



①9



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

①1 Número de publicación: **2 334 639**

⑤1 Int. Cl.:
G01N 33/50 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)

①2

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑨6 Número de solicitud europea: **01946391 .8**
⑨6 Fecha de presentación : **14.06.2001**
⑨7 Número de publicación de la solicitud: **1290444**
⑨7 Fecha de publicación de la solicitud: **12.03.2003**

⑤4 Título: **Tipificación de toxicidad empleando células madre hepáticas.**

③0 Prioridad: **14.06.2000 US 211606 P**

④5 Fecha de publicación de la mención BOPI:
15.03.2010

④5 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
15.03.2010

⑦3 Titular/es: **Vistagen, Inc.**
384 Oyster Point Boulevard, #8
South San Francisco, California 94080, US

⑦2 Inventor/es: **Snodgrass, H., Ralph**

⑦4 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

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

Tipificación de toxicidad empleando células madre hepáticas.

5 **Campo técnico**

Esta invención proporciona métodos para identificación y caracterización de compuestos tóxicos así como para cribado de nuevos compuestos en cuanto a efectos tóxicos.

10 **Técnica anterior**

Los avances en los métodos de descubrimiento moderno de fármacos tales como los que utilizan ensayos de cribado de alta potencia de bibliotecas químicas combinatorias continúan proporcionando números sin precedentes de fármacos candidato para tratamiento de enfermedades. Sin embargo, el problema de la toxicidad de los fármacos para el sistema hospedador continúa siendo un paso importante limitador de la velocidad en la traducción de los fármacos candidato desde el laboratorio al escenario de atención sanitaria. Problemas similares de toxicidad dificultan asimismo el desarrollo de productos químicos industriales y domésticos. Además de resultar costosos y consumir tiempo, los ensayos de cribado toxicológicos disponibles actualmente fallan en cuanto a la detección de todas las toxicidades asociadas con la terapia humana. Por ejemplo, tantos como una tercera parte de todos los tratamientos terapéuticos humanos prospectivos fallan en la primera fase de las pruebas clínicas en humanos debido a toxicidad inesperada. Mejores medios de cribado de agentes terapéuticos potenciales respecto a toxicidad potencial podrían reducir el coste y la incertidumbre del desarrollo de nuevos agentes terapéuticos y, al reducir la incertidumbre, podrían incentivar al sector privado a destinar recursos adicionales al desarrollo de fármacos.

Las alternativas disponibles actualmente a las líneas de células tradicionales “mono-informadoras” y al ensayo de la toxicidad en animales no satisfacen plenamente estas necesidades. Por ejemplo, Farr, Patente EE.UU. 5.811.231, proporciona métodos de identificación y caracterización de compuestos tóxicos por elección de promotores de estrés seleccionados y determinación del nivel de la transcripción de genes ligados a estos promotores en células de diversas líneas de células. Este método depende por tanto del grado en que tanto el promotor como las líneas de células sean representativos del efecto del agente potencialmente tóxico sobre el organismo de interés.

El uso de redes de hibridación de oligonucleótidos proporciona otra ruta para determinación de la toxicidad potencial de las composiciones químicas. La exposición de las células de un cultivo a una composición química, seguida por comparación del patrón de expresión de las células expuestas con el de las células expuestas a otros agentes químicos permite detectar patrones de expresión similares al del compuesto de test, y predecir así que las toxicidades de las composiciones químicas serán similares. Véase, v.g., Service, R., *Science* (1998), 282, 396-399. Estos métodos adolecen del hecho de que las líneas de células individuales pueden no ser plenamente representativas de la biología compleja de un organismo intacto. Además, incluso la repetición de los tests en múltiples líneas de células no reproduce o tiene en cuenta las interacciones complejas entre células y tejidos que ocurren en un organismo.

Se conocen también ensayos de toxicidad basados en células hepáticas. Por ejemplo, Maier describe el desarrollo de un test de toxicidad *in vitro* con cultivos de hepatocitos de rata recién aislados. Maier, P., *Experientia* (1988), 44 (10):807-817. Este test está basado en alteraciones patológicas de ploidía inducidas por fármacos en hepatocitos como indicadores de compuestos que interfieren con la diferenciación celular en el hígado. Sawai y Awata describen un método para cultivar células hepáticas que puede utilizarse para testar la toxicidad de sustancias de test. Sawai y Awata, Patente Japonesa 10179150. Takashina y Naoki describen células hepáticas subcultivables establecidas obtenidas por fusión de una cepa de células hepáticas subcultivable con un hepatocito que pueden utilizarse para tests de toxicidad. Takashina y Naoki, Patente Japonesa 06.319.535. De nuevo, los ensayos de toxicidad que utilizan líneas de células tales como éstas pueden no tener en cuenta plenamente la biología compleja de un organismo o tejido intacto, y pueden no abordar las contribuciones de las interacciones entre células y tejidos en la determinación de los efectos de toxicidad.

Lockhart *et al.* describen un método de cribado de un fármaco respecto a efectos deletéreos secundarios sobre una célula que utiliza perfiles de expresión de un grupo de genes conocidos. Lockhart *et al.*, Patente EE.UU. 6033860. Este método evalúa las alteraciones en la expresión de 16 genes conocidos, y por consiguiente está limitado sólo a tipos de fármacos y tipos de toxicidad que alteran la expresión de un número muy pequeño de genes cuya identidad se conoce y cuyo nivel de expresión puede medirse específicamente.

Se conoce también un método para identificación o testado de la citotoxicidad de un agente basado en la expresión del citocromo P450. Harris *et al.*, Patente EE.UU. 5660986. Este método está basado en el testado de la toxicidad de determinados agentes sobre líneas de células epiteliales bronquiales y hepáticas humanas que expresan el citocromo exógeno P450. Este método está limitado por su estrecho enfoque en cuanto a la expresión de un gen particular y su naturaleza como ensayo que está basado en líneas de células que no tienen en cuenta las complejas interacciones entre células y tejidos.

Debido en gran parte a que desempeña un papel vital en la destoxicación de sustancias venenosas en el cuerpo, el hígado es el sitio en el cual se manifiestan con mayores frecuencia y gravedad los efectos de toxicidad de las sustancias. Véase, v.g., Tabla 1. Por esta razón, podría esperarse que los ensayos de toxicidad que están enfocados fun-

damentalmente en los efectos de compuestos potencialmente tóxicos en células relacionadas con o que se encuentran en el hígado sean particularmente informativos.

Lo que se precisa en la técnica es un método de testado sistemático de composiciones químicas en cuanto a toxicidad potencial en un medio en el cual las células interaccionan con células de otros tipos y que sea lo más relevante posible para la o las dianas comunes de los efectos tóxicos. Se precisa adicionalmente un medio de hacer esto que sea relevante en cuanto al efecto de la composición sobre organismos o tejidos completos, sin la ramificación de coste, tiempo, y ética de los tests en animales y humanos. La presente invención aborda estas y otras necesidades.

10 Descripción de la invención

Esta invención proporciona nuevos métodos para evaluar la toxicidad de las composiciones químicas. En un grupo de realizaciones, la invención está dirigida a métodos de creación de un perfil molecular de una composición química, que comprende los pasos de a) poner en contacto una población aislada de células madre hepáticas (LSCs) de mamífero con la composición química; y b) registrar las alteraciones en la expresión de genes o la expresión de proteínas en las LSCs de mamífero en respuesta a la composición química para crear un perfil molecular de la composición química.

La invención materializa adicionalmente métodos de compilación de una biblioteca de perfiles moleculares de composiciones químicas que presentan toxicidades predeterminadas, que comprenden los pasos de a) poner en contacto una población aislada de LSCs de mamífero con una composición química que presenta toxicidades predeterminadas; b) registrar las alteraciones en la expresión de los genes o la expresión de las proteínas en las LSCs de mamífero en respuesta a la composición química para crear un perfil molecular de la composición química; y c) recopilar una biblioteca de perfiles moleculares por repetición de los pasos a) y b) con al menos dos composiciones químicas que presentan toxicidades predeterminadas. Las bibliotecas de perfiles moleculares recopiladas por los métodos de la invención pueden guardarse en dispositivos de almacenamiento adecuados, tales como discos duros de ordenador, discos compactos, casetes, discos flexibles y análogos. De modo general y preferiblemente, los dispositivos de almacenamiento adecuados almacenan dichos datos en forma legible por máquina (tal como una computadora).

Otra realización de la presente invención proporciona métodos para tipificar la toxicidad de una composición química de test por comparación de su perfil molecular en LSCs con el de una composición química identificada con toxicidad predeterminada. En un aspecto, la composición química de test puede ser la misma que la composición química que presenta toxicidades predeterminadas. Por ejemplo, el producto químico a testar se identifica en este test por exhibir el perfil molecular idéntico a la composición química conocida.

La invención abarca adicionalmente métodos sistémicos para tipificar la toxicidad de una composición química de test haciendo la comparación del perfil con una biblioteca que comprende perfiles de composiciones químicas múltiples con toxicidades predeterminadas. Preferiblemente, las composiciones químicas comprendidas en una biblioteca ejercen toxicidades similares en términos de tipos y tejidos u órganos diana. La biblioteca puede encontrarse en la forma de una base de datos. Una base de datos puede comprender más de una biblioteca para composiciones químicas de categorías de toxicidad diferentes.

En un aspecto de la presente invención, la toxicidad de una composición química de test puede clasificarse de acuerdo con una comparación de su perfil molecular en LSCs con los de composiciones químicas que presentan toxicidades predeterminadas.

Las LSCs de la presente invención pueden ser de mamíferos humanos o no humanos, incluyendo las de especies murinas, así como especies caninas, felinas, porcinas, bovinas, caprinas, equinas, y ovinas.

Las alteraciones en los niveles de expresión de genes o proteínas pueden detectarse por el uso de un identificador seleccionado de cualquiera de los siguientes: fluorescente, colorimétrico, radiactivo, enzima, sustrato enzimático, análogo nucleosídico, magnético, cuentas de vidrio o de látex, oro coloidal, y transpondedor electrónico. Las alteraciones pueden detectarse también por espectrometría de masas. La composición química puede ser conocida (por ejemplo, un nuevo fármaco potencial) o desconocida (por ejemplo una muestra de un producto químico desconocido encontrada en un vertido próximo al borde de una carretera y de toxicidad desconocida).

Adicionalmente, las composiciones químicas pueden ser agentes terapéuticos (o agentes terapéuticos potenciales), o agentes de toxicidades conocidas, tales como neurotoxinas, toxinas hepáticas, toxinas de células hematopoyéticas, miotoxinas, agentes carcinógenos, agentes teratógenos, o toxinas para uno o más órganos reproductivos. Las composiciones químicas pueden ser adicionalmente productos agroquímicos, tales como plaguicidas, fungicidas, nematocidas, y fertilizantes, cosméticos, con inclusión de los denominados "productos cosmeceúticos", residuos o sub-productos industriales, o contaminantes ambientales. Aquéllas pueden ser también agentes terapéuticos para animales o agentes terapéuticos potenciales para animales.

Las LSCs de la invención pueden proporcionarse en formato de red (por ejemplo redes líquidas) que pueden utilizarse convenientemente para realización de los métodos de la invención. Las células proporcionadas en formato de red pueden exponerse a las composiciones químicas de interés, y determinarse los perfiles moleculares de las células. Los perfiles moleculares pueden determinarse, por ejemplo, por sondeo de las LSCs sobre el sustrato (de la

red) propiamente dicho, o por desprendimiento de células del sustrato (de la red) y preparación de las mismas para determinación de perfiles moleculares como se describe en esta memoria.

Sistemas integrados pueden programarse para comparar el perfil molecular de una composición química creado por un método de la invención con una biblioteca de perfiles moleculares de composiciones químicas y correlación del perfil molecular y la toxicidad de la composición química que comprende un lector de redes adaptado para leer el patrón de identificadores en una red, enlazado operativamente a una computadora digital que comprende un archivo de bases de datos que tienen una pluralidad de perfiles moleculares de LSCs de mamífero en contacto con composiciones químicas de toxicidades predeterminadas creadas por el método de la invención y un programa adecuado para correlación perfil molecular-toxicidad. Estos sistemas integrados pueden ser capaces de leer más de 500 identificadores en una hora, y pueden estar ligados adicionalmente de modo operativo a un detector óptico para leer el patrón de identificadores en una red.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 representa ilustrativamente diferencias en la expresión de proteínas nucleares entre LSCs expuestas a una de dos composiciones químicas y LSCs de control.

La Figura 1A ilustra una reproducción en media-tinta de la lectura de un espectrómetro de masas. La banda superior es el espectro de masas para LSCs de control, que se cultivan en ausencia de cualquiera de las composiciones químicas de test. La banda central es el espectro de masas para las LSCs cultivadas en presencia de una composición química de test (composición de test I), y la banda inferior de la Figura 1A representa el espectro de masas de proteínas nucleares expresadas por LSCs expuestas a una segunda composición química de test (composición de test II).

Las Figuras 1B y 1C son gráficos de barras que ilustran sustracciones obtenidas por computación de proteínas idénticas entre las LSCs de test respectivas y las LSCs de control que indican únicamente podría esperarse que podría esperarse que las proteínas que son significativamente diferentes en expresión entre las LSCs de test y las de control. Cada barra representa una proteína simple y la altura de la barra representa la cantidad de proteína expresada por las LSCs expuestas a la composición de test comparada con la cantidad expresada por LSCs no expuestas a la composición química. Figura 1B: expresión de proteínas de LSCs de test puestas en contacto con la composición de test I, comparada con la expresión de proteínas de los controles. Figura 1C: expresión de proteínas de LSCs de test puestas en contacto con la composición de test II, comparada con la expresión de proteínas de controles.

La Figura 2 es un gráfico de barras que ilustra la expresión de pequeñas proteínas nucleares detectadas por espectrometría de masas. Eje X: masa de proteína detectada. Eje Y: cantidad de proteína detectada, en unidades relativas. Figura 2A: Expresión de proteínas de LSCs de control no expuestas a la composición química. Figura 2B: Expresión de proteínas de LSCs expuestas a la composición de test I. Figura 2C: Expresión de proteínas de LSCs expuestas a la composición de test II. Las líneas en negrilla indican proteínas expresadas en diferentes cantidades entre las LSCs expuestas a cada una de las dos composiciones químicas de test.

La Figura 3 es un gráfico de barras que ilustra la expresión de pequeñas proteínas citoplásmicas detectadas por espectrometría de masas. Eje X: masa la proteína detectada. Eje Y: cantidad de proteína detectada, en unidades relativas. Figura 3A: Expresión de proteínas de LSCs de control no expuestas a la composición química. Figura 3B: Expresión de proteínas de LSCs expuestas a la composición de test I. Figura 2C: Expresión de proteínas de LSCs expuestas a la composición de test II. Las líneas en negrilla indican proteínas expresadas en diferentes cantidades entre las LSCs expuestas a cada una de las dos composiciones químicas de test.

La Figura 4 es un gráfico de barras que ilustra la expresión de grandes proteínas nucleares detectadas por espectrometría de masas. Eje X: masa de proteína detectada. Eje Y: cantidad de proteína detectada, en unidades relativas. Figura 4A: Expresión de proteínas de LSCs de control no expuestas a la composición química. Figura 4B: Expresión de proteínas de LSCs expuestas a la composición de test I. Figura 4C: Expresión de proteínas de LSCs expuestas a la composición de test II. Las líneas en negrilla indican proteínas expresadas en diferentes cantidades entre las LSCs expuestas a cada una de las dos composiciones químicas de test.

Modo(s) para realización de la invención

A. Definiciones

“Toxicidad”, como se utiliza en esta memoria, significa cualquier efecto adverso de un producto químico sobre un organismo vivo o porción del mismo. La toxicidad puede referirse a células individuales, a un tejido, a un órgano, o a un sistema orgánico. Una medida de la toxicidad es por tanto esencial para determinar los efectos potenciales del producto químico sobre la salud humana o animal, con inclusión de la importancia de las exposiciones a los productos químicos en el ambiente. Cada producto químico, y cada fármaco, tiene un efecto adverso a determinada concentración; de acuerdo con ello, la cuestión es en parte si un fármaco o producto químico plantea un riesgo suficientemente bajo para ser comercializado para un propósito determinado, o, con respecto a un contaminante ambiental, si el riesgo planteado por su presencia en el ambiente requiere precauciones especiales para evitar su liberación, o imponer cuarentena o remedio una vez que se ha liberado. Véase, v.g., Klaassen, *et al.*, *compiladores*, Casarett y Doull's *Toxicology: The Basic Science of Poisons*, McGraw-Hill, Nueva York, NY, 5ª edición, 1996). Como se utiliza en esta memoria, una

composición química con “toxicidades predeterminadas” significa que el tipo de toxicidades y/o ciertas propiedades farmacodinámicas de la composición química han sido determinados. Por ejemplo, puede saberse que una composición química induce toxicidad hepática. Adicionalmente, la gravedad de la toxicidad hepática causada por el producto químico puede medirse cuantitativamente por la cantidad o concentración del producto químico en contacto con los tejidos hepáticos.

“Alteración en la expresión de genes o proteínas” de acuerdo con la presente invención, significa un cambio en el nivel de expresión de uno o más genes o proteínas comparado con el nivel de expresión del o de los genes o proteínas de LSC que han estado expuestas únicamente a un medio de cultivo tisular normal y condiciones de cultivo normales. Dependiendo del contexto, la frase puede significar una alteración en la expresión de una sola proteína o un solo gen, como en el caso en que LSCs expuestas a un agente químico expresan una proteína no expresada por LSCs de control, o puede significar el patrón global de la expresión de genes o proteínas de LSCs. La frase puede incluir la expresión de genes o proteínas en LSCs en uno o más momentos y/o etapas a lo largo del camino de su diferenciación, crecimiento, y/o desarrollo en células hepáticas totalmente diferenciadas. La frase no incluye la expresión de genes o proteínas en células hepáticas totalmente diferenciadas.

“Tipo LSC” o “tipo de LSC”, como se utiliza en esta memoria, hace referencia a LSCs aisladas de una fuente particular (como se define, por ejemplo, por especie, tejido, edad de la fuente) y/o de acuerdo con un método de aislamiento particular de LSC.

“Composición química”, “producto químico”, “composición”, y “agente”, como se utilizan en esta memoria, son generalmente sinónimos y hacen referencia a un compuesto de interés. El producto químico puede ser, por ejemplo, uno que se considere como un agente terapéutico potencial, un producto agroquímico, un contaminante ambiental, o una sustancia desconocida encontrada en la escena de un crimen, en un sitio de evacuación de residuos, o vertido al borde de una carretera.

Como se utiliza en esta memoria, “perfil molecular” o “perfil” de una composición química hace referencia a un patrón de alteraciones en la expresión de genes o proteínas, o ambos, en LSCs puestas en contacto con la composición química comparadas con LSCs similares en contacto únicamente con el medio de cultivo.

Como se utiliza en esta memoria, “perfil de eficacia” de una composición química hace referencia a la existencia y/o extensión de uno o más efectos esperados, característicos y/o deseados de la composición química en una célula, tejido, órgano y/u organismo. Por ejemplo, el perfil de eficacia de un fármaco conocido o esperado que induzca desarrollo óseo podría incluir un efecto tal como regulación creciente de uno o más genes y/o proteínas asociados con el desarrollo óseo.

Como se utiliza en esta memoria, “base de datos” se refiere a un sistema ordenado para registrar información que correlaciona información acerca de la toxicidad, los efectos biológicos, o ambos, de un agente químico con las alteraciones en el patrón de expresión de genes o proteínas, o ambos, en LSCs puestas en contacto con una composición química comparadas con LSCs similares en contacto únicamente con el medio de cultivo.

Una “biblioteca”, como se utiliza en esta memoria, hace referencia a una recopilación de perfiles moleculares de al menos dos composiciones químicas, que permite una comparación de las alteraciones en la expresión de genes o proteínas, o ambos, en LSCs puestas en contacto con una composición química con los perfiles de tal o tales expresiones causadas por otras composiciones químicas.

“Red” significa una colocación o configuración ordenada. En la mayoría de los casos, dicho término se utiliza en esta memoria para hacer referencia a una colocación ordenada de oligonucleótidos (con inclusión de cDNAs y DNA genómico) o de ligandos colocados en un chip u otra superficie utilizada para capturar oligonucleótidos complementarios (con inclusión de cDNAs y DNA genómico) o sustratos para el ligando. Por ejemplo, una vez que se conoce el oligonucleótido o ligando en cada posición de la configuración, la secuencia (de un ácido nucleico) o una propiedad física (de una proteína) puede determinarse por la posición en la cual el ácido nucleico o sustrato se fija a la red.

“Enlazado operativamente” significa que dos o más elementos están conectados de una manera que permite que un suceso que ocurre en un elemento (tal como una lectura de un lector óptico) se transmita a y se vea afectada por un segundo elemento (tal como un cálculo por un computador concerniente a los datos de un lector óptico).

B. Descripción general

La invención proporciona métodos de evaluación de la toxicidad de las composiciones químicas sobre una base de amplitud genómica, en un sistema *in vitro* que modeliza estrechamente las complejas interacciones biológicas y celulares *in vivo*. En un aspecto, la invención es especialmente útil en el desarrollo de fármacos, tanto debido a su capacidad para validar dianas como debido a su capacidad para identificar y cuantificar rápidamente todos los genes expresados asociados con las respuestas a un agente terapéutico potencial.

La invención alcanza estos objetivos por aprovechamiento de las propiedades de células madre hepáticas pluripotenciales (LSCs). Las LSCs son las células progenitoras pluripotenciales formativas que son capaces de diferenciarse en tipos de células epiteliales múltiples del hígado y/u otros tejidos/órganos, tales como el páncreas y el intestino.

Por regla general, estas son células progenitoras que son capaces de evolucionar en hepatocitos o células de los conductos biliares. Sin embargo, se cree que las mismas son capaces también de diferenciarse en otros tipos de células. Se han encontrado y han sido aisladas LSCs como hepatoblastos (una forma preferida de LSC para el propósito de esta invención), generalmente en la etapa del desarrollo embrionario, en el divertículo hepático del intestino anterior.

5 Las mismas han sido aisladas también de hígado adulto como células que tienen características de células madre o semejantes a células madre. Para el propósito de esta invención, las células ovales encontradas en el hígado adulto son también LSCs. Debido a su pluripotencia para diferenciarse en tipos de tejido múltiples, una población aislada de LSCs proporciona un modelo mucho más próximo a la complejidad de los sistemas *in vivo* que lo hacen los ensayos

10 tradicionales de células simples o levaduras, evitando al mismo tiempo el coste y las dificultades asociadas con el uso de ratones o mamíferos de mayor tamaño.

Para el propósito de la presente invención, las LSCs poseen muchas ventajas sobre otros tipos de células madre tales como células madre embrionarias (ES). Las LSCs son relativamente fáciles de aislar y purificar a partir de varias fuentes. Las mismas son también relativamente aptas para multiplicación en cultivo y para someterse a condiciones

15 modificadas tales como tratamientos con fármacos. Por otra parte, la obtención de células ES puede ser muy complicada y tiende a ser intensiva en mano de obra. En el caso de las células ES, el uso de embriones humanos o animales puede estar sujeto también a juicios éticos y legales. Las LSCs ofrecen también una ventaja importante sobre otras células madre en el sentido de que son las células progenitoras para los hepatocitos y células de los conductos biliares, que son las células predominantes en el hígado, que es el órgano más sensible a la toxicidad debida a fármacos y otras

20 sustancias (véase, como ejemplo, la Tabla 1). Por consiguiente, podría esperarse que los ensayos de toxicidad que están enfocados en los componentes celulares y en el desarrollo del hígado ofrezcan una evaluación más directa de la toxicidad potencial de un número importante de compuestos de test. Adicionalmente, dado que las LSCs pueden aislarse de individuos vivos, por ejemplo mediante una aguja o una pequeña biopsia de cuña de hígado adulto, la presente invención proporciona medios que hacen posible el desarrollo de perfiles de toxicidad para pacientes individuales o

25 poblaciones de pacientes que tienen sensibilidades singulares a los fármacos, un área que sería casi imposible de alcanzar si se utilizaran células ES para el ensayo de toxicidad. Desarrollos tecnológicos recientes permiten el aislamiento de estas células de cadáveres en algunos casos hasta 24 horas después del fallecimiento.

Las LSCs utilizadas en la invención comprenden una población de células, la mayoría de las cuales son células pluripotenciales capaces de desarrollarse en linajes de células diferentes cuando se cultivan en condiciones apropiadas.

30 Se prefiere que la población LSCs comprenda al menos 51% de células pluripotenciales. Más preferiblemente, la población LSC comprende al menos 75% de células pluripotenciales. Y todavía más preferiblemente, la población LSC comprende al menos 95% de células pluripotenciales.

En su forma más simple, el método de crear un perfil molecular de acuerdo con la presente invención implica poner en contacto LSCs con una composición química de interés, y determinar luego las alteraciones en la expresión de los genes, la expresión de las proteínas, o ambas, en las LSCs expuestas a la composición química (las "LSCs de test") comparadas con LSCs que no han sido expuestas al agente (las "LSCs de control").

35

Adicionalmente, puede generarse una biblioteca por recopilación de perfiles moleculares para dos o más composiciones químicas diferentes, tales como aquéllas que presentan toxicidades similares. Los perfiles moleculares de estas composiciones pueden compararse unos con otros, cualitativa o cuantitativamente, a fin de discernir alteraciones comunes en sus patrones de expresión de genes o proteínas. Por ejemplo, si bien el patrón de expresión global de genes o proteínas para cada composición química puede ser único, los cambios en el nivel de expresión de ciertos

45 genes o proteínas específicos pueden ser similares entre composiciones que tengan toxicidades similares - algunos genes/proteínas pueden estar regulados en sentido creciente de modo similar y por consiguiente expresarse en mayor cantidad comparados con los controles; mientras que otros genes/proteínas pueden estar regulados decrecientemente de modo similar y expresarse por consiguiente en menor cantidad comparados con los controles. Estas características moleculares comunes de las composiciones químicas pueden correlacionarse luego con sus toxicidades y servir como

50 marcadores sustitutivos para evaluación de las toxicidades de una composición química nueva o no testada previamente, tal como un fármaco cabeza de serie en ensayos de cribado de fármacos.

Miles de compuestos han sido sometidos a estudios preclínicos y clínicos. Los estudios preclínicos incluyen, entre otras cosas, estudios de toxicidad en al menos dos especies de mamífero, una de las cuales es usualmente una especie murina, típicamente ratones o ratas, y los ensayos clínicos incluyen siempre información acerca de cualquier toxicidad aparente. Se dispone de una cantidad considerable de información acerca de la toxicidad de diversos de estos compuestos. Basándose en la información de toxicidad disponible, estos compuestos se pueden clasificar en categorías de toxicidades particulares. Por ejemplo, en la Tabla 1 cierto número de composiciones químicas se enumeran de acuerdo con los tejidos u órganos en los cuales ejercen toxicidades.

55

60

65

ES 2 334 639 T3

TABLA 1

5	FÁRMACOS	TOXICIDADES					INDICACIÓN	NOMBRESCO-MERC.
		DE S	HÍGA- DO	CV	CN S	SAN- GRE		
	Talidomida	+						
10	Metotrexato	+					Antineoplásticos	
	Ácido retinoico	+					Acné	
	Ácido valproico	+	+				Ataques	Depakene
	Acetaminofén		+				Analgésico	
15	Isoniazida		+				Antibiótico	
	Diclofenaco (NSAIDS)		+				Anti-inflamatorio	Voltarén
	Bromofenaco (NSAIDS)		+				Anti-inflamatorio	Duract
	Troglitazona		+				Diabetes	Rezulin™
20	Rosiglitazona		ntc				Diabetes	Avandia™
	Trovaflazacino		+				Antibiótico	Trovan™
	Ciprofloxacino		ntc				Antibiótico	Cipro™
25	Eritromicina estolato		+				Antibiótico	
	Pravastatina		+				Reducción de lípidos	Pravachol™
	Atorvastin		+				Reducción de lípidos	Lipitor™
	Clofibrato		ntc				Reducción de lípidos	Atromid
30	Clozapina					+	Antipsicótico	Clozaril
	Cloranfenicol					+	Antibiótico	Cloromicetina
	Doxorrubicina			+			Antineoplásticos	
35	Daunorrubicina			+			Antineoplásticos	
	Ciclosofosfamida			+			Antineoplásticos	
40	COMPUESTOS							
	Tetracloruro de carbono		+					
	Cadmio		+					
	Falodidin		+					
45	Etanol		+					
	Di-metil-formida		+					
	Dicloroetileno		+					
	Plomo		+					
50	Benzo(a)pireno			+				
	Alilamina			+				
	Metilmercurio				+			
55	Trimetilestaño				+			
	Disulfuro de carbono				+			
	Acrilamida				+			
	Hexaclorofeno				+			
60	DMSO		no bien estudiado					

"ntc" = no tóxico, toxicidad limitada, control

65 "Dev" = desarrollo "CV" = cardiovascular "CNS" sistema nervioso central

En una realización de la invención, se utilizan composiciones que se sabe presentan toxicidades hepáticas para un análisis sistemático de sus perfiles moleculares en LSCs. En otra realización, se evalúan las composiciones que causan toxicidades al sistema cardiovascular respecto a sus perfiles moleculares en LSCs. En otra realización de la invención, se evalúan las composiciones que causan toxicidades al sistema neuronal por sus perfiles moleculares en LSCs. Alternativamente, pueden utilizarse juntos fármacos conocidos o potenciales para tratamiento de una enfermedad de elección en un análisis sistemático de sus toxicidades. A este respecto, por ejemplo, pueden cribarse fármacos anti-cáncer y fármacos candidato respecto a sus toxicidades para tejidos y órganos.

De acuerdo con un aspecto de la invención, los perfiles moleculares de las composiciones químicas pueden correlacionarse con las toxicidades que demuestran estos agentes en animales no humanos, en humanos, o en ambos. Comparando luego el patrón de expresión de las LSCs expuestas a un agente nuevo o no testado previamente con una biblioteca de tales perfiles de expresión inducidos por agentes de toxicidad conocida, pueden hacerse predicciones en cuanto al tipo probable de toxicidad del nuevo agente. Adicionalmente, la toxicidad del nuevo agente, en su caso, puede clasificarse entre las composiciones tóxicas conocidas, proporcionando información para priorización en el desarrollo de fármacos.

Además de su utilidad en el desarrollo de fármacos, la invención tiene usos también en otras áreas en las cuales existe preocupación por la toxicidad de las composiciones químicas. Así, la invención puede utilizarse para evaluar la toxicidad de productos agroquímicos, tales como plaguicidas y fertilizantes. La misma puede utilizarse adicionalmente con cosméticos. Por ejemplo, la composición puede utilizarse para cribar cosméticos candidatos en cuanto a toxicidad antes de pasar los compuestos a estudios en animales, reduciendo con ello potencialmente el número de animales que precisan ser sometidos a procedimientos tales como el test de irritación ocular de Draize. Análogamente, los métodos de la invención pueden aplicarse a agentes propuestos para uso como "productos cosmeceúticos", en los casos en que se afirma que agentes que son fundamentalmente cosméticos tienen también alguna propiedad cuasi-terapéutica. Adicionalmente, la invención puede utilizarse para evaluar la toxicidad relativa de contaminantes ambientales, con inclusión de productos de desecho, residuos petroquímicos, productos de combustión, y productos de procesos industriales. Ejemplos de tales contaminantes incluyen dioxinas, PCBs, e hidrocarburos.

En general, se prefiere que el método utilizado para detectar los niveles de expresión de proteínas o genes proporcione al menos una medida relativa de la cantidad de expresión de proteína o gen. Más preferiblemente, el método proporciona una medida cuantitativa de expresión de proteína o gen para facilitar la comparación de la expresión de proteína o gen de las LSCs expuestas a la composición química de test con la de LSCs expuestas a composiciones químicas de toxicidad conocida.

C. Preparación de las LSCs

Se conocen en la técnica métodos para preparación de LSCs de humanos u otras especies de mamíferos. Por ejemplo, Reid *et al.*, Patentes EE.UU. Núms. 5.576.207 y 5.789.246, describen métodos para aislamiento y expansión de células inmaduras cuya progenie puede diferenciarse en diversas células hepáticas. Estas células pueden aislarse de diversos tejidos, con inclusión de hígado, páncreas, intestino, pulmón y médula ósea. Las células inmaduras (precursoras) pueden disociarse de la fuente tisular por procedimientos estándar tales como disociación enzimática y mecánica. La población de células disociada puede enriquecerse ulteriormente respecto a células precursoras por métodos estándar, por ejemplo utilizando anticuerpos que reconocen un epítipo de las células precursoras (epítipos de este tipo se conocen en la técnica, y se proporcionan ejemplos más adelante). La expansión de las células precursoras se consigue cultivando las células en presencia de una matriz extracelular, células hepáticas estromales y factores de crecimiento. Se describen también otras condiciones adecuadas para aislamiento y expansión de estas células. Estas células precursoras pueden diferenciarse en hepatocitos, células de conductos biliares, células hepáticas endoteliales, y células Ito.

Se conocen también métodos de aislamiento de hepatoblastos. Por ejemplo, Reid *et al.*, Patente EE.UU. No. 6.069.005, describen un método de aislamiento que utiliza técnicas de lavado en batea y clasificación de células activadas por fluorescencia. Estas células hepáticas progenitoras se aíslan por disociación de células del hígado, seguida por lavado en batea y clasificación, mediante clasificación de células activadas por fluorescencia) utilizando anticuerpos para reducir la cantidad de tipos de células contaminantes.

Otro método para aislamiento, caracterización y cultivo de células hepáticas progenitoras se describe en Naughton *et al.*, Patente EE.UU. No. 5.559.022. Se aíslan células hepáticas progenitoras por centrifugación en gradiente de densidad, y se distinguen de otras células hepáticas parenquimáticas por su morfología, características de tinción, actividad proliferativa alta y capacidad para diferenciarse *in vitro*.

Otro método para obtención de células hepáticas madre se describe en Faris, publicación PCT WO 00/03001. Faris describe métodos de aislamiento de células madre hepáticas primarias a partir de tejido hepático fetal, pediátrico o adulto que están basados en la propensión de las células hepáticas madre para participar en aglomerados de células con hepatocitos, con enriquecimiento ulterior conseguido por inmunosustracción, digestión enzimática selectiva y selección de afinidad de anticuerpos.

El aislamiento de células progenitoras de los conductos biliares que son capaces de dar lugar a diversas células diferenciadas, con inclusión de células de linaje hepático, se describe en Pang *et al.*, Patente EE.UU. No. 5.861.313. Una población de células que tienen una microarquitectura de conducto biliar de mamífero, tal como un explante de conducto biliar, se cultiva, y se pone en contacto con agentes que causan proliferación de células progenitoras en la población cultivada. Subsiguientemente, las células progenitoras se aíslan, por ejemplo por separación mecánica directa del resto del explante o por disolución de la totalidad o una porción del explante. Diversas condiciones adecuadas para aislamiento y cultivo de las células progenitoras se proporcionan en la referencia.

Se ha descrito también el aislamiento de células hepáticas progenitoras transformadas condicionalmente con semejanzas fenotípicas a hepatoblastos. Fiorino *et al.*, *In Vitro Cell. Dev. Biol. -- Animal* (1998), 34:247-258, describen el aislamiento de células capaces de ser inducidas para expresar diversos marcadores de diferenciación de células hepáticas.

La diferenciación específica de linaje de las LSCs puede ser inducida por diversos factores y/o condiciones bioactivos(as) que son bien conocidos en la técnica. Éstos se describen, por ejemplo, en Brill *et al.*, Extracellular matrix regulation of growth and gene expression in liver cell lineages and hepatomas *In Liver Biology and Pathobiology* (1994), pp. 869-897 (Rayen Press, NY); Reid y Luntz, *Ex vivo* maintenance of differentiated mammalian cells *In Basic Cell Culture Protocols* (1997), 75:31-57 (Humana Press, Totowa, NJ); Reid y Luntz (1997), *Methods in Molecular Biology* (1997), 75:31-57; véase, en general Reid, Stem cell/lineage biology and lineage-dependent extracellular matrix chemistry: keys to tissue engineering of quiescent tissues such as liver *In Textbook of Tissue Engineering* (1997), (R.G. Landes/Academic Press, Austin, TX); Brill *et al.*, *Differentiation* (1995), 59:95-102; Brill *et al.*, *Digestive Diseases & Sciences* (1999), 44:364-371; y Faris, Publicación PCT WO00/03001. Por ejemplo, la diferenciación de células hepáticas progenitoras puede conseguirse por eliminación de condiciones conocidas que se sabe mantienen las células en forma indiferenciada o por administración de uno de varios factores de crecimiento conocidos, tales como HGF, FGF e IGF-II. La diferenciación de células madre hepáticas puede inducirse también por contacto con tejido hepático, es decir, con otros hepatocitos o componentes de la matriz celular conocidos en la técnica. Se ha demostrado que la presencia de dexametasona en el medio de cultivo induce diferenciación de las células hepáticas de embrión de ratón en los linajes de hepatocitos y conductos biliares. El refuerzo del medio de cultivo con suero, insulina, dexametasona y dimetil-sulfóxido induce las células aisladas del hígado de ratas E12 a expresar marcadores de hepatocitos, mientras que la exposición de estas células a butirato de sodio causa la expresión de marcadores de células de los conductos biliares. Véase, en líneas generales, Grisham y Thorgeirsson, Liver stem cells *In Stem Cells* pp. 233-282 (Academic Press, Londres) (1997); Shiojiri y Mizuno, *Anat. Embryol.* (1993), 187:221-229; Gall y Bhathal, *J. Exp. Pathol.* (1990), 71:41-50; y Germain *et al.*, *Cancer Res.* (1988), 48:4909-4918.

Las LSCs obtenidas para uso en la presente invención pueden identificarse por sus distintas propiedades como se conoce en la técnica y como se describe en las referencias citadas en esta memoria. Por ejemplo, las células hepáticas madre tienden a ser más pequeñas que sus descendientes más diferenciados, tienen una relación nuclear a citoplásmica alta, núcleos no diferenciados y pálidos, y unas cuantas adhesiones intercelulares. Reid *et al.*, Patente EE.UU. No. 6.069.005. Naughton *et al.*, describen las células hepáticas progenitoras aisladas por su método como células que tienen una relación nuclear a citoplásmica baja, se tiñen con características específicas cuando están en contacto con una combinación de tintes ácidos y básicos, y tienen mayores tasas de proliferación en cultivo que lo hacen las células hepáticas maduras. Naughton *et al.*, Patente EE.UU. No. 5.559.022.

Alternativamente, las LSCs utilizadas en la presente invención pueden identificarse por la detección de marcadores específicos por ejemplo por el uso de anticuerpos específicos para una población de LSCs en una etapa definida. Por ejemplo, Grisham y Thorgeirsson, *supra*, describen una lista sustancial de marcadores de anticuerpos utilizados comúnmente para evaluar la diferenciación y rastrear el linaje de las células epiteliales hepáticas, con inclusión de OC.2 y OC.3, que son marcadores expresados en los hepatoblastos pero no en los hepatocitos. Asimismo, anticuerpos para citoqueratinas podrían ser útiles en la evaluación del linaje y diferenciación de las células epiteliales hepáticas, por ejemplo, Moll *et al.*, *Cell* (1982), 31:11-24; Osborn y Weber, *Cell* (1982), 31:303-306; Marceau, *Lab. Invest.* (1990), 63:4-20; Shiojiri *et al.*, *Cancer Res.* (1991), 51:2611-2620; y Blouin *et al.*, *Differentiation* (1992), 52:45-54, han consignado que todos los tipos de células epiteliales expresan combinaciones de entre 2 y 10 citoqueratinas (CK), y que la combinación particular de CKs expresada por las células, tal como la combinación de CKs que son el equivalente a las CKs humanas 8, 18, 7 y 19 (y raras veces CK14), indica formas diferenciadas de células epiteliales hepáticas.

En caso necesario, las LSCs obtenidas y cultivadas para uso en la presente invención pueden aislarse del cultivo basándose en sus propiedades físicas o químicas (tales como tamaño, masa, densidad, antígeno específico o expresión génica), utilizando métodos conocidos en la técnica (tales como citometría de flujo, clasificación de células, filtración o centrifugación).

Las LSCs utilizadas para testar la composición química pueden ser de cualquier especie de vertebrado. La elección de la especie particular de la que se derivan las LSCs reflejará típicamente un balance de varios factores. En primer lugar, dependiendo del propósito del estudio, pueden presentar interés particular una o más especies. Por ejemplo, las LSCs humanas serán de interés particular para uso con composiciones a testar como agentes terapéuticos humanos potenciales, mientras que LSCs equinas, felinas, bovinas, porcinas, caprinas, equinas u ovinas pueden ser de mayor interés para un agente terapéutico potencial veterinario.

En segundo lugar, incluso con respecto al testado de agentes terapéuticos humanos, consideraciones de coste y manipulación pueden dictar que algunos o todos los tests se realicen con LSCs no humanas, e incluso no procedentes de primates. Para algunos tests, puede ser deseable utilizar LSCs de ratones, ratas, cobayos, conejos, y otros animales de laboratorio fácilmente disponibles, y menos costosos.

En tercer lugar, será útil a menudo seleccionar una especie para la cual se disponga de información considerable sobre la toxicidad de composiciones químicas, a fin de que los cambios observados en la expresión de genes y proteínas puedan correlacionarse con diversos tipos de toxicidad. Por esta razón, ratones y ratas son realizaciones preferidas. La mayoría de los estudios preclínicos se realizan sobre al menos una especie murina, y existe por tanto un gran acervo de información en cuanto a la toxicidad de diversos compuestos sobre diversos tejidos de ratones y de ratas. La utilización de LSCs derivadas de ratones o ratas permite la correlación de las alteraciones en la expresión de genes o proteínas en las LSCs con las toxicidades exhibidas por estos agentes en dichas especies. Las LSCs de otras especies utilizadas comúnmente en estudios preclínicos, tales como cobayos, conejos, cerdos, y perros, se prefieren también por la misma razón. Típicamente, se utilizarán LSCs de estas especies para cribado de "primer paso", o donde no se precise información detallada sobre la toxicidad en humanos, o donde un resultado en una especie murina o cualquier otra de estas especies de laboratorio ha sido correlacionado con una toxicidad conocida u otro efecto en humanos.

En cuarto lugar, aunque los primates no son tan extensamente utilizados en estudios preclínicos y son a menudo más caros de adquirir y mantener que otros animales de laboratorio, su bioquímica y su biología del desarrollo está considerablemente más próxima a la de los humanos que las de los animales de laboratorio más comunes. Las LSCs derivadas de primates se prefieren por tanto para tests de toxicidad donde el estudio es suficientemente importante para justificar las consideraciones adicionales de coste y manipulación. Son muy preferidas las LSCs humanas, dado que las conclusiones acerca de la toxicidad de los agentes en estas LSCs pueden considerarse las más directamente relevantes en cuanto al efecto de una composición química en humanos. Se prevé que deberán realizarse estudios de LSCs de primates o humanas para confirmar los resultados de los estudios de toxicidad en LSCs de otras especies.

En quinto lugar, con respecto a la terapéutica humana, las agencias reguladoras requieren generalmente datos con animales antes que puedan comenzar las pruebas en humanos; por regla general será deseable utilizar LSCs de las especies que se utilizarán en los estudios preclínicos con animales. Los resultados de los tests de toxicidad en las LSCs pueden guiar luego al investigador en cuanto al grado y tipo de toxicidad a prever durante las pruebas con animales. Se sabe en la técnica que ciertas especies animales son mejores modelos de toxicidad humana de tipos diferentes que otras, y las especies difieren también en su capacidad para metabolizar los fármacos. Véase, v.g., Williams, *Environ Health Perspect.* (1978); 22:133-138; Duncan, *Adv. Sci.* (1967), 23:537-541. Así, las especies particulares preferidas para uso en un estudio de toxicidad preclínico particular pueden variar de acuerdo con el uso propuesto del fármaco candidato. Por ejemplo, una especie que proporcione un modelo adecuado para un fármaco propuesto para afectar al sistema reproductivo puede no ser un modelo tan adecuado para un fármaco destinado a afectar al sistema nervioso. Los criterios para seleccionar especies apropiadas para estudios preclínicos son bien conocidos en la técnica.

Si bien pueden utilizarse LSCs de diferentes especies en los métodos de la invención, en general, se prefieren células de mamífero. En las discusiones que siguen, se supone que en cualquier comparación dada de LSCs de control y de test, las LSCs utilizadas como controles y las utilizadas para testar los efectos de las composiciones químicas derivadas de la misma especie.

D. Puesta en contacto de las LSCs con las composiciones químicas

1. Generalidades

Una vez que se ha iniciado un cultivo de LSC, el mismo puede ponerse en contacto con una composición química. Convenientemente, la composición química se encuentra en solución acuosa y se introduce en el medio de cultivo. La introducción puede realizarse por cualquier medio conveniente, pero usualmente se hará por medio de una pipeta, un micropipeteador, o una jeringuilla. En algunas aplicaciones, tales como cribado de alta potencia, las composiciones químicas se introducirán por medios automáticos, tales como sistemas automáticos de pipeteado, que pueden encontrarse en brazos robotizados. Las composiciones químicas pueden introducirse también en el medio en forma de polvo o en formas sólidas, con o sin excipientes farmacéuticos, aglomerantes, y otros materiales utilizados comúnmente en composiciones farmacéuticas, o con otros vehículos que podrían emplearse en el uso propuesto. Por ejemplo, las composiciones químicas destinadas a uso como productos agroquímicos o como agentes petroquímicos pueden introducirse en el medio en sí mismas para testar la toxicidad de dichos productos o agentes químicos, o introducirse en combinación con otros materiales con los cuales podrían utilizarse o que podrían encontrarse en el ambiente, a fin de determinar si la combinación de los productos químicos o agentes tiene un efecto sinérgico. Típicamente, los cultivos se agitarán al menos brevemente mediante sacudidas después de la introducción de una composición química para asegurar que la composición se dispersa en todo el medio.

2. Temporización de la puesta en contacto

El tiempo durante el cual se añade una composición química al cultivo está dentro de la discreción del especialista y variará con el objetivo de estudio particular. Convenientemente, la composición química se añadirá tan pronto como se cultivan las LSCs, permitiendo la determinación de la alteración en la expresión de proteínas o genes sobre el desarrollo de todos los tejidos de las LSCs. Puede ser interesante, sin embargo, enfocar el estudio en el efecto de la composición sobre un tipo de células hepáticas particular. Como se ha indicado previamente, se sabe que las células diferenciadas individuales, tales como los hepatocitos y las células de los conductos biliares, se desarrollan en presencia de factores y/o condiciones de inducción específicos, y pueden identificarse por marcadores de células específicos. Tales factores, condiciones y marcadores se conocen en la técnica, proporcionándose ejemplos en esta memoria y en las referencias citadas. La adición de la composición química puede escalonarse por tanto de tal modo que ocurra en diversos momentos y/o etapas en la diferenciación, crecimiento y/o desarrollo de las LSCs. En una realización, la composición química se pone en contacto con las LSCs mantenidas en forma indiferenciada. En otra realización, la adición de la composición se escalona de tal modo que ocurra en el momento en que el tipo de célula/tejido de interés comienza a desarrollarse. En otra realización adicional, la adición de la composición química se escalona de modo que tenga lugar en un momento seleccionado después del comienzo de dicho desarrollo, a fin de observar el efecto sobre la alteración de la expresión de genes o proteínas en el tipo de célula/tejido de interés.

3. Dosificación de la composición química

Se utilizarán diferentes cantidades de una composición química para establecer el contacto con las LSCs dependiendo de la cantidad de información conocida acerca de la citotoxicidad de dicha composición, los propósitos del estudio, el tiempo disponible, y los recursos del especialista. Puede administrarse una composición química a una sola concentración, particularmente donde otros estudios o el trabajo anterior o la experiencia en campo con el compuesto hayan indicado que una concentración particular es la que se encuentra más comúnmente en el cuerpo. Más frecuentemente, la composición química se añadirá en concentraciones diferentes a cultivos de LSCs ejecutados en paralelo, de tal modo que puedan evaluarse los efectos de las diferencias de concentración sobre la expresión de genes o proteínas y, por tanto, las diferencias en toxicidad de la composición a concentraciones diferentes. Típicamente, por ejemplo, la composición química se añadirá a una concentración normal o intermedia, y se horquillará por aumentos y disminuciones de concentración de dos o cinco veces, dependiendo del grado de precisión deseado.

En los casos en que la composición es una de citotoxicidad desconocida, se realiza primeramente de modo conveniente un estudio preliminar a fin de determinar los intervalos de concentración a los que se testará la composición. Se conocen en la técnica una diversidad de procedimientos para determinación de las dosis de concentración. Un procedimiento común, por ejemplo, consiste en determinar la dosificación a la cual el agente es directamente citotóxico. El experto reduce luego la dosis a la mitad y realiza un estudio de dosificación, típicamente por administración del agente de interés en diluciones de concentración de cinco o dos veces a cultivos paralelos de células del tipo de interés. Para los contaminantes ambientales, la composición se testará también usualmente a la concentración a la que se encuentran los mismos en el ambiente. Para los productos agroquímicos, tales como plaguicidas que dejan residuos en los alimentos, el agente se testará usualmente a la concentración a la cual se encuentra el residuo, aunque el mismo se testará probablemente también a otras concentraciones.

En una realización, el o los perfiles de toxicidad (v.g., perfil molecular) de una composición química en LSCs se correlacionan con la o las concentraciones a las cuales la composición química se pone en contacto con las LSCs. Una correlación de este tipo puede proporcionar indicación útil de la o las concentraciones de la composición química que causa(n) grados de citotoxicidad aceptables o inaceptables. En otra realización, el o los perfiles de eficacia de una composición química en LSCs se correlaciona(n) con la o las concentraciones a las cuales la composición química se pone en contacto con las LSCs. Dicha correlación puede proporcionar indicación útil de la o las concentraciones de la composición química suficientes para causar un grado de eficacia aceptable y/o deseable de la composición. En otra realización adicional, se utilizan la correlación perfil de toxicidad-concentración y la correlación perfil de eficacia-concentración en un índice que proporciona una medida de la conveniencia y/o utilidad de la composición química. Por ejemplo, una composición química muy deseable sería aquella que tiene un índice que es función de concentración alta para causar un nivel inaceptable de toxicidad en las LSC y concentración baja para obtener un nivel de eficacia deseable y/o útil.

E. Detección de alteraciones en los niveles de expresión de genes o proteínas

1. Detección de las Alteraciones de la Expresión de Proteínas

La expresión de proteínas puede detectarse por cierto número de métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, las proteínas en una muestra pueden separarse por electroforesis en gel de dodecilsulfato de sodio-poliacrilamida ("SDS-PAGE") y visualizarse con un tinte tal como azul Coomassie o un tinte de plata. Los identificadores radiactivos pueden detectarse poniendo una hoja de película de rayos X sobre el gel. Las proteínas pueden separarse también sobre la base de su punto isoelectrico por enfoque isoelectrico, y visualizarse por tinción. Adicionalmente, la SDS-PAGE puede realizarse en combinación con el enfoque isoelectrico (realizados usualmente en direcciones perpendiculares) para proporcionar separación bidimensional de las proteínas contenidas en una muestra. Las proteínas pueden separarse ul-

teriormente por técnicas tales como cromatografía líquida de alta presión, HPLC, cromatografía en capa delgada, cromatografía de afinidad, cromatografía de filtración en gel, cromatografía de intercambio iónico, desorción/ionización láser intensificada en superficie ("SELDI"), desorción/ionización láser asistida por matriz ("MALDI"), y, si las tasas de sedimentación son suficientemente diferentes, centrifugación en gradiente de densidad. La detección de las alteraciones en el nivel de expresión de proteínas utilizando estas técnicas puede realizarse, por ejemplo, haciendo pasar en paralelo muestras de LSCs puestas en contacto con una composición cuyo efecto interesa conocer ("muestras de test") y muestras de LSCs cultivadas en condiciones idénticas excepto en lo que se refiere a la presencia de la composición química de interés ("muestras de control"), y observando cualesquiera diferencias en las proteínas detectadas y la cantidad de las proteínas detectadas.

La inmunodetección proporciona un grupo de técnicas útiles para detectar alteraciones en la expresión de proteínas. En estas técnicas se generan típicamente anticuerpos contra la proteína por inyección de la proteína en ratones o conejos siguiendo protocolos estándar, tales como los propuestos en Harlow y Lane, *Antibodies, A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbour Laboratory, Cold Spring Harbour, NY, 1988). Los anticuerpos así generados pueden utilizarse luego para detectar la presencia de y cuantificar la proteína en una diversidad de ensayos inmunológicos conocidos en la técnica, tales como ELISAs, inmunoensayos fluorescentes, transferencias Western y de manchas, inmunoprecipitaciones, e inmunoensayos focales. Las alteraciones en la expresión de proteínas pueden determinarse ejecutando tests en paralelo sobre muestras de test y de control y observando cualesquiera diferencias de resultados entre las muestras. Los resultados de ELISAs, por ejemplo, pueden relacionarse directamente con la cantidad de proteína presente.

La marcación proporciona otra vía para detectar y determinar cambios en la expresión de proteínas. Por ejemplo, el gen que codifica la proteína puede modificarse por ingeniería genética para producir una proteína híbrida que contenga un marcador detectable, a fin de que la proteína pueda ser detectada específicamente por detección del marcador. Están disponibles sistemas que permiten la obtención de imágenes y cuantificación directa de identificadores radiactivos en, por ejemplo, geles en los cuales se han separado las proteínas. Las diferencias de expresión pueden determinarse por observación de las diferencias en la cantidad del marcador presente en las muestras de test y de control.

Las proteínas pueden analizarse también por técnicas estándar de química de proteínas. Por ejemplo, las proteínas pueden analizarse por realización de digestiones proteolíticas con tripsina, proteasa B de *Staphylococcus*, quimotripsina, u otras enzimas proteolíticas. Las diferencias de expresión pueden determinarse por comparación de las cantidades relativas de los productos digeridos.

Un método particularmente preferido para determinación de las diferencias en la expresión de las proteínas es la espectroscopia de masas, o "MS", que proporciona el perfil más amplio del número máximo de proteínas con el mínimo esfuerzo. Además, la MS permite no sólo la detección exacta de las proteínas presentes en una muestra, sino también su cuantificación. El procedimiento puede utilizarse por sí solo, o en combinación con uno o más de los métodos precedentes basados en propiedades físicas selectivas para repartir las proteínas presentes en una muestra. El reparto reduce el número de proteínas de propiedades físicas diferentes en la muestra y da como resultado un mejor análisis MS por permitir una comparación de proteínas semejantes en tamaño, carga electrostática, afinidad para iones metálicos, o propiedades análogas. Así, por ejemplo, las proteínas de una muestra pueden someterse a SDS-PAGE y enfoque isoeléctrico, y una mancha de interés resultante en el gel puede someterse luego a MS. En el Ejemplo 2, dado más adelante, se ilustran un reparto inicial realizado utilizando una columna de clasificación y un segundo reparto realizado utilizando SELDI. Debe indicarse que, en el protocolo descrito en el Ejemplo 2, se ilustra el análisis de proteínas con pesos moleculares menores que 30 kD. Alternativamente, por supuesto, podrían analizarse proteínas de mayor peso en los métodos de la invención, y las proteínas no precisan ser fraccionadas si el especialista está preparado para analizar todas las proteínas de una muestra o, por ejemplo, si un análisis preliminar demuestra que el número total de proteínas diferentes en una muestra es lo suficientemente pequeño para ser analizado sin reparto.

Pueden utilizarse también computadoras conectadas al espectrómetro de masas para analizar las muestras a fin de facilitar la determinación de si un cambio en la expresión de proteínas puede ser indicativo de una toxicidad particular. Por ejemplo, la lectura del MS puede utilizarse en un "cálculo sustractivo" en el cual la expresión de proteínas en las LSCs de control se cuantifica y se sustrae luego de la expresión cuantitativa de proteínas de las LSCs puestas en contacto con una composición química, mostrándose sólo las proteínas expresadas en cantidades mayores o menores que las expresadas por las LSCs de control. Este método enfoca inmediatamente la atención en las diferencias de expresión de proteínas entre un control y una población de test. Ejemplos de tales comparaciones se muestran en las Figuras 1B y 1C, y se exponen en detalle más adelante.

2. Detección de las Alteraciones de la Expresión Génica

Se conocen en la técnica varios métodos para detectar y comparar los niveles de expresión génica.

Un método estándar para tales comparaciones es la transferencia Northern. En esta técnica, se extrae RNA de la muestra y se carga en cualquiera de una diversidad de geles adecuados para análisis de RNA, que se hacen pasar luego para separar el RNA por tamaño, de acuerdo con métodos estándar (véase, v.g., Sambrook, J., et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (2ª ed. 1989)). Los geles se transfieren luego (como se describe en Sambrook, *supra*) y se hibridan a sondas para RNAs de interés. Las sondas pueden ser radiactivas o no radiactivas, dependiendo de la preferencia del especialista para los sistemas de

detección. Por ejemplo, la hibridación con la sonda puede observarse y analizarse por detección quimioluminiscente de las sondas fijadas utilizando el "Genius System" (Boehringer Mannheim Corporation, Indianapolis, IN), siguiendo las instrucciones del fabricante. La carga igual del RNA en las pistas puede juzgarse, por ejemplo, por tinción con bromuro de etidio de las bandas de RNA ribosómico. Alternativamente, las sondas pueden radiomarcarse y detectarse autorradiográficamente utilizando película fotográfica.

El RNA puede amplificarse también por cualquiera de una diversidad de métodos y detectarse luego. Por ejemplo, Marshall, Patente EE.UU. No. 5.686.272, describe la amplificación de secuencias de RNA utilizando la reacción en cadena de la ligasa, o "LCR". La LCR ha sido descrita extensamente por Landegren *et al.*, *Science* Landegren *et al.*, *Science* (1988), 241:1077-1080;

Wu *et al.*, *Genomics* (1989), 4:560-569; Barany, in PCR Methods and Applications, 1:5-16 (1991); y Barany, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1991), 88:189-193.

O bien, el RNA puede someterse a transcripción inversa en DNA y amplificarse luego por LCR, la reacción en cadena de la polimerasa ("PCR"), u otros métodos. Un protocolo ilustrativo para la realización de la transcripción inversa de RNA se expone en la Patente EE.UU. No. 5.705.365. La selección de iniciadores apropiados y protocolos PCR se expone, por ejemplo, en Innis, M., *et al.*, *compiladores*, Protocolos PCR 1990 (Academic Press, San Diego, CA) (en lo sucesivo "Innis *et al.*"). La expresión diferencial del RNA mensajero puede compararse también por transcripción inversa de mRNA en cDNA, que se escinde luego por enzimas de restricción y se separa electroforéticamente para permitir la comparación de los fragmentos de cDNA, como se expone en Belyavsky, Patente EE.UU. No. 5.814.445.

Típicamente, los iniciadores se marcan en el término 5' con biotina o cualquiera de diversos tintes fluorescentes. Las sondas se marcan usualmente con una enzima, tal como peroxidasa de rábano picante (HRP) y fosfatasa alcalina (véase, Levenson y Chang, Nonisotopically Labeled Probes and Primers in Innis, *et al.*, *supra*), pero pueden marcarse también, por ejemplo, con biotina-psoraleno. Protocolos ilustrativos detallados para marcación de iniciadores y para la síntesis de sondas marcadas con enzimas han sido expuestos por Levenson y Chang, *supra*. O bien, las sondas pueden marcarse también con isótopos radiactivos. Un protocolo ilustrativo para la síntesis de sondas de DNA y RNA marcadas radiactivamente se expone en Sambrook *et al.*, *supra*. Usualmente, se utiliza ³²P para marcación de sondas de DNA y RNA. Se conocen varios métodos para detección de productos PCR. Véase, v.g., Innis, *supra* que expone un protocolo detallado para detección de productos PCR utilizando sondas marcadas no isotópicamente. Generalmente, existe un paso que permite la hibridación de la sonda y el producto PCR, después del cual existen uno o más pasos de desarrollo que permiten la detección.

Por ejemplo, si se utiliza una sonda de psoraleno biotinilado, la sonda hibridada se incuba con conjugado estreptavidina-HRP y se incuba después con un cromógeno, tal como tetrametilbencidina (TMB). Alternativamente, si el especialista ha elegido emplear una sonda marcada radiactivamente, los productos PCR a los cuales se ha hibridado la sonda pueden detectarse por autorradiografía. Como otro ejemplo, puede utilizarse dUTP biotinilada (Bethesda Research Laboratories, MD) durante la amplificación. Los productos PCR marcados pueden hacerse pasar luego por un gel de agarosa, pasarse por transferencia Southern a un filtro de nailon, y detectarse, por ejemplo, por un sistema de detección estreptavidina/fosfatasa alcalina. Un protocolo para detección de dUTP biotinilado incorporado se expone, v.g., en Lo *et al.*, Incorporation of Biotinydated dUTP, in Innis *et al.*, *supra*. Finalmente, los productos PCR pueden pasarse en geles de agarosa y los ácidos nucleicos detectarse por medio de un tinte, tal como bromuro de etidio, que reconoce específicamente los ácidos nucleicos.

Sutcliffe, Patente EE.UU. 5.807.680, propone un método para la identificación simultánea de mRNAs expresados diferencialmente y medida de las concentraciones relativas. La técnica, que comprende la formación de cDNA utilizando iniciadores de anclaje seguida por PCR, permite la visualización de prácticamente cualquier mRNA expresado por un tejido como una banda distinta en un gel cuya intensidad corresponde groseramente a la concentración del mRNA.

Otro grupo de técnicas emplean análisis de niveles de expresión relativos de transcritos. Recientemente se han desarrollado cuatro enfoques de esta clase que permiten un análisis exhaustivo de alta potencia. En primer lugar, el cDNA puede transcribirse inversamente a partir de los RNAs contenidos en las muestras (como se describe en las referencias citadas anteriormente), y someterse a secuenciación en un solo paso de los extremos 5' y 3' para definir marcadores de secuencia expresados para los genes expresados en las muestras de test y de control. La enumeración de la representación relativa de los marcadores de las diferentes muestras proporciona una aproximación de la representación relativa del transcrito del gen en las muestras.

En segundo lugar, se ha desarrollado una variación en ESTs, conocida como análisis serial de la expresión génica, o "SAGE", que permite el análisis cuantitativo y simultáneo de un gran número de transcritos. La técnica emplea el aislamiento de marcadores de secuencia de diagnóstico cortos y secuenciación para revelar los patrones de expresión génica característicos de una función diana, y ha sido utilizada para comparar niveles de expresión, por ejemplo, de miles de genes en células normales y tumorales. Véase, v.g., Velculescu, *et al.*, *Science* (1995), 270:368-369; Zhang, *et al.*, *Science* (1997), 276-1268-1272.

En tercer lugar, se han desarrollado métodos basados en presentación diferencial. En estos métodos, pueden utilizarse fragmentos definidos por delimitadores específicos de secuencia como identificadores únicos de genes, cuando se acoplan con información acerca de la longitud de fragmento dentro del gen expresado. La representación relativa de un gen expresado en el interior de una célula puede estimarse luego por la representación relativa del fragmento asociado con dicho gen. Ejemplos de algunos de los varios métodos desarrollados para aprovechar esta idea son el análisis con enzimas de restricción de secuencias expresadas diferencialmente (“READS”) empleado por Gene Logic, Inc., y el análisis de la expresión total de genes (“TOGA”) utilizado por Digital Gene Technologies, Inc. CLONTECH, Inc. (Palo Alto, CA), por ejemplo, vende el Delta® Differential Display Kit para identificación de genes expresados diferencialmente por PCR.

En cuarto lugar, en realizaciones preferidas, la detección se realiza por una de varias técnicas para análisis de hibridación. En estos métodos, el RNA de la muestra de interés se somete usualmente a transcripción inversa para obtener cDNA marcado. El cDNA se hibrida luego, típicamente a oligonucleótidos o cDNAs de secuencia conocida dispuestos en un chip u otra superficie en un orden conocido. La localización del oligonucleótido al que se hibrida el cDNA marcado proporciona información de secuencia acerca del cDNA, mientras que la cantidad de RNA o cDNA hibridado proporciona una estimación de la representación relativa del RNA o cDNA de interés. Adicionalmente, la técnica permite la hibridación simultánea con o más marcadores detectables diferentes. Los resultados de hibridación proporcionan luego una comparación directa de la expresión relativa de las muestras.

Cierto número de kits están disponibles comercialmente para análisis de *hibridación*. Estos kits permiten la identificación de RNA o cDNAs específicos en formatos de alta densidad, que incluyen filtros, portaobjetos de microscopio, microchips, y tecnologías basadas en espectrometría de masas. Por ejemplo, Affimetryx, Inc. (Santa Clara, CA), comercializa redes GeneChip™ Probe que contienen miles de sondas de oligonucleótidos diferentes con secuencias, longitudes, y localizaciones conocidas dentro de la red para secuenciación de genes de interés con gran exactitud. CLONTECH, Inc.’s (Palo Alto, CA) Atlas™ cDNA Expression Array permite la monitorización de los patrones de expresión de 588 genes seleccionados. Hyseq, Inc.’s (Sunnyvale, CA) Gene Discovery Module permite el cribado de alta potencia de RNA sin información previa de secuencia a una resolución de 1 copia de RNA por célula. Incyte Pharmaceuticals, Inc. (Palo Alto, CA) ofrece microrredes que contienen, por ejemplo, oligonucleótidos ordenados de cáncer humano y genes de transducción de señales. Las técnicas utilizadas por otras compañías en este campo se discuten, v.g., en Service R., Science 282:396-399 (1998).

3. Identificadores

Tanto proteínas como genes pueden marcarse para detectar la alteración en los niveles de expresión en los métodos de la invención. El término “identificador” hace referencia a una composición detectable por medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmunoquímicos, o químicos. Por ejemplo, identificadores útiles de ácido nucleico y proteínas incluyen ³²P, ³⁵S, tintes fluorescentes, reactivos electrónicamente densos, enzimas (v.g., como se utiliza comúnmente en un ELISA), biotina, digoxigenina, o haptenos y proteínas para los cuales están disponibles antisueros o anticuerpos monoclonales.

Se conocen una gran diversidad de identificadores y técnicas de conjugación y han sido publicados extensamente, tanto en literatura científica como en literatura de patentes, y son aplicables generalmente a la presente invención para la marcación de ácidos nucleicos, ácidos nucleicos amplificados, y proteínas. Marcadores adecuados incluyen radionucleótidos, enzimas, sustratos, cofactores, inhibidores, restos fluorescentes, restos quimioluminiscentes, partículas magnéticas y análogos. Los agentes de marcación incluyen opcionalmente, v.g., anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, proteínas, u otros polímeros tales como matrices de afinidad, carbohidratos o lípidos. La detección de ácidos nucleicos o proteínas marcados puede proceder por cualquiera de diversos métodos, que incluyen inmunotransferencia, rastreo de marcadores radiactivos o bioluminiscentes, transferencia Southern, transferencia Northern, u otros métodos que rastrean una molécula basándose en su tamaño, carga o afinidad. El identificador o resto detectable particular utilizado y el ensayo particular no son aspectos críticos de la invención.

El resto detectable puede ser cualquier material que tenga una propiedad detectable física o química. Tales identificadores detectables han sido plenamente desarrollados en el campo de geles, columnas, y sustratos sólidos, y en general, identificadores útiles en tales métodos pueden aplicarse a la presente invención. Así pues, un identificador es cualquier composición detectable por medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmunoquímicos, eléctricos, ópticos o químicos. Marcadores útiles en la presente invención incluyen tintes fluorescentes (v.g. isotiocianato de fluoresceína, rojo Texas, rodamina, y análogos), radioidentificadores (v.g., ³H, ¹²⁵I, ³⁵S, ¹⁴C, o ³²P), enzimas (v.g., LacZ, CAT, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina y otras, utilizadas comúnmente como enzimas detectables, sea como productos de genes marcadores o en un ELISA), intercaladores de ácido nucleico (v.g., bromuro de etidio) e identificadores colorimétricos tales como oro coloidal o cuentas de vidrio o plástico coloreados (v.g., poliestireno, polipropileno, látex, etc.), así como transpondedores electrónicos (v.g., Patente EE.UU. 5736332).

Se reconocerá que los identificadores fluorescentes no deben limitarse a moléculas orgánicas de una sola especie, sino que incluyen moléculas inorgánicas, mezclas multimoleculares de moléculas orgánicas y/o inorgánicas, cristales, heteropolímeros, y análogos. Así, por ejemplo, nanocristales núcleo-vaina, CdSe-CdS encerrados en una envoltura de sílice pueden derivatizarse fácilmente por acoplamiento a una molécula biológica. Bruchez *et al.*, Science (1998), 281:2013-2016). Análogamente, manchas cuánticas altamente fluorescentes (seleniuro de cadmio encapsulado con

sulfuro de cinc) han sido acopladas covalentemente a biomoléculas para uso en detección biológica ultrasensible. Warren y Nie, *Science* (1998), 281: 2016-2018.

El identificador está acoplado directa o indirectamente al ácido nucleico o proteína deseado de acuerdo con métodos bien conocidos en la técnica. Como se ha indicado arriba, pueden utilizarse una gran diversidad de identificadores, dependiendo la elección del identificador de la sensibilidad requerida, la facilidad de conjugación del compuesto, los requisitos de estabilidad, la instrumentación disponible, y las provisiones de evacuación. Los identificadores no radiactivos se fijan a menudo por medios indirectos. Generalmente, una molécula ligando (v.g., biotina) se une covalentemente a un polímero. El ligando se fija luego a una molécula anti-ligando (v.g., estreptavidina) que es detectable inherentemente o que se une de modo covalente a un sistema señal, tal como una enzima detectable, un compuesto fluorescente, o un compuesto quimioluminiscente. Pueden utilizarse cierto número de ligandos y anti-ligandos. Cuando un ligando tiene un anti-ligando natural, por ejemplo, biotina, tiroxina, y cortisol, el mismo puede utilizarse en asociación con anti-ligandos marcados. Alternativamente, puede utilizarse cualquier compuesto hapténico o antigénico en combinación con un anticuerpo.

Los identificadores pueden conjugarse también directamente a compuestos generadores de señales, v.g., por conjugación con una enzima o un fluoróforo. Las enzimas de interés como identificadores serán fundamentalmente hidrolasas, particularmente fosfatasas, esterases y glicosidasas, u oxidorreductasas, particularmente peroxidasas. Los compuestos fluorescentes incluyen fluoresceína y sus derivados, rodamina y sus derivados, dansil, umbeliferona, proteína fluorescente verde, y análogos. Los compuestos quimioluminiscentes incluyen luciferina, y 2,3-dihidroftalazinadionas, v.g., luminol.

Los medios de detección de identificadores son bien conocidos por los expertos en la técnica. Así, por ejemplo, donde el identificador es un identificador radiactivo, los medios para detección incluyen un contador de centelleo, un contador de proximidad (placas de microtitulación con fluido de centelleo incorporado), o película fotográfica como en la autorradiografía. Cuando el identificador es un identificador fluorescente, el mismo puede detectarse por excitación del fluorocromo con la longitud de onda de luz apropiada y detección de la fluorescencia resultante, v.g., por microscopía, inspección visual, por medio de película fotográfica, por el uso de detectores electrónicos tales como dispositivos acoplados a una carga (CCDS) o fotomultiplicadores y análogos. Análogamente, pueden detectarse identificadores enzimáticos proporcionando sustratos apropiados para la enzima y detectando el producto de reacción resultante. Finalmente, los identificadores colorimétricos simples se detectan a menudo simplemente por observación del color asociado con el identificador. Así, en diversos ensayos con varillas de inmersión, el oro conjugado aparece frecuentemente de color clavel, mientras que diversas cuentas conjugadas aparecen del color de la cuenta.

F. *Correlación de los perfiles moleculares con las toxicidades*

La invención contempla interacciones múltiples de compilación de una biblioteca de perfiles moleculares por puesta en contacto de las LSCs de test con un grupo en crecimiento continuado de composiciones químicas que presentan toxicidades predeterminadas. Las toxicidades y los efectos biológicos de muchas composiciones químicas son ya conocidas por tests previos en animales o clínicos. Cualquier información de este tipo se anota cuidadosamente junto con las alteraciones de la expresión de genes o proteínas en las LSCs. A medida que se acumulan datos de tests sobre cierto número de composiciones químicas, o agentes, se ensamblan los mismos para formar una biblioteca. Pueden mantenerse bibliotecas separadas para cada tipo de toxicidad; preferiblemente, puede mantenerse una sola base de datos que registra los resultados de todos los tests conducidos y cualquier información de toxicidad disponible acerca de los agentes a los que se expusieron las LSCs. Preferiblemente, se anotan también los efectos biológicos. La experiencia disponible ha indicado que los efectos biológicos están asociados a menudo con, o son marcadores de, toxicidades particulares a medida que la biología de la toxicidad llega a comprenderse mejor.

En un grupo de realizaciones, se recopilan bibliotecas que comprenden perfiles moleculares de uno o más tipos de LSCs, que pueden incluir uno o más de los enumerados en la Tabla 2, puestos en contacto con una o más composiciones químicas que presentan toxicidades predeterminadas, que pueden incluir una o más de las enumeradas en la Tabla 1.

TABLA 2

Ejemplos de tipos de LSCs

Especie	Fuente	Método de aislamiento
Diversas, con inclusión de humanos, roedores, conejo, bovino	Diversas, con inclusión de hígado, páncreas, intestino, pulmón, médula ósea	Reid et al., Patente EE.UU. 5.576.207 y 5.789.246
Rata	Hígado fetal de 14 días	Reid et al., Patente EE.UU. 6.069.005
Rata	Hígado fetal de 15 días	Reid et al., Patente EE.UU. 6.069.005
Rata	Hígado adulto de 6-9 semanas	Naughton et al., EE.UU. No. de Patente 5.559.022
Rata	Hígado adulto	Faris, publicación PCT WO 00/03001
Rata o ratón	Conducto biliar común, adulto o neonatal	Pang et al., Patente EE.UU. 5.861.313

La invención contempla que cada iteración de puesta en contacto de LSCs de test con una composición química generará un patrón de expresión de genes o proteínas, o ambos, característico(s) para dicha(s) composiciones químicas y/o tipo de LSC. La determinación de la alteración en la expresión de genes o proteínas de un número razonablemente grande de compuestos químicos de toxicidad similar es deseable a fin de poder determinar patrones de expresión de genes o proteínas, o ambos, asociados con dicha toxicidad. Los cambios en los patrones de expresión de genes o proteínas en las LSCs que son comunes a las clases de fármacos que presentan toxicidades similares, servirán como perfiles moleculares sustitutivos útiles para reconocer compuestos que tendrán probablemente biología y toxicidades afines. La correlación de estas alteraciones en la expresión de genes o proteínas y las toxicidades es lo que confiere a la invención su poder predictivo con respecto a los compuestos no testados previamente.

La correlación de patrones de expresión de genes o proteínas con toxicidades puede realizarse por cualquier medio conveniente. Por ejemplo, pueden realizarse comparaciones visuales de patrones para determinar patrones asociados con diferentes tipos de toxicidades. Más convenientemente, la correlación puede hacerse por computadora, utilizando uno de los programas estadísticos discutidos en la sección siguiente. Preferiblemente, la correlación se realiza mediante una computadora utilizando métodos estadísticos no paramétricos o programas de redes neurales, dado que los programas de redes neurales están diseñados específicamente para reconocimiento de patrones. Una vez que se ha efectuado una correlación de marcadores de expresión que son biomarcadores para una toxicidad particular, puede hacerse una comparación, de nuevo convenientemente por computadora, de patrones conocidos con el patrón de expresión del gen o proteína inducido por una composición química nueva o desconocida a fin de proporcionar las coincidencias de expresión más estrechas. Los patrones pueden revisarse luego para predecir la toxicidad probable del producto químico nuevo o desconocido.

G. Tipificación y clasificación de las toxicidades de las composiciones químicas de test

Puede establecerse un perfil molecular en una composición química de test por detección de las alteraciones en la expresión de genes o proteínas en LSCs puestas en contacto con la composición química de test como se describe en las secciones anteriores. Una vez que el perfil molecular de la composición de test ha sido determinado, puede compararse el mismo con el de una composición química con toxicidades predeterminadas o, preferiblemente, con una biblioteca de perfiles moleculares de composiciones químicas con toxicidades predeterminadas. El resultado de dicha comparación proporciona información que permite predecir la probabilidad de si la composición de test es tóxica, el tipo de toxicidad o toxicidades, y el grado de toxicidad que presentaría comparada con las otras composiciones tóxicas conocidas.

Para el propósito de llevar a la práctica la invención, las predicciones de toxicidad de la composición de test basadas en sus perfiles moleculares en LSCs no tiene que ser exacta en un 100%. Para producir un impacto positivo importante sobre la eficiencia y costes de desarrollo de fármacos, es únicamente necesario aumentar moderadamente la probabilidad de que los fármacos candidato menos tóxicos y por consiguiente más satisfactorios se encuentren, por ejemplo, en la mitad superior de una lista priorizada de nuevos fármacos cabezas de serie.

Como se ha indicado en las secciones previas, las alteraciones en la expresión de genes o proteínas en LSCs expuestas a una composición química pueden ser detectadas por cualquiera de varios medios conocidos en la técnica. La expresión de proteínas determinada por MS es particularmente conveniente para tales comparaciones, dado que los datos de salida se alimentan por regla general directamente a una computadora conectada al espectrómetro de masas y están disponibles inmediatamente para una diversidad de cálculos. Si las alteraciones son susceptibles de representación gráfica, como cuando se utiliza MS como medio de detección, puede hacerse una comparación directa del efecto de la composición química sobre la expresión de las proteínas comparada con las LSCs de control. Si las alteraciones se detectan, por ejemplo, por un ELISA, que produce una lectura numérica, entonces pueden utilizarse las lecturas numéricas para cuantificar la expresión de la proteína. Para la expresión de genes, pueden correlacionarse transferencias Northern con la cantidad de RNA presente para cada RNA sondado. En los casos en que la expresión de los genes es detectada por redes de hibridación, el patrón de hibridación para ácidos nucleicos de las LSCs de test y de control proporciona una base para la comparación.

La comparación de perfiles moleculares puede hacerse por varios medios conocidos en la técnica. Usualmente, los gráficos resultantes de los cálculos pueden guardarse, por ejemplo, en carpetas de archivos o medios análogos, y examinarse visualmente para discernir patrones comunes de expresión comparados con el control, así como diferencias. Convenientemente, sin embargo, los datos pueden guardarse en y ser comparados por una computadora. Por ejemplo, están disponibles programas para comparar datos de espectrometría de masas. Una forma de comparación está basada en el uso de "cálculo sustractivo" y representación gráfica para comparar la expresión de proteínas en las LSCs de control ("muestras de control") contra la de las LSCs puestas en contacto con la o las composiciones químicas de test ("muestras de test"). En este tipo de comparación, la cantidad de cada proteína expresada por las muestras de control se sustrae de la cantidad expresada por las muestras de test. El valor de las muestras de control se representa por una línea horizontal, y cualquier proteína expresada en una cantidad diferente se representa como una línea por encima o por debajo de la línea (representando cantidades positivas y negativas comparadas con el control, respectivamente), designando la altura de la línea la cantidad por la cual la expresión de la muestra de test se diferencia de la del control. Este método concentra su atención en las diferencias en la expresión de proteínas. De manera análoga, el programa puede utilizarse también para comparar la expresión de dos o más muestras de test de tal manera que cualesquiera diferencias en los patrones de expresión pueden discernirse fácilmente. Se espera que cuanto más similar sea el patrón de expresión, tanto más similar será el efecto, y el tipo de toxicidad, de los dos agentes.

Esta forma de comparación se ilustra ulteriormente en la Figura 1, que se proporciona únicamente para claridad de discusión. La Figura 1 ilustra diferencias en proteínas nucleares expresadas por las LSCs. El panel superior, panel 1A, es una reproducción en media tinta de la lectura de un espectrómetro de masas. Observando la hoja a lo largo del eje longitudinal, la banda superior sería el espectro de masas del control, las LSCs que crecen en ausencia de composiciones químicas de test. La banda intermedia sería el espectro para las LSCs que crecen en presencia de un compuesto químico de test añadido (composición de test I), y la banda inferior de la Figura 1A sería el espectro de masas de proteínas nucleares expresadas por LSCs expuestas a un segundo compuesto químico de test (composición de test II).

Las Figuras 1B y 1C ilustran gráficamente diferencias en el nivel de expresión de proteínas entre las LSCs en contacto con una de las composiciones químicas de test ("las LSCs de test") y las LSCs de control que han crecido en medio de crecimiento estándar de tejidos sin adición de composiciones químicas. Estos paneles ilustran sustracciones computacionales de proteínas idénticas entre las respectivas LSCs de test y las LSCs de control que indican solamente aquellas proteínas que son significativamente diferentes en expresión entre las LSCs de test y las de control. Cada barra representa una sola proteína y la longitud de la barra representa la cantidad de proteína expresada por las LSCs expuestas a la composición de test comparada con la cantidad expresada por las LSCs de control. Una barra por encima de la línea central indica que las LSCs de test expresan mayor cantidad de dicha proteína que lo hacen las LSCs de control. Una barra por debajo de la línea indica que las LSCs de test expresan una menor cantidad de dicha proteína.

La Figura 1B ilustra diferencias en las proteínas nucleares expresadas por LSCs que han crecido en presencia de la composición de test I comparadas con LSCs de control. La Figura 1C ilustra las diferencias en las proteínas nucleares expresadas por las LSCs que han crecido en presencia de la composición de test II, y el control. (Tanto las LSCs de test como las de control se encontrarían en el mismo momento de diferenciación/developmento/crecimiento). En estas figuras ilustrativas, leyendo las Figuras 1B y 1C desde la izquierda, la primera barra encontrada está por encima de la línea en la misma posición para ambas figuras, pero la altura de la barra es mucho mayor en la Figura 1C. Esto indica que ambos grupos de LSCs de test expresan mayor cantidad de esta proteína que lo hace el control, pero que las células en contacto con la composición de test II expresan considerablemente más que las células en contacto con la composición de test I.

Continuando a lo largo del eje X, o peso molecular, de la Figura 1C, se muestra que las cuatro barras siguientes tienen una contrapartida en la Figura 1B. Además, en cada una de las figuras, las barras que representan las mismas tres proteínas están por debajo de la línea, en tanto que la barra para la misma cuarta proteína está por encima de la

línea. Una vez más, la altura de las líneas difiere entre las Figuras 1C y 1B. Así, en esta ilustración, para las cinco primeras proteínas nucleares detectadas, se muestra que las LSCs en contacto con las composiciones químicas de test I y II exhiben el mismo patrón de expresión de proteínas, pero con niveles de expresión diferentes. Cada una de estas proteínas, y el patrón de expresión global, sería un candidato para inclusión en un perfil que indica que una composición química desconocida, tal como un nuevo agente terapéutico potencial, tendría la toxicidad tisular de la o las composiciones de test. Inversamente, se observa que la primera proteína detectada como se ilustra en la Figura 1C a la derecha de la línea de peso molecular de 4000 Daltons, no tiene contrapartida (o al menos una contrapartida en términos de ser expresada a un nivel diferente que la de las células de control) en la Figura 1B. Esta proteína no debería considerarse como una proteína que demuestre un camino común de toxicidad tisular/orgánica de la o las composiciones químicas de test. Dependiendo de su correlación con los caminos de expresión de otras toxinas contra el mismo tejido/órgano, aquélla podría, sin embargo, estar asociada con toxicidad hacia el mismo tejido/órgano exhibida por las composiciones químicas de test. Análisis similares pueden hacerse para las otras proteínas ilustradas en los dos gráficos.

Otra forma de comparación se ilustra en las Figuras 2, 3 y 4, que se proporcionan únicamente para claridad de exposición. Estas figuras representan gráficamente las proteínas nucleares pequeñas, citoplásmicas pequeñas, y citoplásmicas grandes expresadas por muestras de control y por muestras de test expuestas a una de dos composiciones químicas, así como la cantidad de proteína expresada por las muestras. Estos gráficos pueden compararse visualmente, y las proteínas y las cantidades expresadas pueden registrarse manualmente. La Figura 2 compara la expresión de proteínas nucleares pequeñas en los tres grupos de LSC descritos anteriormente. En estos gráficos, cada barra en un panel representa una sola proteína, pero la longitud de la barra representa la cantidad relativa de proteína expresada, en lugar de una comparación de la cantidad expresada comparada con las LSCs de control. En la Figura 2, el panel superior, 2A, representa gráficamente el nivel de expresión de proteína, como se determina por espectroscopia de masas, en las LSCs no expuestas a composiciones químicas aparte de las existentes en un medio de cultivo de tejidos estándar. El panel central, 2B, ilustra el nivel de expresión de proteínas de LSCs expuestas a la composición de test I. Y el panel inferior, 2C, ilustra el nivel de expresión de LSCs en contacto con la composición de test II. En estos paneles, el nivel de expresión de la proteína, que se muestra representado en el eje Y como valor relativo, se representa en función del peso molecular, representado a su vez en el eje X. Una comparación visual de los paneles tal como se ilustran revelan que algunas de las proteínas expresadas por las LSCs expuestas a las dos composiciones químicas testadas son la misma, aunque quizás a niveles de expresión diferentes, y que otras son diferentes, y que ambas revelan un patrón de expresión diferente que lo hacen las LSCs de control no expuestas a ninguna de las composiciones.

La Figura 3 ilustra el nivel de expresión de pequeñas proteínas citoplásmicas en los mismos tres grupos de LSCs que los expuestos en el párrafo anterior. Los paneles están dispuestos en el mismo orden que en la Figura 2. Una vez más, el nivel de expresión de la proteína para cada grupo, representado gráficamente en el eje Y, se representa en función del peso molecular de las proteínas, que aparece representado en el eje X. De nuevo, una comparación visual de los paneles tal como se ilustra revela que algunas de las proteínas expresadas por las LSCs expuestas a las dos composiciones químicas testadas son iguales, aunque quizás a niveles de expresión diferentes, y que otras son diferentes.

Análogamente, la Figura 4 ilustra un análisis gráfico de las grandes proteínas citoplásmicas expresadas por los mismos grupos de LSCs discutidos anteriormente. Una vez más, el nivel de expresión determinado por la espectrometría de masas se representa en el eje Y, mientras que el peso molecular se representa en el eje X. Nuevamente, pueden observarse semejanzas claras, y diferencias claras, entre los patrones de expresión de proteínas de las LSCs expuestas a las composiciones químicas de test, y entre los patrones de expresión de dichas proteínas, y el de las LSCs que han crecido sin exposición a ninguna de las composiciones químicas de test.

De figuras tales como las anteriores se deducirá claramente que los fármacos pueden inducir patrones de expresión de proteínas complejos y singulares. Algunas proteínas estarían expresadas en menores cantidades (o “reguladas en sentido decreciente”) comparadas con la expresión proteínica en las LSCs de control, y otras estarían expresadas en cantidades mayores (o “reguladas en sentido creciente”) comparadas con los controles. Adicionalmente, las composiciones químicas pueden afectar algunas de las mismas proteínas y compartir por tanto sub-patrones comunes.

Por ejemplo, como se ilustra en la Figura 2C, a la derecha de la línea que designa un peso molecular de 2500 Daltons, se observa una línea alta, de más de 15 unidades en el eje Y, que designaría una proteína expresada fuertemente. Siguiendo la línea hacia arriba hasta los paneles 2B y 2A, se observa que la misma proteína se expresa a niveles altos tanto en las LSCs en contacto con una composición de test I como en las LSCs de control no puestas en contacto con ninguna composición. Por consiguiente, esta proteína se consideraría como expresada fuertemente en las LSCs en el momento de desarrollo en que se toman las muestras, aunque existiría cierta variación en el nivel de expresión. En cambio, continuando hacia la derecha en el panel 2C y realizando las mismas comparaciones, se observa que la siguiente proteína presente está presente, aproximadamente en la misma cantidad, en las LSCs expuestas a la composición de test I, pero no es expresada en absoluto por las LSCs de control. Por tanto, esta proteína sería un candidato para la diferenciación de composiciones químicas con la toxicidad tejido/órgano de la o las composiciones químicas de test de otras composiciones y otras clases de toxicidad.

Preferiblemente, los resultados se introducen en una base de datos de computadora, con información acerca de las toxicidades conocidas de las composiciones químicas registradas en campos de datos investigables. Las entradas de datos procedentes de otras formas de detección de alteraciones en la expresión de proteínas o genes pueden revisarse

también y registrarse manualmente o en una base de datos de computadora. Por ejemplo, los valores procedentes de un ELISA, o las proteínas identificadas en una transferencia Western pueden registrarse para identificar los tipos y cantidades de proteínas expresadas en muestras de control y de test. Análogamente, los patrones en una transferencia Northern, o el patrón de hibridación en una red de oligonucleótidos, pueden registrarse para identificar la expresión de genes de muestras de control y de test. La información puede guardarse manualmente, pero preferiblemente se mantiene en una forma investigable por computadora.

Programas estándar de bases de datos, tales como Enterprise Data Management (Sybase, Inc., Emeryville, CA) u Oracle8 (Oracle Corp., Redwood Shores, CA) pueden utilizarse para guardar y comparar información. Alternativamente, los datos pueden registrarse, o analizarse, o ambas cosas, en programas específicamente diseñados disponibles, por ejemplo, de Partek Inc. (St. Charles, Mo).

Adicionalmente, las compañías vendedoras de sistemas analíticos integrados, tales como espectrómetros de masas, proporcionan junto con las máquinas software integrado para el registro de los resultados. Compañías de este tipo incluyen Finnigan Corp. (San José, CA), Perkin-Elmer Corp. (Norwalk CT), Ciphergen Biosystems, Inc. (Palo Alto CA), y Hewlett Packard Corp. (Palo Alto, CA). Análogamente, compañías tales como Affymetrix, Inc. (Santa Clara, CA) e Incyte Pharmaceuticals, Inc. (Palo Alto, CA) que proporcionan servicios de hibridación de oligonucleótidos, mantienen algoritmos patentados de reconocimiento de imágenes para registrar y analizar las imágenes escaneadas de redes de hibridación.

En una realización preferida, los datos pueden registrarse y analizarse por tecnología de redes neurales. Las redes neurales son ecuaciones de modelización no lineales complejas que están diseñadas específicamente para reconocimiento de patrones en series de datos. Un programa de este tipo es el algoritmo de clasificación NeuroShell Classifier™ de Ward Systems Group, Inc. (Frederick, MD). Otros programas de redes neurales están disponibles, v.g., de Partek, Inc., BioComp Systems, Inc. (Redmond WA) y Z Solutions, LLC (Atlanta, GA).

H. Adaptación de lectores de red

En una realización, la invención se refiere a la formación de redes de oligonucleótidos hibridados o de proteínas fijadas para detectar cambios en la expresión de genes o proteínas, respectivamente. Tales redes pueden ser escaneadas o leídas por lectores de red.

Típicamente, el lector de red tendrá un escáner óptico adaptado para leer el patrón de identificadores en una red, por ejemplo de proteínas fijadas u oligonucleótidos hibridados, enlazado operativamente a una computadora que tiene guardado en ella, o accesible a ella (por ejemplo, en una unidad externa o a través de Internet) uno o más archivos de datos que tienen una pluralidad de perfiles de expresión de genes o expresión de proteínas de LSCs de mamífero en contacto con composiciones químicas tóxicas conocidas o desconocidas. El lector de red puede, sin embargo, estar provisto de un dispositivo de detección adecuado para "leer" identificadores que no pueden ser leídos ópticamente, tales como transpondedores electrónicos.

I. Uso en cribado de alta potencia

Los métodos de la invención pueden adaptarse fácilmente al cribado de alta potencia. El cribado de alta potencia ("HTP") es sumamente deseable debido al gran número de compuestos no caracterizados ya desarrollados en las principales compañías farmacéuticas, así como el torrente de nuevos compuestos que están siendo sintetizados actualmente por química combinatoria. Utilizando la invención, pueden testarse centenares de composiciones químicas en LSCs, y las alteraciones resultantes en la expresión de genes o proteínas, o ambas, compararse con toxicidades de composiciones químicas conocidas para predecir el tipo y posiblemente el grado de toxicidad que poseen los nuevos compuestos. Aquellas composiciones con perfiles de toxicidad aceptables pueden considerarse luego para niveles de test ulteriores.

El cribado HTP puede facilitarse utilizando sistemas de cultivo, preparación de las muestras (proteína o RNA/cDNA), y análisis automatizados e integrados. Estos pasos pueden realizarse en material de laboratorio corriente utilizando brazos robotizados estándar, o en dispositivos de microchip y microfluidos desarrollados más recientemente, tales como los desarrollados por Caliper Technologies Corp. (Palo Alto, CA), descrito en la Patente EE.UU. 5.800.690, por Orchid Biocomputer, Inc. (Princeton, NJ), descrito en el número de 25 de octubre de 1997 de New Scientist, y por otras compañías, que proporcionan métodos de análisis automático que utilizan volúmenes muy pequeños de reactivos. Véase, v.g., McCormick, R., *et al.*, Anal. Chem. (1997), 69:2626-2630; Turgeon, M., *Med Lab. Management Rept.*, diciembre de 1997, página 1.

Ejemplos

Ejemplo 1

5 Selección de compuestos químicos para cribado de toxicidad

Composiciones que caen en categorías de toxicidad particulares se utilizan para establecer perfiles moleculares y recopilar bibliotecas para toxicidades particulares. La Tabla 1 enumera varias composiciones que se sabe son tóxicas para ciertos tejidos u órganos o durante etapas del desarrollo. En particular, aquellas composiciones que causan toxicidades hepáticas se evalúan respecto a sus perfiles moleculares por determinación de las alteraciones de los patrones de expresión de genes o proteínas en las LSCs en contacto con cada composición. De este modo se recopila una biblioteca que comprende perfiles moleculares de composiciones que presentan toxicidades hepáticas. Aquellas composiciones que causan toxicidades cardiovasculares se evalúan análogamente respecto a sus perfiles moleculares y se recopila una biblioteca. Adicionalmente, perfiles moleculares y bibliotecas de los mismos respecto a composiciones que presentan toxicidades sobre el sistema nervioso central y para composiciones que presentan toxicidades experimentales se establecen de modo análogo utilizando el sistema LSC. Los procedimientos experimentales descritos arriba en general, y con mayor detalle en los ejemplos que se dan más adelante, siguen para recopilar los perfiles moleculares y bibliotecas para composiciones con tipos de toxicidades particulares.

Fármacos con actividades conocidas o sospechosos de exhibir actividades contra enfermedades particulares pueden utilizarse para establecer perfiles moleculares y bibliotecas para evaluación de toxicidad. Los fármacos antineoplásicos con toxicidades similares, por ejemplo los enumerados en la Tabla 1, pueden utilizarse para recopilar perfiles moleculares por determinación de las alteraciones en los patrones de expresión de genes o proteínas en LSCs expuestas a estos fármacos. Análogamente, antibióticos con toxicidades similares pueden evaluarse también respecto a sus alteraciones en los patrones de expresión de genes o proteínas en LSCs. Se utilizan también fármacos de control de la diabetes, fármacos para reducción de los niveles de lípidos, o fármacos antiinflamatorios. Una vez que se ha establecido una biblioteca compuesta que comprende perfiles moleculares de tipos específicos de fármacos que presentan toxicidades similares, puede utilizarse la misma para cribado respecto a nuevos fármacos cabezas de serie de tipo similar respecto a sus toxicidades potenciales. Una vez más, los procedimientos experimentales descritos arriba en general, y con mayor detalle en los ejemplos que se dan a continuación, siguen para recopilación de los perfiles moleculares y bibliotecas, y para tipificación/clasificación de las toxicidades de nuevos fármacos cabeza de serie.

35 Ejemplo 2

Establecimiento de perfiles de proteínas para agentes químicos en relación con las toxicidades para tejidos/órganos

Este ejemplo demuestra el cultivo de células madre hepáticas, la exposición de las células madre hepáticas a diferentes agentes químicos que presentan toxicidades de tejidos u órganos predeterminadas, y la determinación de los cambios en la expresión de proteínas en las células madre hepáticas.

Aislamiento de las células

Células progenitoras de hígado humano se aíslan, purifican y expanden en cultivo de acuerdo con los métodos descritos a continuación:

Método 1

Se aíslan células precursoras hepáticas de acuerdo con Reid *et al.*, Patentes EE.UU. Núms. 5.576.207 y 5.789.246. Resumidamente, se introduce una porción de hígado en una solución de PBS enfriada en hielo que contiene 500-5000 mg/l de glucosa, y 2-10% de antibióticos (v.g., penicilina y estreptomycin). La porción de hígado se desmenuza y se digiere secuencialmente con una solución que contiene colagenasa, pronasa y desoxirribonucleasa, preparada en una solución salina que contiene CaCl_2 1 mM. La digestión se efectúa a 37°C en un baño de agua agitada mediante sacudidas durante aproximadamente 20 minutos. El tejido parcialmente digerido se tamiza luego a través de un tamiz de tejidos por gravedad y los residuos no digeridos se digieren de nuevo dos veces. Las células recogidas se lavan luego con solución salina. Las células se extienden sobre o en el interior de una matriz de colágeno Tipo IV a fin de dejar que las mismas se polaricen y se alimenten a través de una superficie basal tal como un soporte Millicell. Las células fijadas a la matriz se proveen de una capa alimentadora de células estromales derivadas de hígado embrionario, y se cultivan en un medio basal (v.g., RPMI1640, Ham's F10, Ham's F12) que contiene calcio en concentración menor que 0,4 mM y 10 $\mu\text{g/ml}$ de insulina, 10 $\mu\text{U/ml}$ de hormona del crecimiento, 20 mU/ml de prolactina, 10 $\mu\text{g/ml}$ de glucagón, 50 ng/ml de EGF, dexametasona 10^{-8} M, T3 10^{-9} M, selenio 3×10^{-10} M, cobre 10^{-7} M y cinc 10^{-10} M (el medio que contiene lo anterior se designa en lo sucesivo como "medio A"). Alternativamente, el medio contiene además 0,4% de seroalbúmina bovina, 76 mEq por litro de una mezcla de ácidos grasos libres que contiene 31% de ácido palmítico, 2,8% de ácido palmitoleico, 11,6% de ácido esteárico, 13,4% de ácido oleico, 35,6% de ácido linoleico y 5,6% de ácido linolénico (el medio que contiene lo anterior se designa en lo sucesivo como "medio B"). Puede utilizarse también medio A o B que contiene dexametasona 10^{-6} M, 0,1 a 100 $\mu\text{g/ml}$ de insulina, 50 ng/ml de actividad multiestimulante (Sigma Chemical Co. St. Louis, Mo), 25 a 100 ng/ml de EGF, norepinefrina 10^{-4} M,

ES 2 334 639 T3

25 $\mu\text{l/ml}$ de hepatopoyetinas y 10 ng/ml de FGF's. Las células hepáticas precursoras obtenidas por este método se analizan de acuerdo con la presente invención como se describe más adelante.

Método 2

Se aíslan hepatoblastos de acuerdo con los métodos descritos en Reid *et al.*, Patente EE.UU. No. 6.069.005. Resumidamente, se disecan hígados de fetos de rata del día de gestación 14, y se ponen en solución salina reciente de Hank, enfriada en hielo (HBSS). Una vez que se han recogido todos los tejidos y se ha separado el tejido no hepático, se añade HBSS-EGTA 5 mM hasta una concentración final de EGTA de 1 mM. Se trituran luego suavemente los hígados, 6 a 8 veces para disgregar parcialmente el tejido y se centrifugan después a 400 g durante 5 minutos a 4°C. Todos los pasos de centrifugación subsiguientes se realizan con los mismos ajustes. Se retira el sobrenadante y el sedimento de células y tejido se resuspende en colagenasa D al 0,6% (Boehringer Mannheim, Indianapolis, Ind) en HBSS que contiene CaCl_2 1 mM, se desmenuza suavemente y se agita luego a 37°C durante 15 minutos. Las células dispersadas se reagrupan, se suspenden en HBSS que contiene EGTA 1 mM y se filtran a través de un colector de tejidos de 46 μm (Bellco Glass, Inc., Vineland, N.Y.). La suspensión de células se centrifuga y las células resuspendidas en HBSS se refuerzan con aminoácidos MEM, vitaminas MEM, aminoácidos no esenciales MEM, insulina (10 $\mu\text{g/ml}$) transferrina saturada de hierro (10 $\mu\text{g/ml}$), ácidos grasos libres (7,6 mEq/l), elementos traza, albúmina (0,1%, fracción V, exenta de ácidos grasos, Miles Inc., Kankakee, Ill.), mio-inositol (0,5 mM) y gentamicina (10 $\mu\text{g/ml}$), Gibco BRL, Grand Island, N.Y.) (HBSS-MEM). El número y la viabilidad de las células se determinan por hemocitómetro y exclusión con azul tripán.

Para eliminar las células eritroides, se utilizan cápsulas de lavado en batea preparadas de acuerdo con el procedimiento estándar con una RBC IgG anti-rata de conejo (Rockland Inc., Gilbertsville, Pa.). Los anticuerpos (0,5 mg/cápsula) diluidos en Tris 0,05 M de pH 9,5 se vierten en cápsulas petri bacteriológicas de poliestireno de 100 mm² (Falcon, Lincoln Park, N.J.). Las cápsulas se someten a rotación para recubrir uniformemente la superficie y se incuban a la temperatura ambiente durante aproximadamente 40 minutos. Las cápsulas recubiertas se lavan cuatro veces con PBS y una sola vez con HBSS que contiene 0,1% de PSA antes de su utilización.

Suspensiones de células que contienen hasta 3×10^7 células se incuban a 4°C durante aproximadamente 10 minutos en las cápsulas recubiertas con la RBC IgG anti-rata de conejo. Las células no adherentes se separan por aspiración y las placas se lavan 3 veces con HBSS-0,1% BSA-EGTA 0,2 mM, y se centrifugan. El sedimento de células se resuspende en HBSS-MEM, y se repite el lavado en batea de los RBC. Después del segundo lavado en batea de los RBC, se determinan de nuevo el número y la viabilidad de las células.

Las células recuperadas después del lavado en batea de los RBC se marcan luego en suspensión por incubación con anticuerpo monoclonal de ratón OX-43 (1/200 = 15 $\mu\text{g/ml}$, MCA 276, Bioproducts for Science, Indianapolis Ind.) y anticuerpo monoclonal 374.3 (1/500-1/750, disponible de R. Faris y D. Hixon, Brown University, Providence, R.I.) simultáneamente a 4°C durante 40 minutos. Los anticuerpos secundarios son IgG anti-ratón conjugada con PE, específico de cadena pesada (Southern Biotechnology Inc., Ala.) e IgM anti-ratón conjugada con FITC, específica de cadena pesada (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo).

Las células se mantienen antes y después de la clasificación a 4°C y en HBSS-MEM. Después de la marcación con anticuerpos, se añade a cada muestra yoduro de propidio a 10 $\mu\text{g/ml}$. La clasificación de las células activada por fluorescencia se realiza con un instrumento Becton Dickinson FACSTAR⁺ (San José, CA) utilizando un láser de argón de 4 W con 60 mW de potencia y una tobera de 100 μm . Se recoge la emisión fluorescente a 488 nm de excitación después de pasar a través de un filtro de paso de banda de 530/30 nm para FITC y 585/42 nm para PE. Las medidas de fluorescencia se realizan utilizando amplificación logarítmica en gráficos biparamétricos de FL1 (FITC) frente a FL2 (PE). Las células se consideran positivas cuando la fluorescencia es mayor que 95% de las células de control negativas.

Para la medida de las características físicas de las células, los parámetros FACSTAR⁺ son ganancia 8 FSC y ganancia 8 SSC. Como fluido de envoltura se utiliza HBSS. Se obtienen datos en modo de registro y se analizan utilizando software LysisII.

Para determinar la positividad para un solo anticuerpo se utilizan gráficos de puntos de fluorescencia en función de la dispersión lateral. Se utilizan gráficos de densidad FL1 frente a FL2 para seleccionar poblaciones con respecto a la expresión de ambos antígenos. Se utiliza un módulo de mejora de clase para discriminación no rectangular y el uso de discriminación multiparamétrica para seleccionar poblaciones de interés.

Las células clasificadas de todas las poblaciones se extienden en placas en un medio exento de suero y definido hormonalmente con α -MEM como el medio basal al que se añaden los siguientes componentes: insulina (10 $\mu\text{g/ml}$); EGF (0,01 $\mu\text{g/ml}$, Upstate Biotechnology, Lake Placid, N.Y.); hormona de crecimiento (10 $\mu\text{U/ml}$); prolactina (20 mU/ml); Triiodotironina (10^{-7} M); dexametasona (10^{-7} M); transferrina saturada de hierro (10 $\mu\text{g/ml}$); ácido fólico (10^{-8} M, Gibco BRL, Grand Island, N.Y.), mezcla de ácidos grasos libres (7,6 mEq/l; Nu-Chek-Prep, Elysian, Minn.); putrescina (0,02 $\mu\text{g/ml}$); hypoxantina (0,24 $\mu\text{g/ml}$); timidina (0,07 $\mu\text{g/ml}$); albúmina de bovino (0,1%, fracción V, exenta de ácidos grasos, Miles Inc. Kankakee, Ill.); elementos traza; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0,000025 mg/l), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,8 mg/l), $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,0000024 mg/l), $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (0,0012 mg/l), $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0,000012 mg/l), NH_4VO_3 (0,000058 mg/l), H_2SeO_3 (0,00039 mg/l); Hepes (31 mM) y Gentamicina (10 $\mu\text{g/ml}$, Gibco BRL, Grand Island, N.Y.)

[HDM]. Los reactivos son suministrados por Sigma Chemical Company, St. Louis, Mo., a no ser que se especifique otra cosa. La mezcla de elementos traza está disponible de Dr. I. Lemishka, Princeton University, NJ.

Partes alícuotas de cada población cultivada, así como centrifugados de diversas suspensiones de células se fijan con etanol o acetona enfriados en hielo. Después de bloqueo con PBS que contiene 1% de BSA durante 30 minutos a la temperatura ambiente, las células fijadas se estudian por inmunofluorescencia indirecta utilizando los anticuerpos primarios siguientes: albúmina policlonal anti-rata de conejo (United States Biochemical Corporation, Cleveland, Ohio), antisero AFP anti-ratón de conejo (ICN Biomedical, Inc., Costa Mesa, Calif.), citoqueratina 19 monoclonal anti-humano de ratón (Amersham Life Science, Arlington Heights, Ill.), receptor IGF II policlonal anti-humano de conejo (Dr. Michael Czech, University of Worcester, Mass.), Thy-1 monoclonal anti-rata de ratón (OX-7, Bioproducts for Science, Indianapolis, Ind.), anti-desmina monoclonal de ratón (Boehringer Mannheim, Indianapolis, Ind.), y 258,26, un anticuerpo monoclonal anti-rata de ratón que identifica hepatocitos postnatales así como algunas células parenquimáticas de hígado fetal (Drs. R. Faris y D. Hixon, Brown University, RI). Los segundos anticuerpos incluyen anticuerpos conjugados con Rodamina específicos de especie, correspondientes a los anticuerpos primarios. Los controles negativos están constituidos por células teñidas con IgG de ratón o de conejo, o controles isotipo de ratón. Como controles positivos se utilizan hepatocitos adultos recién aislados para tinción de albúmina. Se ensaya gamma-glutamyltranspeptidasa (GGT) por inmunquímica en células fijadas con etanol utilizando el método descrito por Rutenberg *et al.*, *J. His. Cyt.* (1969), vol. 17, pp. 517-526.

La población de células que contiene fundamentalmente células hepáticas progenitoras inmaduras se identifica como la población que expresa albúmina, alfa-fetoproteína y GGT. En algunos casos, la identidad de las células se confirma por análisis mediante transferencia Northern y/o Western para marcadores de estas células, que se describen en esta memoria y son conocidos en la técnica.

Las células hepáticas progenitoras obtenidas se mantienen en HDM y se analizan de acuerdo con la presente invención como se describe más adelante.

Método 3

Se disecan hígados de fetos de rata el día 15 de la gestación y se ponen en HBSS exento de Ca^{2+} y enfriado en hielo, que contiene MgCl_2 0,8 mM, HEPES 20 mM, pH 7,3 y se agitan suavemente a la temperatura ambiente durante aproximadamente 1 minuto. Después de la separación del tejido no hepático, los hígados se trituran suavemente y se agitan luego a 37°C durante aproximadamente 10-15 minutos con collagenasa Tipo IV al 0,6% (Sigma Chemical Co., Lote 11H6830, St. Louis, Mo.) en HBSS que contiene CaCl_2 1 mM, y 0,06% de DNasa I (Boehringer Mannheim, Indianapolis, Ind). A intervalos de 5 minutos, se dejan sedimentar los fragmentos de tejido a 1 g. Se recupera el sobrenadante y se añade solución reciente de collagenasa. Las células dispersadas se reagrupan, se suspenden en HBSS que contiene EGTA 5 mM y se filtran a través de un colector de tejidos de 46 μm (Bellco, Glass, Inc., Vineland, N.Y.) a 1 g. La suspensión de células resultante se centrifuga a 4°C durante aproximadamente 5 minutos a 450 g. El sedimento de células se resuspende en HBSS que contiene EGTA 0,2 mM y 0,5% de BSA (HBSS-EGTA-0,5% BSA), y se estima el número de células. Se evalúa la viabilidad de las células por exclusión con azul tripán al 0,04%, y una parte alícuota de la suspensión se centrifuga a 450 g durante aproximadamente 5 minutos.

Para fijar por inmunoadherencia las células hemopoyéticas y endoteliales sobre cápsulas de poliestireno recubiertas con anticuerpos, se preparan cápsulas de lavado en batea de acuerdo con procedimientos estándar con RBC IgG anti-rata de conejo (Inter-Cell Technologies, Inc., Hopewell, N.J.) e IgG de cabra dirigida hacia la molécula IgG entera de ratón (M-3014, Sigma, St. Louis, Mo.). Los anticuerpos (0,5 mg/cápsula) diluidos en Tris 0,05 M de pH 9,5 se vierten en cápsulas petri bacteriológicas de poliestireno de 100 mm² (Flacon, Lincoln Park, N.J.) hasta recubrir uniformemente la superficie y se incuban a la temperatura ambiente durante aproximadamente 40 minutos. Las cápsulas recubiertas se lavan con PBS y luego con HBSS que contiene 0,1% de BSA antes de ser utilizadas.

Se incuba una suspensión de células que contiene hasta 3×10^7 células a 4°C durante 10 minutos en las cápsulas recubiertas. El sobrenadante que contiene las células no adherentes se retira por aspiración suave mientras se inclina y se hace girar, combinado con lavados HBS-EGTA-0,1% BSA, y se centrifuga a 4°C durante aproximadamente 5 minutos 450 g. Se reagrupan las células y se someten nuevamente a lavado en batea con una cápsula nueva recubierta con RBS IgG anti-rata de conejo. Las células no adherentes se retiran luego como anteriormente y se resuspenden con HBS-EGTA-0,5% BSA hasta una concentración de $1 \times 10^7/\text{ml}$. Los hepatoblastos enriquecidos se incuban luego simultáneamente a 4°C durante 40 minutos con anticuerpo monoclonal de conejo OX-43 (15 $\mu\text{g}/\text{ml}$, MCA 276, Serotec, Indianapolis, Ind.). Después del lavado, se consigue el enriquecimiento en hepatoblastos por lavado de las células en batea a 4°C durante 10 minutos en una cápsula recubierta con el anticuerpo IgG anti-ratón de cabra entero. Las células no adherentes se retiran como en el caso anterior.

Las células hepáticas progenitoras obtenidas se mantienen en HDM (véase el método 3 anterior) y se analizan de acuerdo con la presente invención como se describe más adelante.

Método 4

Las células hepáticas progenitoras se aíslan de acuerdo con los métodos descritos en Naughton *et al.*, patente EE.UU. No. 5559022. Resumidamente, se extirpa el hígado de ratas adultas de acuerdo con procedimientos estándar.

Se pone el hígado en un embudo de Buchner modificado y se somete a perfusión con un tampón que contiene Ca^{2+} y 0,05 g/dl de colagenasa Tipo IV (Sigma Chemical Co., Mo) en un sistema mantenido en recirculación durante aproximadamente 15-20 min. Se transfiere luego el hígado a una cápsula petri que contiene tampón de colagenasa reforzado con 1,5% de BSA y los hepatocitos se liberan en suspensión después de la perforación de la cápsula de Glisson, se filtran a través de un tamiz de nailon de 185 μm , se reducen a un sedimento por centrifugación, y se resuspenden en medio DMEM completo, acondicionado con 6% de suero bovino fetal y 10% de suero equino, y reforzado con 35 μl de glucagón (Sigma #G9261), 10 μg de insulina (Sigma #14011), 0,25 g de glucosa, y 250 μl de hemisuccinato de hidrocortisona por cada 500 ml de medio. Las células hepáticas se separan en subpoblaciones utilizando centrifugación en gradiente Percoll.

Para obtener células hepáticas progenitoras, se separa una población de células acidófilas grandes (aproximadamente 30 μm de diámetro), que proliferan y se diferencian en cultivo a células que se asemejan a hepatocitos maduros, como sigue: dispersiones de células simples de células hepáticas aisladas recientemente se centrifugan (500 x g/5 min) y el sedimento se resuspende en un medio. La suspensión de células se estratifica sobre 25 ml de una solución al 70% v/v de Percoll "neto" y 1 x BPS y se centrifuga a 800 x g durante 10 min. Se reagrupan las dos zonas inferiores (de 4), se lavan, y se centrifugan contra un gradiente discontinuo 25%/50% (v/v, Percoll neto/1 x PBS), obteniéndose una zona distinta de interfase y un sedimento. La interfase (densidad = 1,0381 g/ml) está constituida por aproximadamente 90% de células grandes, ligeramente acidófilas, mono- o binucleares con nucléolos prominentes múltiples. Las células precursoras hepáticas obtenidas por este método se analizan luego de acuerdo con la presente invención como se describe más adelante.

Método 5

Se aíslan células hepáticas progenitoras de acuerdo con los métodos descritos en Faris, publicación PCT WO 00/03001. Resumidamente, se extirpa el hígado, se desmenuza y se pone en un tampón de suspensión que contiene HBSS con Hepes 0,1 M. El tejido desmenuzado se incuba a 37°C en una placa provista de agitación durante aproximadamente 40-50 minutos. La suspensión combinada se filtra secuencialmente a través de un filtro de malla de acero de 230 micrómetros, y un filtro de malla de nailon de 60 micrómetros. Los residuos que quedan en los filtros se separan por lavado y se ponen en un tampón de digestión, que es una solución de medio CMF (Gibco) que contiene 0,02 g de seroalbúmina bovina, Hepes 0,1 M, CaCl_2 (500 mM), STI (0,025 g/100 ml; Gibco) y colagenasa Tipo IV (60 unidades/ml), @ pH 7,4-7,5. Las células se incuban a 37°C en un baño de agua provisto de agitación. Después de 20 minutos, la suspensión de células se separa en un tubo y se deja sedimentar por gravedad.

Se separan luego el sobrenadante y el residuo (material sedimentado). Se decanta el sobrenadante y se centrifuga a 80 x g durante 5 minutos. Se añade a las células tampón de digestión reciente y se ponen de nuevo las células en un baño de agua provisto de agitación. El sedimento remanente después de la centrifugación se resuspende con tampón de lavado (DMEM-F12 y BSA (1 g/100 ml), @ pH 7,2-7,3).

La suspensión de células se filtra a través de un filtro de malla de nailon de 60 micrómetros y se mezcla luego con un volumen igual de 90% Percoll y 10% DMEM-F12 10 x. Se centrifuga el todo a 300 x g durante aproximadamente 5 minutos. Se resuspende el sedimento en tampón de lavado (como se ha descrito arriba), y se centrifuga a 120 x g durante aproximadamente 5 minutos. El sedimento se resuspende luego en tampón de lavado.

Se añaden a la suspensión de células Dinabeads conjugadas a un anticuerpo monoclonal de ratón específico para el conducto biliar de rata y células mesoteliales (IgG_{2b}), y se incuban a 4°C en un rotor durante aproximadamente 10 minutos. Se pone luego la suspensión sobre un imán para separar las células positivas al anticuerpo, que se desechan. Este paso se repite como mínimo 3 veces más. Las células negativas al anticuerpo se someten a más incubaciones con Dinabeads conjugadas a un anticuerpo específico para CCAM (v.g., cell-CAM 105 anti-rata; Endogen), y las células positivas al anticuerpo con una célula madre fijada (v.g., agrupaciones de células tales como dobletes y tripletes) se cultivan y se someten a citocentrifugación.

Las agrupaciones de células aisladas se tripsinizan para disociar las agrupaciones de células, y se exponen luego a anticuerpos específicos para marcadores de células tales como CK19 (Amersham), CCAM (Endogen), dipeptidil-peptidasa-4 (Endogen) en combinación con cuentas magnéticas o clasificación FACS para enriquecimiento en las células madre.

Las células precursoras hepáticas obtenidas por este método se analizan de acuerdo con la presente invención como se describe a continuación.

Exposición de las células a la composición química de test y métodos de análisis de la expresión de proteínas

Las células aisladas como se ha descrito arriba se extienden en placas a alta densidad (v.g., 50.000 a 100.000 células/cm² por pocillo) en pocillos recubiertos con colágeno tipo I extraído de tendón de cola de rata, para permitir la diferenciación de las células. Un fármaco con toxicidad predeterminada, tal como troglitazona, que es un fármaco diseñado para el control de la diabetes que ha demostrado toxicidad hepática rara pero grave y ha sido retirado recientemente del mercado, se añade a una concentración final de aproximadamente 20 μM a un grupo de placas (grupo "A") que contienen las LSCs. El mismo día, otro fármaco con toxicidad predeterminada, tal como eritromicina estolato (Sigma, número de catálogo E8630), que es una forma de eritromicina con toxicidad hepática conocida, se añade a un

ES 2 334 639 T3

segundo grupo de placas (grupo “B”) a una concentración final de aproximadamente 50 μ M. Un tercer grupo de placas que contienen las células cultivadas (grupo “C1”) se cultiva sin ningún fármaco añadido para servir como control. Adicionalmente, placas que contienen únicamente medio de cultivo de tejidos (grupo “C2”) se cultivan junto con las que contienen células cultivadas como control para la degradación de las proteínas en el medio de cultivo. Después de un periodo de exposición de las células a los fármacos, por ejemplo después de aproximadamente 10, 20, 30 y 40 días, se cosechan los cultivos, se lavan las células con un tampón tal como PBS, y se someten luego a lisis en un tampón que contiene, por ejemplo, PBS, 0,5% de Triton X-100 durante aproximadamente 10 minutos en hielo. Los núcleos se reducen a un sedimento, y el sobrenadante se retira y se guarda a -80°C hasta su análisis. Los núcleos se someten a lisis en un tampón tal como PBS con 0,2% de SDS y se tratan en un homogeneizador Dounce para cizallar el DNA. El material insoluble se reduce a un sedimento y los lisados nucleares se guardan a -80°C hasta su análisis. Se toman también lisados citoplásmicos y nucleares el día 0 antes de la exposición a cualesquiera composiciones químicas de test para servir como controles adicionales.

Los lisados y las muestras de medio se diluyen, por ejemplo, tres veces en tampón que contiene Tris-HCl 50 mM a pH 8, y NaCl 0,4 M. Se ponen muestras alícuotas de lisado diluido o medio en una columna giratoria de clasificación que fracciona la muestra con un punto de corte por tamaño de, por ejemplo, 30 kD y se equilibran en Tris-HCl 50 mM, pH 8 y NaCl 50 mM. La columna se centrifuga a una fuerza apropiada durante un periodo apropiado, tal como 700 g durante 3 minutos, para cada fracción. Se recogen fracciones múltiples de aproximadamente 25 μ l para cada columna utilizando el tampón de columna equilibrado.

Las muestras se distribuyen por desorción/ionización láser intensificada en la superficie (“SELDI”), y las proteínas se detectan por espectroscopia de masas. SELDI permite la captura de las proteínas en una superficie de elección, la cual puede lavarse luego a severidad seleccionada, para permitir el fraccionamiento de acuerdo con las características deseadas, tales como afinidad para iones metálicos de la superficie utilizada para la captura.

Se utilizan chips Ciphergen de fase normal (Ciphergen Biosystems, Palo Alto, CA) para distribuir las proteínas en las fracciones generadas por las columnas de centrifugación. Se depositan partes alícuotas de aproximadamente 1 μ l de cada fracción en una mancha del chip, y la muestra se seca al aire a la temperatura ambiente durante aproximadamente 5 minutos. Se aplica a cada mancha una mezcla de aproximadamente 0,5 μ l de ácido sinapínico saturado (“SPA”) en acetonitrilo al 50% con 0,5% de ácido trifluoroacético (“TFA”). El chip se deja secar de nuevo al aire durante aproximadamente 5 minutos a la temperatura ambiente, y se aplica una segunda parte alícuota de la mezcla de SPA.

Se leen los chips por el lector Ciphergen Protein Biology System 1. Los ajustes ilustrativos del lector son como sigue. Se utiliza modo automático para la recogida de datos, en el ajuste de cuantificación SELDI. Se recogen dos series de perfiles de proteínas, una a intensidad de láser baja (a 15 con filtro retirado) y una a intensidad de láser alta (a 50 con filtro retirado), y ajuste del detector a 10. Se realizan un promedio de 15 disparos por localización en la misma mancha de muestra. Se comparan los perfiles de proteínas de diferentes lisados utilizando software SELDI (Ciphergen Biosystems, Palo Alto, CA). Este programa asume que dos proteínas con un peso molecular dentro de aproximadamente 1% una de la otra son la misma. El mismo cuantifica luego los resultados, compara las muestras de test contra las muestras de control, e imprime un gráfico que muestra la cantidad de cada proteína en el control como una línea horizontal, con cualquier reducción o exceso en la cantidad de cada proteína en la muestra de test comparada con la cantidad de dicha proteína en la muestra de control como una línea por debajo o por encima de la línea que representa el control.

Ejemplo 3

Cribado de fármacos anti-cáncer respecto a toxicidad en tejidos y órganos

Este ejemplo ilustra la utilización del sistema LSC para cribado de agentes anticáncer respecto a su toxicidad en tejidos u órganos.

Compuestos y fármacos (tanto anti-cáncer como terapéuticos) que presentan toxicidades conocidas y puntos finales biológicos en humanos y/o animales se seleccionan para recopilación de sus perfiles de expresión de genes o proteínas en LSCs. Adicionalmente, se seleccionan compuestos con mecanismos de actividades afines conocidos y con relación a compuestos que se han utilizado en estudios previos para correlacionar los resultados clínicos con los efectos de cultivo en células humanas *in vitro*. Tabla 3.

TABLA 3

FÁRMACOS	TOXICIDADES						MECANISMO
	DEV. HÍGADO	CV	GI	CNS	RENAL	SANGRE	
Cloroquinoxalina		+			+		?
Sulfonamida							
Didemnina B			+				?
Cyclosofosfamida		+					alquilador
Bizelesina						+	alquilador
carboplatino			+			+	alquilador
cisplatino			+		+	+	alquilador
oxaliplatino				+			alquilador
ecteinascidina 743						+	alquilador
penclomedina				+			alquilador
metotrexato	+	+					anti-metabolito
fuzarabine						+	anti-metabolito
fludarabina			+			+	anti-metabolito
flavopiridol		+					inhibidor CdK
doxorubicina						+	intercalador de DNA
amonafide		+				+	intercalador de DNA
daunorrubicina						+	inhib. sint. DNA
gemcitabina						+	inhib. sint. DNA
etoposido		+					inhib. sint. DNA
desoxiespergualina						+	inmunosupresión
camptotecina						+	inhibidor topo-I
9-aminocamptotecina					+	+	inhibidor topo-I
topotecán						+	inhibidor topo-I
merbarona						+	inhibidor topo-II
dolastatina 10	+					+	inhibidor de tubulina
taxol	+					+	inhibidor de tubulina
vinblastina	+		+			+	inhibidor de tubulina
vincristina	+					+	inhibidor de tubulina
vindesina							inhibidor de tubulina
vinorelbina							inhibidor de tubulina
"Dev" = en desarrollo "GI" = gastro-intestinal "CV" = cardiovascular "CNS"							
= sistema nervioso central							

A. Establecimiento de los perfiles de expresión de genes

El patrón de expresión de genes de un compuesto seleccionado se mide y se cuantifica utilizando microrredes de cDNA y se normaliza con diferenciación celular. El patrón de expresión de genes del compuesto se compara con un cultivo de control de LSC no expuestas al compuesto o, en caso apropiado, cultivos LSC tratados con fármacos afines con función o toxicidad limitante de las dosis similares. Por recopilación de los perfiles de expresión de genes para cierto número de agentes anti-cáncer que tengan toxicidades similares o afines, se disciernen las alteraciones comunes en la expresión génica y se correlacionan con las toxicidades, y se utilizan como perfiles sustitutivos para evaluar las toxicidades de fármacos candidato anti-cáncer de test.

La microrred de cDNA puede ser una cualquiera de muchas clases que son conocidas y están disponibles en la técnica, por ejemplo, como se describe en Shalon *et al.*, (1996), *Genome Res* 6: 639-645. Las microrredes de cDNA

5 permiten la monitorización simultánea de la expresión de miles de genes, por comparación directa de células de control y tratadas químicamente. Marcadores de secuencia con expresión en 3' (ESTs) se disponen en redes y se aplican como manchas sobre portaobjetos de vidrio de microscopio con una densidad de centenares a millares por portaobjetos utilizando sistemas robóticos de alta velocidad. Se generan sondas fluorescentes de cDNA a partir de los RNAs de control y de test utilizando una reacción de transcriptasa inversa con dUTP marcado utilizando agentes fluorescentes que excitan a dos longitudes de onda diferentes, a saber Cy3 y Cy5, lo que permite la hibridación del RNA tanto de control como de test al mismo chip para comparación directa de la expresión génica relativa en cada muestra. La señal fluorescente se detecta utilizando un microscopio confocal de barrido modificado especialmente por ingeniería. Puede utilizarse una colección de 15.000 clones humanos verificados en secuencia y 8700 clones de ratón en la marcación de las microrredes de cDNA. Estas microrredes son ideales para el análisis de patrones de expresión génica en cultivos de LSC tratados con una diversidad de agentes.

15 Otro ejemplo de análisis de microrredes se describe en Lockhart *et al.*, patente EE.UU. No. 6.040.138. En este método, RNA o cDNA marcados procedentes de células diana se hibridan a una red de alta densidad de sondas oligonucleotídicas donde la red de alta densidad contiene sondas de oligonucleótidos complementarias a subsecuencias de ácidos nucleicos diana en la muestra de RNA o cDNA. Sondas de oligonucleótidos 20-meros preparadas como se describe en Lockhart *et al.*, *supra*, se disponen en redes en un portaobjetos planar de vidrio. Los RNAs marcados se generan a partir de LSCs de control y de test utilizando métodos conocidos en la técnica, tales como la incubación de células en presencia de nucleótidos marcados. Alternativamente, se preparan cDNAs marcados a partir de RNAs de las células de test y de control utilizando una reacción de transcripción inversa con nucleótidos marcados, tales como dUTP utilizando agentes fluorescentes que excitan a longitudes de onda diferentes. La señal del RNA o cDNA marcado puede ser leída por un microscopio de fluorescencia de barrido confocal iluminado por láser. La microrred en este método es capaz de monitorizar simultáneamente más de 10.000 genes diferentes.

25 Resumidamente, se aíslan los RNAs de las LSCs de control y tratadas. El RNA total se prepara utilizando el kit RNAeasy de Qiagen. Subsiguientemente, se marcan los RNA con Cy3 o Cy5 dUTP en una tanda simple de transcripción inversa. Los cDNAs marcados resultantes se mezclan en un volumen concentrado y se hibridan a las redes. Las hibridaciones se incuban durante una noche a 65°C en una cámara diseñada ex-profeso que impide la evaporación. A continuación de la hibridación, el chip se escanea con un escáner de láser confocal diseñado ex-profeso que proporcionará una señal de salida de la intensidad de cada mancha en la red tanto para el canal Cy3 como para el Cy5. Los datos se analizan luego con un paquete de software que contiene extensiones adicionales. Estas extensiones permiten la integración de una señal a través de cada mancha, normalización de los datos a un panel de genes "internos" (housekeeping), y cálculos estadísticos para generar una lista de genes cuyas relaciones son resultados aberrantes o han cambiado significativamente por el tratamiento. Además del software de análisis de imágenes, se utilizan paquetes informáticos tales como Spot-Fire y GeneSpring, los dos cuales están disponibles comercialmente, para permitir la re-agrupación y el análisis de genes en experimentos múltiples a través de dosis y/o tiempo. La tecnología de microrredes de cDNA, en general, está siendo validada todavía como técnica viable para proporcionar datos cuantitativos. Si bien la relación rojo/verde proporciona datos cualitativos satisfactorios acerca del nivel relativo de expresión de un gen en una población frente a la otra, no es un valor absoluto del nivel de inducción/regulación decreciente de dicho gen. Cada par de muestras en las redes se hibrida por triplicado. Los valores aberrantes que son inducidos o suprimidos consistentemente en dos de los tres experimentos de hibridación se validan ulteriormente por un método de cuantificación tradicional de RNA, tal como transferencia Northern o RT-PCR.

45 Cada fármaco se testa al menos tres veces en cultivos LSC separados respecto a sus efectos sobre el crecimiento, la diferenciación y la expresión del RNA. Los recuentos de células (crecimiento), cantidad de células que expresan/no expresan y/o exhiben un marcador/característica de diferenciación (diferenciación y niveles de RNA/datos de microrredes de cDNA (expresión de RNA) se promedian para los tres o más experimentos y se determina el valor medio y el error estándar del valor medio (SEM). Todos los resultados se normalizan utilizando aproximadamente 15 genes "internos". Esto hace posible una comparación cuantitativa de los efectos de los fármacos de test con compuestos de control que no son tóxicos en humanos o animales. Las comparaciones estadísticas proporcionan información para determinar si un fármaco dado afecta a la expresión de un gen de LSC comparado con fármacos de control o células no tratadas y para determinar si un cambio en el RNA de las células es relevante.

55 B. Establecimiento de los perfiles de expresión de proteínas

Los perfiles de expresión de proteínas de los fármacos anti-cáncer seleccionados se establecen utilizando el sistema de espectroscopia de masas SELDI de Ciphergen (MS)-TOF, como se describe en el Ejemplo 2. Los lisados totales de células de cultivos LSC cosechados se preparan en SDS al 0,1% o Triton X-100 (0,5%) y se aplica directamente una masa igual de proteína a chips de redes de proteínas utilizando los protocolos del fabricante. Para algunas situaciones puede ser deseable añadir una masa definida de uno o más péptidos de control conocidos como estándares internos de calibración y cuantificación para permitir comparaciones más cuantitativas entre chips y muestras. Cada chip puede analizar dos fármacos por triplicado. Después de la elaboración de las condiciones de severidad y réplicas experimentales, se utilizan como promedio 6 ProteinChips™ por cada compuesto de test.

65 La tecnología Ciphergen permite que las proteínas de la muestra se capturen, retengan y purifiquen directamente en el chip. Las proteínas en el microchip se analizan luego por SELDI. Este análisis determina el peso molecular de las proteínas en la muestra. Puede evaluarse luego una lectura automática de los pesos moleculares de las proteínas purificadas en la muestra. Típicamente, este sistema tiene un CV inferior a 20%. El sistema de análisis de datos

ES 2 334 639 T3

Ciphergen normaliza los datos a estándares de referencia internos y sustrae la lectura de las proteínas encontradas en las células de control de las correspondientes a las células tratadas con fármaco. Este análisis de los datos revela la expresión de proteínas estimulada por los fármacos así como proteínas encontradas únicamente en las células de expresión cuya expresión es inhibida por el fármaco. El análisis proporciona una lectura cualitativa de la expresión de proteínas entre un grupo de control y un grupo tratado. El análisis de muestras múltiples proporciona un cambio medio de aumento (“average fold change”) en la expresión de proteínas y una medida relativa de la variabilidad. Ésta puede representarse como un valor medio $\pm$ SEM que puede proporcionar una medida estadística de los cambios de proteínas. Este análisis se utiliza para determinar si los fármacos que inducen formas de toxicidad similares en humanos causan cambios similares en la expresión de proteínas en las LSCs. Cada fármaco se analiza al menos en tres grupos separados de LSCs.

REIVINDICACIONES

1. Un método de creación de un perfil molecular de una composición química, que comprende los pasos de:

a) poner en contacto una población aislada de células madre hepáticas (LSCs) de mamífero con la composición química; y

b) registrar las alteraciones en la expresión de genes o la expresión de proteínas en las LSCs de mamífero en respuesta a la composición química para crear un perfil molecular de la composición química.

2. El método de la reivindicación 1, en donde las alteraciones en la expresión génica o la expresión de proteínas son detectadas por un identificador.

3. El método de la reivindicación 2, en donde el identificador se selecciona de un agente fluorescente, colorimétrico, radiactivo, enzima, sustrato enzimático, análogo de nucleósido, magnético, vidrio, cuenta de látex, oro coloidal, y transpondedor electrónico.

4. El método de la reivindicación 1, 2 ó 3, en donde el perfil molecular comprende alteraciones en la expresión génica.

5. El método de la reivindicación 4, en donde las alteraciones en la expresión génica son detectadas por un ensayo de hibridación de nucleótidos.

6. El método de la reivindicación 1, 2 ó 3, en donde el perfil molecular comprende alteraciones en la expresión de proteínas.

7. El método de la reivindicación 6, en donde las alteraciones en la expresión de proteínas son detectadas por un ensayo de inmunoreactividad.

8. El método de la reivindicación 6, en donde las alteraciones en la expresión de proteínas son detectadas por un ensayo de espectrometría de masas.

9. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 en donde las LSCs son de origen humano.

10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 en donde las LSCs son de mamíferos no humanos.

11. El método de la reivindicación 10, en donde los mamíferos no humanos son roedores.

12. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la composición química se selecciona de agentes terapéuticos, neurotoxinas, toxinas hepáticas, toxinas de células hematopoyéticas, micotoxinas, carcinógenos, teratógenos o toxinas para uno o más órganos reproductivos.

13. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en donde la composición química se selecciona de productos agroquímicos, cosméticos y contaminantes ambientales.

14. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en donde la composición química es un agente terapéutico potencial o un cosmético candidato.

15. Un método de recopilación de una biblioteca de perfiles moleculares de composiciones químicas que presentan toxicidades predeterminadas, que comprende los pasos de:

a) realización del método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 con una composición química que presenta toxicidades predeterminadas; y

b) recopilación de una biblioteca de perfiles moleculares por repetición del paso a) con al menos dos composiciones químicas que presentan toxicidades predeterminadas.

16. Un método de tipificación de la toxicidad de una composición química de test, que comprende los pasos de:

a) creación de un perfil molecular de la composición química de test de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13; y

b) comparación del perfil molecular en el paso a) con el perfil molecular de una composición química que presenta toxicidades predeterminadas;

en donde el tipo de toxicidad de la composición química de test se determina por la comparación efectuada en el paso b).

ES 2 334 639 T3

17. El método de la reivindicación 16, en donde en el paso b) el perfil molecular se compara con una biblioteca compuesta de perfiles moleculares de composiciones químicas que presentan toxicidades predeterminadas, comprendiendo la biblioteca compuesta los perfiles moleculares de al menos dos composiciones químicas y creándose dichos perfiles moleculares de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13.

18. El método de la reivindicación 17, que comprende adicionalmente clasificar la toxicidad de la composición química de test basada en la comparación del paso b).

19. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 18, en donde la composición química de test es conocida o desconocida.

20. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 19, en donde las composiciones químicas que presentan toxicidades predeterminadas se seleccionan de agentes terapéuticos, neurotoxinas, toxinas renales, toxinas hepáticas, toxinas de células hematopoyéticas, y micotoxinas.

21. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 19, en donde las composiciones químicas que presentan toxicidades predeterminadas se seleccionan de agentes que son tóxicos para las células de uno o más órganos reproductivos, agentes teratógenos y carcinógenos.

22. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 19, en donde las composiciones químicas que presentan toxicidades predeterminadas se seleccionan de productos agroquímicos, cosméticos, y contaminantes ambientales.

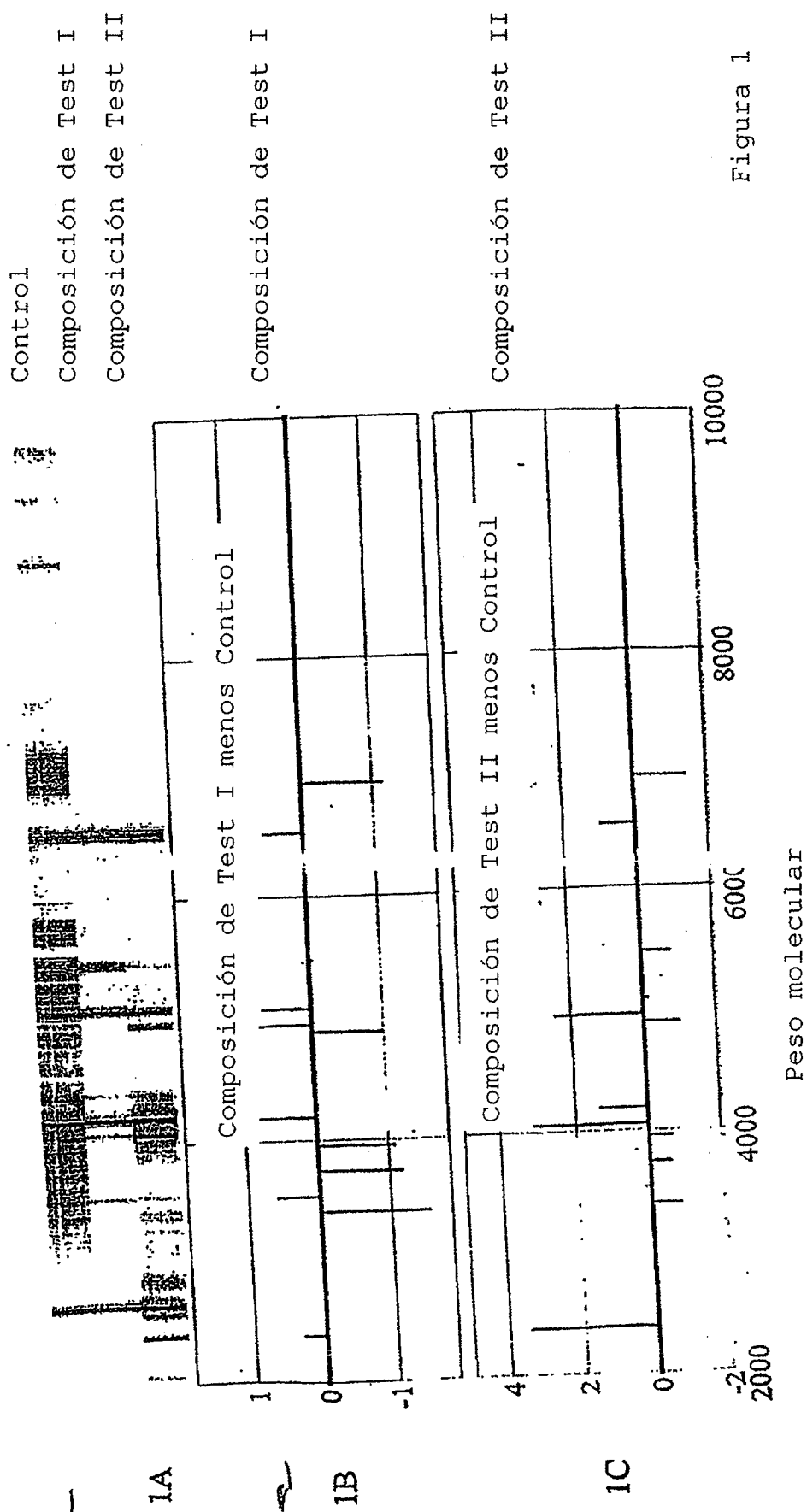


Figura 1

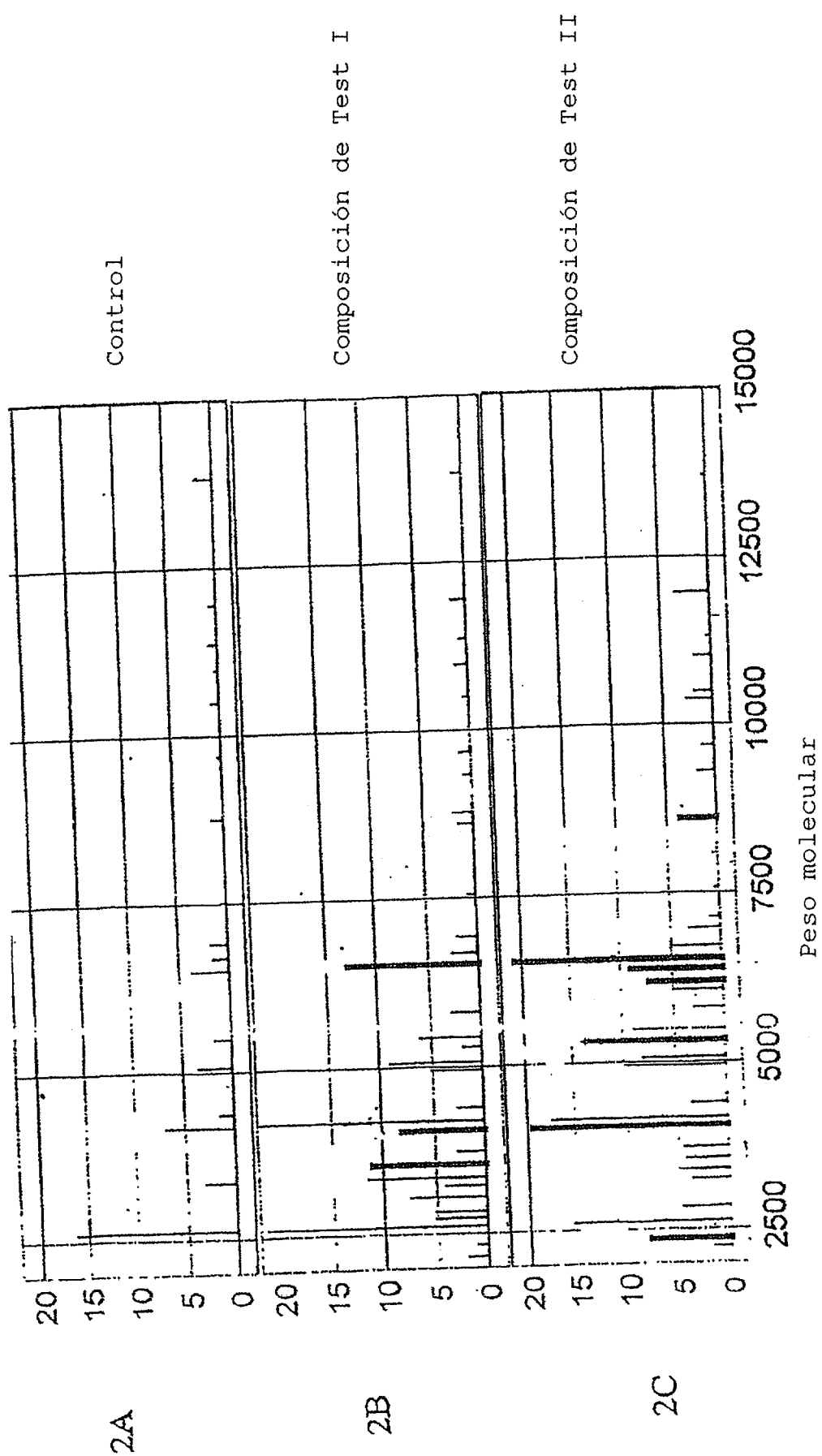


Figura 2

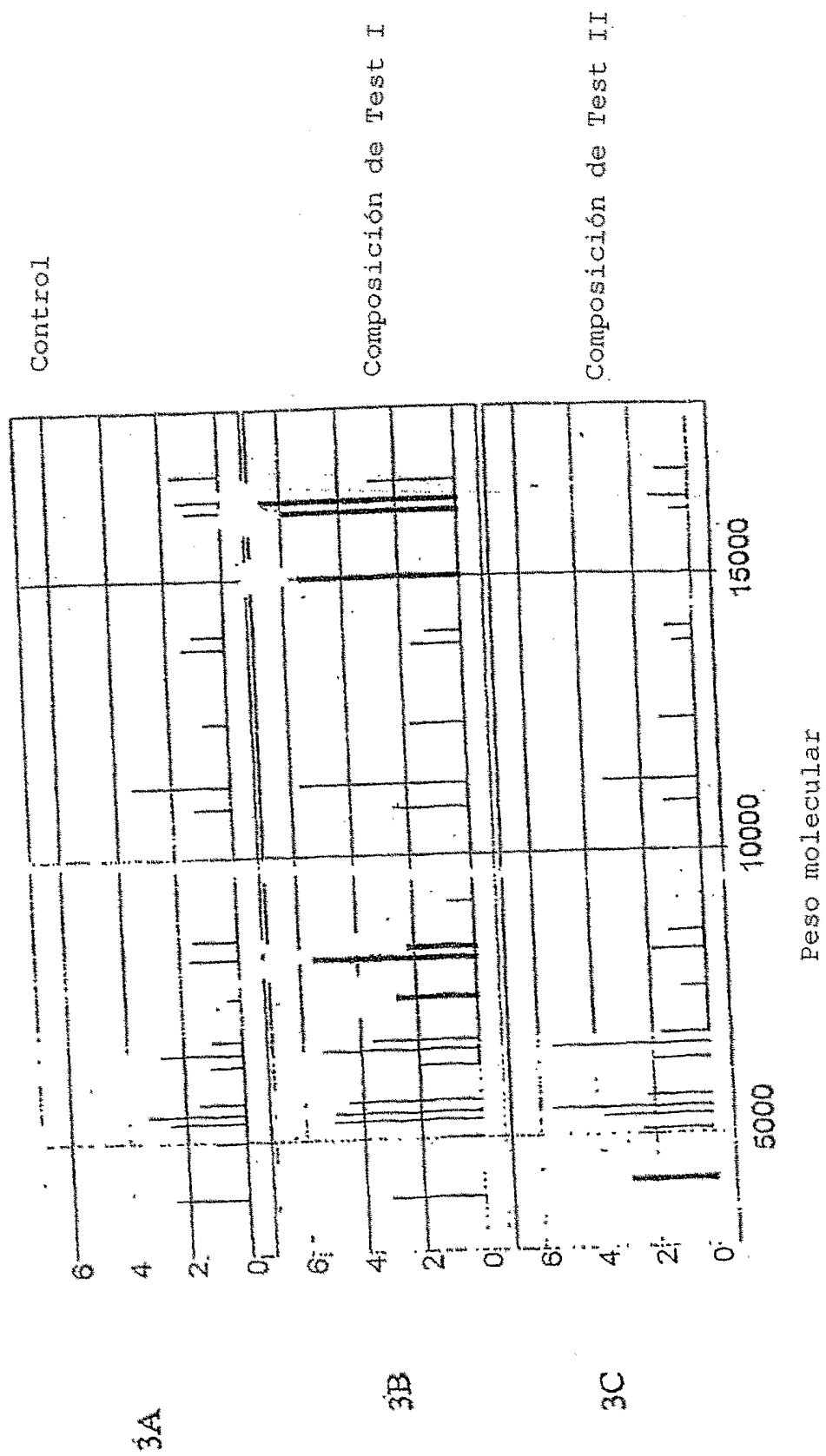


Figura 3

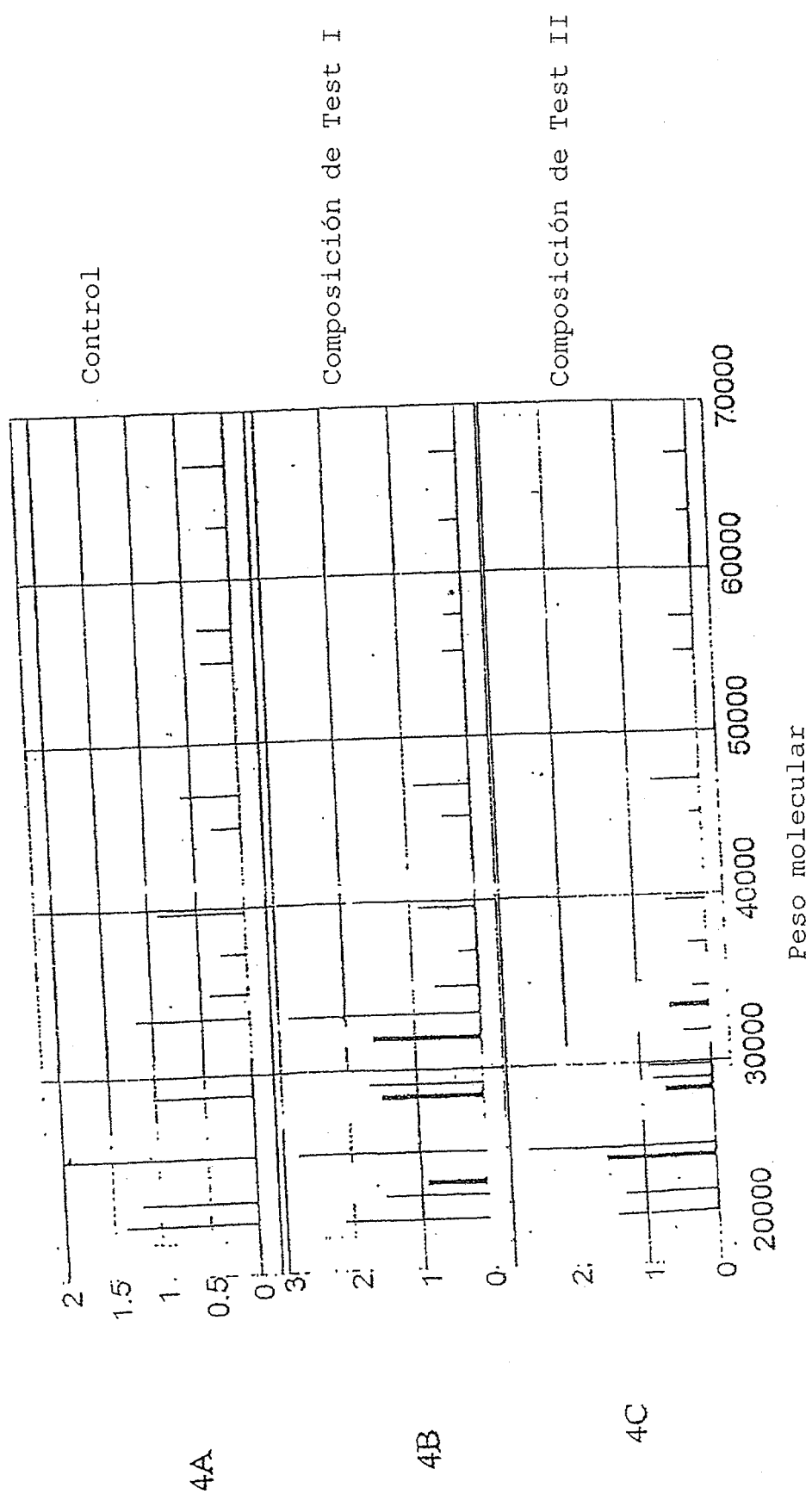


Figura 4