFOS	1763-1723-1	74483	20
2-amino-1-metil-6-fenilimidazo[4,5-b]piridina	PhIP	105650-23-5	1530	50
prednisolona	PRD	50-24-8	5755	500
N-(3,4-Diclorofenil)propanamida (Propanil)	PROP	709-98-8	4933	100
cloruro de tributilestaño	TBTC	1461-22-9	15096	0,1
óxido de tributilestaño	TBTO	56-35-9	16682746	0,1

Tabla 2, lista de compuestos de control.

Controles				
nitrate de plata	AgNO ₃	7761-88-8	24470	1,35
ampicilina	AMP	69-53-4	6249	850
azatioprina	AZA	446-86-6	2265	0,1
Bis(2-etilhexil)ftalato	DEHP	117-81-7	8343	300
citrato de trisodio	NaCitrato	8055-55-8	71474	2000
dimetilnitrosamina	DMNA	62-75-9	6124	34
furosemda	FURO	54-31-9	3440	100
2-amino-3-metil-3H-imidazo[4,5-F]quinolina	IQ	76180-96-6	53462	50

(continuación)

CONTROLES No inmunotóxicos	Genes			
uretano	1,2 ± 0,3	-1,4 ± 0,1	1,1 ± 0,5	1,2 ± 0,4

Ejemplos

Ejemplo 1: Cultivo celular

La estirpe de linfocitos T linfoblásticos humanos (Jurkat) se obtuvo de la American Type Culture Collection (clon de Jurkat E6-1, N.º de cat. TIB-152TM, ATCC). Las células Jurkat se cultivaron en medio RPMI-1640 (Invitrogen) complementado con suero de ternera fetal (FCS) al 10 % inactivado por calor, glutamina 2 mM, piruvato de sodio 1 mM, aminoácido no esencial 1 mM, penicilina 100 U/ml y estreptomicina 100 µg/ml. Las células se cultivaron a 37 °C con un 5 % de CO₂ en una atmósfera humidificada. Los cultivos de células Jurkat se mantuvieron en matraces T-75 (GIBCO), a un volumen de 30 ml y el medio se renovó cada 2 días.

Ejemplo 2: Compuestos

Los inventores sometieron a ensayo un número de compuestos inmunotóxicos conocidos en el procedimiento como se describe en el presente documento. Aquellos compuestos se enumeran en la tabla A. Como control, se sometieron a ensayo once compuestos en el mismo procedimiento. Estos compuestos de control y sus detalles se enumeran en la tabla B. Se fabricaron soluciones madre de todos los productos químicos mediante disolución de las sustancias en dimetilsulfóxido (DMSO; Merck, Darmstadt, Alemania). Fue necesario inactivar el benzo[a]pireno (BaP), la ocratoxina A (OTA) y la ciclofosfamida (CP) antes de ejercer sus efectos inmunomoduladores (Carlson y col., *Mar Environ Res.* Agosto-Diciembre de 2004; 58 (2-5): 731-4; Ekhardt y col. *Cancer Treat Rev.* Febrero de 2009; 35 (1): 18-31, Manderville, *Chem Res Toxicol.* Julio de 2005; 18 (7): 1091-7). Por tanto, estos compuestos se sometieron a un sistema de activación metabólica *in vitro* usando fracciones S9 agrupadas de hígados humanos que contenían enzimas hepáticas. Las mezclas de reacción S9, que tenían un volumen total de 1 ml, consistían en 570 µl de H₂O (MQ), 200 µl de tampón de fosfato de potasio 0,5 M (pH 7,4), 100 µl de solución A de sistema de regeneración de NADPH (BD Bioscience, Breda, Países Bajos), 20 µl de solución B de sistema de regeneración de NADPH (BD Bioscience, Breda, Países Bajos), 10 µl de materia prima de compuesto en DMSO y 100 µl de mezcla de S9 (BD Bioscience, Breda, Países Bajos). Después de que se incubara durante 1, 6 y 24 horas, respectivamente, las mezclas de reacción química de S9 se inactivaron por calor (5 minutos a 56 °C) y se agruparon en volúmenes iguales.

Ejemplo 3: Selección de concentraciones de exposición de compuestos

Los inventores determinaron curvas de respuesta a la dosis y viabilidad para cada compuesto, tras exposiciones químicas de 24 h en un formato de placa de 96 pocillos, en al menos N = 3 experimentos independientes. Se usaron dos ensayos diferentes como procedimientos de lectura para determinar la viabilidad, siendo el ensayo ATPLite el que determina el contenido de ATP intracelular y siendo el ensayo de WST-1 el que determina la actividad de la deshidrogenasa mitocondrial.

Los inventores también establecieron el valor de 24 h ≤ VC80 para cada compuesto. Esto significa que para cada compuesto los inventores determinaron la concentración más alta que proporcionó un valor de viabilidad de ≥ 80 % tras la exposición de las células Jurkat durante 24 horas. Estos valores se determinaron por separado para los ensayos ATPLite y de WST-1. Estos valores de ≤ VC80 se usaron como concentraciones de exposición finales de 6 h para los experimentos de perfilado de la expresión de ARNm que siguieron. Si los ensayos ATPLite y de WST-1 proporcionaron valores de VC80 diferentes, se eligió el valor más bajo como concentración de exposición final.

Ejemplo 4: Ensayo de WST-1.

El WST-1 disulfonato de (4-[3-(4-yodofenil)-2-(4-nitrofenil)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benceno, Roche Diagnostic Ned BV, Almere, Países Bajos) es una sal de tetrazonio hidrosoluble que se escinde por las deshidrogenasas mitocondriales para formar un complejo de formazán coloreado y la cantidad de formazán se correlaciona con la viabilidad de las células. Se sembraron células Jurkat (11.000 por pocillo) 20 horas antes en placas de 96 pocillos, por lo que en el momento de inicio de la exposición había aproximadamente 20.000 células por pocillo. La exposición se realizó por triplicado en 100 µl de medio durante 24 horas a concentraciones crecientes de compuestos o a los controles de vehículo. En las últimas 2 horas de exposición, se añadieron 10 µl de reactivo WST-1. Se midió la absorbancia a 450 nm en un lector de microplacas (BioTek, Winooski Vermont, EE.UU.).

Ejemplo 5: Ensayo ATPLite

El ensayo ATPLite (Perkin Elmer, Oosterhout, Países Bajos) se basa en la producción de luz provocada por la reacción de ATP con la luciferasa y la D-luciferina añadidas. La luz emitida es proporcional a la cantidad de ATP, que es un marcador de la viabilidad celular. Las células Jurkat (11.000 por pocillo) se sembraron 20 horas antes en placas de 96 pocillos, por lo que en el momento de inicio de la exposición había -20.000 células por pocillo. La

exposición se realizó por triplicado en 100 µl de medio en placas de 96 pocillos durante 24 horas a concentraciones crecientes de compuestos o a los controles de vehículo. Después de la exposición, el ensayo se realizó de acuerdo con el protocolo del fabricante.

Ejemplo 6: Exposiciones químicas

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

Ejemplo 7: Aislamientos de ARN total y síntesis de ADNc

- Después de haber sido expuestas a los compuestos o controles de vehículo durante 6 horas, las células se transfirieron a viales de 15 ml (Greiner), seguido de centrifugación (5 min a 300 g, 4 °C). Posteriormente, se retiró el medio y los sedimentos se resuspendieron en PBS helado, seguido de centrifugación (5 min a 300 g, 4 °C). Posteriormente, las células se resuspendieron en tampón RLT que contenía β-mercaptoetanol al 10 %, se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido (> 5 minutos) y se almacenaron a -80 °C. El ARN total se aisló usando el kit QIAshredder (Qiagen, n.º de catálogo 79656), de acuerdo con el protocolo del fabricante. La purificación posterior del ARN se realizó de acuerdo con el protocolo del fabricante, mediante el uso del kit miRNeasy Mini (Qiagen, n.º de cat. 217004) que incluye un tratamiento con DNase-1 en la columna (Qiagen, n. de cat. 79254). El rendimiento de ARN se evaluó espectrofotométricamente (NanoDrop 2000, Thermoscientific, a través de Isogen-lifescience, De Meern, Países Bajos). La calidad del ARN total se determinó mediante la aplicación de 250 nanogramos de ARN total a la electroforesis en gel automatizada usando chips Experion (n.º de cat. 700-7103, Experion, Biorad, Veenendaal, Países Bajos). Las muestras con números de índice de calidad de ARN (ICA) > 8 se consideraron de calidad suficiente. Las muestras de ADNc se sintetizaron a partir de muestras de ARN total usando el kit de transcripción inversa miScript de acuerdo con el protocolo del fabricante, usando 250 nanogramos de ARN total como entrada de muestra (n.º de cat. 218161, Qiagen, Venlo, Países Bajos).

Ejemplo 8: Experimentos múltiples de PCR cuantitativa en tiempo real de Fluidigm

- Las muestras de ADNc se sometieron a 14 ciclos de amplificación de diana específica (ADE), usando una mezcla 0,2X de todos los ensayos de Expresión Génica de Taqman (cebadores/sonda) combinados y la Mezcla Maestra PreAmp de Taqman (AppliedBiosystems), seguido diluciones con factor de dilución 5. El agua se incluyó como control sin molde (CSM).

- Los CSM también se incluyeron en la reacción de ADE, para que sirvieran como un verdadero control negativo para todo el procedimiento. Después de la dilución con factor de dilución 5, las muestras de ADE se mezclaron con los ensayos Taqman. Después, cada muestra se distribuyó en la Matriz Dinámica 96.96 de BioMark (Fluidigm, San Francisco del Sur, CA 94080, EE.UU., Distribuidor Bioké, Leiden, Países Bajos). Las posiciones de ensayo vacías se llenaron con controles sin ensayo (CSE, en los que la mezcla de ensayo 20X se sustituyó por agua).

- La Matriz Dinámica de Biomark se llenó usando el Controlador Integrado de Circuitos Fluidos Biomark (Fluidigm, San Francisco del Sur, CA 94080, EE.UU.). La Matriz Dinámica 96.96 de BioMark llena se colocó después en el sistema de PCR en tiempo real de Biomark (Fluidigm, San Francisco del Sur, CA 94080, EE.UU.) donde se realizaron las reacciones de ciclado térmico y se detectó la fluorescencia usando una cámara CCD. Se usó el protocolo de PCR de Taqman por defecto en el instrumento BioMark con una temperatura de hibridación de 60 °C y un total de 35 ciclos de PCR. Se realizaron combinaciones por pares de todas las muestras con cada uno de los ensayos por duplicado en la matriz.

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

Al final de cada ciclo de PCR, se recopilaron datos de las cámaras de reacción en cada matriz y se extrajeron valores de Ct usando el software de análisis de PCR en tiempo real de BioMark versión 3.0.2. El umbral de calidad se estableció en 0,65 (valor por defecto).

- Los niveles de expresión de ARNm relativos se calcularon para cada muestra individual mediante la aplicación del procedimiento delta-delta-CT. Delta (1) era la corrección para la abundancia de ARNm mediante el uso de genes de referencia y Delta (2) era la corrección para los controles de vehículo (principalmente DMSO). Los inventores usaron N = 3 genes de referencia que habían demostrado que se expresaban de forma constante sin verse influenciados por exposiciones a compuestos (mayor correlación de Pearson con una relación de expresión de ARNm (compuesto/control de vehículo) de 1,0), en el conjunto de datos del "compendio" de micromatrices de ARNm que consistía en N = 256 muestras. Los tres genes de referencia fueron beta-2-macroglobulina (B2M, alta abundancia), proteína 4 de tráfico de Golgi a RE (GET4) y clase G1 de biosíntesis de anclaje de fosfatidilinositol glucano (PIGG), respectivamente.

Ejemplo 10: Criterios de genes clasificadores de niveles de ARNm modificado

5 Dentro del contexto de la selección de genes clasificadores para determinar la inmunotoxicidad, un nivel de ARNm modificado se define como se indica a continuación: Tras 6 horas de exposición a un nivel subcitotóxico de un compuesto inmunotóxico, el nivel de ARNm de un gen clasificador es uno aumentado o disminuido $\geq 2,0$ veces, en comparación con la exposición de 6 horas a un control de vehículo (tal como DMSO al 0,1 % (v/v) o medio), en al menos dos de los tres experimentos de exposición independientes.

10 Un nivel subcitotóxico se define en la sección denominada Selección de concentraciones de exposición de compuestos. En resumen, un nivel subcitotóxico se define como la concentración más alta que tiene, tras 24 horas de exposición, un efecto < 20 % sobre la viabilidad de las células Jurkat, según se determina mediante dos ensayos separados (WST-1, Roche y ATPLite, Perkin Elmer) y corregida por las diferencias en la densidad celular entre el compuesto de ensayo y el control de vehículo.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento *in vitro* para determinar si un compuesto es inmunotóxico, en el que el nivel de expresión de al menos un gen marcador se determina en una muestra obtenida de una célula Jurkat cultivada *in vitro*, que se expone al compuesto en el cultivo *in vitro*, en el que el gen marcador es *CHAC1* y en el que se concluye que el compuesto es inmunotóxico si el nivel de expresión del gen marcador *CHAC1* está por debajo o por encima de un valor de referencia predeterminado.
2. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el nivel de expresión de dos genes marcadores adicionales se determina en la muestra obtenida de la célula Jurkat cultivada *in vitro*, en el que se concluye que el compuesto es inmunotóxico si el nivel de expresión de al menos un gen marcador adicional está por debajo o por encima de un valor de referencia predeterminado, en el que los genes marcadores adicionales son *CRIM1* y *HMGCS1*.
3. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que se concluye que el compuesto es inmunotóxico si el nivel de expresión del gen marcador *CHAC1* está al menos 2 veces por debajo o por encima de un valor de referencia predeterminado.
4. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que la célula Jurkat se expone al compuesto durante un período de tiempo que varía desde varias horas a varios días.
5. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 4, en el que el período de tiempo es de 6 horas.
6. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que el valor de referencia predeterminado es un valor obtenido de la expresión de un gen de referencia.
7. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 6, en el que el gen de referencia se selecciona entre el grupo que consiste en beta-2-macroglobulina, proteína 4 de tráfico de Golgi a RE y clase G1 de biosíntesis de anclaje de fosfatidilinositol glucano.