



(12)发明专利



(10)授权公告号 CN 104364649 B

(45)授权公告日 2017.05.17

(21)申请号 201380030301.2

(22)申请日 2013.05.28

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 104364649 A

(43)申请公布日 2015.02.18

(30)优先权数据

61/659,024 2012.06.13 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2014.12.09

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2013/001575 2013.05.28

(87)PCT国际申请的公布数据

W02013/185884 EN 2013.12.19

(73)专利权人 默克专利股份有限公司

地址 德国达姆施塔特

(72)发明人 S·O·穆勒 Y·迪茨

(74)专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专

利商标事务所 11038

代理人 殷骏

(51)Int.Cl.

G01N 33/50(2006.01)

(56)对比文件

CN 1961080 A,2007.05.09,

CN 102449168 A,2012.05.09,

Paul W.Hastwell et.al..High-specificity and high-sensitivity genotoxicity assessment in a human cell line: Validation of the GreenScreen HC GADD45a-GFP genotoxicity assay.《Mutation Research》.2006,第607卷

Espen Hansen et.al..The α , β , γ , δ -unsaturated aldehyde 2-trans-4-trans-decadienal disturbs DNA replication and mitotic events in Early Sea Urchin embryos.《Toxicological Sciences》.2004,第81卷

Craig Moore.In vitro modelling of dermal absorption following environmental or accidental exposure..《Newcastle University PhD Thesis》.2010,

Eike Gallmeier et.al..Novel genotoxicity assays identify norethindrone to activate p53 and phosphorylate H2AX.《Carcinogenesis》.2005,第26卷(第10期), (续)

审查员 毕秀华

权利要求书1页 说明书34页

(54)发明名称

用于鉴定具有基因毒性的化合物的蛋白表达分析

(57)摘要

本发明涉及用于筛选具有(前-)基因毒性活性的化合物的方法,所述方法通过提供能够表达一组确定的蛋白的系统,用待筛选的化合物温育至少部分系统,并将系统中的蛋白表达与对照系统中的蛋白表达相比较,从而检测(前-)基因毒性活性来进行。本发明的另一个目的涉及用于通

过测定取自哺乳动物的生物样品中确定的蛋白的表达水平来监控发生生理和/或病理状况的可能性的方法,所述状况通过响应给需要这样的治疗的哺乳动物施用的化合物而导致的增殖、分化和/或损伤修复的失调引起、介导和/或传播。本发明还涉及用于筛选具有(前-)基因毒性活性的化合物的试剂盒,其包含特异性结合标志蛋白的抗体。

[接上页]

(56)对比文件

Neera Tewari-Singh et.al..Biological and molecular mechanisms of sulfur mustard analogue-induced toxicity in JB6 and HaCaT cells: possible role of ataxia telangiectasia-mutated/ataxia telangiectasia-Rad3-related cell cycle checkpoint pathway.《Chem Res Toxicol》.2010,第23卷

Jennifer T. Fox et.al..High-throughput genotoxicity assay identifies antioxidants as inducers of DNA damage

response and cell death..《PNAS》.2012,第109卷(第14期),

Nana Asare et.al..Signalling pathways involved in 1-nitropyrene(1-NP)-induced and 3-introfluoranthene(3-NF)-induced cell death in Hepalcl7 cells..《Mutagenesis》.2009,

Fabienne Baus et.al..p21-Mediated nuclear retention of cyclin B1-Cdk1 in response to genotoxic stress.《Molecular Biology of the Cell》.2004,第15卷

1. 一种用于就基因毒性和/或前基因毒性活性高通量筛选化合物的方法,包括测定用一种或多种化合物温育的系统中相对于未用所述化合物温育的系统中p-p53 (Ser15)、p21、p-H2A.X (Ser139)、p-ATM (Ser1981)、p-Chk1 (Ser345)、p-ATR (Ser428)、p-cdc2 (Thr14/Tyr15)、Gadd45a和p-Chk2 (Thr68) 蛋白的活性形式的表达水平的步骤,其中用化合物温育的系统中相对于未用所述化合物温育的系统,所述蛋白的表达水平升高至少1.5倍表示所述基因毒性和/或前-基因毒性活性,并以至少80%的灵敏度和/或特异度筛选具有所述活性的化合物。

2. 权利要求1的方法,其中通过免疫荧光染色或Luminex技术测定表达水平。

3. 权利要求1的方法,其中施用降低的浓度的化合物以提供具有1至1.1倍的表达水平。

4. 权利要求1至3的任一项的方法,其中具有最低前-基因毒性或最低基因毒性的化合物或者非-前-基因毒性或非基因毒性的化合物被鉴定,并且其中表达水平的最低升高或无升高表明所述化合物适合用于对该化合物所期望的用途。

5. 测定取自哺乳动物的生物样品中的蛋白p-p53 (Ser15)、p21、p-H2A.X (Ser139)、p-ATM (Ser1981)、p-Chk1 (Ser345)、p-ATR (Ser428)、p-cdc2 (Thr14/Tyr15)、Gadd45a和p-Chk2 (Thr68) 的表达水平的试剂在制备用于监控发生癌症、肿瘤、转移和/或血管生成障碍的可能性的试剂盒中的用途,所述疾病或障碍因响应利用化合物的治疗而导致的增殖、分化和/或损伤修复的失调引起、介导和/或传播,其中以至少80%的灵敏度和/或特异度测定所述蛋白的表达水平升高至少1.5倍表明所述化合物具有基因毒性和/或前-基因毒性活性并且所述可能性得以增加,所述哺乳动物需要利用给所述哺乳动物施用所述化合物的这样的治疗。

6. 蛋白p-p53 (Ser15)、p21、p-H2A.X (Ser139)、p-ATM (Ser1981)、p-Chk1 (Ser345)、p-ATR (Ser428)、p-cdc2 (Thr14/Tyr15)、Gadd45a和p-Chk2 (Thr68) 用作以至少80%的灵敏度和/或特异度高通量筛选化合物的基因毒性和/或前-基因毒性活性的标志蛋白的用途。

7. 一种用于检测基因毒性和/或前基因毒性活性的试剂盒,其由分别特异性结合p-p53 (Ser15)、p21、p-H2A.X (Ser139)、p-ATM (Ser1981)、p-Chk1 (Ser345)、p-ATR (Ser428)、p-cdc2 (Thr14/Tyr15)、Gadd45a和p-Chk2 (Thr68) 的抗体组成。

用于鉴定具有基因毒性的化合物的蛋白表达分析

[0001] 本发明涉及用于筛选具有(前-)基因毒性活性的化合物的方法,所述方法通过提供能够表达一组确定的蛋白的系统,用待筛选的化合物温育至少部分系统,将系统中的蛋白表达与对照系统中的蛋白表达相比较,从而检测(前-)基因毒性活性来进行。本发明的另一个方面涉及用于通过测定从哺乳动物取出的生物样品中确定的蛋白的表达水平来鉴定发生生理和/或病理状况的方法,所述状况通过响应给需要这样的治疗的哺乳动物施用的化合物而导致的增殖、分化和/或损伤修复的失调引起、介导和/或传播。本发明还涉及用于筛选具有(前-)基因毒性活性的化合物的试剂盒,其包含特异性结合标志蛋白的抗体。

[0002] 化合物的潜在基因毒性的全面评价在化学药品危险性评估和药物开发过程中是非常重要的部分。目前的标准测试组合包括被设计来检测通过多种不同作用机制诱导DNA损伤的化合物的体外和体内测试。需要细菌回复突变测定以及在体外和/或体内利用哺乳动物细胞进行的基因毒性测试。由于在这些测试中被测试为阳性的化合物是潜在人的致癌物,因此基因毒性测试系统的重要性增加。然而,标准测试组合具有低通量,从而需要大量的化合物。为此,这些测试在早期药物发现阶段是不太适合的(Westerink等人,2011, Mutat. Res. 724, 7-21)。

[0003] 通常地,原本不是体内基因毒素或不通过致诱变或DNA反应性机制诱导肿瘤的的化学药品在哺乳动物细胞测试中产生假阳性结果,这使人的危险外推复杂化。

[0004] 此外,根据EU REACH法规中的化学药品表征和现代风险评价,机理分析日益变得重要。

[0005] 困难现正在强迫新的体外工具的发展。需要具有增加的特异度(即更少的假阳性结果)而不丢失灵敏度(即检测DNA反应性致癌物和体内基因毒素)的新型基因毒性测试系统(Kirkland等人,2005, Mutat. Res. 584, 1-256; Kirkland等人,2006, Mutat. Res. 608, 29-42; Kirkland等人,2008, Mutat. Res. 653, 99-108)。

[0006] 因此,形成本发明的基础的技术问题是提供用于筛选化合物的方法,所述方法有效地使得能够鉴定和表征它们的基因毒性和/或前基因毒性性质。本发明的另一个问题是提供用于检测基因毒性和/或前-基因毒性活性的试剂盒。

[0007] 本发明通过提供用于筛选具有基因毒性和/或前-基因毒性活性的化合物的方法来解决,所述方法包括测定至少两种蛋白(选自p-p53(Ser15)、p21、p-H2A.X(Ser139)、p-ATM(Ser1981)、p-Chk1(Ser345)、p-ATR(Ser428)、p-cdc2(Thr14/Tyr15)、Gadd45a和p-Chk2(Thr68))的活性形式在利用一种或多种化合物温育的系统中的表达水平相对于所述蛋白在大体上未用所述化合物或相同浓度的所述化合物温育的系统中的表达水平的步骤。

[0008] 本发明人已令人惊讶地显示至少两种所述蛋白的组合与基因毒性相关。因此,前述多种标志蛋白代表新型基因毒性标志物,所述标志物十分适合用于区分基因毒性的阶段。下面的蛋白(the underlying proteins)被选择为差异表达分析的结果。通过针对未处理细胞的独特差异来表征所有蛋白的表达,其中经处理的细胞显示体现于上调的差异。在本领域中已描述了所测定的蛋白的序列和其它特征,但在本发明的定义的组合中缺乏与基因毒性的联系。配对标志蛋白组合(任选地补充以另外的标志蛋白)的任一个可用于最大限

度的测试可靠性。蛋白可能以另一种方式命名,但唯一地通过被许多数据库例如UniProt、SwissProt等(参考资料表1;Zhou和Bartek,2004,Nat Rev Cancer4,216-25)普遍接受并已于其中注册的登录号来定义。

[0009] 虽然所鉴定的9种蛋白参与DNA-损伤-反应信号-传导网络,但它们并不一定如目前已知的,以它们的实体在功能或位置上发生关联,但不排除这样的联系出现在组的单个成员或更多成员之间。

[0010] DNA-损伤-反应信号-传导网络由至少两个不同的途径组成:共济失调性毛细血管扩张症突变激酶(ATM)和共济失调性毛细血管扩张突变及Rad3相关(ATR)途径。响应损伤的DNA,ATM途径通过ATM在Ser1981上的自磷酸化来起始。ATM通过数种蛋白的磷酸化来调节细胞周期检查点和DNA修复。ATR途径响应DNA双链断裂(DSB)(尽管比ATM慢)和干扰DNA复制叉的化学药品。存在可导致ATR活化的两个可磷酸位点(p-ATR(Ser428)和p-ATR(Thr1989))。最初识别异常DNA结构并活化DNA损伤反应网络的传感器还不清楚。

[0011] DNA损伤反应的极早期事件是通过ATM在Ser139上对组蛋白H2A.X进行的磷酸化。磷酸化H2A.X在DNA损伤位点上积累,并招募多种DNA损伤反应和DNA修复信号。

[0012] DNA双链断裂诱导ATM对Chk2在Thr68和该区域中的其它位点上的磷酸化,这导致p53-依赖性或不依赖于p53的细胞周期停滞和/或细胞凋亡。

[0013] p53在位置Ser15上的磷酸化(特别地通过ATM)阻止了mdm2结合的能力并阻止其降解。磷酸化,从而被激活的p53用作数个基因(包括蛋白p21以及生长停滞和DNA损伤诱导蛋白a(Gadd45a)的基因)的转录因子。P21抑制导致细胞周期在G1期停滞的不同细胞周期蛋白依赖性激酶。此外,p21抑制PCNA并中断DNA复制。诱导的细胞核Gadd45a与细胞周期蛋白依赖性激酶2(cdc2)相互作用,并导致其从cdc2/cyclin B1复合物解离。游离细胞周期蛋白B1被输出至细胞质内,并通过泛素化降解。Gadd45a从而抑制cdc2激酶活性,细胞保持在进入有丝分裂的过渡期。

[0014] 除了cdc2激酶的Gadd45a介导的抑制外,还发生通过Chk1的调节。Chk1可被激酶ATM和ATR激活,但Chk1在Ser345和Ser317的磷酸化通过ATR来进行。Chk1能够在Ser216上磷酸化磷酸酶Cdc25C,这使cdc2在Thr14和Tyr15上不能丢失抑制磷酸化,并且细胞保持在G2/M过渡期。

[0015] 如上论述的蛋白和相关分子的分析显示例如响应HepG2细胞对(前-)基因毒性剂的暴露的细胞死亡和存活的复杂调控。主要受影响的过程包括细胞周期调控、细胞增殖和细胞凋亡。经发现被差异调控的蛋白可多半被赋予促细胞凋亡和抗增殖功能。数据显示响应化合物诱导的DNA损伤的细胞周期停滞和程序化细胞死亡的诱导。

[0016] 基因毒性与独特蛋白的联系被用于诱变剂和前诱变剂的体外检测,所述诱变剂和前诱变剂能够干扰增殖、分化或损伤修复的信号传导。基于本发明的众多蛋白建立化合物特异性蛋白表达特征谱在建立基因毒性效应机制中具有预料之外的益处,从而支持对经典筛选法是替代性或补充性的新型化合物的潜在危害或益处的评价。本发明方法背后的发明原理包括检测确定的蛋白。针对其绝对和相对量以及对特定细胞类型的特异性来选择基因产物。

[0017] “蛋白”是指包含一种或多种多肽的生物化学化合物。多肽是通过相邻氨基酸残基的羧基与氨基之间的肽键键合在一起的氨基酸的单个线性聚合物。其通常折叠成球形或纤

维形式以有利于生物功能。蛋白的“活性形式”是指蛋白中的残基通常被翻译后修饰化学修饰的事实,所述修饰改变蛋白的物理和化学性质、折叠、稳定性、活性,最终改变其功能。例如,转录因子p53的活性依靠蛋白磷酸化来决定性调控,所述磷酸化可通过多个信号,包括一般细胞应激、DNA损伤或干扰素来诱导。

[0018] 如本文中所用,“多种蛋白”是指其在不同组织、细胞中或在不同条件或生物学状态下表达水平变化的一组经鉴定的或经分离的蛋白。不同条件可通过暴露于特定试剂(无论是外源性的还是内源性的,其包括激素、受体配体、化合物等)产生。多种蛋白的表达显示特定模式。即,多种蛋白中的每一种蛋白在不同条件下或在暴露或不暴露于特定内源性或外源性试剂的情况下差异表达。每一种蛋白的表达程度或水平在多种蛋白中可变化,并且可按照本发明来定性和/或定量地测定。如本文中所用,蛋白表达特征谱是指在不同水平上差异表达的多种蛋白,其构成“模式”或“特征谱”。如本文中所用,术语“表达特征谱”、“特征谱”、“表达模式”、“模式”、“蛋白表达特征谱”和“蛋白表达模式”可互换使用。

[0019] 如本文中所用,“具有基因毒素活性的化合物”也称为“诱变剂”,其为改变生物体的基因物质(通常地DNA),从而使突变频率增加至高于天然背景水平的物理或化学试剂。本领域普通技术人员已知,例如诱变剂的生物作用之一是促进癌症的发展。诱变剂的其它生物作用已被详尽记录和讨论。突变产生的核酸序列的变化包括核苷酸碱基对的置换以及一个或多个核苷酸在DNA序列中的插入和缺失。

[0020] 首先,提供了系统,并将其整体或部分温育。系统在下文中也称为测试系统。虽然细胞系统在本发明的范围内是优选的,但可选择地可使用基于无活细胞蛋白合成的体外翻译系统。细胞系统被定义为任何受试者,只要所述受试者包含细胞。因此,细胞系统可选自单细胞、细胞培养物、组织、器官、植物和动物。细胞系统的范围还包括这样的生物实体的部分,即组织、器官、植物和动物的样品。除植物外,还应理解按上述序列每一种细胞系统可代表下列各自系统的样品。细胞样品、非人动物、哺乳动物或非人哺乳动物是根据本发明的细胞系统的优选实施方案。细胞样品是指以分离状态、培养物形式存在的或作为细胞系存在的任何类型的原代细胞或基因工程细胞。具体地,从待测试的哺乳动物体内或原位获得细胞样品。细胞样品的取出遵照医疗管理规范。生物样品可取自任何类型的生物物种,但样品特别地取自人、大鼠或小鼠。

[0021] 在本发明中,细胞系统还可包括生物液体,其中体液的样品优选由血液、血清、血浆、唾液或尿组成。还优选地通过生物活组织检查收集组织样品,特别地从靠近疾病的位置获取样品。生物样品可获自任何组织,包括肝、肾、肠、骨髓等。在优选实施方案中,生物样品来自肾、肝和肠。可纯化样品以除去干扰物质,例如氢键形成的抑制剂。

[0022] 系统能够表达或表达数种蛋白p53、p21、H2A.X、ATM、Chk1、ATR、cdc2、Gadd45a或Chk2。在本发明的实施方案中,系统额外地能够表达或表达MDM2。系统还能够激活或激活数种蛋白p-p53(Ser15)、p21、p-H2A.X(Ser139)、p-ATM(Ser1981)、p-Chk1(Ser345)、p-ATR(Ser428)、p-cdc2(Thr14/Tyr15)、Gadd45a和p-Chk2(Thr68)。系统优选能够表达或表达选自p-p53(Ser15)、p21、p-H2A.X(Ser139)、p-ATM(Ser1981)、p-Chk1(Ser345)、p-ATR(Ser428)、p-cdc2(Thr14/Tyr15)、Gadd45a和p-Chk2(Thr68)的至少两种蛋白的活性形式。更优选地,系统能够表达或表达选自p-p53(Ser15)、p21、p-H2A.X(Ser139)和p-Chk1(Ser345)的至少两种蛋白的活性形式。最优选,系统能够表达或表达选自p-p53(Ser15)、

p21、p-H2A.X (Ser139)、p-ATM (Ser1981) 和 p-Chk1 (Ser345) 的至少两种蛋白的活性形式。

[0023] 应理解,具有相同功能的变体、突变体、部分或同源蛋白序列包括在定义以及保护的范围内。优选地,同源性总计至少85%。可能的改变包括至少一个氨基酸的缺失、插入、置换、修饰和添加,或与另一个肽或蛋白的融合。工程细胞能够在用具有潜在核酸序列或其部分的适当载体转染后表达这些蛋白。优选地,重组细胞具有真核生物来源。

[0024] 在本发明的更优选实施方案中,提供了用于筛选法的HepG2细胞。使用的S9的剂量对实验结果具有影响,尽管在细胞毒性评价中是阴性的。应当指出所述剂量可与调控标准基因毒性测试中使用的剂量相比较。显著地受S9调控的基因与通过(前-)基因毒性剂诱导的基因不同,S9-作用可通过与适当的对照比较来调整。在任何情况下,具有足够的固有代谢活性的细胞系统一定是适当的,但目前不存在用于基因毒性评价的这样的具有代谢能力的细胞系统。原代肝细胞是目前用于药物代谢和CYP诱导/抑制的体外研究的金标准。尽管成熟分化的肝细胞缺乏增殖能力(从而使它们成为不适当的基因毒性研究的模型),它们还在人肝细胞的培养、有限利用中显示形态学以及蛋白和基因表达的显著变化,和通常显著的供体/批次可变性而使这样的系统的标准化复杂化,但HepG2细胞的主要有利方面是它们的人分子特征。例如,特异性靶例如拓扑异构酶和真核生物修复酶被表达,并且防止基因毒性的高估,从而促成假阳性减少。

[0025] 将细胞样品贮存(例如冷冻)、培养一定时期或立即经历下一步骤。在用待筛选的化合物温育其之前,可将细胞样品分成多个部分。如果这样做,提供至少两个部分;一个部分用于筛选而另一部分用作对照。优选地,用于筛选的部分的数目超过对照部分的数目。通常地,将许多部分经历高通量筛选。

[0026] 化合物由能够与靶分子相互作用的生物和/或化学结构组成。在本文中,基因组学或蛋白组学信号转导的任何组分可被当作“靶分子”,所述靶分子不限于基因或调节子蛋白或其基因产物,或信号转导途径的组分,包括其基因或基因产物。因此,化合物的特定相互作用可牵涉仅仅靶向或细胞功能改变的诱导,或其可甚至同时包括两种作用。

[0027] 总之,在本发明方法中待筛选的化合物不受限制。具体地,化合物选自核酸、肽、碳水化合物、具有50至1.000Da的分子量的小分子和蛋白。这些化合物通常可在文库中获得。优选在细胞样品的不同部分内温育单种化合物。然而,还可能通过在一个部分内温育至少两种化合物来研究化合物的作用。当用一种或多种待分析的(前-)基因毒性化合物温育细胞系统的一部分时,在化合物不存在的情况下温育细胞的另外部分,系统的该另外的非处理部分用作阴性对照。通过在暴露于基因毒性应激之前测定状态,并将其与基因毒性应激后的状态相比较,系统还可能同时用作测试和对照系统。其它对照系统概述于下文中。

[0028] 术语“温育”表示化合物与细胞进行不同时期的接触,这取决于化合物和/或靶的类型。温育过程还取决于各种其它参数,例如细胞类型和检测的灵敏度,该最优化遵从本领域普通技术人员已知的常规过程。可在诱变剂的化学转化不存在的情况下实现温育过程,或可包括前诱变剂的代谢转化。添加化学药品溶液和/或施加物理过程例如热的影响,可改善样品中靶结构的可及性。作为温育的结果,形成特定温育产物。

[0029] 在本发明的意义上有效化合物的鉴定通过测定系统能够表达的至少两种确定的蛋白的表达模式来间接进行。在指定的时刻进行测定,使其与实验开始时的信号强度和对照信号强度发生关系。例如,不用化合物温育对照系统(阴性对照),或用不具有基因毒性活

性(阴性对照)的标准化合物温育对照系统。对照系统还可具有(前-)基因毒性活性(阳性对照)的标准化合物来温育。通过表达的变化来显示活性。优选地,将在暴露于诱变剂的细胞中表达的蛋白与在未暴露于诱变剂的细胞中表达的蛋白相比较。在每一个处理之间进行配对比较。配对比较包括将在给定的处理条件下的给定蛋白的表达数据与在第二处理条件下的该蛋白的表达数据相比较。使用适当的统计技术,借助于已知的商购可得的程序进行比较。

[0030] 本发明的另一个优选方面是,如果相较于阴性、阳性或阴性对照系统,蛋白的表达在系统中被上调,或如果蛋白的表达在系统和阳性对照系统中大体上相同,则检测到固有的(前-)基因毒性活性。详细地,(i)测试系统相较于未用任何化合物温育的阴性对照系统的更高的蛋白表达表明所述活性,或(ii)在测试系统中相较于用具有基因毒性和/或前-基因毒性活性的标准化合物温育的阳性对照系统的大体上相同或更高的蛋白表达表明所述活性,或(iii)用具有不同于测试系统中的浓度的浓度的化合物温育的相对对照系统的更高蛋白表达(前提是更低的浓度被赋予相对对照系统)表明所述活性。应理解,无需通过上述两个或全部比较测定表达,但因在(i)、(ii)或(iii)下的表达水平的任何比较产生的(前-)基因毒性活性的指示必然意指任何其它比较测定(无论进行与否)中的所述活性。

[0031] 更优选地,用化合物温育的系统相较于未用化合物温育的系统的所述蛋白的至少一种的表达水平的升高表明所述活性。本发明的最优选实施方案是,所述蛋白的至少3、4、5、6、7、8或9种的表达水平升高。高度优选地,现有活性通过与阴性对照系统相比较的差异蛋白表达分析来检测。

[0032] 在本发明的另一个优选方面,表达水平升高至少1.5倍,更优选至少1.6倍,最优选至少1.8倍,高度优选至少1.9倍和特别高度优选至少2.1倍。

[0033] 本发明的另一个最特别方面是施用降低的浓度的化合物以提供具有相较于对照系统的表达水平1至1.1倍的表达水平。降低的化合物浓度是指至少10%,优选至少20%,更优选至少30%,最优选至少40%,高度优选至少50%,特别高度优选至少60%的降低。

[0034] 在本发明的另一个更优选实施方案中,利用化合物温育的系统相较于利用具有基因毒性和/或前-基因毒性活性的标准化合物温育的系统的所述蛋白的至少一种的大体上相同的表达水平表明所述活性。

[0035] 用于鉴定蛋白表达的适当测试、氨基酸序列的测定和变异分析对于本领域普通技术人员来说是已知的,或可按照常规容易设计的。根据本发明的测定可以是适合于检测和/或定量蛋白表达的任何测定。本发明的优选实施方案是通过免疫荧光染色来测定表达水平。

[0036] 所选择的标志物可特别地用于建立具有更高通量的筛选工具,优选高含量成像(High Content Imaging)(HCI)或Luminex xMAP技术。称为微球体的Luminex颜色-编码小珠粒编码500个不同的组。每一个珠粒组可用对于特定生物测定是特异性的试剂涂覆,从而允许捕获和检测来自样品的特定分析物。Luminex技术特别地将固定在微粒珠粒上的夹心ELISA与流式细胞术组合。其允许在一个单一样品中同时定量测量数种蛋白。在Luminex分析仪内部,光源激发鉴定每一个微球颗粒的内部染料,以及在测定过程中被捕获的任何报道分子染料。将双波长激光器用于检测珠粒的身份(基于特异于每一种分析物的珠粒的光谱性质)和相关藻红蛋白(PE)荧光的量(Hoffmann等人,2010,Toxicology 277,49-58)。组

合荧光显微镜与成像分析算法和信息学工具的自动化成像平台使得能够通过细胞组分、细胞大分子结构的定位和细胞功能的时间动态的高分辨检查来分析数百万个细胞的荧光图像。HCI技术用于毒理学评价的应用显示体外预测可通过鉴定人肝脏毒物来加强常规临床前测试的性能(Xu等人,2008,Toxicol Sci 105,97-105)。此外,HCI技术可通过检测微核(MN)用于基因毒性评价。体外MN测试通过计数细胞的细胞质中的称为微核的染色体片段来检测化合物诱导的致畸变(染色体损伤)和非整倍体诱发(染色体丢失)效应。基于HCI的测定能够检测具有高性能评分的潜在基因毒性,同时还允许区分非整倍体诱发化合物与致畸变化合物(Westerink等人,2011,Mutat.Res.724,7-21)。

[0037] 此外,所述技术允许组合数个选择的终点,从而保留生物学复杂性和分子相互作用至某一程度。HCI提供了将经典基因毒性终点(例如MN诱导)和细胞标志物的分析与细胞活力/细胞毒性的同时获取组合的可能性。细胞活力是考虑基因毒性测试的重要参数,因为标准测定中的假阳性可除其它以外通过细胞毒性产生。这同样适用于测量分子标志物例如p53。虽然p53对DNA损伤反应极其敏感,但营养不足和缺氧也可诱导活化。将细胞毒性(为了进行剂量选择)与多个终点测量一起考虑可防止或减少假阳性。

[0038] 因此,本发明涉及用于预测具有基因毒性活性的化合物的细胞作用的方法,该方法通过从待评价的细胞制备蛋白样品,将所述蛋白样品与抗体接触,检测蛋白对抗体的结合,和将检测结果与使用从对照细胞制备的蛋白样品检测的结果相比较来进行所述预测。

[0039] 可通过将完整细胞用于选择的检测法来进行检测。然而,优选地首先提供细胞提取物。可在适当的公知的裂解缓冲液中进行细胞裂解,所述缓冲液可引起渗透冲击并使细胞膜穿孔。还可通过机械力例如球磨机、弗压碎器、超声波处理器等,分别通过细胞壁和细胞膜的酶促降解,和/或通过表面活性剂的作用来破坏细胞结构的稳定性。可进一步纯化生物标志物以除去干扰物质或可在样品中浓缩生物标志物。优选通过沉淀、透析、凝胶过滤、凝胶洗脱或层析例如HPLC或离子交换层析的方法进行下游处理和/或浓缩。建议组合几种方法以获得更好的产率。

[0040] 用于检测基因毒性的适当测试对于本领域技术人员来说是已知的,或可按照常规容易地设计。许多不同类型的测定是已知的,其实例示于下文中。虽然根据本发明的测定可以是适合于检测和/或定量基因表达的任何测定,但基因毒性优选通过与蛋白p-p53(Ser15)、p21、p-H2A.X(Ser139)、p-ATM(Ser1981)、p-Chk1(Ser345)、p-ATR(Ser428)、p-cdc2(Thr14/Tyr15)、Gadd45a和p-Chk2(Thr68)特异性相互作用的物质来测定。

[0041] 如本文中所用,术语“特定物质”包括能够以这样的方式与本发明的蛋白相互作用以便使识别、结合和相互作用成为可能的生物学和/或化学结构。具体地,所述物质选自核酸、肽、碳水化合物、聚合物、具有50至1,000Da的分子量的小分子和蛋白,优选核酸和蛋白。特定物质表达足够的灵敏度和特异度以确保可靠结合和检测。存在于样品中的其它生物分子未显著结合特异于本发明的蛋白标志物的物质。优选地,结合至除标志蛋白外的生物分子的水平导致仅为标志蛋白的亲力的10%,更优选仅5%或更少的结合亲和力。特定物质对于对应的标志蛋白具有至少 10^{-7} M的亲和力。特定物质优选对于标志蛋白具有 10^{-8} M或更优选 10^{-9} M的亲和力。最优选特定物质满足上述亲和力以及特异性的最低标准。

[0042] 物质优选特异于蛋白的部分。这样的部分代表对于特定功能的表达是足够的那些区域的限制,即用于识别的结构决定簇的提供。所有截断不可避免地受限于保留功能例

如独特识别的需要。然而,蛋白片段可以非常小。优选地,物质是单特异性的以保证与选择的单一靶的专有定向相互作用。

[0043] 根据本发明的蛋白的识别可通过在氨基酸序列的一级、二级和/或三级结构水平上与物质特异性相互作用来实现。在本发明的说明书中,术语“识别”(不限于其)涉及特定物质与靶之间的任何类型的相互作用,特别地共价或非共价结合或缔合,例如共价键、疏水/亲水相互作用、范德瓦尔斯力、离子对、氢键、配体-受体相互作用、表位与抗体结合部位之间的相互作用、核苷酸碱基配对等。这样的缔合还可包括其它分子例如肽、蛋白或其它核苷酸序列的存在。

[0044] 特定物质优选选自抗体、细胞因子、脂质运载蛋白、受体、外源凝集素、抗生物素蛋白、脂蛋白、糖蛋白、寡肽、肽配体和肽激素。更优选,抗体用作特定物质。“抗体”是指基本上由免疫球蛋白基因编码的多肽或其片段。根据本发明,抗体作以完整免疫球蛋白或许多良好表征的片段的形式存在。片段优选选自F_{ab}片段、F_c片段、单链抗体(scFv)、可变区、恒定区、H链(V_H)和L链(V_L),更优选F_{ab}片段和scFv。片段,例如F_{ab}片段和F_c片段可通过使用不同的肽酶切割来产生。此外,可将片段工程化和重组表达,优选地scFv。

[0045] 已发现DNA适体和RNA适体表达针对许多靶分子的高亲力。靶结构可包括蛋白、肽和小分子,例如有机染料、核苷酸、氨基酸、维生素、生物碱等。更优选的是RNA适体,因为可在RNA中获得的2'-羟基促进几个分子内和分子间接触,后者存在于具有相同序列、不同序列的分子之间,或RNA与不由RNA组成的任何其它分子之间。这些核酸配体可通过高效体外选择法-所谓的SELEX法(通过指数式富集法对配体进行的系统性评价)来鉴定。由于RNA对生物溶液中的溶核降解敏感的,因此应当使用例如硫代磷酸酯、锁核酸或Spiegelmer来化学修饰RNA适体。称为Spiegelmer的适体的L-RNA形式特别长寿,因为它们基本上不受天然降解过程影响。由于它们对于广谱结构靶的高亲和力,因此适体作用与抗体非常相似。可使用标准亚磷酸胺化学来合成适体。此外,可有利地通过体外转录大量合成具有超过约30个核苷酸的RNA适体。适体的选择、合成和纯化对于本领域普通技术人员来说是公知的。

[0046] 可标记特定物质,在该情况下标记依赖于它们固有特性和使用的检测法,即需要的灵敏度、缀合的容易性、稳定性要求和可获得的装置和处理规定。为了检测特定温育产物,使用的方法取决于待监控的特定温育产物,并且对于本领域普通技术人员来说是公知的。根据本发明的适当检测法的优选实例是发光,特别地荧光,此外VIS着色和/或放射性发射。

[0047] 发光涉及作为化学发光、生物发光或光致发光的结果的光的发射。化学发光牵涉作为化学反应的结果的可见光的发射,然而生物发光需要萤光素酶的活性。也称为荧光刺激的目前优选的光致发光通过光子(优选通过辐射提供的)的吸收引起,所述光子作为具有30至50nm的波长偏移的光子在约 10^{-8} 秒的时间内再次被释放。用于荧光检测的装置包括但不限于典型台式荧光计、荧光多孔板读数器、光导纤维荧光计、荧光显微镜和偶联荧光检测的微芯片/微流体系统。

[0048] VIS着色是指任何消色差物质(achromatic substance)的可视化,以使能被裸眼看见。优选地,着色的强度利用光度计进行测量。

[0049] 同位素的放射性辐射通过闪烁来测量。液体闪烁法包括通过捕获称为闪烁混合液的有机溶液与溶质的系统中的 β 发射来检测样品内的 β 衰变。由样品中的放射性同位素例

如 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{32}P 、 ^{33}P 和 ^{35}S 发射的 β 衰变电子激发溶剂分子,所述溶剂分子依次将能量转移至溶质。溶质的能量发射(可见光子)通过闪烁计数器内的光电倍增管被转化成电信号。混合液必须还可用作增溶剂,从而保持样品的均匀悬浮。 γ 射线光子通常作为其它衰变过程(链式衰变)的结果产生来清除新形成的过量能力的核。它们没有质量,如果沿着其路径发生任何直接碰撞电离则产生极小质量。通过如下3个机制的一个或多个机制吸收 γ 光子以进行检测和定量:康普顿效应、光电效应和偶生成(pair production)。本发明的有利的 γ 衰变同位素为 ^{125}I 。

[0050] 标记法不受特别限制,只要标记物可被容易地检测。“标记的特定物质”是这样的物质,其通过接头或化学键共价地,或通过离子键、范德瓦尔斯、静电、疏水相互作用或氢键非共价地结合于标记物,以便标志蛋白的存在可通过检测结合于它们的标记物的存在来检测。

[0051] 抗体对酶的共价连接可通过不同方法例如利用戊二醛的偶联来进行。酶和抗体都通过游离氨基与戊二醛交联,除去网络化酶和抗体的副产品。在另一种方法中,如果酶是糖蛋白例如过氧化物酶,则将酶通过糖残基偶联于抗体。通过高碘酸钠氧化酶,将其与抗体的氨基直接交联。还可将其它包含糖类的酶以这样的方式偶联于抗体,然而有时因氧化作用而观察到活性的丧失,例如降低的碱性磷酸酶的活性。酶偶联还可通过使用异双功能交联剂例如琥珀酰亚胺6-(N-马来酰亚胺)己酸盐将抗体的氨基与酶例如 β -半乳糖苷酶的游离巯基交联来进行。

[0052] 可直接或间接检测抗体对蛋白的特异性免疫组合。直接标记物包括连接于抗体的荧光或发光标记物、金属、染料、放射性核素等。可使用利用碘-125 (^{125}I) 标记的抗体。使用特异于蛋白标志物的化学发光抗体的化学发光测定适合用于蛋白水平的灵敏非放射性检测。利用荧光染料标记的抗体也是适当的。荧光染料的实例包括但不限于DAPI、荧光素、异硫氰酸荧光素(FITC)、Oregon绿、Hoechst 33258、R-藻青蛋白、绿色荧光蛋白(GFP)、B-藻红蛋白、R-藻红蛋白、罗丹明、Texas红、四甲若丹明异硫氰酸盐(TRITC)、Cy3、Cy5和丽丝胺。间接标记物包括本领域已知的各种酶,例如辣根过氧化物酶(HRP)、碱性磷酸酶(AP)、 β -半乳糖苷酶、尿素酶等。可使用辣根过氧化物酶检测系统,例如利用显色底物四甲基联苯胺(TMB),其在过氧化氢存在的情况下产生在450nm可检测的可溶性产物。可以例如将碱性磷酸酶检测系统与显色底物对-硝基苯基磷酸一起使用,这产生在405nm可容易被检测的可溶性产物。类似地,可将 β -半乳糖苷酶检测系统与显色底物邻-硝基苯基- β -D-吡喃半乳糖苷(ONPG)一起使用,这产生在410nm可检测的可溶性产物。可将尿素酶检测系统与底物例如尿素-溴甲酚紫一起使用。自动淬灭荧光化合物(Auto-quenched fluorescent compound)可通过肿瘤相关蛋白酶、酶例如荧光素酶、纳米颗粒、生物素、地高辛配基等来激活。

[0053] 在本发明的另一个优选实施方案中,用地高辛配基、生物素、化学发光物质、荧光染料、磁珠、金属珠粒、胶体颗粒、电子致密试剂、酶(其全部在本领域中是公知的)或放射性同位素标记适体。用于标记本发明范围内的核酸的优选同位素为 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{32}P 、 ^{33}P 、 ^{35}S 或 ^{125}I ,更优选 ^{32}P 、 ^{33}P 或 ^{125}I 。

[0054] 可使用多种免疫测定技术,包括竞争性和非竞争性免疫测定。术语“免疫测定”包括技术,包括但不限于酶免疫测定(EIA),例如酶倍增免疫测定技术(enzyme multiplied immunoassay technique) (EMIT)、酶联免疫吸附测定(ELISA)、IgM抗体捕获ELISA (MAC

ELISA)和微粒酶免疫测定(MEIA)、此外毛细管电泳免疫测定(CEIA)、放射免疫测定(RIA);放射免疫分析(IRMA)、荧光偏振免疫测定(FPIA)和化学发光测定(CL)。必要时,可使这样的免疫测定自动化。还可将免疫测定与激光诱导荧光例如Luminex技术结合使用。脂质体免疫测定,例如流动注射脂质体免疫测定和脂质体免疫传感器也适合用于本发明。此外,其中蛋白/抗体复合物的形成导致增加的光散射的比浊法适合用于本发明的方法,所述光散射被转化成作为标志物浓度的函数的峰值比信号(peak rate signal)。

[0055] 在本发明的实施方案中,抗体用作特定物质,并且通过抗体的标记,优选通过ELISA,RIA,荧光免疫测定(FIA),可溶性颗粒免疫测定(SPIA)或western印迹检测温育产物。

[0056] 在本发明的优选实施方案中,将ELISA用于温育产物的检测。ELISA的组分为结合于免疫反应的一个配偶体的酶。优选在竞争性ELISA中,使用单个捕获抗体(在下文中称为一抗)标记标志蛋白的标记抗原(分析物衍生物),然而优选在非竞争性ELISA中标记抗体,优选地包括利用第二抗体(在下文中称为二抗)而非一抗沉淀抗原—抗体复合物,所述第二抗体针对所述标志蛋白的另一个表位。由抗原和两个抗体组成的复合物也称为夹心复合物。检测包括随后底物至产物,优选地有色产物的酶促转化,所述产物通过可视着色、生物发光、荧光或电信号的测量(酶电极)来识别。用于本发明的标记的有利的酶对于本领域普通技术人员来说是已知的,例如过氧化物酶(例如HRP)、氯霉素乙酰转移酶(CAT)、绿色荧光蛋白(GFP)、谷胱甘肽S-转移酶(GST)、荧光素酶、 β -半乳糖苷酶和AP。

[0057] 另外优选的是利用放射性同位素的放射免疫测定,所述同位素在合成过程中被掺入免疫试剂,或随后偶联于测定的免疫试剂,优选偶联于抗体。本发明方法中的优选放射性同位素为 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{32}P 、 ^{33}P 、 ^{35}S 和 ^{125}I ,更优选为 ^{14}C 、 ^{35}S 和 ^{125}I 。喜爱的方法遵从竞争性结合原理。恒定量的放射性蛋白标志物可变量的待分析的样品的所述标志物竞争确定量的过量存在的抗体。标记物的置换与可通过校准曲线估计的标志物浓度成正比。

[0058] 将有利地用荧光基团标记的抗原或抗体分别用于FIA。

[0059] SPIA利用作为凝集的结果的银颗粒的颜色变化。既不需要第二抗体也不需要指示剂反应来使其特别适用于本发明的范围。类似地有利地是使用结合于有色胶乳颗粒的抗体的胶乳凝集测试。

[0060] 用于本发明的特定温育产物的另一个喜爱的检测法是western印迹。首先,将凝胶混合和浇铸,将先前制备的样品加载至凝胶上,通过电泳分级分离。将存在于聚丙烯酰胺凝胶中的蛋白点印至硝酸纤维素膜,可将抗体施用于硝酸纤维素膜以检测特定目标蛋白。简单地进行Western印迹,有利地此时浓度的精确测定不是必需的。

[0061] 不同数目的抗本发明的蛋白标志物的特异性抗体是可获得的。当免疫反应通过对于生物体是陌生的并且具有超过3.000g/mol的分子量的抗原引起时,抗体通常在哺乳动物生物体中产生。用于抗体产生的有利的宿主物种包括山羊、兔和小鼠。其它多克隆和单克隆抗体可源自不同物种及其片段。流行的技术例如杂交瘤技术对于本领域普通技术人员来说是公知的。抗体在本发明方法中被用作特定物质。

[0062] 可将抗体固定在多种固体载体(例如磁珠或层析基质颗粒、测定板(例如微量滴定孔)的表面、成片固体基质材料或膜(例如塑料、尼龙、纸)等)上。测试条可通过将抗体或多种抗体涂覆在固体载体上的阵列中来制备。随后可将该测试条浸入测试样品,通过洗涤和

检测步骤快速处理以产生可测量的信号例如有色斑点。

[0063] 可在多种物理形式中进行分析。例如,微量滴定板或自动化的使用可用于促进大量测试样品的处理。或者,单个样品形式可被开发以适时的方式促进诊断或预后。有用的物理形式包括用于检测多种生物标志物的具有多个分离可寻址的位置的表面。这样的形式包括蛋白微阵列或蛋白芯片。在这些实施方案中,每一个分离的表面位置可包含结合一种或多种蛋白标志物的抗体以用于每一个位置上的检测。表面可以可选择地包含一种或多种固定在表面的分离位置上的分离的颗粒(例如微粒或纳米颗粒),其中微粒包含抗体来固定用于检测的一种或多种蛋白标志物。在一个实施方案中,提供了基质,其中每一个位置代表蛋白的分开结合位点,并且其中存在所有蛋白p-p53 (Ser15)、p21、p-H2A.X (Ser139)、p-ATM (Ser1981)、p-Chk1 (Ser345)、p-ATR (Ser428)、p-cdc2 (Thr14/Tyr15)、Gadd45a和p-Chk2 (Thr68)的结合位点。

[0064] 可以例如使用分光光度计检测来自显色义物的颜色,使用检测放射的放射线计数器,例如用于 ^{125}I 的检测的 γ 计算器,或在具有特定波长的光存在的情况下使用荧光计检测荧光来分析来自直接或间接标记物的信号。为了检测酶联抗体,可按照制造商的说明书,使用分光光度计例如EMAX微量滴定板读数器(Molecular Devices;Menlo Park,CA)进行定量分析。必要时,可使本发明的测定自动化或通过机器人来进行,可同检测来自多个样品的信号。详细地,可通过例如利用荧光激光显微镜和CCD照相机记录的荧光来检测蛋白,利用计算机分析荧光强度。在本文中的任何实施方案中,任选地例如通过数字化图像以及在计算机上存储和分析图像来进一步处理通过照相机或其它记录设备(例如光电二极管和数据存储装置)观察和任选地记录的光学图像。多种商购可得的外周设备和软件可获得用于数字化、存储和分析数字化影像或数字化光学图像。一个常规系统将来自样本视野的光传递至通常用于本领域的冷却的电荷耦合器件(CCD)照相机。CCD照相机包括一系列图片元素(像素)。来自样本的光在CCD上成像。将对应于样本的区域的特定像素取样以获得每一个位置的光强读数。平行地处理多个像素以增加速度。本发明的装置和方法容易地用于通过荧光或暗视野显微技术观察任何样品。

[0065] 在筛选法的另一个实施方案中,可另外地改进诱变和/或前-诱变活性的检测。为此目的,通过检测选自p-p53 (Ser15)、p21、p-H2A.X (Ser139)、p-ATM (Ser1981)、p-Chk1 (Ser345)、p-ATR (Ser428)、p-cdc2 (Thr14/Tyr15)、Gadd45a和p-Chk2 (Thr68)的数种蛋白,将一定量的信号或信号的变化与系统中蛋白表达发生关系来测定蛋白表达。换句话说,蛋白的活性形式的表达水平与发射的物理信号的量或发射的物理信号的变化相关。用不同浓度的鉴定的具有(前-)基因毒性的化合物温育本发明的细胞系统。在诱变化合物存在的情况下观察到的发射的信号的量或信号的变化表示通过化合物经历的蛋白表达的变化。变化从而可与样品中诱变剂的浓度相关,即,校准曲线使得能够进行匹配浓度的计器读数。优选地,如果使用UV/VIS着色或发光,校准曲线基于Lambert-Beer公式。化合物的基因毒性通过将样品中蛋白的浓度与利用诱变剂和/或未用诱变剂处理的细胞的已知蛋白浓度水平相比较来诊断。应理解已知的浓度在统计上已被证明,从而分别代表一定水平或范围。还已通过本发明的标志蛋白的差异表达分析计算了蛋白表达的方法和强度,以便识别对于某一因子的显著上调。与非受激细胞的蛋白浓度水平相异的任何测量的浓度表示测试的细胞样品的异常性,然而在可与非受激细胞的浓度水平相比较的蛋白浓度上不能将化合物分类为诱变

剂。优选地测量高于非受激细胞的蛋白浓度水平的浓度以检测基因毒性。通过使用该方法，本发明人证明了对亚微摩尔或甚至纳米摩尔浓度的敏感性。校准曲线显示可在横跨数个数量组的动态范围内使用所述方法。

[0066] 因此，本发明的方法包括通过将测试系统中的蛋白表达水平与对照系统中的蛋白表达水平相比较来筛选基因毒性和/或前-基因毒性活性的水平。

[0067] 虽然本发明的生物标志物组显示允许在筛选法的范围内仅使用两个标志蛋白的灵敏性，但优选将超过这些标志蛋白的标志蛋白用于检测基因毒性。本发明人已举例说明分析多个诱变剂响应蛋白通过覆盖比低-多个-蛋白报道分子测定更广谱的基因毒性反应来增加筛选稳定性和减少错误率。在本发明的优选实施方案中，测定所述蛋白的至少3、4、5、6、7、8或9种，更优选至少5种蛋白，最优选9种蛋白的表达水平。

[0068] 最优选地，测定至少蛋白p-p53 (Ser15) 和p21的表达水平。高度优选地，测定至少蛋白p-p53 (Ser15)、p21、p-H2A.X (Ser139)、p-ATM (Ser1981) 和p-Chk1 (Ser345) 的表达水平。除了所述5种蛋白的表达以外，还可测定选自p-ATR (Ser428)、p-cdc2 (Thr14/Tyr15) 和p-Chk2 (Thr68)，特别地选自p-ATR (Ser428)、p-cdc2 (Thr14/Tyr15)、Gadd45a和p-Chk2 (Thr68) 的一种或多种蛋白的表达水平。

[0069] 在本发明的另一个最优选实施方案中，测定至少蛋白p-p53 (Ser15)、p21、p-H2A.X (Ser139)、p-Chk1 (Ser345)、p-ATR (Ser428)、p-Chk2 (Thr68) 和任选地MDM2的表达水平。本发明的另一个最优选实施方案是测定至少蛋白p-p53 (Ser15)、p-H2A.X (Ser139)、p-Chk1 (Ser345) 和p-Chk2 (Thr68) 的表达水平以及p21和任选地ATR及MDM2的总蛋白水平。

[0070] 高度优选地测定蛋白p-p53 (Ser15)、p21、p-H2A.X (Ser139)、p-ATM (Ser1981)、p-Chk1 (Ser345)、p-ATR (Ser428)、p-cdc2 (Thr14/Tyr15)、Gadd45a和p-Chk2 (Thr68) 的表达水平。

[0071] 不用说，将任何优选实施方案中的所述各自优选的标志蛋白的表达与对照系统中的蛋白表达相比较。

[0072] 如果系统或其样品能够表达多种蛋白并且将多种蛋白的表达模式与对照系统中的表达模式相比较，则可化合物特异性地表征基因毒性。具体地，通过多种蛋白的关系和/或改变的调控的量级测定表达模式。本发明的筛选法不仅评价了对待评价的细胞具有基因毒性活性的化学物质的效应，而且还显示了该效应的细节。通过单个地评价分类的蛋白的表达水平，可能区分具有基因毒性活性的化合物是如何影响待评价的细胞的。

[0073] 本发明还教导筛选法的实施方案，其中相较于显示非基因毒性效应的哺乳动物，测定取自施用了一种或多种待筛选的化合物的哺乳动物，优选实验室哺乳动物的生物样品，其中表达水平的升高表示增加的化合物对于基因毒性易感病态具有治疗作用的可能性。对于治疗作用，包括了定量水平。“治疗作用”在一定程度上缓解了疾病的一个或多个症状，或使一个或多个与疾病或病态或其病因相关的生理或生物化学参数部分或完全地恢复正常。此外，表达“治疗有效量”表示与未接受该量的对应受试者相比较具有下列结果的量：疾病、综合征、状况、抱怨、障碍或副作用的改善的治疗、治愈、预防或消除，或还有疾病、抱怨或障碍的进展的减慢。表达“治疗有效量”还包括对于增强正常生理功能是有效的量。数种化合物的测试使得选择最适合于哺乳动物受试者的治疗的该化合物成为可能。根据特定细胞的体外数据，有利地针对所述细胞预调整选择的化合物的体内剂量率。因此，治疗作用

得到显著增强。

[0074] 在本发明的另一个方面,在例如一系列化合物内鉴定了具有最小(前-)基因毒性的化合物或非(前-)基因毒性化合物,其中表达水平的最低升高或未升高表示适合于其期望的用途的所述化合物。用途可以是治疗性的或非治疗性的,并且不受限于任何特定目的,但与本领域中已知的期望用途相容(例如手册、纸等)。在本发明的优选方面,提供了用于给患者施用治疗性化合物的方法,包括利用一系列化合物进行本发明的筛选方法,鉴定不具有基因毒性和前-基因毒性活性的化合物,和给需要所述化合物的期望用途的患者施用所述化合物。应理解,方法的目的不在于任何用途和/或对于所述用途最具活性的化合物的鉴定,而在于在期望的用途过程中不利(前-)基因毒性效应的消除。

[0075] 本发明还涉及用于监控发生因增殖、分化和/或损伤修复的失调(因响应利用化合物的治疗而导致的)而引起的、介导的和/或传播的癌症、肿瘤、转移和/或血管生成的障碍的可能性的方法,其中测定取自哺乳动物的生物样品中选自p-p53(Ser15)、p21、p-H2A.X(Ser139)、p-ATM(Ser1981)、p-Chk1(Ser345)、p-ATR(Ser428)、p-cdc2(Thr14/Tyr15)、Gadd45a和p-Chk2(Thr68)的至少两种蛋白的表达水平,其中至少一种所述蛋白的表达水平的升高表明所述化合物具有基因毒性和/或前-基因毒性活性,并且所述可能性增加,所述哺乳动物需要利用给所述哺乳动物施用所述化合物的这样的治疗。优选通过上文中所示的本发明的筛选方法获得化合物。因此,本说明书关于筛选法的先前教导是有效的且可应用的而非限于监控法(如果是有利的)。

[0076] 上述多个基因的鉴定提供了用于评估状态、状况或治疗的进展的强有力工具。具体地,可在事件例如手术、治疗方案起始或治疗方案完成之前在患者中鉴定多个基因,以提供基线结果。随后可在这样的事件过程中或之后将该基线与使用相同方法获得的结果相比较。该信息可用于诊断和预后目的。

[0077] 本发明的监控方法可用于人和兽医学。哺乳动物优选为实验室哺乳动物和/或非人生物体。在本文中,可在疾病发作前或发作后施用化合物一次或数次,用作疗法。术语“有效量”或“有效剂量”或“剂量”可在本文中互换使用,并且表示对疾病或病态具有预防性或治疗性相关伤脑筋的药物化合物的量,即该量在组织、系统、动物或人中引起为例如研究者或医生所寻找或期望的生物或医学反应。

[0078] 本发明的上述医学产品特别地用于治疗性治疗。监控被当作一种类型的治疗,其中优选以不同的间隔施用化合物,例如以增强反应和完全消除病原体和/或基因毒性介导的疾病的症状。可应用相同的化合物或不同的化合物。还可将药剂用于减少发生疾病的可能性或甚至预先预防由于基因毒性影响造成的与增殖、分化和/或损伤修复相关的那些疾病的起始,或用于治疗出现和连续的症状。在本发明的含义中,如果受试者具有上述生理或病理状况例如家族素因、遗传缺陷或先前通过的疾病,则预防性治疗是合理的。本发明考虑的疾病优选为癌症、肿瘤、转移和/或血管生成的障碍。

[0079] 根据本发明的所述化合物可以以它们的最终非盐形式使用。在另一方面,本发明还包括以它们药学上可接受的盐形式存在的这些化合物的用途,所述盐形式可通过本领域已知的方法从不同的有机及无机酸和碱产生。在本文中可互换使用的表达“药学上可接受的盐”和“生理上可接受的盐”在本关系中被用来表示活性成分,该成分包含以其盐之一的形式存在的根据本发明的化合物,特别地如果该盐形式相较于活性成分的游离形式或更早

使用的活性成分的任何其它盐形式赋予活性成分改善的药代动力学的话。活性成分的药物可接受盐形式还可首次提供具有其先前不具有的期望的药代动力学性质的该活性成分,并且相对于其在体内的治疗功效甚至可对该活性成分的药代动力学具有积极影响。

[0080] 此外,本发明涉及用于预测患者响应利用药物的治疗性治疗而遭受肿瘤的可能性的体外方法,包括步骤:(i) 测量来自所述患者的组织或血浆的活检样品的至少两种蛋白的表达水平,所述蛋白选自p-p53 (Ser15)、p21、p-H2A.X (Ser139)、p-ATM (Ser1981)、p-Chk1 (Ser345)、p-ATR (Ser428)、p-cdc2 (Thr14/Tyr15)、Gadd45a和p-Chk2 (Thr68), (ii) 将来自所述患者的组织或血浆的组织样品离体地暴露于所述药物,和 (iii) 测量步骤 (ii) 的所述暴露的样品中的步骤 (i) 中指定的所述蛋白的表达水平,以及计算步骤 (i) 和 (iii) 中测量的表达水平的差异,其中该步骤 (iii) 相较于步骤 (i) 中获得的所述蛋白的至少一种的表达水平的升高表示所述药物具有基因毒性和/或前基因毒性活性并且所述可能性增加。

[0081] 本发明的目的还有使用选自p-p53 (Ser15)、p21、p-H2A.X (Ser139)、p-ATM (Ser1981)、p-Chk1 (Ser345)、p-ATR (Ser428)、p-cdc2 (Thr14/Tyr15)、Gadd45a和p-Chk2 (Thr68) 的至少两种蛋白作为标志蛋白来筛选具有基因毒性和/或前基因毒性活性的化合物。本说明书关于筛选法的先前的教导是有效的且可应用的而非限于所述用途(如果是有利的)。

[0082] 本发明的另一个目的是使用与至少一种标志蛋白特异性相互作用的物质来检测基因毒性或前基因毒性活性。本发明的优选方面是使用至少两种抗体(每一种抗体具有对选自p-p53 (Ser15)、p21、p-H2A.X (Ser139)、p-ATM (Ser1981)、p-Chk1 (Ser345)、p-ATR (Ser428)、p-cdc2 (Thr14/Tyr15)、Gadd45a和p-Chk2 (Thr68) 的不同蛋白的特异性结合)来检测基因毒性和/或前基因毒性活性。抗体优选直接用同位素例如生色团、发光体或色原标记,或间接用生物素标记,链霉抗生物素蛋白复合物可随后结合所述生物素。通过测定抗体的存在或不存在,可检测目标标志蛋白的存在或不存在。本说明书关于筛选法的先前的教导被认为是有效的且可应用的而非限于所述抗-标志物抗体的所述用途(如果是有利的)。

[0083] 本发明还可作为用于检测基因毒性和/或前基因毒性活性的试剂盒来进行实践,其包含至少两种抗体,每一种具有对选自p-p53 (Ser15)、p21、p-H2A.X (Ser139)、p-ATM (Ser1981)、p-Chk1 (Ser345)、p-ATR (Ser428)、p-cdc2 (Thr14/Tyr15)、Gadd45a和p-Chk2 (Thr68) 的不同蛋白的特异性结合。试剂盒被特别地设计来进行本发明的方法以筛选具有基因毒性和/或前基因毒性活性的化合物。本发明的试剂盒可包括物品,其包括书面说明书或指导用户如何实践本发明的方法。本说明书关于筛选法的先前的教导被认为是有效的且可应用的而非限于试剂盒(如果是有利的)。

[0084] 在本发明的范围内,首次提供了用于筛选具有基因毒性活性的化合物的方法,该方法利用达到9种蛋白的独特蛋白表达模式。本发明教导与基因毒性相关的标志蛋白的特征表达指纹。数据支持体外机制分析(mechanistic profiling in-vitro)相较于单终点检测是强有力的预测基因毒性的工具。机制分析在这样的数据解释过程中具有益处,并且机制研究是促进具有基因毒性的化合物的分类的强有力工具。此外,机制数据将改善具有基因毒性的化合物的化学表征和风险评估。在药物开发过程中将蛋白分析用于早期筛选,有助于对不同分子进行评级和在开发早期突出显示具有基因毒性特征的化合物,从而通过阻止随后的体内测试来节省成本和动物。

[0085] 可将发现的9种假定的标志蛋白用于筛选未知化合物,所述化合物有效地允许在药物开发早期特异性地和灵敏性地鉴定和表征它们的基因毒性和前基因毒性潜力。能够在功能上表达达到9种标志蛋白的细胞系统的基因毒性应激导致相较于该细胞系统的对照这些标志蛋白的增加的表达和激活。组合的上述蛋白具有协同作用,从而使得能够检测具有高性能的基因毒素。不同表达的蛋白的分析特别适合用于高通量测试系统。基于高含量成像(HCI)的蛋白表达分析可用可有利地用于具有未知作用模式的基因毒素和预测它们在药物发现过程早期产生基因毒性效应的潜能。除此以外,使用HCI的基于细胞的模型具有以少量化合物需要快速产生数据的有利方面。可以以简单的,有成本效益的可靠方式来进行本发明的检测法以及生成监控法(arising monitoring method)。以至少75%,更优选至少80%,最优选至少90%的灵敏度和/或特异度筛选具有(前-)基因毒性活性的化合物。在本文中,“灵敏度”是指相对于所有阳性测试化合物经正确测试为阳性的化合物的数量,“特异度”是指相对于所有阴性化合物经测试为阴性的化合物的数量。可将该特异性标志物组与其它基因毒性终点如微核测定组合来产生用于广泛的潜在地具有基因毒性的化合物的高预测性筛选系统。

[0086] 将本文中引用的所有参考资料通过引用整体并入本发明的公开内容。

[0087] 应理解本发明不限于本文中描述具体方法、特定物质、用途和阵列,因为这样的物质可变化。还应理解,本文中使用的术语仅为了描述具体的实施方案,并且无意限定本发明的范围,所述范围仅由所附权利要求界定。如本文中所用,包括所附权利要求,除非上下文另外明确地指出,否则单词例如“一个/一种(a)”、“一个/一种(an)”和“所指物(the)”的单数形式包括它们对应的复数所指物。因此,例如“一个/一种化合物”包括单个/种或多个/种不同的化合物,“一个/一种方法”包括对于本领域普通技术人员来说是已知的等同步骤和方法等等。除非另外定义,否则本文中使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属的领域内的普通技术人员通常理解的含义相同的含义。

[0088] 根据本发明是必需的技术详细地描述于本说明书中。未详细描述的有关技术对应于本领域普通技术人员公知的已知标准方法,或描述更详细地描述于引用的参考资料、专利申请或标准文献中。虽然与本文中描述的方法和材料相似或等同的方法和材料可用于本发明的实践或测试,但在下文中描述了适当的实例。下列实施例通过举例说明但非限制的方式提供。在实施例中,使用无污染活性(在可行的情况下)的标准试剂和缓冲液。特别地解释实施例以便它们不限于明确显示的特征组合,但如果本发明的技术问题得以解决则可无限制地组合举例说明的特征。

[0089] 表1列出了5种分析的蛋白和具有它们的翻译后修饰的4种补充标志物、(别名)蛋白名称、(别名)基因名称和登录号,其对于每一种蛋白都是唯一。

[0090] 表2列出了用(前-)基因毒素(环磷酰胺、7,12-二甲基苯并蒽、黄曲霉毒素B₁、2-乙酰氨基苄、放射菌素D、磺酸甲酯、依托泊苷)和非基因毒素(D-甘露醇、苯乙福明HCl、孕酮)测试的9种蛋白标志物(p-p53(Ser15)、p21、p-H2A.X(Ser139)、p-ATM(Ser1981)、p-Chk1(Ser345)、p-ATR(Ser428)、p-cdc2(Thr14/Tyr15)、Gadd45a和p-Chk2(Thr68))。阳性/阴性结果分别通过红/绿颜色显示。

[0091] 表3列出了由欧洲替代方法验证中心(ECVAM)推荐的组1化学药品(“在体外哺乳动物细胞基因毒性测试中应当被检测为阳性的体内基因毒素”)以判断体外基因毒性测试的

性能 (Kirkland等人, 2008, Mutat. Res. 653, 99-108)。

[0092] 表4列出了由欧洲替代方法验证中心 (ECVAM) 推荐的组2化学药品 (“非DNA反应性化学药品, 包括非基因毒性致癌物, 其在体外哺乳动物细胞基因毒性测试中应当产生阴性结果”) 以判断体外基因毒性测试的性能 (Kirkland等人, 2008, Mutat. Res. 653, 99-108)。

[0093] 表5列出了由欧洲替代方法验证中心 (ECVAM) 推荐的组3化学药品 (“应当在体外哺乳动物细胞基因毒性测试中产生阴性结果但未曾被报导通常以高浓度或高细胞毒性水平在小鼠淋巴瘤细胞中诱导染色体畸变或tk突变的化学药品。”) 以判断体外基因毒性测试的性能 (Kirkland等人, 2008, Mutat. Res. 653, 99-108)。

[0094] 表6列出了由ECVAM推荐的组1化学药品 (“在体外哺乳动物细胞基因毒性测试中应当被检测为阳性的体内基因毒素”) 和它们的受自发荧光 (AF) 限制的测试的最高浓度、基于先前的实验 (Cyto) 和沉淀 (Prec) 的细胞毒性, 以及<50%的两个细胞毒性参数每有效视野选择的细胞计数 (selected cell count per valid field) (SCC) 和CMFDA细胞质平均强度 (CMFDA) 的最高浓度。

[0095] 表7列出了由ECVAM推荐的组2化学药品 (“非DNA反应性化学药品, 包括非基因毒性致癌物, 其在体外哺乳动物细胞基因毒性测试中应当产生阴性结果”) 和它们的受自发荧光 (AF) 限制的测试的最高浓度、基于先前的实验 (Cyto) 和沉淀 (Prec) 的细胞毒性, 以及<50%的两个细胞毒性参数每有效视野选择的细胞计数 (SCC) 和CMFDA细胞质平均强度 (CMFDA) 的最高浓度。

[0096] 表8列出了由ECVAM推荐的组3化学药品 (“应当在体外哺乳动物细胞基因毒性测试中产生阴性结果但未曾被报导通常以高浓度或高细胞毒性水平在小鼠淋巴瘤细胞中诱导染色体畸变或tk突变的化学药品。”), 和它们的受自发荧光 (AF) 限制的测试的最高浓度、基于先前的实验 (Cyto) 和沉淀 (Prec) 的细胞毒性, 以及<50%的两个细胞毒性参数每有效视野选择的细胞计数 (SCC) 和CMFDA细胞质平均强度 (CMFDA) 的最高浓度。

[0097] 表9列出了用由ECVAM推荐的组1化学药品 (“在体外哺乳动物细胞基因毒性测试中应当被检测为阳性的体内基因毒素”) 测试的5种蛋白标志物 (p-p53 (Ser15)、p21、p-H2A.X (Ser139)、p-ATM (Ser1981)、p-Chk1 (Ser345)) 的结果。阳性/阴性结果分别由红/绿色显示。

[0098] 表10列出了用由ECVAM推荐的组2化学药品 (“非DNA反应性化学药品, 包括非基因毒性致癌物, 其在体外哺乳动物细胞基因毒性测试中应当产生阴性结果”) 测试的5种蛋白标志物 (p-p53 (Ser15)、p21、p-H2A.X (Ser139)、p-ATM (Ser1981)、p-Chk1 (Ser345)) 的结果。阳性/阴性结果分别由红/绿色显示。

[0099] 表11列出了用由ECVAM推荐的组3化学药品 (“应当在体外哺乳动物细胞基因毒性测试中产生阴性结果但未曾被报导通常以高浓度或高细胞毒性水平在小鼠淋巴瘤细胞中诱导染色体畸变或tk突变的化学药品。”) 测试的5种蛋白标志物 (p-p53 (Ser15)、p21、p-H2A.X (Ser139)、p-ATM (Ser1981)、p-Chk1 (Ser345)) 的结果。阳性/阴性结果分别由红/绿色显示。

[0100] 表12列出了使用MILLIPLEX MAP磁珠试剂盒和Luminex系统获得的细胞裂解物中磷酸化p53 (Ser15) 的变化和p21的总蛋白水平的结果。

实施例

[0101] • 化学药品和细胞培养基补充剂

[0102] 测试的化合物组被欧洲替代方法验证中心 (ECVAM) 推荐来判断体外基因毒性测试的性能: 列出了3组已测试的化合物中的两组 (表3、4和5) (Kirkland等人, 2008, Mutat. Res. 653, 99-108)。以97%的最低纯度获得所有测试的化合物。除来自Calbiochem (Darmstadt, 德国) 的环磷酰胺外, 大部分化合物订购自Sigma-Aldrich (Taufkirchen, 德国); 2-乙酰氨基苄和泰素来自Acros Organics (Geel, 比利时), 二甲基亚硝胺和氟草隆来自Dr. Ehrenstorfer GmbH (Augsburg, 德国), 2-氨基-3-甲基咪唑并[4,5-f]喹诺酮和2-氨基-1-甲基-6-苯基咪唑并[4,5-f]吡啶来自Apollo Scientific Ltd. (Bredbury, UK), N,N-二环己基硫脲来自LGC (Teddington, UK), 氨唑来自TCI Europe (Zwijndrecht, 比利时) 以及硫酸麻黄碱来自LGC (Teddington, UK)。DMEM/F12、庆大霉素和丙酮酸钠购自Invitrogen Corp. (Karlsruhe, 德国)。胎牛血清 (FBS) 获自HyClone (Order No. SV30160.03, Lot No. RSJ30856, HyClone UK Ltd., Cramlington, UK)。B-蔡黄酮/苯巴比妥诱导的大鼠肝S9 (Order No. R1081.S9, Lot No. 0710507) 订购自Tebu-bio (Offenbach, 德国)。胰蛋白酶、β-烟酰胺腺嘌呤二核苷酸2'-磷酸还原的四钠盐水合物 (NADPH) 和青霉素/链霉素溶液获自Sigma-Aldrich (Taufkirchen, 德国)。氯化镁、氯化钾、磷酸二氢钠一水合物和磷酸氢二钠七水合物购自Merck KGaA (Darmstadt, 德国)。

[0103] • 细胞培养

[0104] 将HepG2细胞 (Order No. HB-8065, Lot. 58483209, ATCC, Manassas, USA) 于培养瓶中在37℃和5%CO₂下培养在DMEM/F12 (具有L-谷氨酰胺和补充有10% (v/v) FBS、1% (v/v) 青霉素 (10kU/ml)/链霉素 (10mg/ml) 溶液的15mM Hepes、0.1% (v/v) 庆大霉素 (50mg/ml) 和1mM丙酮酸钠) 中。取决于实验, 在使用胰蛋白酶使细胞脱离后, 将适当数目的细胞接种至板上, 在处理之前将细胞在37℃和5%CO₂下处理24h。利用第4-20代的细胞进行所有实验3次。

[0105] 9种假定标志蛋白的测试

[0106] • 细胞处理和剂量选择

[0107] 将细胞接种至黑色多聚D-赖氨酸涂覆的96孔板 (BD Biocoat, Franklin Lakes, USA) (0.02x 10⁶个细胞/孔) 上, 放置24h以进行附着, 随后用测试化合物处理。对于每一种化合物, 利用2倍系列稀释度测试7个浓度。DMSO 1% (v/v) 用作实验的载体对照。对于具有直接基因毒性和前基因毒性的化合物处理方法不同。具有直接基因毒性的化合物的处理是持续的, 并且在48h过程中每日进行重复。将具有前基因毒性的化合物与代谢活化系统一起温育6h (以限制S9-混合物的细胞毒性作用)。在该时期后, 用细胞培养基洗涤细胞, 随后进行18-h的恢复期。在48h过程中每日重复该处理。所使用的代谢活化系统由下列组分和浓度组成: 8mM MgCl₂、32.8mM KCl、12mM NADPH、124mM磷酸盐缓冲液和2500pmol/ml细胞色素P450 (CYP) (于预混合物中的含量), 对应于在用细胞培养基以1:3.33稀释后作为终浓度的2.4mM MgCl₂、9.8mM KCl、3.6mM NADPH、37.2mM磷酸盐缓冲液和750pmol/ml CYP。

[0108] • 免疫荧光染色

[0109] -用于细胞毒性参数的染色方案:

[0110] 处理后, 用PBS (Gibco Invitrogen, Karlsruhe, 德国) 漂洗细胞, 随后用10μM的细胞培养基中的CellTracker Green 5-氯甲基荧光素二乙酸酯 (CMFDA) (Invitrogen, Karlsruhe, 德国) 进行染色。CMFDA本身是非荧光的, 被活细胞中的酯酶水解成荧光染料。与

硫醇基的反应导致可渗透细胞的荧光染料-加合物。酯酶活性可用作细胞活力的指示器 (Papadopoulos等人,1994,J Immunol Methods 177,101-111)。在于37℃进行30min的温育期后,用PBS洗涤细胞,随后3.7%的PBS中的甲醛 (Sigma-Aldrich,Taufkirchen,德国) 固定20min。随后,用0.05%Tween 20进行2次额外的洗涤步骤,随后用PBS洗涤细胞,最后添加PBS和测量细胞。

[0111] -用于假定标志蛋白的染色方案:

[0112] 处理后,用PBS (Gibco Invitrogen,Karlsruhe,德国) 漂洗细胞,随后用3.7%的PBS中的甲醛 (Sigma-Aldrich,Taufkirchen,德国) 固定20min。在用PBS洗涤2次后,封闭细胞,用PBS中的7.5%山羊血清 (Sigma-Aldrich,Taufkirchen,德国) 和0.3%Triton X-100 (Sigma-Aldrich,Taufkirchen,德国) 透化细胞30min。将每一种一抗分别于封闭/透化溶液中稀释至如下终浓度:10μg/ml抗-Gadd45α兔单克隆抗体IgG (Cell Signaling,Danvers,USA)、10μg/ml抗-p21兔单克隆抗体IgG (Cell Signaling,Danvers,USA);5μg/ml抗-p-ATM (Ser1981) 兔单克隆抗体IgG (Cell Signaling,Danvers,USA);10μg/ml抗-p-ATR (Ser428) 兔单克隆抗体IgG (Cell Signaling,Danvers,USA);4μg/ml抗-p-cdc2 (Tyr15/Thr14) 兔多克隆抗体IgG (Santa Cruz Biotechnology,Inc.,Santa Cruz,USA);20μg/ml抗-p-Chk1 (Ser345) 兔单克隆抗体IgG (Cell Signaling,Danvers,USA);20μg/ml抗-p-Chk2 (Thr68) 兔单克隆抗体IgG (Cell Signaling,Danvers,USA);2.5μg/ml抗-p-组蛋白H2A.X (Ser139) 兔单克隆抗体IgG1 (Cell Signaling,Danvers,USA) 或2μg/ml抗-p-p53 (Ser15) 兔单克隆抗体IgG (Invitrogen,Karlsruhe,德国),随后添加所述抗体。在温育16-18h后,用0.05%的PBS中的Tween 20 (Calbiochem,Darmstadt,德国) 洗涤细胞2次,添加封闭/透化溶液中的二抗/16μM Hoechst染色溶液。将二抗 (Alexa Fluor 488山羊抗-兔IgG,Invitrogen,Karlsruhe,德国) 稀释至终浓度2μg/ml。在1h的温育后,用0.05%Tween 20进行2次额外的洗涤步骤,用PBS洗涤细胞,最后添加PBS,测量细胞。

[0113] • 图像获取和细胞毒性参数的分析:

[0114] 在ArrayScan VTI HCS读数器 (Cellomics,Pittsburgh,USA) 上,使用10x物镜进行图像获取。为了检测足够的细胞,采集在每一个孔的中间开始的20个图像。

[0115] 对于每一种染料按照激发/发射波长选择滤光片:

[0116] -用于细胞毒性参数的方案:

[0117] 通道1:365±25和515±10nm (XF93-Hoechst),用于Hoescht 33342,

[0118] 通常2:475±20和515±10nm (XF93-FITC),用于CMFDA

[0119] • 图像获取和假定标志蛋白的分析:

[0120] 在ArrayScan VTI HCS读数器 (Cellomics,Pittsburgh,USA) 上,使用20x物镜进行图像获取。为了检测足够的细胞,采集在每一个孔的中间开始的20个图像。

[0121] 对于每一种染料按照激发/发射波长选择滤光片:

[0122] -用于假定标志蛋白的方案:

[0123] 通道1:365±25和515±10nm (XF93-Hoechst),用于Hoescht 33342

[0124] 通道2:475±20和515±10nm (XF93-FITC),用于Alexa Fluor 488山羊抗-兔

[0125] 使用软件iDev和Bioapplication 4.0版 (Cellomics,Pittsburgh,USA) 分析图像。将染色的细胞核用于核和细胞质 (围绕核的环) 的定位。

[0126] 产生下列读出参数:

[0127] -用于细胞毒性参数的方案:

[0128] 通道1:每有效视野选择的细胞计数

[0129] 通道2:CMFDA细胞质平均强度

[0130] -用于假定标志蛋白的方案:

[0131] 通道2:蛋白核平均强度

[0132] • 数据分析和解释

[0133] 针对每一种化合物和浓度计算处理样品相对于载体对照的倍数调控。使用学生氏t检验测定统计显著性 (p -值 <0.05)。基于对照值和相较于对照值的3倍标准差的增加选择每一个参数的阈值。对于p-p53 (Ser15)、p-H2A.X (Ser139) 和p-ATM (Ser1981), 阈值被设置至1.5, 对于p21、p-Chk1 (Ser345)、p-ATR (Ser428)、p-cdc2 (Tyr15/Thr14) 和Gadd45 α , 阈值被设置至1.6, 对于p-Chk2 (Thr68) 阈值被设置至1.9。不包括具有沉淀或自发荧光的浓度以及至少在两个细胞毒性参数 (每有效视野选择的细胞计数和细胞质中的CMFDA强度) 之一中显示 $\geq 50\%$ 的细胞毒性作用的浓度。

[0134] 5种标志蛋白的测试

[0135] • 细胞处理和剂量选择

[0136] 将细胞接种至黑色多聚D-赖氨酸涂覆的96孔板 (BD Biocoat, Franklin Lakes, USA) (0.02×10^6 个细胞/孔) 中, 放置24h以进行附着, 随后用由ICH S2 (R1) 指导 (EMA, 2011) 推荐的1mM的最大浓度的测试化合物进行处理。对于每一种化合物, 利用2倍系列的稀释度测试9个浓度。DMSO 1% (v/v) 用作实验的载体对照。对于具有直接基因毒性和前基因毒性的化合物, 处理方法不同。具有直接基因毒性的化合物的处理正在进行, 并且在48h过程中每日进行重复。将具有前基因毒性的化合物与代谢活化系统一起温育6h (以限制S9-混合物的细胞毒性作用)。在该时期后, 用细胞培养基洗涤细胞, 随后进行18-h的恢复期。在48h过程中每日重复该处理。使用的代谢活化系统由下列组分和浓度组成: 8mM $MgCl_2$ 、32.8mM KCl、12mM NADPH、124mM磷酸盐缓冲液和2500pmol/ml细胞色素P450 (CYP) (于预混合物中的含量), 对应于在用细胞培养基以1:3.33稀释后作为终浓度的2.4mM $MgCl_2$ 、9.8mM KCl、3.6mM NADPH、37.2mM磷酸盐缓冲液和750pmol/ml CYP。

[0137] • 免疫荧光染色

[0138] 利用和不利用代谢活化系统对每一种化合物进行两种不同的染色法:

[0139] -染色方案1:

[0140] 处理后, 用PBS (Gibco Invitrogen, Karlsruhe, 德国) 漂洗细胞, 随后用3.7%的PBS中的甲醛 (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, 德国) 固定细胞20min。在用PBS进行额外的洗涤步骤后, 用2%的PBS中的驴血清 (Millipore, Schwalbach, 德国) 和0.25%的Triton X-100 (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, 德国) 封闭和透化细胞30min。将一抗于封闭/透化溶液中稀释至如下终浓度: 2 μ g/ml抗-p-p53 (Ser15) 兔单克隆抗体IgG (Invitrogen, Karlsruhe, 德国), 0.8 μ g/ml抗-p21山羊多克隆抗体IgG (R&D systems, Minneapolis, USA); 4 μ g/ml抗-p-组蛋白H2A.X (Ser139) 小鼠单克隆抗体IgG1 (Millipore, Schwalbach, 德国), 随后添加所述抗体。在温育16-18h后, 用0.05%的PBS中的Tween 20 (Calbiochem, Darmstadt, 德国) 洗涤细胞, 随后添加封闭/透化溶液中的二抗/16 μ M Hoechst染色溶液。将二抗以1:400稀释

(Alexa Fluor 488驴抗-兔、Alexa Fluor 555驴抗-山羊、Alexa Fluor 647驴抗-小鼠, Invitrogen, Karlsruhe, 德国)。在1h的温育后,用0.05% Tween 20进行两个额外的洗涤步骤,用PBS洗涤细胞,最后添加PBS,测量细胞。

[0141] -染色方案2:

[0142] 处理后,用PBS (Gibco Invitrogen, Karlsruhe, 德国)漂洗细胞,随后用10 μ M的细胞培养基中的CellTracker Green 5-氯甲基荧光素二乙酸酯(CMFDA) (Invitrogen, Karlsruhe, 德国)染色30min。CMFDA本身是非荧光的,被活细胞中的酯酶水解成荧光染料。与硫醇基的反应导致可渗透细胞的荧光染料-加合物。酯酶活性可用作细胞活力的指示器 (Papadopoulos等人,1994, J Immunol Methods 177, 101-111)。随后,用PBS洗涤细胞,然后用3.7%的PBS中的甲醛 (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, 德国)固定20min。随后,用PBS洗涤细胞,用2%的PBS中的驴血清 (Millipore, Schwalbach, 德国)和0.25%的PBS中的Triton X-100 (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, 德国)封闭和透化细胞30min。将一抗于封闭/透化溶液中稀释至如下终浓度:4 μ g/ml抗-p-Chk1 (Ser345) 山羊多克隆抗体IgG (santa cruz, Santa Cruz, USA)、4 μ g/ml抗-p-ATM (Ser1981) 小鼠单克隆抗体IgG1 κ (Millipore, Schwalbach, 德国),随后添加至细胞。在温育16-18h后,用0.05%的PBS中的Tween 20 (Calbiochem, Darmstadt, 德国)洗涤细胞,添加封闭/透化溶液中的二抗/16 μ M Hoechst染色溶液。将二抗以1:400稀释 (Alexa Fluor 555驴抗-山羊、Alexa Fluor 647驴抗-小鼠, Invitrogen, Karlsruhe, 德国)。在温育1h后,用0.05% Tween 20进行2次额外的洗涤步骤,用PBS洗涤细胞,最终添加PBS,测量细胞。

[0143] • 图像获取和分析

[0144] 在ArrayScan VTI HCS读数器 (Cellomics, Pittsburgh, USA) 上,使用20x物镜进行图像获取。为了检测足够的细胞,采集在每一个孔的中间开始的50个图像。

[0145] 对于每一种染料按照激发/发射波长选择滤光片:

[0146] -方案1:

[0147] 通道1:365 $\pm$ 25和515 $\pm$ 10nm (XF93-Hoechst),用于Hoescht 33342

[0148] 通道2:475 $\pm$ 20和515 $\pm$ 10nm (XF93-FITC),用于Alexa Fluor 488驴抗-兔

[0149] 通道3:549 $\pm$ 4和600 $\pm$ 12.5nm (XF93-TRITC),用于Alexa Fluor 555驴抗-山羊

[0150] 通道4:655 $\pm$ 15和730 $\pm$ 25nm (XF110-Cy5 (敏感度)),用于Alexa Fluor 647驴抗-小鼠

[0151] -方案2:

[0152] 通道1:365 $\pm$ 25和515 $\pm$ 10nm (XF93-Hoechst),用于Hoescht 33342

[0153] 通道2:475 $\pm$ 20和515 $\pm$ 10nm (XF93-FITC),用于CMFDA

[0154] 通道3:549 $\pm$ 4和600 $\pm$ 12.5nm (XF93-TRITC),用于Alexa Fluor 555驴抗-山羊

[0155] 通道4:655 $\pm$ 15和730 $\pm$ 25nm (XF110-Cy5 (sensitive)),用于Alexa Fluor 647驴抗-小鼠。

[0156] 利用软件iDev和Bioapplication 4版 (Cellomics, Pittsburgh, USA) 进行图像分析。将两个测定中的染色的细胞核用于核和细胞质 (围绕核的环) 的定位。

[0157] 产生每一个孔的下列读出参数:

[0158] -方案1:

[0159] 通道2:p-p53 (Ser15) 核平均强度

[0160] 通道3:p21核平均强度

[0161] 通道4:p-H2A.X (Ser139) 核平均强度

[0162] -方案2:

[0163] 通道1:每有效领域选择的细胞计数

[0164] 通道2:CMFDA细胞质平均强度

[0165] 通道3:p-Chk1 (Ser345) 核平均强度

[0166] 通道4:p-ATM (Ser1981) 核平均强度

[0167] • 数据分析和解释

[0168] 针对每一种化合物和浓度计算处理样品相对于载体对照的倍数调控。使用学生氏t检验测定统计显著性 (p -值 <0.05)。基于对照值和相较于对照值的3倍标准差的增加选择每一个参数的阈值。对于对于p-Chk1 (Ser345) 和p-H2A.X (Ser139), 阈值被设置至2.1, 对于p21、p-ATM (Ser1981), 阈值被设置至1.8, 对于p-p53 (Ser15) 阈值被设置至1.9。如果5种蛋白的至少一种显示高于该阈值的倍数变化, 则化合物被设置为阳性。否则化合物被设置为阴性。不包括具有沉淀或自发荧光的浓度以及至少在两个细胞毒性参数 (每有效视野选择的细胞计数和细胞质中的CMFDA强度) 之一中显示 $\geq 50\%$ 的细胞毒性作用的浓度。

[0169] 研究的目的在于使用HepG2细胞开发新型的基于特异性和灵敏性高含量成像的体外诱变剂和前诱变剂测试系统。由于其有限的代谢能力, 建立用于前诱变剂测试的HepG2细胞与代谢活化系统 (MAS大鼠肝S9) 的组合系统。达到9种不同的参与DNA损伤修复反应的蛋白用作化合物诱导的基因毒性的假定标志。在利用 (前-) 基因毒素 (环磷酰胺、7,12-二甲基苯并蒽、黄曲霉毒素B₁、2-乙酰氨基苻、放线菌素D、甲磺酸甲酯、依托泊苷) 和非-基因毒素 (D-甘露醇、苯乙福明HCl、孕酮) 处理后48h, 使用HCI技术定量蛋白表达和活化的变化。

[0170] 使用9种假定的标志蛋白中的5种进行最佳分类。选择上述9种标志物 (p-p53 (Ser15)、p21、p-H2A.X (Ser139)、p-ATM (Ser1981)、p-Chk1 (Ser345)、p-ATR (Ser428)、p-cdc2 (Thr14/Tyr15)、Gadd45a、p-Chk2 (Thr68)) 中的5个最具预测性的标志物。尽管所述5种标志物p-p53 (Ser15)、p21、p-H2A.X (Ser139)、p-ATM (Ser1981)、p-Chk1 (Ser345) 被实验预定, p-ATR (Ser428)、p-cdc2 (Thr14/Tyr15)、Gadd45a、p-Chk2 (Thr68) 的额外分析使得能够更详细地表征化合物的作用模式, 将它们用作补充标志物。

[0171] 在用 (前-) 基因毒素 (环磷酰胺、7,12-二甲基苯并蒽、黄曲霉毒素B₁、2-乙酰氨基苻、放线菌素D、甲磺酸甲酯、依托泊苷) 和非-基因毒素 (D-甘露醇、苯乙福明HCl、孕酮) 处理后48h, 使用HCI技术定量9种假定标志物p-p53 (Ser15)、p21、p-H2A.X (Ser139)、p-ATM (Ser1981)、p-Chk1 (Ser345)、p-ATR (Ser428)、p-cdc2 (Thr14/Tyr15)、Gadd45a和p-Chk2 (Thr68) 的分析。使用9种假定标志蛋白中的5种标志 (p-p53 (Ser15)、p21、p-H2A.X (Ser139)、p-ATM (Ser1981) 和p-Chk1 (Ser345)) (表2) 进行最佳分类。

[0172] 由ECVAM推荐的组1化学药品 (“在体外哺乳动物细胞基因毒性测试中应当被检测为阳性的体内基因毒素”) 的分析导致4种假阴性化合物。乙基亚硝脲、二甲基亚硝胺、2,4-二氨基甲苯和氯化镉对于测试的任何蛋白标志物产未产生阳性结果。因此, 具有20种测试的体内基因毒素中的18种分类为阳性的化合物的该测试系统的灵敏度为80% (表6和9)。

[0173] 组2化学药品 (“非DNA反应性化学药品, 包括非基因毒性致癌物, 其在体外哺乳动

物细胞基因毒性测试中应当产生阴性结果”)导致两个假阳性测试化合物。孕酮和Phenanthracene对于p-ATM(Ser1981)都产生阳性结果,从而导致23种测试化合物中的两种假阳性测试化合物。因此,可计算91.3%的特异度(表7和10)。

[0174] 组3化学药品(“非DNA反应性化学药品,包括非基因毒性致癌物、代谢毒物,以及应当在体外哺乳动物细胞基因毒性测试中产生阴性结果但未曾被报导通常以高浓度或高细胞毒性水平在小鼠淋巴瘤细胞中诱导染色体畸变或tk突变的其它化学药品”)导致4种假阳性测试化合物。没食子酸丙酯、对-硝基酚、丁香酚和2,4-二氯苯酚产生阳性结果,从而导致19种测试化合物中的4种假阳性测试化合物。因此,可计算78.9%的特异度(表8和11)。

[0175] 这5种蛋白是用于在药物发现过程早期鉴定潜在基因毒素的潜在候选者。

[0176] ●Luminex分析

[0177] 将磁珠试剂盒(Milliplex MAP)用于使用Luminex系统检测细胞裂解物中磷酸化p53(Ser15)的变化以及p21的总蛋白水平。

[0178] MILLIPLEX MAP基于Luminex xMAP技术。Luminex使用专利技术来用两种荧光染料内部颜色编码微球体。通过这些染料的精确浓度,可产生100种不同的有色珠粒,其每一种用特定捕获抗体涂覆。在通过珠粒捕获来自测试样品的分析物后,引入生物素化检测抗体。随后用链霉抗生物素蛋白-藻红蛋白(SAPE)缀合物、报道分子温育反应混合物来在每一个微球体表面上完成反应。对微球体进行照明,内部染料发荧光,从而标识用于特定测定的微球体组。第二照明光源激发PE,报道分子上的荧光染料。最后,高速数字-信号处理器鉴定每一个单个微球体,并基于荧光报道分子信号定量其生物测定的结果。

[0179] 如下文中所述进行测定的性能,使用来自MILLIPLEX MAP试剂盒(EMD Millipore Cat.#46-662和46-621)的试剂。

[0180] -细胞裂解方案

[0181] 可在相同板中处理、洗涤和裂解生长在无菌96孔组织培养级板中贴壁或非贴壁细胞,但需要在分开的96孔滤板中进行过滤。方案步骤如下:对于非贴壁细胞,将组织培养板以500x g离心2分钟以沉淀细胞。如果使用贴壁细胞,这始于下一步骤。通过抽吸除去培养基,添加100μL冰冷PBS或TBS。对于非贴壁细胞,重复第一步骤。通过抽吸除去洗涤液。添加35μL/孔含有磷酸酶抑制剂(包括1mM正钒酸钠(Na_3VO_4))和新配制的蛋白酶抑制剂的冰冷的1X MILLIPLEX MAP裂解缓冲液。将板置于定轨摇床(600-800rpm)上在4℃进行10-15分钟。将裂解物于-70℃贮存直至准备使用。

[0182] -免疫测定方案

[0183] 将过滤的裂解物于**MILLIPLEX®** MAP测定缓冲液中以至少1:1稀释。用于测定的蛋白浓度的建议工作范围为1至25μg的总蛋白/孔(25μL/孔,40至1000μg/mL)。将50μL测定缓冲液添加至板的每一个孔,加盖,在室温(20-25℃)于板摇床上混合10分钟。倾倒测定缓冲液,通过将板倒置从所有孔除去残留量,灵巧地将其轻叩至吸湿巾上数次。将1X珠粒悬浮液涡旋10秒,将25μL 1X珠粒悬浮液添加至每一个孔。将25μL的测定缓冲液、重建的对照细胞裂解物和样品裂解物添加至适当的孔,在板摇床(600-800rpm)上于2-8℃避光温育过夜(16-20小时)。将手提式磁力分离块贴附于板,放置60秒以待珠粒沉降,随后倾倒出样品和对照。从磁力分离块取出板,用每孔100μL测定缓冲液洗涤反。重复总共2次洗涤。添加25μL/孔的1XMILLIPLEX MAP检测抗体。密封板,加盖覆盖,在室温(20-25℃)于板摇床上搅拌温育

1小时。贴附磁力分离块,等待60秒,随后倾倒出检测抗体。添加25 μ L的1X MILLIPLEX MAP链霉抗生物素蛋白-藻红蛋白(SAPE)。密封板,用盖子覆盖,在室温(20-25 $^{\circ}$ C)于板摇床上搅拌温育15分钟。将25 μ L的MILLIPLEX MAP扩增缓冲液添加至每一个孔。密封板,加盖覆盖,在室温(20-25 $^{\circ}$ C)于板摇床上搅拌温育15分钟。贴附磁力分离块,等待60秒,随后倾倒出SAPE/扩增缓冲液。将珠粒悬浮于150 μ L MILLIPLEX MAP测定缓冲液中,于板摇床上混合5分钟,随后使用Luminex系统进行分析。

[0184] 数据分析 and 解释

[0185] 针对每一种化合物和浓度计算处理样品相对于载体对照的倍数调控。基于对照值和相较于对照值3倍标准差的增加选择每一个参数的阈值。对于p-p53(Ser 15)和p21,将阈值设置至1.5。如果至少一种蛋白显示高于该阈值的倍数变化,则所述化合物被设置为阳性。否则化合物被设置为阴性。

[0186] 用于使用Luminex系统检测细胞裂解物中测磷酸化p53(Ser15)的变化以及p21的总蛋白水平的MILLIPLEX MAP磁力珠粒试剂盒的结果示于表12中。检测具有基因毒性的化合物甲磺酸甲酯和依托泊苷以及非基因毒性D甘露醇。

[0187] 表1

[0188]

蛋白 (具有翻译后修饰)	蛋白名称 (别名)	基因名称 (别名)	登录号
p-p53 (Ser15)	细胞肿瘤抗原 p53, (别名: 抗原 NY-CO-13, 磷蛋白 p53 肿瘤抑制蛋白 p53)	TP53 (P53)	P04637
p21	细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂 1, (CDK-相互作用蛋白 1 黑色素瘤分化-相关蛋白 6, p21)	CDKN1A, (CAP20, CDKN1, CIP1, MDA6, PIC1, SDI1, WAF1)	P38936
H2A.X (Ser139)	组蛋白 H2A.X	H2AFX, (H2AX)	P16104
p-Chk1 (Ser345)	丝氨酸/苏氨酸-蛋白激酶 Chk1, (CHK1 检查点同源物 细胞周期检查点激酶 检查点激酶-1)	CHEK1, (CHK1)	014757
p-ATM (Ser1981)	丝氨酸-蛋白激酶 ATM, (突变的共济失调性毛细血管扩张症)	ATM	Q13315
补充标志物			
p-ATR (Ser428)	丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 ATR, (共济失调性毛细血管扩张症和 Rad3-相关蛋白 FRAP-相关蛋白 1)	ATR, (FRP1)	Q13535
p-cdc2 (Thr14/ Tyr15)	细胞周期依赖性激酶 1, (细胞细胞分裂控制蛋白 2 同源物, 细胞分开蛋白激酶 1 p34 蛋白激酶)	CDK1, (CDC2, CDC28A, CDKN1, P34CDC2)	P06493
Gadd45a	生长停滞和 DNA 损伤可诱导蛋白 GADD45 α , (DNA 损伤可诱导的转录物 1 蛋白)	GADD45A, (DDIT1, GADD45)	P24522
p-Chk2 (Thr68)	丝氨酸/苏氨酸-蛋白激酶 Chk2, (CHK2 检查点同源物, Cds1 同源物, 检查点激酶 2)	CHEK2, (CDS1, CHK2, RAD53)	096017

[0189]

表 2

终点	I. 直接基因毒性的			II. 前基因毒性+MAS				III. 非基因毒性			
	Eto	ActD	MMS	CPA	DMBA	AFB1	AAF	D-Man	Prog	Phen	
最高测试浓度 [μM]	2	0.2	1000	200	400	200	1000	1000	1000	1000	
最高测试浓度 SCC	2	0.013	250	100	400	200	1000	1000	15.63	125	
<50%的细胞毒性 [μM]	2	0.2	500	50	400	200	1000	1000	31.25	1000	
p-p53 (Ser15)											
p21											
p-组蛋白 H2A.X (Ser139)											
Gadd45a											
p-ATM (Ser1981)											
p-ATR (Ser428)											
p-cdc2 (Thr 14/Tyr 15)											
p-Chk1 (Ser345)											
p-Chk2 (Thr68)											

[0190]

表 3

化合物	缩写	CAS 缩写
I. Ames-阳性体内基因毒性 (i) 06 和 N7 烷化剂		
环磷酸胺	CPA	6055-19-2
乙基亚硝酸脲	ENU	759-73-9
甲磺酸甲酯	MMS	66-27-3
(ii) 多环芳香烃		
苯并[a]芘	BaP	50-32-8
7,12-二甲基苯并[a]蒽	DMBA	57-97-6
(iii) 芳香胺		
二甲基亚硝酸胺	DMN	62-75-9
2-乙酰氨基苄	AAF	53-96-3
2,4-二氨基甲苯	DAT	95-80-7
IQ (2-氨基-3-甲基咪唑并[4,5-f]喹啉)	IQ	76180-96-6
PhIP, HCl (2-氨基-1-甲基-6-苯基咪唑并[4,5-f]吡啶)	PhIP	105650-23-5
(iv) 其它		
黄曲霉毒素 B1	AFB1	1162-65-8
氯化镉	CC	10108-64-2
顺铂	CP	15663-27-1
对氯苯胺	CA	106-47-8
II. Ames 中体内基因毒性阴性或不确定		
依托泊苷	Eto	33419-42-0
氢醌	HQ	123-31-9
叠氮胸苷	AZT	30516-87-1
亚砷酸钠	SA	7784-46-5
泰素	T	33069-62-4
氟唑素	CIA	56-75-7

[0191]

表 4

化合物	缩写	CAS 缩写
(i) 具有阴性体内基因毒性数据的非致癌物		
三水氧苄青霉素	AmpT	7177-48-2
D-甘露醇	D-Man	69-65-8
(ii) 不具有体内基因毒性数据的非致癌物		
苯乙双胍 HCl	Phen	834-28-6
正-氯丁烷	n-BCl	109-69-3
(2-氯乙基)三甲基氯化铵	TAC	999-81-5
环己酮	CyH	108-94-1
N,N-二环己基硫脲	DCHT	1212-29-9
EDTA 三钠三水合物	TET	150-38-9
硫酸麻黄碱	EpS	134-72-5
硬脂酸红霉素	EyS	643-22-1
Fluometron	FM	2164-17-2
菲	PhA	85-01-8
(iii) 非基因毒性致癌物		
D-柠檬烯	DL	5989-27-5
二-(2-乙基己基)邻苯二甲酸盐	DEPh	117-81-7
氮唑	AT	61-82-5
叔丁醇	TBA	75-65-0
二乙醇胺	DA	111-42-2
三聚氰胺	Mel	108-78-1
氨基甲酸甲酯	MetC	598-55-0
孕酮	Pro	57-83-0
吡啶	Pyr	110-86-1
三-(2-乙基己基)磷酸盐	TEP	78-42-2
六氯乙烷	HCE	67-72-1

[0192]

表 5

(i) 对于体内基因毒性是阴性或不确定的非致癌物		
D,L-薄荷醇	Men	15356-70-4
邻苯二甲酸酐	PhAh	85-44-9
叔-丁基氢醌	TBHQ	1948-33-0
邻-氨基茴香	AA	118-92-3
1,3-二羟基苯(间苯二酚)	DB	108-46-3
2-乙基-1,3-己二醇	EH	94-96-2
磺胺异噁唑	SO	127-69-5

[0193]

表6

(ii) 不具有体内基因毒性数据的非致癌物		
乙硫异烟胺	EtAm	536-33-4
姜黄素	Cu	458-37-7
苯甲醇	BA	100-51-6
尿素	U	57-13-6

(iii) 通过无关(对于人)机制的非基因毒性致癌物或致癌的糖精钠		
	Ssa	128-44-9

(iv) 补充列表(体外基因毒性结果的预测不太清楚)		
没食子酸丙酯	PG	121-79-9
对硝基苯酚	NPh	100-02-7
二甲苯磺酸钠	SXS	1300-72-7
丙烯酸乙酯	EtAc	140-88-5
丁香酚	Eu	97-53-0
异丁醛	IBA	78-84-2
2,4-二氯苯酚	DP	120-83-2

[0194]

			SCC		CMFDA	
			-S9	+S9	-S9	+S9
I. Ames-阳性体内基因毒素	最高浓度		最高浓度 <50%			
(i) O6 和 N7 烷化剂	mM	限制	高于对照的细胞毒素 [μM]			
环磷酰胺	1.00	mM	1000	1000	1000	62.5
乙基亚硝脒	1.00	mM	1000	1000	1000	1000
甲磺酸甲酯	1.00	mM	250	500	500	250
(ii) 多环芳香烃						
苯并[a]芘	0.125	AF	3.91	125	125	125
7,12-二甲基苯并[a]蒽	1.00	mM	125	500	250	1000
(iii) 芳香胺						
二甲基亚硝胺	1.00	mM	1000	1000	1000	1000
2-乙酰氨基苄	1.00	mM	1000	1000	1000	1000
2,4-二氨基甲苯	1.00	mM	1000	1000	1000	1000
IQ (2-氨基-3-甲基咪唑并[4,5-f]喹啉)	1.00	mM	1000	125	1000	125
PhIP. HCl (2-氨基-1-甲基-6-苯基咪唑并[4,5-f]吡啶)	1.00	mM	500	1000	500	1000
(iv) 其它						
黄曲霉素素 B1	1.00	mM	31.25	500	500	500
氯化镉	1.00	mM	31.25	125	62.5	62.5
顺铂	1.00	mM	1000	1000	1000	1000
对氯苯胺	1.00	mM	1000	1000	1000	1000
II. Ames 中的体内基因毒素阴性或不确定						
依托泊苷	1/0.005	mM	-/2.5	1000/5	1000/5	1000/5
氯醌	1.00	mM	250	1000	250	1000
叠氮胸苷	1.00	mM	1000	1000	1000	1000
亚砷酸钠	1.00	mM	7.81	125	62.5	125
泰素	1.00	mM	1000	500	1000	1000
氯霉素	1.00	mM	1000	1000	1000	1000

表7

			SCC		CMFDA	
			-S9	+S9	-S9	+S9
(i) 具有阴性体内基因毒性数据的非致癌物	最高浓度 mM	限制	最高浓度 <50% 高于对照的细胞毒素 [μM]			
三水氧苄青霉素	1.00	mM	1000	1000	1000	1000
D-甘露醇	1.00	mM	1000	1000	1000	1000
(ii) 不具有体内基因毒性数据的非致癌物						
苯乙双胍 HCl	1.00	mM	500	1000	1000	1000
正-氯丁烷	1.00	mM	1000	1000	1000	1000
(2-氯乙基) 三甲基-氯化铵	1.00	mM	1000	1000	1000	1000
环己酮	1.00	mM	1000	1000	1000	1000
N, N-二环己基硫脲	1.00	mM	500	1000	1000	500
EDTA 三钠三水合物	1.00	mM	500	1000	1000	1000
硫酸麻磺碱	1.00	mM	1000	1000	1000	1000
硬脂酸红霉素	1.00	mM	31.25	125	62.5	125
氟草隆	1.00	mM	500	1000	1000	1000
菲	1.00	mM	1000	1000	1000	1000
(iii) 非基因毒性致癌物						
D-柠檬烯	1.00	mM	1000	1000	1000	1000
二-(2-乙基己基) 邻苯二甲酸盐	1.00	mM	1000	1000	1000	1000
氮唑	1.00	mM	1000	1000	1000	1000
叔丁醇	1.00	mM	1000	1000	1000	1000
二乙醇胺	1.00	mM	1000	1000	1000	1000
三聚氰胺	1.00	mM	1000	1000	1000	1000
氨基甲酸甲酯	1.00	mM	1000	1000	1000	1000
孕酮	1.00	mM	125	500	62.5	250
吡啶	1.00	mM	1000	1000	1000	1000
三-(2-乙基己基) 磷酸盐	1.00	mM	500	1000	7.813	1000
六氯乙烷	1.00	mM	1000	1000	1000	1000

[0197] 表8

[0198]

			SCC		CMFDA	
			-S9	+S9	-S9	+S9
(i) 对于体内基因毒性是阴性的或不确定的非致癌物	最高浓度		最高浓度 : <50% 高于对照的细胞毒素 [μM]			
	mM	限制				
D, L-薄荷醇	1.00	mM	1000	1000	1000	1000
邻苯二甲酸酐	1.00	mM	1000	1000	1000	1000
叔-丁基氢醌	1.00	mM	125	1000	125	1000
邻-氨基酚	1.00	mM	1000	1000	1000	1000
1, 3-二羟基苯 (间苯二酚)	1.00	mM	1000	1000	1000	500
2-乙基-1, 3-己二醇	1.00	mM	1000	1000	1000	1000
磺胺异噁唑	1.00	mM	1000	1000	1000	1000
(ii) 不具有体内基因毒性数据的非致癌物						
乙硫异烟胺	1.00	mM	1000	1000	1000	1000
姜黄素	0.125	AF	31.25	125	31.25	125
苯甲醇	1.00	mM	1000	1000	1000	1000
尿素	1.00	mM	1000	1000	1000	1000
(iii) 通过无关 (对于人) 机制的非基因毒性致癌物或致癌的						
糖精钠	1.00	mM	1000	1000	1000	1000
(iv) 补充列表 (体外基因毒性结果的预测不太清楚)						
没食子酸丙酯	1.00	mM	500	1000	1000	1000
对硝基苯酚	1.00	mM	500	1000	500	1000
二甲苯磺酸钠	1.00	mM	1000	1000	1000	1000
丙烯酸乙酯	1.00	mM	1000	1000	1000	1000
丁香酚	1.00	mM	1000	125	1000	125
异丁醛	1.00	mM	1000	1000	1000	1000
2, 4-二氯苯酚	1.00	mM	250	500	1000	1000

[0199]

表 9

I. Ames-阳性体内基因毒素
(i) 06 和 N7 烷化剂

环磷酸胺	p-p53 (Ser15) -S9 +S9	p21 -S9 +S9	p-H2A.X (Ser139) -S9 +S9	p-Chk1 (Ser345) -S9 +S9	p-ATM (Ser1981) -S9 +S9
乙基亚硝脒					
甲磺酸甲酯					
(ii) 多环芳香烃					
苯并[a]芘					
7,12-二甲基苯并[a]蒽					
(iii) 芳香胺					
二甲基亚胺胺					
2-乙酰氨基芴					
2,4-二氨基甲苯					
IQ (2-氨基-3-甲基咪唑并[4,5-f]喹啉)					
PhIP.HCl (2-氨基-1-甲基-6-苯基咪唑并[4,5-f]吡啶)					
(iv) 其它					
黄曲霉毒素 B1					
氯化铂					
顺铂					
对氯苯胺					
II. Ames 中的体内基因毒素阴性或不确定的					
依托泊苷					
氯醌					
叠氮胸苷					
亚砷酸钠					
泰素					
氯霉素					

[0200]

表 10

	p-p53 (Ser15)		p21		p-H2A.X (Ser139)		p-Chk1 (Ser345)		p-ATM (Ser1981)	
	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9
(i) 具有体内基因毒性数据的非致癌物										
三水氟辛青霉素										
D-甘露醇										
(ii) 不具有体内基因毒性数据的非致癌物										
羧乙双胍 HCl										
正-氯丁烷										
(2-氯乙基)三甲基-氯化铵										
环己酮										
N,N-二环己基硫脲										
BDTA 三钠三水合物										
硫酸麻磺碱										
硬脂酸红霉素										
氟草隆										
菲										
(iii) 非基因毒性数据致癌物										
D-柠檬烯										
二(2-乙基己基)邻苯二甲酸盐										
氯唑										
叔丁醇										
二乙醇胺										
三聚氰胺										
氨基甲酸甲酯										
孕酮										
吡啶										
三(2-乙基己基)磷酸盐										
六氯乙烷										

[0201]

表 11

(i) 对于体内基因毒性是阴性的或不确定的非致癌物	p-p53 (Ser15) -S9 +S9	p21 -S9 +S9	p-H2A.X (Ser139) -S9 +S9	p-Chk1 (Ser345) -S9 +S9	p-ATM (Ser1981) -S9 +S9
D,L-薄荷醇					
邻苯二甲酸酐					
叔-丁基氢醌					
邻-氨基苯酸					
1,3-苯二酚 (间苯二酚)					
2-乙基-1,3-己二醇					
磺胺异					
(ii) 不具有体内基因毒性数据的非致癌物					
乙硫异烟胺					
姜黄素					
苯甲醇					
尿素					
(iii) 通过无关 (对于人) 机制的非基因毒性致癌物或致癌的					
糖精钠					
(iv) 补充列表 (体外基因毒性结果的预测不太清楚)					
没食子酸丙酯					
对硝基苯酚					
二甲苯磺酸钠					
丙烯酸乙酯					
丁香酚					
异丁醛					
2,4-二氯苯酚					

[0202]

表 12

终点	p-p53 (Ser15)	P21
具有基因毒性的测试化合物		
甲磺酸甲酯		
依托泊苷		
非基因毒性测试化合物		
D-甘露醇		