

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2015-521728

(P2015-521728A)

(43) 公表日 平成27年7月30日(2015.7.30)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53	D 2GO45
GO 1 N 33/50 (2006.01)	GO 1 N 33/50	Z 4BO63
GO 1 N 33/15 (2006.01)	GO 1 N 33/15	Z
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 49 頁)

(21) 出願番号	特願2015-516504 (P2015-516504)	(71) 出願人	591032596
(86) (22) 出願日	平成25年5月28日 (2013.5.28)		メルク パテント ゲゼルシャフト ミツト ベシユレンクテル ハフツング
(85) 翻訳文提出日	平成27年2月13日 (2015.2.13)		Merck Patent Gesellschaft mit beschränkter Haftung
(86) 国際出願番号	PCT/EP2013/001575		ドイツ連邦共和国 デー-64293 ダルムシュタット フランクフルター シュトラーセ 250
(87) 国際公開番号	W02013/185884		Frankfurter Str. 250, D-64293 Darmstadt, Federal Republic of Germany
(87) 国際公開日	平成25年12月19日 (2013.12.19)	(74) 代理人	100102842
(31) 優先権主張番号	61/659,024		弁理士 葛和 清司
(32) 優先日	平成24年6月13日 (2012.6.13)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 遺伝毒性化合物を同定するためのタンパク質発現分析

(57) 【要約】

本発明は、定義されたタンパク質のパネルを発現することができるシステムを提供すること、該システムの少なくとも一部を、スクリーニングされるべき化合物と共にインキュベートすること、および、該システムにおけるタンパク質の発現を、対照システムにおけるタンパク質発現と比較して、それにより（前駆型）遺伝毒性活性を検出することによる、（前駆型）遺伝毒性活性を有する化合物をスクリーニングするための方法に関する。本発明の別の目的は、哺乳動物から回収された生物学的試料中の定義されたタンパク質の発現レベルを決定することによる、かかる処置を必要とする哺乳動物に投与される化合物への応答において、増殖、分化および/または損傷の修復の遺伝子的な調節解除により引き起こされるか、媒介されるか、および/または伝播される、生理学および/または病理学的状態を発症する見込みをモニタリングするための方法に関する。本発明はまた、マーカータンパク質に特異的に結合する抗体を含む、（前駆型）遺伝毒性活性を有する化合物をスクリーニングするためのキットに関する。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

遺伝毒性および/または前駆型遺伝毒性活性について化合物をスクリーニングするための方法であって、1または2以上の化合物と共にインキュベートされたシステムにおける、p-p53 (Ser15)、p21、p-H2A.X (Ser139)、p-ATM (Ser1981)、p-Chk1 (Ser345)、p-ATR (Ser428)、p-cdc2 (Thr14 / Tyr15)、Gadd45aおよびp-Chk2 (Thr68)の群から選択される少なくとも2つのタンパク質の活性形態の発現レベルを、前記化合物と共にインキュベートされていないシステムにおける発現レベルと比較して決定するステップを含む、前記方法。

【請求項 2】

少なくともタンパク質p-p53 (Ser15) およびp21の発現レベルが決定される、請求項1に記載の方法。

【請求項 3】

少なくともタンパク質p-p53 (Ser15)、p21、p-H2A.X (Ser139)、p-ATM (Ser1981) およびp-Chk1 (Ser345)の発現レベルが決定される、請求項1または2に記載の方法。

【請求項 4】

タンパク質p-p53 (Ser15)、p21、p-H2A.X (Ser139)、p-ATM (Ser1981)、p-Chk1 (Ser345)、p-ATR (Ser428)、p-cdc2 (Thr14 / Tyr15)、Gadd45aおよびp-Chk2 (Thr68)の発現レベルが決定される、請求項1～3のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 5】

発現レベルが、免疫蛍光染色またはLuminex技術により決定される、請求項1～4のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6】

化合物と共にインキュベートされたシステムにおける前記タンパク質のうちの少なくとも1つの発現レベルの、前記化合物と共にインキュベートされていないシステムと比較した場合の増大が、前記活性を示す、請求項1～5のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7】

発現レベルが少なくとも1.5倍増大する、請求項6に記載の方法。

【請求項 8】

1～1.1倍の発現レベルを提供するために、減少した濃度の化合物が投与される、請求項7に記載の方法。

【請求項 9】

少なくとも80%の感度および/または特異度により、前記活性を有する化合物がスクリーニングされる、請求項1～8のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 10】

請求項1～9のいずれか一項に記載の方法であって、ここで、(前駆型)遺伝毒性が最も低い化合物または非(前駆型)遺伝毒性化合物が同定され、およびここで、最も低い発現レベルの増大または発現レベルが増大しないことが、前記化合物がその意図される使用のために好適であることを示す、前記方法。

【請求項 11】

治療用化合物を患者に投与するための方法であって、一連の化合物を用いて請求項1～10のいずれか一項に記載の方法を行うこと、遺伝毒性および前駆型遺伝毒性活性を有さない化合物を同定すること、および、前記化合物を、該化合物の意図される使用を必要とする患者に投与することを含む、前記方法。

【請求項 12】

化合物による処置への応答において、増殖、分化および/または損傷の修復の調節解除により引き起こされるか、媒介されるか、および/または伝播される、癌、腫瘍、転移および/または血管新生の障害を発症する見込みをモニタリングするための方法であって、ここで、p-p53 (Ser15)、p21、p-H2A.X (Ser139)、p-ATM (Ser1981)、p-Chk1 (Ser345)、p-ATR (Ser428)、p-cdc2 (Thr14 / Tyr15)、Gadd45aおよびp-Chk2 (Thr68)の群か

10

20

30

40

50

ら選択される少なくとも2つのタンパク質の発現レベルが、哺乳動物に投与される前記化合物によるかかる処置を必要とする前記哺乳動物から回収された生物学的試料において決定され、ここで、前記タンパク質のうちの少なくとも1つの発現レベルの増大が、前記化合物が遺伝毒性および/または前駆型遺伝毒性活性を有すること、ならびに前記見込みが増大されることを示す、前記方法。

【請求項13】

薬物による治療的処置に対する応答において患者が腫瘍を罹患する見込みを予測するためのin-vitroの方法であって、以下のステップ：

(i) 前記患者の組織または血漿からの生検試料において、p-p53 (Ser15)、p21、p-H2A.X (Ser139)、p-ATM (Ser1981)、p-Chk1 (Ser345)、p-ATR (Ser428)、p-cdc2 (Thr14 / Tyr15)、Gadd45aおよびp-Chk2 (Thr68)の群から選択される少なくとも2つのタンパク質の発現レベルを測定すること、

(ii) 前記患者の組織または血漿からの試料を、前記薬物にex-vivoで暴露すること、ならびに、

(iii) ステップ(ii)の前記暴露された試料において、ステップ(i)において特定された前記タンパク質の発現レベルを測定し、ステップ(i)および(iii)において測定される発現レベルの差異を計算することに加えて、ここで、このステップ(iii)において得られた前記タンパク質のうちの少なくとも1つの発現レベルの、ステップ(i)と比較した増大が、前記薬物が遺伝毒性および/または前駆型遺伝毒性活性を有すること、ならびに前記見込みが増大されることを示す、を含む、前記方法。

【請求項14】

p-p53 (Ser15)、p21、p-H2A.X (Ser139)、p-ATM (Ser1981)、p-Chk1 (Ser345)、p-ATR (Ser428)、p-cdc2 (Thr14 / Tyr15)、Gadd45aおよびp-Chk2 (Thr68)の群から選択される少なくとも2つのタンパク質の、遺伝毒性および/または前駆型遺伝毒性活性を有する化合物をスクリーニングするためのマーカータンパク質としての使用。

【請求項15】

遺伝毒性および/または前駆型遺伝毒性活性の検出における使用のためのキットであって、各々がp-p53 (Ser15)、p21、p-H2A.X (Ser139)、p-ATM (Ser1981)、p-Chk1 (Ser345)、p-ATR (Ser428)、p-cdc2 (Thr14 / Tyr15)、Gadd45aおよびp-Chk2 (Thr68)の群から選択される異なるタンパク質に対する特異的結合を有する、少なくとも2つの抗体を含む、前記キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、一団の定義されたタンパク質を発現することができるシステムを提供すること、該システムの少なくとも一部を、スクリーニングされるべき化合物と共にインキュベートすること、および、該システムにおけるタンパク質の発現を、対照システムにおけるタンパク質発現と比較して、それにより(前駆型)遺伝毒性活性を検出することにより、(前駆型)遺伝毒性活性を有する化合物をスクリーニングするための方法に関する。本発明の別の目的は、哺乳動物から回収された生物学的試料中の定義されたタンパク質の発現レベルを決定することにより、かかる処置を必要とする哺乳動物に投与される化合物への応答において、増殖、分化および/または損傷の修復の遺伝子的な調節解除により引き起こされるか、媒介されるか、および/または伝播される、生理学および/または病理学的状態を発症する見込みをモニタリングするための方法に関する。本発明はまた、マーカータンパク質に特異的に結合する抗体を含む、(前駆型)遺伝毒性活性を有する化合物をスクリーニングするためのキットに関する。

【背景技術】

【0002】

化合物の遺伝毒性潜在能力の包括的評価は、化学リスク評価および医薬開発の間の重要

10

20

30

40

50

な部分である。現在の標準的な試験バッテリーは、多様な作用機序によりDNA損傷を誘導する化合物を検出するために設計されたin-vitroおよびin-vivoでの試験を含む。細菌復帰変異アッセイ、ならびにin-vitroおよび/またはin-vivoにおける哺乳動物細胞による遺伝毒性試験が必要とされる。遺伝毒性試験システムは、これらの試験において陽性であると試験された化合物が潜在的なヒトの発癌物質であるという事実により、重要性を増している。しかし、標準的な試験バッテリーは、低い処理量しか有さず、比較的大量の化合物を必要とする。この理由のために、これらのアッセイは、初期の薬物発見期においてはあまり好適ではない(Westerink et al., 2011, Mutat. Res. 724, 7-21)。

【0003】

頻繁に、in-vivoでの遺伝毒性物質ではないこと、または変異原性もしくはDNA反応性の機序を介して腫瘍を誘導するものではないことが判明する化学物質は、哺乳動物細胞試験において偽陽性の結果を生じ、これは、ヒトの危険性の推定を複雑にする。

さらに、EU REACH法内の化学的特徴および近代的なリスク評価に関して、機序の分析が重要性を増している。

【0004】

現在、困難は、新たなin-vitroのツールの開発に向けられている。感度を失うことなく(すなわち、DNA反応性の発癌物質およびin-vivoで遺伝毒性の物質を検出しつつ)、特異度が増強された(すなわち、偽陽性の結果が少ない)、新規の遺伝毒性試験システムが必要とされている(Kirkland et al., 2005, Mutat. Res. 584, 1-256; Kirkland et al., 2006, Mutat. Res. 608, 29-42; Kirkland et al., 2008, Mutat. Res. 653, 99-108)。

【0005】

したがって、本発明の基礎を形成する技術的問題は、化合物をスクリーニングするための方法であって、それらの遺伝毒性および/または前駆型遺伝毒性特性の同定および特徴を効果的に可能にするものを提供することである。本発明の別の問題は、遺伝毒性および/または前駆型遺伝毒性活性の検出のためのキットを提供することである。

【発明の概要】

【0006】

本発明は、遺伝毒性および/または前駆型遺伝毒性活性を有する化合物をスクリーニングするための方法を提供することにより、問題を解決し、該方法は、p-p53 (Ser15)、p21、p-H2A.X (Ser139)、p-ATM (Ser1981)、p-Chk1 (Ser345)、p-ATR (Ser428)、p-cdc2 (Thr14 / Tyr15)、Gadd45aおよびp-Chk2 (Thr68)の群から選択される1または2以上の化合物と共にインキュベートされたシステムの群から選択される少なくとも2つのタンパク質の活性形態の発現レベルを、当該化合物または同じ濃度の当該化合物と実質的にインキュベートされていないシステムにおける前記タンパク質の発現レベルと比較して決定するステップを含む。

【0007】

驚くべきことに、本発明者は、前記タンパク質のうちの少なくとも2つの組み合わせが遺伝毒性と相関していることを示した。その結果として、前述の複数のマーカータンパク質は、新規の遺伝毒性マーカーを表わし、これは遺伝毒性の段階を識別するためによく適している。基礎となるタンパク質は、発現差異分析の結果として選択される。全てのタンパク質発現は、未処置の細胞との識別可能な差異により特徴づけられ、ここで、処置された細胞は、上方調節により差異を示す。決定されたタンパク質は、当該分野において配列および他の特徴により既に記載されているが、本発明の明確な組み合わせにおける遺伝毒性との関連を欠いている。対になったマーカータンパク質の組み合わせ(任意にさらなるマーカータンパク質により補充される)のいずれを、最大の試験信頼性のために用いてもよい。タンパク質は、別の方法において命名されてもよいが、アクセッション番号により一意的に定義され、これは、一般的に受容され、UniProt、SwissProtなどの多数のデータベースにおいて登録される(表1; ZhouおよびBartek, 2004, Nat Rev Cancer 4, 216-25を参照)。

【0008】

10

20

30

40

50

同定された9個のタンパク質は、DNA損傷応答シグナル伝達ネットワークに関与しているが、それらは、必ずしも、現在知られているそれらの実体における機能および位置によっては関連していないが、しかしその群の単一のメンバーまたはより多くのメンバーの間にかかる関係が現れることは除外されない。

【0009】

DNA損傷応答シグナル伝達ネットワークは、少なくとも2つの異なる経路：血管拡張性失調症変異キナーゼ（ATM）および血管拡張性失調症変異およびRad3関連（ATR）経路からなる。損傷を受けたDNAに対する応答において、ATM経路は、ATMのSer1981における自己リン酸化により開始される。ATMは、一对のタンパク質のリン酸化を介して、細胞周期チェックポイントおよびDNAの修復を調節する。ATR経路は、ATMよりはゆっくりであるが、DNA二本鎖切断（DSB）に対して、およびDNA複製フォークを妨害する化学物質に対して応答する。2つのリン部位（p-ATR（Ser428）およびp-ATR（Thr1989））が存在し、それらはATRの活性化をもたらす。初めに異常なDNA構造を認識して、DNA損傷応答シグナル伝達ネットワークを活性化するセンサーは、不明である。

10

【0010】

DNA損傷応答の非常に初期のイベントは、ATMを介したヒストンH2A.XのSer139におけるリン酸化である。リン酸化されたH2A.Xは、DNA損傷の部位に集積し、多様なDNA損傷応答およびDNA修復シグナルを動員する。

DNA二本鎖切断は、ATMによるChk2のThr68およびこの領域における他の部位におけるリン酸化を誘導し、これは、p53依存性またはp53非依存性の細胞周期停止および/またはアポトーシスをもたらす。

20

【0011】

特にATMを介する、位置Ser15におけるp53のリン酸化は、mdm2が結合する能力を妨害し、その分解を抑制する。リン酸化され、それにより活性化されたp53は、タンパク質p21ならびに増殖の停止およびDNA損傷を誘導するタンパク質（Gadd45a）のための遺伝子を含む一对の遺伝子のための転写因子として作用する。P21は、多様なサイクリン依存性キナーゼを阻害し、それらは、G1期において細胞周期停止をもたらす。さらに、p21は、PCNAに結合して、DNA複製を中断させる。誘導された核Gadd45aは、サイクリン依存性キナーゼ2（cdc2）と相互作用し、そのcdc2/サイクリンB1複合体からの解離をもたらす。遊離のサイクリンB1は、細胞質中へ輸送され、ユビキチン化を介して分解される。Gadd45aは、したがってcdc2キナーゼ活性を抑制し、細胞は有糸分裂への移行期において留まる。

30

【0012】

Gadd45aに媒介されるcdc2キナーゼの阻害の他に、Chk1を介した媒介もまた起こる。Chk1は、キナーゼATMおよびATRにより活性化され得るが、Chk1のSer345およびSer317におけるリン酸化は、ATRにより行われる。Chk1は、ホスファターゼCdc25CをSer216においてリン酸化することができ、これは、cdc2のThr14およびTyr15における抑制性のリン酸化の解除を不能にし、細胞はG2/M期の移行期に留まる。

【0013】

タンパク質および関連分子の分析は、上記のとおり、例えばHepG2細胞の（前駆型）遺伝子毒への暴露に対する応答における、細胞の死と生存との複雑な調節を示す。主に影響を受けるプロセスは、細胞周期の調節、細胞の増殖およびアポトーシスを含む。差次的に調節されることが見出されたタンパク質は、主に、アポトーシス促進性および抗増殖機能に割り当てられ得る。データは、化合物により誘導されるDNA損傷に対する応答における、細胞周期停止およびプログラム細胞死の誘導を示す。

40

【0014】

個々のタンパク質に対する遺伝毒性の関連は、増殖、分化または損傷の修復におけるシグナル伝達を妨害することができる変異原および前駆型変異原のin-vitro検出のために利用される。本発明の複数のタンパク質に基づいて、化合物に特異的なタンパク質発現プロフィールを構築することには、遺伝毒性の作用機序を確立する上での予想外の利益があり、したがって、古典的なスクリーニング方法に対して代替的に、または補足的に、新規化

50

化合物の潜在的な危険性または利益の評価をサポートする。本発明の方法の基礎となる発明の原理は、定義されたタンパク質を検出することを含む。遺伝子産物は、その絶対的および相対的量の両方、ならびに特定の細胞型に対する特異度に関して選択される。

【発明を実施するための形態】

【0015】

「タンパク質」とは、1または2以上のポリペプチドを含む生化学的化合物を指す。ポリペプチドは、隣接するアミノ酸残基のカルボキシル基とアミノ基との間のペプチド結合により一緒に結合したアミノ酸の、単一の直鎖状のポリマー鎖である。それは、典型的には、生物学的機能を促進するために、球状または線維状の形態に折り畳まれる。タンパク質の「活性形態」とは、タンパク質中の残基がしばしば翻訳後修飾により化学的に修飾され、それがそのタンパク質の物理学的および化学的特性、折り畳み、安定性、活性および最終的にはその機能を改変すると言いう事実を指す。例えば、転写因子p53の活性は、タンパク質のリン酸化により決定的に調節され、これは、一般的な細胞ストレス、DNA損傷またはインターフェロンを含む複数のシグナルにより誘導され得る。

10

【0016】

「複数のタンパク質」とは、本明細書において用いられる場合、同定された、または単離されたタンパク質の群であって、その発現のレベルが異なる組織、細胞において、または異なる条件下もしくは生物学的状態において変化するものを指す。異なる条件は、ホルモン、受容体リガンド、化学化合物などを含む特定の剤 - 外因性または内因性のいずれであっても - への暴露によって引き起こされる場合がある。複数のタンパク質の発現は、特定のパターンを示す。すなわち、複数のものの中の各々のタンパク質は、異なる条件において、または特定の内因性または外因性の剤に暴露することにより、もしくはそれを行わないことにより、差次的に発現される。各々のタンパク質の発現差異の程度またはレベルは、複数のものの中で異なり、本発明により、定性的におよび/または定量的に決定することができる。タンパク質発現プロファイルとは、本明細書において用いられる場合、異なるレベルにおいて差次的に発現される複数のタンパク質であって、「パターン」または「プロファイル」を構成するものを指す。本明細書において用いられる場合、用語「発現プロファイル」、「プロファイル」、「発現パターン」、「パターン」、「タンパク質発現プロファイル」および「タンパク質発現パターン」は、交換可能に用いられる。

20

【0017】

本明細書において用いられる場合、「遺伝毒性活性を有する化合物」は、また「変異原」としても言及され、生物の遺伝子材料、通常はDNAを変化させ、それにより変異の頻度を天然のバックグラウンドレベルの上まで増大させる、物理学的または化学的な剤である。当業者は、例えば、変異原の生物学的効果のうちの一つは、癌の発症を促進することであることを知っているであろう。変異原の他の生物学的効果は、よく記述され、議論されている。変異による核酸配列における変更は、DNA配列中のヌクレオチド塩基対の置換ならびに1または2以上のヌクレオチドの挿入および欠失を含む。

30

【0018】

第1に、システムが提供され、その全体においてまたは部分においてインキュベートされる。システムはまた、以下で試験システムとしても言及される。本発明の範囲においては細胞システムが好ましいが、生細胞によらないタンパク質合成に基づくin-vitro翻訳システムを、代替的に用いてもよい。細胞システムは、当該対象が細胞を含むことを前提として、提供される任意の対象であると定義される。したがって、細胞システムは、単一の細胞、細胞培養、組織、器官、植物および動物の群から選択することができる。細胞システムの範囲はまた、かかる生物学的実体、すなわち、組織、器官、植物および動物の試料の部分を含む。植物でない場合、前述の順序における各々の細胞システムは、それぞれ以下のシステムの試料を表わす。細胞試料、非ヒト動物、哺乳動物または非ヒト哺乳動物は、本発明による細胞システムの好ましい態様である。細胞試料は、単離された状態において、培養においてまたは細胞株において、任意の型の初代細胞または遺伝子操作された細胞を指す。特に、細胞試料は、試験されるべき哺乳動物から、in-vitroまたはin-situに

40

50

において取得される。細胞試料の回収は、優れた医療行為に従う。生物学的試料は、任意の種類生物種から取得され得るが、試料は、特にヒト、ラットまたはマウスから取得される。

【0019】

本発明において、細胞システムはまた、生体液を含んでもよく、ここで、体液の試料は、好ましくは、血液、血清、血漿、唾液または尿からなる。組織試料を生検、特に患部の位置の近くにおいて採取されることにより収集することもまた好ましい。生物学的試料は、肝臓、腎臓、腸、骨髄などを含む任意の組織に由来してもよい。好ましい態様において、生物学的試料は、腎臓、肝臓および腸からのものである。試料を、水素結合の形成の阻害剤などの邪魔な物質を取り除くために精製してもよい。

10

【0020】

システムは、p53、p21、H2A.X、ATM、Chk1、ATR、cdc2、Gadd45aまたはChk2のうちの幾つかのタンパク質を発現することができるか、または発現している。本発明の一態様において、システムは、さらに、MDM2を発現することができるか、または発現している。システムはまた、p-p53 (Ser15)、p21、p-H2A.X (Ser139)、p-ATM (Ser1981)、p-Chk1 (Ser345)、p-ATR (Ser428)、p-cdc2 (Thr14 / Tyr15)、Gadd45aおよびp-Chk2 (Thr68)のうちの幾つかのタンパク質を活性化することができるか、または活性化している。システムは、好ましくは、p-p53 (Ser15)、p21、p-H2A.X (Ser139)、p-ATM (Ser1981)、p-Chk1 (Ser345)、p-ATR (Ser428)、p-cdc2 (Thr14 / Tyr15)、Gadd45aおよびp-Chk2 (Thr68)のうちの少なくとも2つのタンパク質の活性形態を、発現することができるか、または発現している。より好ましくは、システムは、p-p53 (Ser15)、p21、p-H2A.X (Ser139) およびp-Chk1 (Ser345)の群から選択される少なくとも2つのタンパク質の活性形態を、発現することができるか、または発現している。最も好ましくは、システムは、p-p53 (Ser15)、p21、p-H2A.X (Ser139)、p-ATM (Ser1981) およびp-Chk1 (Ser345)の群から選択される少なくとも2つのタンパク質の活性形態を、発現することができるか、または発現している。

20

【0021】

同じ機能を有するパリアント、変異体、相同なタンパク質の配列の部分は、定義ならびに保護の範囲内に含まれることが理解されるべきである。好ましくは、相同性は、少なくとも85%に達する。可能な変化は、欠失、挿入、置換、修飾、および少なくとも1のアミノ酸の付加、または別のペプチドもしくはタンパク質との融合を含む。操作された細胞は、基礎となる核酸配列またはその部分を保有する適当なベクターによるトランスフェクションの後で、これらのタンパク質を発現することができる。好ましくは、組換え細胞は、真核生物由来のものである。

30

【0022】

本発明のより好ましい態様において、スクリーニング方法のためにHepG2細胞が提供される。用いられるS9の用量は、細胞傷害性の評価においては陰性であるにもかかわらず、実験結果に対して影響を有する。用量は、規制による標準的な遺伝毒性試験内において用いられる用量に匹敵することに注意すべきである。S9により著しく調節された遺伝子は、(前駆型)遺伝毒性剤により誘導されたものとは異なり、S9の効果は、適正な対照に対する比較により調整することができる。いずれにせよ、十分な固有の代謝活性を有する細胞システムが無論適当であるが、現在、遺伝毒性評価のためのかかる代謝的に適格な細胞システムは存在しない。初代肝細胞は、薬物代謝およびCYP誘導/阻害のin-vitroでの研究のための現在の最高の基準である。成人の分化した肝細胞は増殖能力を欠き、そのことがそれらを遺伝毒性の研究のためには適さないモデルとしており、およびそれらはまた、培養中の形態ならびにタンパク質および遺伝子の発現の顕著な変化、ヒト肝細胞の限定された利用可能性、ならびにしばしばかかるシステムの標準化を複雑にする顕著なドナー/バッチの変動性を示すにもかかわらず、HepG2細胞の主要な利点は、それらのヒトの分子的特徴である。例えば、トポイソメラーゼおよび真核生物の修復酵素などの特異的標的が発現され、遺伝毒性の過剰評価を防止し、したがって偽陽性の減少に寄与する。

40

50

【0023】

細胞試料は、凍結されるなどして保存され、一定の期間培養されるかまたはすぐに次のステップに供される。スクリーニングされるべき化合物と共にインキュベートする前に、細胞試料は、複数の部分に分割してもよい。そのようにする場合は、少なくとも2つの部分が提供される；1つはスクリーニングのために用いられるが、他方は対照として役立つ。好ましくは、スクリーニングのための部分の数は、対照部分の数を超える。通常は、多数の部分を、ハイスループットスクリーニングに供する。

【0024】

化合物は、標的分子と相互作用することができる生物学および/または化学的構造からなる。本明細書において、ゲノクスまたはプロゲノクスシグナル伝達のうちの任意の成分が、「標的分子」としてみなされるべきであり、これは、遺伝子、またはレギュレータータンパク質もしくはその遺伝子産物、または遺伝子もしくはその遺伝子産物を含むシグナル伝達経路の成分に限定されない。その結果、化合物の特異的な相互作用は、単なる標的化であるか、または細胞機能の改変の誘導のいずれかを含み得るか、あるいは、両方の効果を同時に含んでもよい。

10

【0025】

本発明の方法においてスクリーニングされるべき化合物は、決して限定されない。特に、化合物は、核酸、ペプチド、炭水化物、ポリマー、50~1,000Daの分子量を有する低分子およびタンパク質の群から選択される。これらの化合物は、しばしばライブラリーにおいて利用可能である。単一の化合物を、細胞試料の区別し得る部分中でインキュベートすることが好ましい。しかし、少なくとも2つの化合物を1つの部分中でインキュベートすることにより、化合物の共同的効果を調べることも可能である。細胞システムの画分を、分析されるべき1または2以上の(前駆型)遺伝毒性化合物と共にインキュベートし、細胞のさらなる部分を化合物の不在下においてインキュベートして、システムのこのさらなる未処置の画分を、陰性対照として用いる。遺伝毒性ストレスに暴露する前の状態を決定すること、およびそれを遺伝毒性ストレス後の状態と比較することにより、システムを試験および対照のシステムとして同時に作用させることもまた可能である。さらなる対照システムを、以下に概説する。

20

【0026】

用語「インキュベーション」は、化合物を細胞と、明確な期間(これは化合物および/または標的の種類に依存する)にわたり、接触させることを表わす。インキュベーションプロセスはまた、多様な他のパラメーター、例えば、細胞の型および検出の感度に依存し、この最適化は、当業者に公知の慣用的な手順に従う。インキュベーションの手順は、変異原の化学的変換なしで現実化することができ、または前駆型変異原の代謝的変換を伴ってもよい。化学溶液を添加すること、および/または物理学的手順、例えば熱の影響を適用することは、試料中の標的の構造のアクセシビリティを改善し得る。特定のインキュベーション生成物が、インキュベーションの結果として形成される。

30

【0027】

本発明の意味において有効な化合物の同定は、システムが発現することが可能な少なくとも2つの定義されたタンパク質の発現パターンを決定することにより、間接的に行われる。決定は、特定された時間において行われ、実験の開始時および対照におけるシグナル強度と相関される。例えば、対照システムは、化合物と共にインキュベートされない(陰性対照)、または、対照システムは、遺伝毒性活性を有さない標準化合物と共にインキュベートされる(陰性対照)。対照システムはまた、(前駆型)遺伝毒性活性を有する標準化合物と共にインキュベートされてもよい(陽性対照)。活性は、発現の変化により明らかとなる。好ましくは、変異原により細胞において発現されるタンパク質を、変異原に暴露されなかった細胞において発現されるタンパク質と比較する。処置の各々の間で、ペアワイズ比較を行う。ペアワイズ比較は、所与の処置条件下における所与のタンパク質についての発現データを、第2の処置条件下におけるこのタンパク質についての発現データと比較することを含む。比較は、好適な統計学的技術を用いて、既知および市販のプログラ

40

50

ムの補助により行う。

【0028】

システムにおけるタンパク質の発現が、陰性、陽性もしくは陰性対照システムと比較して上方調節される場合、または、システムおよび陽性対照システムにおけるタンパク質の発現が、実質的に同一である場合に、固有の（前駆型）遺伝毒性活性が検出されることは、本発明の別の好ましい側面である。詳しくは、（i）システムにおける、任意の化合物と共にインキュベートされていない陰性対照システムと比較してより高いタンパク質発現が、前記の活性を示す、または（ii）試験システムにおける、遺伝毒性および/または前駆型遺伝毒性活性を有する標準化合物と共にインキュベートされる陽性対照システムと比較して、実質的に同一またはより高いタンパク質発現が、前記の活性を示す、または（iii）より低い濃度が相対的対照システムに割り当てられるという条件で、試験システムにおけるもの以外の濃度を有する化合物と共にインキュベートされる相対的対照システムにおいて、より高いタンパク質発現が、前記の活性を示す。上記の2つまたは全ての比較を決定することは必要とされないが、（i）、（ii）または（iii）下における発現レベルの比較からもたらされる（前駆型）遺伝毒性活性の指標は、必然的に、任意の他の比較的決定における（行われるか否かに関わらず）前記の活性を暗示することが理解されるべきである。

10

【0029】

化合物と共にインキュベートされたシステムにおける前記タンパク質のうちの少なくとも1つの発現レベルの、前記化合物と共にインキュベートされていないシステムと比較しての増大が、前記の活性を示すことが、より好ましい。前記タンパク質のうちの少なくとも3、4、5、6、7、8または9つの発現レベルが増大することが、本発明の最も好ましい態様である。高度に好ましくは、対照システムとのタンパク質発現差異分析により、既存の活性を検出する。

20

本発明の別の好ましい側面において、発現レベルは、少なくとも1.5倍、より好ましくは少なくとも1.6倍、最も好ましくは少なくとも1.8倍、高度に好ましくは少なくとも1.9倍、および特に高度に好ましくは少なくとも2.1倍、増大する。

【0030】

対照システムのものと比較して1~1.1倍の発現レベルを提供するために、減少した濃度の化合物が投与されることは、本発明の別の最も特別な側面である。減少した化合物濃度とは、少なくとも10%、好ましくは少なくとも20%、より好ましくは少なくとも30%、最も好ましくは少なくとも40%、高度に好ましくは少なくとも50%、特に高度に好ましくは少なくとも60%の減少を指す。

30

本発明の別のより好ましい側面において、化合物と共にインキュベートされたシステムにおける前記タンパク質のうちの少なくとも1つの、遺伝毒性および/または前駆型遺伝毒性活性を有する標準化合物と共にインキュベートされたシステムと比較して実質的に同一の発現レベルが、前記の活性を示す。

【0031】

タンパク質発現、アミノ酸配列の決定およびバリエーション分析をモニタリングするために好適な試験は、当業者に公知であるか、または慣用的なこととして容易に設計することができる。本発明によるアッセイは、タンパク質発現を検出および/または定量するために好適な任意のアッセイであってよい。発現レベルが免疫蛍光染色により決定されることは、本発明の好ましい態様である。

40

【0032】

選択されるマーカーは、ハイスループットでのスクリーニングツール、好ましくはHigh Content Imaging (HCI) またはLuminex xMAP技術を確立するために、特に用いることができる。Luminexは、マイクロスフェアと称される小ビーズを、500の区別し得るセットに色でコードする。各々のビーズセットは、特定のバイオアッセイに特異的な試薬で被覆することができ、試料からの特異的な分析物の捕捉および検出を可能にする。Luminex技術は、特に、微粒子ビーズ状に固定されたサンドウィッチELISAと、フローサイトメト

50

リーを組み合わせる。それは、1つの試料中の幾つかのタンパク質の同時の定量的測定を可能にする。Luminexアナライザの内部において、光源は、各マイクロスフェア粒子を同定する内部色素、およびまたアッセイ中に捕捉される任意のレポーター色素を励起する。二重レーザーは、ビーズ（各分析物について特異的なビーズのスペクトル特性に基づいて）、および結合しているフィコエリトリン（PE）蛍光を検出して同定するために使用される（Hoffmann et al, 2010, Toxicology 277, 49-58）。画像分析アルゴリズムを備えた蛍光顕微鏡法を、情報学ツールと組み合わせる、自動化されたイメージングプラットフォームは、細胞成分の局在、細胞の高分子構造および細胞機能の時間的動態の高分解能検査による、何百万個もの細胞からの蛍光画像の分析を可能にする。HCI技術の毒物学的評価のための適用は、in-vitroでの予測が、ヒト肝臓毒（hepatotoxicant）を同定することによる古典的な全臨床試験の実施を強化することができることを示す（Xu et al., 2008, Toxicol Sci 105, 97-105）。さらに、HCI技術は、微小核（MN）を検出することによる遺伝毒性評価のために用いることができる。in-vitroでのMN試験は、微小核と称される細胞の細胞質中の染色体フラグメントを計数することにより、化合物に誘導される染色体異常誘発性（染色体損傷）および異数性誘発性（染色体欠失）効果を検出する。HCIベースのアッセイは、高性能のスコアにより遺伝毒性の潜在的能力を検出することができ、また、異数性誘発性化合物と染色体異常誘発性化合物との間の識別を可能にする（Westerink et al., 2011, Mutat. Res. 724, 7-21）。

10

【0033】

さらに、その技術は、幾つかの選択されたエンドポイントの組み合わせを可能にし、生物学的複雑性および分子相互作用をある程度まで保存することができる。HCIは、古典的な遺伝毒性のエンドポイント（例えば、MNの誘導）および細胞マーカーの分析を、細胞の生存率/細胞傷害性の同時取得と組み合わせることの可能性を提供する。細胞の生存率は、遺伝毒性試験のために考慮すべき重要なパラメーターである。なぜならば、標準的なアッセイにおける偽陽性は、特に細胞傷害性を介して生じ得るからである。同じことは、p53などの分子マーカーを測定することについても真である。p53は、DNA損傷に対して極めて高感度に反応するが、栄養欠乏および低酸素もまた、活性化を誘導し得る。用量の選択についての細胞傷害性の考慮と、複数のエンドポイント測定により、偽陽性を防止するかまたは減少させることができる。

20

【0034】

結果的に、本発明は、評価されるべき細胞からタンパク質試料を調製すること、当該タンパク質試料を抗体と接触させること、抗体へのタンパク質結合を検出すること、および検出された結果を対照細胞から調製されたタンパク質試料を用いて検出された結果と比較することにより、遺伝毒性活性を有する化合物の細胞効果を予測するための方法に関する。

30

【0035】

検出は、完全な細胞を、選択される検出方法に適用することにより行うことができる。しかし、細胞抽出物を初めに提供することが好ましい。細胞溶解は、好適な周知の溶解バッファー中で行うことができ、これは、浸透圧ショックを引き起こし、細胞膜に穿孔することができる。細胞の構造の安定性はまた、ボールミル、フレンチプレス、超音波などの機械力により、それぞれ細胞壁および細胞膜の酵素分解により、および/または界面活性剤の作用により破壊してもよい。バイオマーカーをさらに精製して、邪魔な物質を除去してもよく、またはバイオマーカーを試料中で濃縮してもよい。下流の処理および/または濃縮は、好ましくは、沈澱、透析、ゲル濾過、ゲル溶離、またはHPLCもしくはイオン交換クロマトグラフィーなどのクロマトグラフィーにより行う。より良好な収率のために、幾つかの方法を組み合わせることが推奨される。

40

【0036】

遺伝毒性を検出するための好適な試験は、当業者に公知であるか、または慣用的なこととして容易に設計することができる。多くの異なる型のアッセイが知られており、その例を以下に記載する。本発明によるアッセイは、遺伝子発現を検出および/または定量する

50

ために好適な任意のアッセイであってよいが、遺伝毒性は、好ましくは、タンパク質p-p53 (Ser15)、p21、p-H2A.X (Ser139)、p-ATM (Ser1981)、p-Chk1 (Ser345)、p-ATR (Ser428)、p-cdc2 (Thr14 / Tyr15)、Gadd45aおよびp-Chk2 (Thr68)と特異的に相互作用する物質を用いて決定される。

【0037】

用語「特異的物質」は、本明細書において用いられる場合、本発明のタンパク質と、認識、結合および相互作用を可能にする様式において相互作用することができる、生物学的および/または化学的構造を含む。特に、物質は、核酸、ペプチド、炭水化物、ポリマー、50~1,000Daの分子量を有する低分子およびタンパク質の群から選択され、好ましくは、核酸およびタンパク質である。特異的物質は、信頼性のある結合および検出を確実にするために、十分な感度および特異度を表わす。試料中に存在する他の生体分子は、本発明のタンパク質マーカーについて特異的な物質に有意には結合しない。好ましくは、マーカータンパク質以外の生体分子への結合のレベルは、マーカータンパク質のアフィニティーの僅か10%、より好ましくは僅か5%またはそれより低い結合アフィニティーをもたらす。特異的物質は、対応するマーカータンパク質について少なくとも 10^{-7} Mのアフィニティーを有する。特異的物質は、マーカータンパク質について、好ましくは 10^{-8} M、またはさらにより好ましくは 10^{-9} Mのアフィニティーを有する。最も好ましい特異的物質は、アフィニティーについて、ならびに特異度についての、両方の最少判断基準より高いことを満たすであろう。

【0038】

物質は、好ましくは、タンパク質の部分に対して特異的である。かかる部分は、それらの領域に対する限定を表わし、これは特異的機能、すなわち認識のための構造決定要因の提供の発現のために十分である。全ての切断は、必然的に、機能、例えば特有の認識の保全の必要性により限定される。しかし、タンパク質フラグメントは、非常に小さくてもよい。好ましくは、物質は、選択された単一の標的との排他的かつ定方性の相互作用を保証するために、単一特異性である。

【0039】

本発明によるタンパク質の認識は、物質との、アミノ酸配列の一次、二次および/または三次構造レベルにおける特異的相互作用により、実現することができる。本発明に関して、用語「認識」とは、それらに限定されることなく、特異的物質と標的との間の任意の型の相互作用、特に、共有結合、疎水性/親水性相互作用、ファンデルワールス力、イオン対、水素結合、リガンド-受容体相互作用、エピトープと抗体の結合部位との間の相互作用、ヌクレオチド塩基対などの、共有的または非共有的な結合または会合に関する。かかる会合はまた、ペプチド、タンパク質または他のヌクレオチド配列などの、他の分子の存在を包含してもよい。

【0040】

特異的物質は、好ましくは、抗体、サイトカイン、リポカイン、受容体、レクチン、アビジン、リポタンパク質、糖タンパク質、オリゴペプチド、ペプチドリガンドおよびペプチドホルモンからなる群より選択される。より好ましくは、抗体は、特異的物質として用いられる。「抗体」とは、免疫グロブリン遺伝子またはそのフラグメントにより本質的にコードされるポリペプチドを表わす。本発明によれば、抗体は、完全な免疫グロブリン、または多数のよく特徴づけられたフラグメントを表わす。フラグメントは、好ましくは、 F_{ab} フラグメント、 F_c フラグメント、一本鎖抗体(s c F v)、可変領域、定常領域、H鎖(V_H)およびL鎖(V_L)、より好ましくは F_{ab} フラグメントおよびs c F vからなる群より選択される。 F_{ab} フラグメントおよび F_c フラグメントなどのフラグメントは、多様なペプチダーゼを用いる切断により生成することができる。さらに、フラグメントは、操作して組換え的に、好ましくはs c F vとして発現させることができる。

【0041】

DNAアプタマーおよびRNAアプタマーは、広範な標的分子に対して高いアフィニティーを表わすことが見出されている。標的の構造は、タンパク質、ペプチドおよび有機色素など

10

20

30

40

50

の低分子、ヌクレオチド、アミノ酸、ビタミン、アルカロイドなどを含み得る。より好ましいものは、RNAアプタマーである。なぜならば、RNAにおいて利用可能な2'-ヒドロキシル基が、一对の分子内および分子間接触を促進し、後者は、同じ配列、異なる配列の分子間で、またはRNAとRNAからなるものではない任意の他の分子との間に生じるからである。これらの核酸リガンドは、効率的なin-vitro選択手順 - いわゆるSELEXプロセス (systematic evolution of ligands by exponential enrichment: 試験管内進化法) により、同定することができる。RNAは、生体液中での核酸分解に対して非常に感受性が高いので、RNAアプタマーは、例えばホスホロチオエート、ロックド核酸、Spiegelmersを用いて、化学修飾されるべきである。Spiegelmersと称されるアプタマーの1-RNAバージョンは、天然の分解プロセスに対して不浸透性であるので、特に長命である。広範な構造的標的に対するそれらの高いアフィニティーに起因して、アプタマーは、抗体と非常に類似して作用する。アプタマーは、標準的なホスホラミダイト化学を用いて合成することができる。さらに、約30ヌクレオチドより多くを有するRNAアプタマーは、in-vitro転写により有利に大量に合成することができる。アプタマーの選択、合成および精製は、当業者に周知である。

10

【0042】

特異的物質は、標識することができ、それを行う場合は、標識は、それらの固有の特徴および適用されるべき検出方法、すなわち、必要とされる感度、共役の容易性、安定性の要求、および利用可能な器具および廃棄手段の供給に依存する。特異的なインキュベーション産物の検出のために、適用される方法は、モニタリングされるべき特異的なインキュベーション産物に依存し、当業者に周知である。本発明による好適な検出方法の好ましい例は、発光、特に蛍光、さらにはVIS呈色および/または放射活性放出である。

20

【0043】

発光は、化学発光、生物発光または光ルミネッセンスの結果としての光の放出に関する。化学発光は、化学反応の結果として可視光の放出を伴い、一方、生物発光は、ルシフェラーゼの活性を必要とする。現在好まれている光ルミネッセンスは、蛍光刺激としても知られ、好ましくは放射線により提供される光子の吸収により引き起こされ、これは再び光子として、30~50nmの波長においてシフトして、約 10^{-8} 秒間の期間内において、放出される。蛍光検出のための器具として、限定されないが、典型的なベンチトップ蛍光光度計、蛍光マルチウェルプレートリーダー、光ファイバー蛍光光度計、蛍光顕微鏡、および蛍光検出と組み合わされたマイクロチップ/微小流体システムが挙げられる。

30

VIS呈色とは、裸眼に見えるようにするための、任意のアクロマティック物質の可視化を表わす。好ましくは、呈色の強度は、光度計により測定される。

【0044】

同位元素の放射性放射線は、シンチレーションにより測定する。液体シンチレーションのプロセスは、シンチレーションカクテルとして言及される無機溶媒および溶質の系におけるベータ放出の捕捉を介する、試料中のベータ崩壊の検出を含む。試料中の ^3H 、 ^{14}C 、 ^{32}P 、 ^{33}P および ^{35}S などの放射活性同位元素により放出されるベータ崩壊電子は、溶媒分子を励起し、これが次いで溶質にエネルギーを移動する。溶質(光子)のエネルギー放出は、シンチレーションカウンター内の光電子倍增管により電子的シグナルに変換される。カクテルはまた、均一な試料の懸濁液を保持する可溶化剤としても作用する。ガンマ線光子は、しばしば他の崩壊プロセス(系列崩壊)の結果として、新たに形成された核から過剰なエネルギーを取り除くために、生じる。それらは質量を有さず、それらの進路に沿った衝突による直接的なイオン化を(たとえあるとしても)殆ど生じない。ガンマ光子は、以下の3つの機構: コンプトン効果、光電効果、および電子対生成のうちの1または2以上により、検出および量子化のために吸収される。本発明の有利なガンマ崩壊同位体元素は、 ^{125}I である。

40

【0045】

標識方法は、標識が容易に検出できる限りは特に限定されない。「標識された特異的物質」は、マーカータンパク質に結合した標識の存在を検出することによりマーカータンバ

50

ク質の存在を検出することができるように、共有的にリンカーもしくは化学結合を通して、またはイオン結合、ファンデルワールス結合、静電結合、疎水性相互作用結合または水素結合を通して非共有的に、標識に結合しているものである。

【0046】

抗体の酵素への共有的結合は、グルタルアルデヒドとのカップリングなどの多様な方法により行うことができる。酵素および抗体の両方を、遊離のアミノ基を介してグルタルアルデヒドと相互に連結させ、ネットワーク化された酵素と抗体との副生成物を取り除く。別の方法において、酵素を、それがペルオキシダーゼなどの糖タンパク質である場合、糖残基を介して抗体にカップリングする。酵素を、過ヨウ素酸ナトリウムにより酸化し、抗体のアミノ基と直接的に相互に連結させる。炭水化物を含有する他の酵素もまた、この様式において抗体にカップリングすることができるが、ときに、酸化に起因して活性の喪失が観察される（例えばアルカリホスファターゼの活性の低下）。酵素のカップリングはまた、抗体のアミノ基を、 α -ガラクトシダーゼなどの酵素の遊離のチオール基と、スクシンイミジル6-(N-マレイミド)ヘキサノアートなどのヘテロ二機能性リンカーを用いて相互に連結させることにより行ってもよい。

10

【0047】

抗体のタンパク質への特異的免疫学的結合は、直接的にまたは間接的に検出することができる。直接的標識として、抗体に結合した蛍光または発光タグ、金属、色素、放射性核種などが挙げられる。ヨウ素-125 (^{125}I)で標識された抗体を用いてもよい。タンパク質マーカに対して特異的な化学発光抗体を用いる化学発光アッセイは、タンパク質レベルの高感度の非放射活性検出のために好適である。蛍光色素で標識された抗体もまた好適である。蛍光色素の例として、限定することなく、DAPI、フルオレセインイソチオシアネート (FITC)、オレゴングリーン、ヘキスト33258、R-フィコシアニン、緑色蛍光タンパク質 (GFP)、B-フィコエリトリン、R-フィコエリトリン、ローダミン、テキサスレッド、テトラローダミンイソチオシアネート (TRITC)、Cy3、Cy5およびリサミンが挙げられる。間接的標識として、セイヨウワサビペルオキシダーゼ (HRP)、アルカリホスファターゼ (AP)、 α -ガラクトシダーゼ、ウレアーゼなどの、当該分野において周知の多様な酵素が挙げられる。セイヨウワサビペルオキシダーゼ検出系を、例えば過酸化水素の存在下において450 nmにおいて検出可能な可溶性の生成物を生じる発色性物質であるテトラメチルベンジジン (TMB)と共に、用いることができる。アルカリホスファターゼ検出系は、例えば、405 nmにおいて容易に検出可能な可溶性生成物を生じる発色性物質であるp-ニトロフェニルホスフェートと共に用いることができる。同様に、 α -ガラクトシダーゼ検出系は、410 nmにおいて検出可能な可溶性生成物を生じる発色性物質であるo-ニトロフェニル-D-ガラクトピラノシド (ONPG)と共に用いることができる。ウレアーゼ検出系は、尿素-プロモクレゾールパープルなどの基質と共に用いることができる。自己消光される蛍光化合物は、腫瘍関連プロテアーゼ、酵素、例えばルシフェラーゼ、ナノ粒子、ピオチン、ジゴキシゲニンなどにより活性化される。

20

30

【0048】

本発明の別の好ましい態様において、アプタマーは、ジゴキシゲニン、ピオチン、化学発光物質、蛍光色素、磁性ビーズ、金属ビーズ、コロイド粒子、高電子密度試薬、酵素（これらは全て当該分野において周知である）、または放射性同位元素により標識される。本発明の範囲において核酸を標識するための好ましい同位元素は、 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{32}P 、 ^{33}P 、 ^{35}S または ^{125}I 、より好ましくは ^{32}P 、 ^{33}P または ^{125}I である。

40

【0049】

競合的および非競合的イムノアッセイを含む多様なイムノアッセイ技術を用いることができる。用語「イムノアッセイ」は、限定することなく、競合的酵素免疫分析法 (enzyme multiplied immunoassay technique: EMIT)、酵素結合免疫吸着測定法 (ELISA)、IgM抗体捕捉ELISA (MAC ELISA) および微粒子酵素免疫測定法 (MEIA) などの酵素免疫測定法 (EIA)、さらにはキャピラリー電気泳動イムノアッセイ (CEIA)、ラジオイムノアッ

50

セイ (RIA)、免疫放射線測定アッセイ (IRMA)、蛍光偏光イムノアッセイ (FPIA) および化学発光アッセイ (CL) を含む技術を抱合する。所望の場合、かかるイムノアッセイは、自動化されていてもよい。イムノアッセイはまた、Luminex技術などのレーザー誘起蛍光と組み合わせて用いてもよい。フローインジェクションリポソームイムノアッセイおよびリポソーム免疫センサーなどのリポソームイムノアッセイもまた、本発明における使用のために好適である。さらに、タンパク質/抗体複合体の形成が光散乱の増大をもたらし、それがマーカー濃度の関数としてのピーク速度シグナルに変換されるネフェロ分析アッセイは、本発明の方法における使用のために好適である。

【0050】

本発明の一態様において、抗体は、特異的物質として用いられ、インキュベーションの生成物は、抗体を標識することにより、好ましくはELISA、RIA、フルオロイムノアッセイ (FIA)、可溶性粒子免疫アッセイ (SPIA) またはウェスタンブロットにより検出される。

10

【0051】

本発明の好ましい態様において、ELISAは、インキュベーションの生成物の検出のために用いられる。ELISAの成分は、免疫学的反応の一方のパートナーに結合した酵素である。マーカータンパク質のトレーサー抗原 (分析物誘導体) は、好ましくは、単一捕捉抗体 (本明細書において以後一次 (primary) として言及される) を用いる競合的ELISAにおいて標識され、一方、抗体は、好ましくは、非競合的ELISAにおいて標識され、これは好ましくは、前記マーカータンパク質の一次抗体とは別のエピトープに指向される二次抗体 (本明細書において以後二次として言及される) による抗原-抗体複合体の沈澱を含む。抗原と2つの抗体からなる複合体はまた、サンドウィッチ複合体とも称される。検出は、その後の酵素による基質の、生成物、好ましくは呈色した生成物への変換を含み、これは、視覚的な呈色、生物発光、蛍光、または電気的シグナルの測定 (酵素電極) により認識される。本発明における標識のために有利な酵素は、当業者に公知であり、ペルオキシダーゼ (例えば、HRP)、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ (CAT)、緑色蛍光タンパク質 (GFP)、グルタチオンS-トランスフェラーゼ (GST)、ルシフェラーゼ、
- ガラクトシダーゼおよびAPなどである。

20

【0052】

さらに好ましいものは、免疫試薬中に組み込まれているか、または後でアッセイの免疫試薬、好ましくは抗体にカップリングされる放射性同位元素を利用する、放射活性イムノアッセイである。本発明の方法における好ましい放射性同位元素は、 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{32}P 、 ^{33}P 、 ^{35}S および ^{125}I 、より好ましくは ^{14}C 、 ^{35}S および ^{125}I である。有利な方法は、結合の競合原理に従う。一定量の放射活性タンパク質マーカーと、分析されるべき試料の可変量の前記マーカーとは、過剰に存在する規定量の抗体について競合する。トレーサーの転置は、マーカー濃度に直接的に比例し、これはキャリブレーション曲線により評価することができる。

30

有利にはフルオロフォアにより標識される抗原または抗体は、それぞれ、FIAにおいて用いられる。

【0053】

SPIAは、凝集の結果としての銀粒子の色の変化を利用する。二次抗体および指示薬のいずれも、それを本発明の範囲において特に有用とする上で必要ではない。同様に有利であるのは、呈色したラテックス粒子に結合している抗体を用いるラテックス凝集試験である。

40

【0054】

本発明の特異的インキュベーション生成物のための別の好ましい検出方法は、ウェスタンブロットである。第1に、ゲルを混合して鑄型に流し、先に調製しておいた試料をゲル上にロードし、電気泳動により分画する。ポリアクリルアミドゲル中に存在するタンパク質は、ニトロセルロース膜上にプロットし、それに抗体を適用して、目的の特異的なタンパク質を検出することができる。ウェスタンブロットは、簡便に、および濃度の正確な決

50

定が不要である場合には有利に行われる。

【0055】

本発明のタンパク質マーカーに対して、区別し得る数の特異的抗体が利用可能である。抗体は、通常、哺乳動物の生体内で、当該生物にとって未知であり 3.000 g/mol を超える分子量を有する抗原により免疫応答が引き起こされる場合に産生される。抗体産生のために好ましい宿主種は、ヤギ、ウサギおよびマウスを含む。異なる種に由来するさらなるポリクローナルおよびモノクローナル抗体およびそのフラグメントを選択することができる。ハイブリドーマ技術などの一般的な技術は、当業者に周知である。抗体は、本発明の方法において、特異的物質として適用される。

【0056】

抗体は、磁性またはクロマトグラフィーマトリックス粒子、アッセイプレート（例えばマイクロタイターウェル）の表面、固体基質材料または膜（例えばプラスチック、ナイロン、紙）の薄片などの、多様な固体支持体上に固定することができる。アッセイストリップは、抗体またはアレイ中の複数の抗体を、固体支持体上でコーティングすることにより調製することができる。このストリップを、次いで、試験試料中に浸漬し、洗浄および検出のステップを通して迅速に処理して、呈色したスポットなどの測定可能なシグナルを生成させることができる。

【0057】

分析は、多様な物理的形式において行うことができる。例えば、多数の試験試料の処理を容易にするために、マイクロタイタープレートまたは自動化の使用を用いてもよい。あるいは、時宜を得た様式における診断または予後予測を容易にするために、単一試料のフォーマットを開発してもよい。有用な物理的フォーマットは、複数の異なるバイオマーカーの検出のための複数の別々のアドレス指定できる位置を有する表面を含む。かかる形式は、タンパク質マイクロアレイまたはタンパク質チップを含む。これらの態様において、各々の別々の表面は、各々の位置における検出のための、1または2以上のタンパク質マーカーに結合する抗体を含んでもよい。表面は、代替的に、表面の別々の位置において固定された1または2以上の別々の粒子（例えば、マイクロ粒子またはナノ粒子）を含んでもよく、ここで、マイクロ粒子は、検出のための1または2以上のタンパク質マーカーを固定するための抗体を含む。一態様において、マトリックスが提供され、ここで、各々の位置は、タンパク質についての別々の結合部位を表わし、およびここで、結合部位は、全てのタンパク質 p-p53 (Ser15)、p21、p-H2A.X (Ser139)、p-ATM (Ser1981)、p-Chk1 (Ser345)、p-ATR (Ser428)、p-cdc2 (Thr14 / Tyr15)、Gadd45a および p-Chk2 (Thr68) について存在する。

【0058】

直接的または間接的標識からのシグナルは、例えば、発色性基質からの色を検出するための分光光度計を用いて、 ^{125}I の検出のためのガンマカウンターなどの放射線を検出する放射線カウンターを用いて、または特定の波長の光の存在下において蛍光を検出するための蛍光光度計を用いて、分析することができる。酵素結合抗体の検出のために、EMAX マイクロプレートリーダー (Molecular Devices; Menlo Park, CA) などの分光光度計を製造者の指示に従って用いて、定量的分析を行うことができる。所望される場合、本発明のアッセイは、自動化されていても、またはロボットにより行うことができ、複数の試料からのシグナルを同時に検出することができる。詳細には、タンパク質を蛍光により検出ことができ、これを、例えば蛍光レーザー顕微鏡および CCD カメラにより記録し、蛍光強度をコンピューターにより分析する。光学的画像を観察し、任意にカメラまたは他の記録デバイス（例えば光ダイオードおよびデータ保存デバイス）により記録し、任意にさらに、本明細書における態様のいずれかにおいて処理する（例えば、画像をデジタル化し、画像をコンピューター上で保存および分析する）。多様なデジタル化、デジタル化されたビデオまたはデジタル化された光学的画像を保存および分析するために、市販の周辺機器およびソフトウェアが利用可能である。1つの従来システムは、当該分野における一般的な使用において、標本の視野からの光を冷却電荷結合素子 (CCD) カメラへと運搬す

10

20

30

40

50

る。CCDカメラは、画素（ピクセル）のアレイを含む。標本からの光は、CCD上で画像化される。標本の領域に対応する特定のピクセルが、各位置についての光強度の読み取り値を得るためにサンプリングされる。速度を速めるために、複数のピクセルを並行して処理する。本発明の装置および方法は、例えば蛍光または暗視野顕微鏡技術により、任意の試料を観察するために容易に用いることができる。

【0059】

スクリーニング方法の別の態様において、変異原性および/または前駆型変異原性活性の検出を、さらに洗練することができる。この目的のために、p-p53 (Ser15)、p21、p-H2A.X (Ser139)、p-ATM (Ser1981)、p-Chk1 (Ser345)、p-ATR (Ser428)、p-cdc2 (Thr14/Tyr15)、Gadd45aおよびp-Chk2 (Thr68)の群から選択される幾つかのタンパク質を検出することにより、タンパク質発現を決定して、シグナルの量またはシグナルの変化を、システム中のタンパク質発現と関連させる。言い換えると、タンパク質の活性形態の発現レベルは、放出された物理的シグナルの量、または放出された物理的シグナルの変化に相関する。本発明の細胞システムは、多様な濃度の同定された（前駆型）遺伝毒性化合物と共にインキュベートされる。変異原性化合物の存在下において観察される、放出されるシグナルの量またはシグナルの変化は、当該化合物により経験されるタンパク質発現の変化の指標である。変化を次いで、試料中の変異原の濃度に関連付けることができる。すなわち、キャリブレーション曲線により、マッチする濃度の測定が可能となる。好ましくは、キャリブレーション曲線は、UV/VIS呈色または発光を用いる場合、Lambert-Beerの式に基づく。化合物の遺伝毒性は、試料中のタンパク質の濃度を、変異原で処置された細胞および/またはこれで処置されていない細胞の既知のタンパク質濃度レベルと比較することにより、診断される。既知の濃度は統計学的に証明されており、したがってそれぞれ特定のレベルまたは範囲を表わすことが、理解されるべきである。タンパク質発現の指向性および強度もまた、本発明のマーカータンパク質の発現差異分析により、特定の因子による明確な上方調節が認識されるものとして理解された。測定された任意の濃度であって未刺激の細胞のタンパク質濃度レベルと異なるものは、試験された細胞試料の異常性を示すが、一方、未刺激の細胞の濃度レベルに匹敵するタンパク質濃度においては、化合物は変異原としては分類することができない。遺伝毒性を検出するためには、未刺激の細胞のタンパク質濃度レベルよりも高い濃度を測定することが好ましい。この方法を用いて、本発明者らは、マイクロモル以下、ナノモル濃度までの感度を実証した。キャリブレーションプロットは、当該方法を、2桁にわたるダイナミックレンジにおいて適用することができることを明らかにする。

【0060】

したがって、本発明の方法は、試験システムにおけるタンパク質発現レベルを、対照システムにおけるタンパク質発現レベルと比較することにより、遺伝毒性および/または前駆型遺伝毒性活性のレベルをスクリーニングすることを含む。

【0061】

本発明のバイオマーカーパネルは、スクリーニング方法の範囲内において、2つのみのマーカータンパク質の使用を可能にする感度を示すが、遺伝毒性を検出するために、これらより多くのマーカータンパク質を適用することが好ましい。本発明者らは、複数の変異原応答性タンパク質を分析することは、低複数性タンパク質レポーターアッセイよりも広い範囲の遺伝毒性応答をカバーすることにより、スクリーニングの安定性を増大させ、エラー率を減少させることを示した。本発明の好ましい態様において、前記タンパク質のうち少なくとも3、4、5、6、7、8または9、より好ましくは少なくとも5つのタンパク質、最も好ましくは9つのタンパク質の発現レベルを決定する。

【0062】

少なくともタンパク質p-p53 (Ser15) およびp21の発現レベルが決定されることが、最も好ましい。少なくともタンパク質p-p53 (Ser15)、p21、p-H2A.X (Ser139)、p-ATM (Ser1981) およびp-Chk1 (Ser345)の発現レベルが決定されることが、高度に好ましい。前記の5つのタンパク質の発現に加えて、p-ATR (Ser428)、p-cdc2 (Thr14/Tyr15) およ

10

20

30

40

50

びp-Chk2 (Thr68) の群から選択される、特にp-ATR (Ser428)、p-cdc2 (Thr14 / Tyr15)、Gadd45aおよびp-Chk2 (Thr68) の群から選択される 1 または 2 以上のタンパク質の発現レベルを決定することができる。

【0063】

本発明の別の最も好ましい態様において、少なくともタンパク質p-p53 (Ser15)、p21、p-H2A.X (Ser139)、p-Chk1 (Ser345)、p-ATR (Ser428)、p-Chk2 (Thr68) および任意にMDM2の発現レベルを決定する。少なくともタンパク質p-p53 (Ser15)、p-H2A.X (Ser139)、p-Chk1 (Ser345) およびp-Chk2 (Thr68) の発現レベル、ならびにp21、および任意にATRおよびMDM2の合計タンパク質レベルを決定することは、本発明のなお別の最も好ましい態様である。

10

タンパク質p-p53 (Ser15)、p21、p-H2A.X (Ser139)、p-ATM (Ser1981)、p-Chk1 (Ser345)、p-ATR (Ser428)、p-cdc2 (Thr14 / Tyr15)、Gadd45aおよびp-Chk2 (Thr68) の発現レベルを決定することは、高度に好ましい。

言うまでもないことであるが、任意の好ましい態様における前記のそれぞれの好ましいマーカータンパク質の発現は、対照システムにおけるタンパク質発現と比較される。

【0064】

システムまたはその試料が複数のタンパク質を発現することができ、複数のタンパク質の発現パターンを対照システムにおける発現パターンと比較する場合、遺伝毒性を、化合物に特異的に特徴づけることができる。特に、発現パターンを、複数のタンパク質および/または改変された調節の程度の相関により決定する。本発明のスクリーニング方法は、評価されるべき細胞に対して遺伝毒性活性を有する化学物質の効果を評価するのみならず、またこの効果の詳細を示すこともできる。分類されるタンパク質の発現レベルを個々に評価することにより、細胞に影響を及ぼす遺伝毒性活性を有する化学化合物をどのようにして評価するべきかを区別することが可能である。

20

【0065】

本発明はまた、スクリーニング方法の態様を教示し、ここで発現レベルは、スクリーニングされるべき 1 または 2 以上の化合物を投与された哺乳動物、好ましくは実験哺乳動物から回収された生物学的試料において、非遺伝毒性効果を示さない哺乳動物と比較して決定され、ここで発現レベルの増大は、当該化合物が、遺伝毒性に感受性の病理学的状態について治療効果を有する見込みが高いことを示す。治療効果に、定性的レベルを組み込む。「治療効果」は、ある程度まで、疾患の 1 または 2 以上の症状を軽減するか、あるいは、疾患または病理学的状態に関連しているかまたはこれの原因である 1 または 2 以上の生理学的または生化学的なパラメーターを、部分的にまたは完全に、正常まで回復させる。さらに、表現「治療有効量」とは、この量を投与されていない対応する対象と比較して、以下の結果を有する量を表わす：疾患、症候群、状態、愁訴、障害または副作用の処置の改善、治癒、予防または除去、あるいはまた、疾患、愁訴または障害の進行の低減。表現「治療有効量」はまた、正常な生理学的機能を増大させるために有効である量を包含する。幾つかの化合物の試験は、哺乳動物対象の処置のために最も適している化合物の選択を可能にする。選択された化合物のin-vivoでの投与速度は、有利に、特定の細胞に対して、それらのin-vitroでのデータに関して、予め調整される。したがって、治療効力は著しく増強される。

30

40

【0066】

本発明の別の側面において、例えば一連の化合物中で、(前駆型) 遺伝毒性が最も低い化合物または非(前駆型) 遺伝毒性である化合物が同定され、ここで、発現レベルの増大が最少であることまたは発現レベルが増大しないことが、前記化合物がその意図される用途のために好適であることを示す。使用は、治療的または非治療的であってよく、任意の特定の目的に限定されないが、当該分野において公知であるような意図される使用に準拠する(例えば、マニュアル、文書など)。本発明の好ましい側面において、治療用化合物を患者に投与するための方法が提供され、該方法は、本発明のスクリーニング方法を一連の化合物により実施すること、遺伝毒性および前駆型遺伝毒性活性を有さない化合物を同

50

定すること、ならびに前記化合物を、該化合物の意図される使用の必要がある患者に投与することを含む。方法は、意図される使用の経過における逆の（前駆型）遺伝毒性効果の除去以外の、任意の使用および/または前記使用のための最も活性な化合物の同定を目的としないことが理解されるべきである。

【0067】

本発明はまた、化合物による処置への応答において、増殖、分化および/または損傷の修復の調節解除により引き起こされるか、媒介されるか、および/または伝播される、癌、腫瘍、転移および/または血管新生の障害を発症する見込みをモニタリングするための方法に関し、ここで、p-p53 (Ser15)、p21、p-H2A.X (Ser139)、p-ATM (Ser1981)、p-Chk1 (Ser345)、p-ATR (Ser428)、p-cdc2 (Thr14/Tyr15)、Gadd45aおよびp-Chk2 (Thr68)の群から選択される少なくとも2つのタンパク質の発現レベルが、前記化合物によるかかる処置を必要とし、それを投与された哺乳動物から回収された生物学的試料において決定され、ここで、前記タンパク質のうちの少なくとも1つの発現レベルの増大が、前記化合物が遺伝毒性および/または前駆型遺伝毒性活性を有すること、および前記見込みが増大することを示す。化合物は、好ましくは、上記のような本発明のスクリーニング方法により得られる。したがって、スクリーニング方法に関する本明細書の先の教示は、妥当であり、目的にかなう場合は、モニタリングの方法に限定されることなく適用可能である。

10

【0068】

上記の複数の遺伝子の同定は、状態、条件または処置の進行を評価するための強力なツールを提供する。特に、ベースラインの結果を提供するために、手術、治療レジメンの開始または治療レジメンの完了などの出来事の前に、患者において複数の遺伝子を同定することができる。ベースラインを、次いで、かかる出来事の間またはその後のいずれかにおいて同一の方法を用いて得られた結果と比較することができる。この方法を、診断および予後予測の両方の目的のために用いることができる。

20

【0069】

本発明のモニタリングの方法は、ヒトおよび獣医の医学において使用することができる。哺乳動物は、好ましくは、実験動物および/または非ヒト生物である。本明細書において、化合物は、疾患の発症の前またはその後で投与することができ、1回または数回治療として作用する。用語「有効量」または「有効用量」または「用量」は、本明細書において置き換え可能として用いられ、疾患または病理学的状態に対して予防的または治療的に適切な効果を有する、すなわち、組織、系、動物またはヒトにおいて、例えば研究者または医師により、求められるかまたは所望される生物学的または医学的応答を引き起こす、医薬化合物の量を表わす。

30

【0070】

本発明の使用の前述の医薬品は、特に、治療的処置において用いられる。モニタリングは、処置の一種であるとみなされ、ここで、化合物は、好ましくは、応答をブーストして遺伝毒性に媒介される疾患の病原および/または症状を完全に根絶するために、明確な間隔において投与される。同一の化合物または異なる化合物のいずれが適用されてもよい。医薬はまた、遺伝毒性の影響に起因して増殖、分化および/または損傷の修復に関連する疾患が発症する見込みを低減するか、またはそれらの疾患の開始を前もって予防するために、あるいは発生中または持続中の症状を処置するために、用いることができる。本発明の意味において、予防的処置は、対象が、前述の生理学的または病理学的状態についての何らかの前状態（家族性素質、遺伝的欠損または先に経過した疾患など）を有する場合に得策である。本発明により関連する疾患は、好ましくは癌、腫瘍、転移および/または血管新生の障害である。

40

【0071】

本発明による前記化合物は、最終的な非塩形態において用いてもよい。一方、本発明はまた、これらの化合物のその薬学的に受容可能な塩の形態の使用を包含し、これは、多様な有機および無機の酸および塩基から、当該分野において公知の手順により誘導すること

50

ができる。表現「薬学的に受容可能な塩」および「生理学的に受容可能な塩」は、本明細書において交換可能に用いられ、本発明に関して、本発明による化合物をその塩のうちの一つの形態において含む活性成分を意味する（この塩形態が、活性成分に、当該活性成分の遊離の形態または先に使用された当該活性成分の任意の他の塩形態と比較して改善された薬物動態学的特性を付与する場合は特に）ものと理解される。活性成分の薬学的に受容可能な塩形態はまた、この活性成分を、それが先には有していなかった所望される薬物動態学的特性を備えたものとして初めて提供することができ、この活性成分の薬力学に対して、体内におけるその治療能力に関して前向きな影響すら有することができる。

【0072】

さらに、本発明は、薬物による治療的処置に対する応答において、患者が腫瘍を罹患する見込みを予測するための、in-vitroでの方法に関し、該方法は、以下のステップを含む：

(i) 前記患者の組織または血漿からの生検試料において、p-p53 (Ser15)、p21、p-H2A.X (Ser139)、p-ATM (Ser1981)、p-Chk1 (Ser345)、p-ATR (Ser428)、p-cdc2 (Thr14 / Tyr15)、Gadd45aおよびp-Chk2 (Thr68) の群から選択される少なくとも2つのタンパク質の発現レベルを測定すること、

(ii) 前記患者の組織または血漿からの組織試料を、前記薬物にex vivoで暴露すること、ならびに

(iii) ステップ(ii)の前記の暴露された試料において、ステップ(i)において特定された前記タンパク質の発現レベルを測定し、それと共にステップ(i)および(ii)において測定される発現レベルの差異を計算すること、ここで、このステップ(iii)において得られた前記タンパク質のうちの少なくとも1つの発現レベルの、ステップ(i)と比較した増大は、前記薬物が遺伝毒性および/または前駆型遺伝毒性活性を有すること、および前記見込みが増大されることを示す。

【0073】

本発明の目的はまた、p-p53 (Ser15)、p21、p-H2A.X (Ser139)、p-ATM (Ser1981)、p-Chk1 (Ser345)、p-ATR (Ser428)、p-cdc2 (Thr14 / Tyr15)、Gadd45aおよびp-Chk2 (Thr68) の群から選択される少なくとも2つのタンパク質の、遺伝毒性および/または前駆型遺伝毒性活性を有する化合物をスクリーニングするためのマーカータンパク質としての使用である。スクリーニング方法に関する本明細書の先の教示は、妥当であり、目的にかなう場合は、前記の使用に限定されることなく適用可能である。

【0074】

少なくとも1つのマーカータンパク質と特異的に相互作用する物質を、遺伝毒性または前駆型遺伝毒性活性を検出するために使用することは、本発明のなお別の目的である。各々が、p-p53 (Ser15)、p21、p-H2A.X (Ser139)、p-ATM (Ser1981)、p-Chk1 (Ser345)、p-ATR (Ser428)、p-cdc2 (Thr14 / Tyr15)、Gadd45aおよびp-Chk2 (Thr68) の群から選択される異なるタンパク質に対する特異的結合を有する少なくとも2つの抗体を、遺伝毒性および/または前駆型遺伝毒性活性を検出するため用いることは、本発明の好ましい側面である。抗体は、好ましくは、同位元素、例えば発色団、発光団または色素原で直接的に標識されるか、後でストレプトアビジン複合体が結合し得るビオチンで、間接的に標識される。抗体の存在下または不在下においてアッセイすることにより、目的のマーカータンパク質の存在または不在を検出することができる。スクリーニング方法に関する本明細書の先の教示は、妥当であるとみなされ、目的にかなう場合は、前記の抗マーカー抗体の前記の使用に限定されることなく適用可能である。

【0075】

本発明はまた、遺伝毒性および/または前駆型遺伝毒性活性の検出における使用のためのキットとして実施してもよく、該キットは、各々が、p-p53 (Ser15)、p21、p-H2A.X (Ser139)、p-ATM (Ser1981)、p-Chk1 (Ser345)、p-ATR (Ser428)、p-cdc2 (Thr14 / Tyr15)、Gadd45aおよびp-Chk2 (Thr68) の群から選択される異なるタンパク質に対して特異的結合を有する、少なくとも2つの抗体を含む。キットは特に、本発明の方法を、遺伝

10

20

30

40

50

毒性および/または前駆型遺伝毒性活性を有する化合物をスクリーニングするために実施するために、設計される。本発明のキットは、本発明の方法を実施する方法についての、文書による説明書を含むか、ユーザーを文書による説明書に導く物品を含んでもよい。スクリーニング方法に関する本明細書の先の教示は、妥当であるとみなされ、目的にかなう場合は、キットに限定されることなく適用可能である。

【0076】

本発明の範囲において、9つまでのタンパク質の固有のタンパク質発現パターンを適用する、遺伝毒性活性を有する化合物をスクリーニングするための方法が、初めて提供される。本発明は、遺伝毒性と関連するマーカータンパク質の特徴的な発現フィンガープリントを教示する。データは、in-vitroでの構造的プロファイリングが、単一エンドポイントの検出と比較して強力な遺伝毒性を予測するためのツールであることを支持する。構造的プロファイリングは、かかるデータの解釈の間に有益であり、構造的な研究は、遺伝毒性化合物の分類を容易にする強力なツールである。さらに、構造的データは、遺伝毒性化合物についての化学的特徴づけおよびリスク評価を改善するであろう。医薬の開発の間の初期スクリーニングにタンパク質プロファイリングを適用することは、開発の初期において異なる分子をランク付けして遺伝毒性の特徴を有する化合物を強調し、in-vivoにおけるフォローアップ試験を回避することにより経費を節減し、動物を救うために役立つ。

【0077】

見出された9つの推定のマーカータンパク質は、未知の化合物をスクリーニングするために用いることができ、これは、それらの遺伝毒性および/または前駆型遺伝毒性潜在能力の特徴の特異的かつ高感度な同定および特徴づけを、薬物開発の初期において効果的に可能にする。9つまでの推定のマーカータンパク質機能的に発現することができる細胞システムの遺伝毒性ストレスは、この細胞システムの対象と比較して、これらのマーカータンパク質の発現および活性化の増大をもたらす。組み合わせにおける前述のタンパク質は相乗効果を有し、したがって高性能により遺伝毒性物質を検出することを可能にする。差次的に発現されたタンパク質の分析は、ハイスループット試験システムのために特に好適である。High Content Imaging (HCI) ベースのタンパク質発現分析を、未知の作用の様式を有する遺伝子毒に対して有利に適用して、薬物発見のプロセスの初期においてそれらが遺伝毒性効果を発揮する潜在能力を予測することができる。それに加えて、HCIを用いる細胞ベースのモデルは、低分子のニーズによりデータを迅速に作製する利点を有する。本発明の検出方法ならびに生じるモニタリングの方法は、簡便で、費用効率が高く、信頼し得る様式において行うことができる。(前駆型)遺伝毒性活性を有する化合物は、少なくとも75%、より好ましくは少なくとも80%、最も好ましくは少なくとも90%の感度および/または特異度によりスクリーニングされる。本明細書において、「感度」とは、全ての陽性に試験される化合物に対して相対的な、陽性であると正確に試験される化合物の数を表わし、「特異度」とは、全ての陰性化合物に対して相対的な、陰性であると試験される化合物の数を表わす。この特異的マーカーセットを、微小核アッセイのような他の遺伝毒性エンドポイントと組み合わせ、広範な潜在的に遺伝毒性である化合物についての高度に予測的なスクリーニングシステムを作製することができる。

本明細書における全ての引用は、本発明の開示においてその全体において参考として援用される。

【0078】

本発明は、本明細書において記載される特定の方法、特異的物質、使用およびアレイに限定されないことが理解されるべきである。なぜならば、かかる事項は変化し得るからである。また、本明細書において用いられる用語は、単に特定の態様を記載する目的のためのものであり、本発明野範囲を限定することを意図するものではなく、それは添付される請求の範囲によってのみ定義されることも、理解されるべきである。添付される請求の範囲を含む本明細書において用いられる場合、「a」、「an」および「the」などの単語の単数形は、文脈が明確に他を指示しない限りにおいて、それらの対応する複数の参照対象を含む。したがって、例えば、「a compound」への言及は、単一または幾つかの異なる化合

10

20

30

40

50

物を含み、「a method」への言及は、当業者に公知の等価なステップおよび方法への言及を含む、などとなる。他に定義されない限りにおいて、本明細書において用いられる全ての技術用語および化学用語は、本発明が属する分野における当業者により一般的に理解されるものと同じ意味を有する。

【0079】

本発明によって本質的である技術は、明細書において詳細に記載される。詳細には記載されない他の技術は、当業者に周知である標準的な方法に対応するか、または当該技術は、引用される参考文献、特許出願もしくは標準的な文献においてより詳細に記載される。本明細書において記載されるものに類似するかまたはそれと等しい方法および材料を、本発明の実施または試験において用いてもよく、好適な例を以下に記載する。以下の例は、説明を目的とするものであり、限定のためのものではない。例の中において、（実際的である場合は常に）汚染性の活性からフリーである、標準的な試薬およびバッファーが用いられる。例は、特に、それらは明示的に示された特徴の組み合わせに限定されるものではなく、例示された特徴は、本発明の技術的な問題が解決される場合には、非制限的に再び組み合わせられてもよいものと、解釈されるべきである。

10

【0080】

表1は、分析された5つのタンパク質および4つの補足マーカート、それらの転写後修飾、（代替的な）タンパク質の名称、（代替的な）遺伝子の名称およびアクセッション番号（これらは各々のタンパク質について特有である）を列記する。

20

【0081】

表2は、9つのタンパク質マーカー（p-p53（Ser15）、p21、p-H2A.X（Ser139）、p-ATM（Ser1981）、p-Chk1（Ser345）、p-ATR（Ser428）、p-cdc2（Thr14 / Tyr15）、Gadd45aおよびp-Chk2（Thr68））についての、（前駆型）遺伝毒性物質（シクロホスファミド、7, 12 - ジメチルベンズアントラセン、アフラトキシンB₁、2 - アセチルアミノフルオレン、アクチノマイシンD、メチルメタンスルホン酸、エトポシド）ならびに非遺伝毒性物質（D - マンニトール、フェンホルミンHCl、プロゲステロン）で試験された結果を列記する。陽性 / 陰性の結果を、それぞれ赤 / 緑の色により示す。

【0082】

表3は、in-vitro遺伝毒性試験の実施を審査するためにEuropean Center for the Validation of Alternative Methods (ECVAM) により推奨される、群1の化学物質（「in-vitroでの哺乳動物細胞遺伝毒性試験において陽性として検出されるべきである、in-vivo遺伝毒性物質」）（Kirkland et al., 2008, Mutat. Res. 653, 99-108）を列記する。

30

【0083】

表4は、in-vitro遺伝毒性試験の実施を審査するためにEuropean Center for the Validation of Alternative Methods (ECVAM) により推奨される、群2の化学物質（「in-vitroでの哺乳動物細胞遺伝毒性試験において陰性の結果を生じるべきである、非遺伝毒性発癌物質を含む非DNA反応性化学物質」）（Kirkland et al., 2008, Mutat. Res. 653, 99-108）を列記する。

【0084】

表5は、in-vitro遺伝毒性試験の実施を審査するためにEuropean Center for the Validation of Alternative Methods (ECVAM) により推奨される、群3の化学物質（「in-vitroでの哺乳動物細胞遺伝毒性試験において陰性の結果を生じるべきであるが、しばしば高濃度において、または高レベルの細胞傷害性において、マウスリンパ腫細胞において染色体異常またはtk変異を誘導することが報告されている化学物質」）（Kirkland et al., 2008, Mutat. Res. 653, 99-108）を列記する。

40

【0085】

表6は、ECVAMにより推奨される、群1の化学物質（「in-vitroでの哺乳動物細胞遺伝毒性試験において陽性として検出されるべきである、in-vivo遺伝毒性物質」）、および自己蛍光（AF）により限定されるそれらの試験された最高濃度、先の実験に基づく細胞傷害性（Cyto）および沈澱（Prec）、ならびに、2つの細胞傷害性パラメーター：有効視野

50

あたりの選択細胞カウント (SCC) およびCMFDA細胞質平均強度 (CMFDA) についての < 50 % の最高濃度を列記する。

【 0 0 8 6 】

表 7 は、ECVAMにより推奨される、群 2 の化学物質 (「in-vitroでの哺乳動物細胞遺伝毒性試験において陰性の結果を生じるべきである、非遺伝毒性発癌物質を含む非DNA反応性化学物質」)、および自己蛍光 (AF) により限定されるそれらの試験された最高濃度、先の実験に基づく細胞傷害性 (Cyto) および沈澱 (Prec)、ならびに、2つの細胞傷害性パラメーター：有効視野あたりの選択細胞カウント (SCC) およびCMFDA細胞質平均強度 (CMFDA) についての < 50 % の最高濃度を列記する。

【 0 0 8 7 】

表 8 は、ECVAMにより推奨される群 3 の化学物質 (「in-vitroでの哺乳動物細胞遺伝毒性試験において陰性の結果を生じるべきであるが、しばしば高濃度において、または高レベルの細胞傷害性において、マウスリンパ腫細胞において染色体異常または tk 変異を誘導することが報告されている化学物質」) および自己蛍光 (AF) により限定されるそれらの試験された最高濃度、先の実験に基づく細胞傷害性 (Cyto) および沈澱 (Prec)、ならびに、2つの細胞傷害性パラメーター：有効視野あたりの選択細胞カウント (SCC) およびCMFDA細胞質平均強度 (CMFDA) についての < 50 % の最高濃度を列記する。

【 0 0 8 8 】

表 9 は、5つのタンパク質マーカー (p-p53 (Ser15)、p21、p-H2A.X (Ser139)、p-ATM (Ser1981)、p-Chk1 (Ser345)) についての、ECVAMにより推奨される群 1 の化学物質 (「in-vitroでの哺乳動物細胞遺伝毒性試験において陽性として検出されるべきである、in-vivo遺伝毒性物質」) により試験された結果を列記する。陽性/陰性の結果を、それぞれ赤/緑の色により示す。

【 0 0 8 9 】

表 10 は、5つのタンパク質マーカー (p-p53 (Ser15)、p21、p-H2A.X (Ser139)、p-ATM (Ser1981)、p-Chk1 (Ser345)) についての、ECVAMにより推奨される群 2 の化学物質 (「in-vitroでの哺乳動物細胞遺伝毒性試験において陰性の結果を生じるべき非遺伝毒性発癌物質を含む、非DNA反応性化学物質」) により試験された結果を列記する。陽性/陰性の結果を、それぞれ赤/緑の色により示す。

【 0 0 9 0 】

表 11 は、5つのタンパク質マーカー (p-p53 (Ser15)、p21、p-H2A.X (Ser139)、p-ATM (Ser1981)、p-Chk1 (Ser345)) についての、ECVAMにより推奨される群 3 の化学物質 (「in-vitroでの哺乳動物細胞遺伝毒性試験において陰性の結果を生じるべきであるが、しばしば高濃度において、または高レベルの細胞傷害性においてマウスリンパ腫細胞において、染色体異常または tk 変異を誘導することが報告されている化学物質」) により試験された結果を列記する。陽性/陰性の結果を、それぞれ赤/緑の色により示す。

【 0 0 9 1 】

表 12 は、MILLIPLEX MAP 磁性ビーズキットおよびLuminexシステムを用いる、細胞ライセート中のリン酸化されたp53 (Ser15) およびp21の合計タンパク質レベルの変化の結果を列記する。

【 0 0 9 2 】

例

・化学物質および細胞培養培地の補充

試験された化合物のセットは、in-vitro遺伝毒性試験の実施を審査するためにEuropean Center for the Validation of Alternative Methods (ECVAM) により推奨される：既に試験されている3群の化合物の2つを列記する (表 3、4 および 5) (Kirkland et al., 2008, Mutat. Res. 653, 99-108)。試験された全ての化合物は、97%の最低純度において得た。化合物の殆どはSigma-Aldrich (Taufkirchen, Germany) からオーダーしたが、但し以下を除く：シクロホスファミドはCalbiochem (Darmstadt, Germany) から；2 - アセチルアミノフルオレンおよびタキソールはAcros Organics (Geel, Belgium) から、

10

20

30

40

50

ジメチルニトロソアミンおよびフルオメツロンはDr. Ehrenstorfer GmbH (Augsburg, Germany) から、2 - アミノ - 3 メチルイミダゾ [4 , 5 - f] キノロンおよび 2 - アミノ - 1 - メチル - 6 - フェニルイミダゾ [4 , 5 - f] ピリジンはApollo Scientific Ltd. (Bredbury, UK) から、N , N - ジクロロヘキシルチオウレアおよびアミトロールはTCI Europe (Zwijndrecht, Belgium) から、ならびに硫酸エフィドリンはLGC (Teddington, UK) から。DMEM/F12、ゲンタマイシンおよびピルビン酸ナトリウムは、Invitrogen Corp. (Karlsruhe, Germany) から購入した。ウシ胎児血清 (FBS) は、HyClone (オーダー番号SV30160.03、ロット番号RSJ30856、HyClone UK Ltd., Cramlington, UK) から得た。 - ナフトフラボン / フェノバルピタールにより誘導されるラット肝臓S9 (オーダー番号R1081. S9、ロット番号0710507) は、Tebu-bio (Offenbach, Germany) からオーダーした。トリプシン、還元型 - ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド 2' - リン酸四ナトリウム塩水和物 (NADPH) およびペニシリン / ストレプトマイシン溶液は、Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Germany) から得た。塩化マグネシウム、塩化カリウム、リン酸ナトリウム一塩基性一水和物およびリン酸ナトリウム二塩基性七水和物は、Merck KGaA (Darmstadt, Germany) から購入した。

10

【 0 0 9 3 】

・細胞培養

HepG2細胞 (オーダー番号HB-8065、ロット58483209、ATCC, Manassas, USA) を、DMEM/F12中で、L - グルタミン、ならびに 10 % (v / v) FBS、1 % (v / v) ペニシリン (10 k U / m l) / ストレプトマイシン (10 m g / m l) 溶液、0 . 1 % (v / v) ゲンタマイシン (50 m g / m l)、および 1 m M のピルビン酸ナトリウムを補充した 15 m M のHepesと共に、37 °C および 5 % C O ₂ において、培養フラスコ中で培養した。実験に依存して、トリプシンを用いる細胞の剥離の後で、適切な数の細胞をプレート上に播種し、細胞を、37 °C および 5 % C O ₂ において、処置の前に 24 時間培養した。全ての実験を、4 ~ 20 回継代した細胞を用いて、3 回行った。

20

【 0 0 9 4 】

9 つの推定のマーカータンパク質の試験

・細胞の処置および用量の選択

細胞を、黒色のポリ - D - リジンコートされた 96 ウェルプレート (BD Biocoat, Franklin Lakes, USA) 上に播種し (0 . 02 × 10⁶ 細胞 / ウェル)、接着のために 24 時間静置し、次いで、試験化合物で処置した。各化合物について、2 倍連続希釈による 7 つの濃度を試験した。DMSO (1 % (v / v)) を、実験のためのビヒクル対照として利用した。処置の手順は、直接的遺伝毒性化合物と前駆型遺伝毒性化合物とで、異なった。直接的遺伝毒性化合物のための処置を続けたまま、48 時間にわたって、1 日 1 回繰り返した。前駆型遺伝毒性化合物は、代謝活性化システムと一緒に 6 時間インキュベートした (S9 混合物の細胞傷害性効果を限定するために)。この期間の後で、細胞を細胞培地で洗浄し、48 時間にわたり、1 日 18 回繰り返した。用いられた代謝活性化システムは、以下の成分および濃度からなった：プレ混合物中で、8 m M の M g C l ₂、32 . 8 m M の K C l、12 m M の NADPH、124 m M のリン酸バッファーおよび 2500 p m o l / m l のチトクロム P450 (CYP) の含有物は、細胞培養培地での 1 : 3 . 33 希釈の後での最終濃度として、2 . 4 m M の M g C l ₂、9 . 8 m M の K C l、3 . 6 m M の NADPH、37 . 2 m M のリン酸バッファー、および 750 p m o l / m l の CYP に対応した。

30

40

【 0 0 9 5 】

・免疫蛍光染色

- 染色細胞傷害性パラメーターについてのプロトコル :

処置の後で、細胞を PBS (Gibco Invitrogen, Karlsruhe, Germany) でリンスし、次いで細胞培養培地中 10 μ M の CellTracker Green 5 - クロロメチルフルオレセイン二酢酸 (CMFDA) (Invitrogen, Karlsruhe, Germany) で染色した。CMFDA は、それ自体は非蛍光であり、生細胞中のエステラーゼにより蛍光色素へと加水分解される。チオール基との反応は、細胞に非透過性の蛍光色素付加物をもたらす。エステラーゼ活性は、細胞の生存率

50

の指標として用いることができる (Papadopoulos et al., 1994, J Immunol Methods 177, 101-111)。37 における30分間のインキュベーション期間の後で、細胞をPBSで洗浄し、次いでPBS中3.7%のホルムアルデヒド (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany) で20分間固定した。その後、0.05%のTween 20による2回のさらなる洗浄ステップが続き、次いで細胞をPBSで洗浄し、最終的にPBSを添加し、細胞を測定した。

【0096】

- 推定のマーカータンパク質のための染色プロトコル:

処置の後で、細胞をPBS (Gibco Invitrogen, Karlsruhe, Germany) でリンスし、次いでPBS中3.7%のホルムアルデヒド (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany) で20分間固定した。PBSで2回洗浄した後、細胞を、PBS中7.5%のヤギ血清 (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany) および0.3%のTriton X-100 (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany) で30分間ブロッキングおよび透過処理した。ブロッキング/透過処理溶液中で以下の最終濃度まで別々に希釈した各一次抗体を、その後添加した: 10 μ g/mlの抗Gadd45 ウサギモノクローナル抗体IgG (Cell Signaling, Danvers, USA)、10 μ g/mlの抗p21ウサギモノクローナル抗体IgG (Cell Signaling, Danvers, USA); 5 μ g/mlの抗p-ATM (Ser1981) ウサギモノクローナル抗体IgG (Cell Signaling, Danvers, USA); 10 μ g/mlの抗p-ATR (Ser428) ウサギモノクローナル抗体IgG (Cell Signaling, Danvers, USA); 4 μ g/mlの抗p-cdc2 (Tyr15/Thr14) ウサギポリクローナル抗体IgG (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, USA); 20 μ g/mlの抗p-Chk1 (Ser345) ウサギモノクローナル抗体IgG (Cell Signaling, Danvers, USA); 20 μ g/mlの抗p-Chk2 (Thr68) ウサギモノクローナル抗体IgG (Cell Signaling, Danvers, USA); 2.5 μ g/mlの抗p-ヒストンH2A.X (Ser139) ウサギモノクローナル抗体IgG1 (Cell Signaling, Danvers, USA) または2 μ g/mlの抗p-p53 (Ser15) ウサギモノクローナル抗体IgG (Invitrogen, Karlsruhe, Germany)。16~18時間にわたるインキュベーションの後で、細胞をPBS中0.05%のTween 20 (Calbiochem, Darmstadt, Germany) で2回洗浄し、ブロッキング/透過処理溶液中の二次抗体/16 μ MのHoechst染色溶液を添加した。二次抗体 (Alexa Fluor 488ヤギ抗ウサギIgG、Invitrogen, Karlsruhe, Germany) を、最終濃度2 μ g/mlまで希釈した。1時間のインキュベーションと、その後の0.05%のTween 20による2回のさらなる洗浄ステップの後で、細胞をPBSで洗浄し、最終的にPBSを添加し、細胞を測定した。

【0097】

・細胞傷害性パラメーターについての画像取得および分析:

画像取得は、ArrayScan VTI HCSリーダー (Cellomics, Pittsburgh, USA) において、10xの対物レンズを用いて、行った。十分な細胞を検出するために、各ウェルの中心から始めて20枚の画像を集めた。

【0098】

各色素のための励起/発光波長に従って、フィルターを選択した:

- 細胞傷害性パラメーターについてのプロトコル:

チャンネル1: 365 \pm 25 および 515 \pm 10 nm (XF93 - Hoechst)、Hoescht 33342に対して

チャンネル2: 475 \pm 20 および 515 \pm 10 nm (XF93 - FITC)、CMFDAに対して

【0099】

・画像取得および推定のマーカータンパク質についての分析:

画像取得は、ArrayScan VTI HCSリーダー (Cellomics, Pittsburgh, USA) において、20xの対物レンズを用いて行った。十分な細胞を検出するために、各ウェルの中心から始めて20枚の画像を集めた。

【0100】

各色素のための励起/発光波長に従って、フィルターを選択した:

- 推定のマーカータンパク質のためのプロトコル:

チャンネル1: 365 \pm 25 および 515 \pm 10 nm (XF93 - Hoechst)、Hoescht 33342に

対して

チャンネル 2 : 475 ± 20 および 515 ± 10 nm (XF93 - FITC)、Alexa Fluor 488 ヤギ抗ウサギに対して

【0101】

画像の分析は、ソフトウェア iDev および Bioapplication バージョン 4 により行った (Cellomics, Pittsburgh, USA)。染色された核を、核および細胞質の局在のために用いた (核の周囲の輪)。

以下の読み出しパラメーターを作製した：

- 細胞傷害性パラメーターのためのプロトコル：

チャンネル 1 : 有効視野あたりの選択細胞カウント

チャンネル 2 : CMFDA 細胞質平均強度

- 推定のマーカータンパク質のためのプロトコル：

チャンネル 2 : タンパク質核平均強度

【0102】

・データ分析および解釈

処置された試料のビヒクル対照に対する調節の倍率を、各化合物および濃度について計算した。統計学的有意 (p 値 < 0.05) は、スチューデント t 検定を用いて決定した。各パラメーターについての閾値を、対照値と比較して、対照値に標準偏差の 3 倍を加算したものに基いて選択した。 p -p53 (Ser15)、 p -H2A.X (Ser139) および p -ATM (Ser1981) について、閾値を 1.5 に、 p 21、 p -Chk1 (Ser345)、 p -ATR (Ser428)、 p -cdc2 (Tyr15/Thr14) および Gadd45 については 1.6 に、 p -Chk2 (Thr68) については 1.9 に設定した。沈澱または自己蛍光による濃度、ならびに 2 つの細胞傷害性パラメーター (有効視野あたりの選択細胞カウントおよび CMFDA の細胞質における強度) のうちの少なくとも 1 つにおいて 50% の細胞傷害性効果を示した濃度を除外した。

【0103】

5 つのマーカータンパク質の試験

・細胞の処置および用量の選択

細胞を、黒色のポリ-D-リジンコートされた 96 ウェルプレート (BD Biocoat, Franklin Lakes, USA) 上に播種し (0.02×10^6 細胞/ウェル)、接着のために 24 時間静置し、次いで、試験化合物で、ICH S2 (R1) ガイドライン (EMA, 2011) により推奨される 1 mM の最大濃度において、処置した。各化合物について、2 倍連続希釈による 9 つの濃度を試験した。DMSO (1% (v/v)) を、実験のためのビヒクル対照として利用した。処置の手順は、直接的遺伝毒性化合物と前駆型遺伝毒性化合物とで、異なった。直接的遺伝毒性化合物のための処置を続けたまま、48 時間にわたって、1 日 1 回繰り返した。前駆型遺伝毒性化合物は、代謝活性化システムと一緒に 6 時間インキュベートした (S9 混合物の細胞傷害性効果を限定するために)。この期間の後で、細胞を細胞培地で洗浄し、48 時間にわたって、1 日 18 回繰り返した。用いられた代謝活性化システムは、以下の成分および濃度からなった：プレ混合物中で、8 mM の $MgCl_2$ 、32.8 mM の KCl、12 mM の NADPH、124 mM のリン酸バッファーおよび 2500 pmol/ml のチトクロム P450 (CYP) の含有物は、細胞培養培地での 1:3.33 希釈の後での最終濃度として、2.4 mM の $MgCl_2$ 、9.8 mM の KCl、3.6 mM の NADPH、37.2 mM のリン酸バッファー、および 750 pmol/ml の CYP に対応した。

【0104】

・免疫蛍光染色

各化合物について、代謝活性化システムを用いて、およびこれを用いずに、2 つの異なる染色手順を行った：

- 染色プロトコル 1：

処置の後で、細胞を PBS (Gibco Invitrogen, Karlsruhe, Germany) でリンスし、次いで PBS 中 3.7% のホルムアルデヒド (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany) で 20 分間固定した。PBS によるさらなる洗浄ステップの後で、細胞を PBS 中 2% のロバ血清 (Mill

10

20

30

40

50

ipore, Schwalbach, Germany) および 0.25% の Triton X-100 (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany) で 30 分間ブロッキングおよび透過処理した。ブロッキング / 透過処理溶液中で以下の最終濃度まで希釈した一次抗体を、その後添加した: 2 $\mu\text{g} / \text{ml}$ の抗 p-p53 (Ser15) ウサギモノクローナル抗体 IgG (Invitrogen, Karlsruhe, Germany)、0.8 $\mu\text{g} / \text{ml}$ の抗 p21 ヤギポリクローナル抗体 IgG (R&D systems, Minneapolis, USA); 4 $\mu\text{g} / \text{ml}$ の抗 p-ヒストン H2A.X (Ser139) マウスモノクローナル抗体 IgG1 (Millipore, Schwalbach, Germany)。16 ~ 18 時間にわたるインキュベーションの後で、細胞を PBS 中 0.05% の Tween 20 (Calbiochem, Darmstadt, Germany) で洗浄し、ブロッキング / 透過処理溶液中の二次抗体 / 16 μM の Hoechst 染色溶液を添加した。二次抗体を 1:400 希釈した (Alexa Fluor 488 α 抗ウサギ、Alexa Fluor 555 α 抗ヤギ、Alexa Fluor 647 α 抗マウス、Invitrogen, Karlsruhe, Germany)。1 時間のインキュベーションと、その後の 0.05% の Tween 20 による 2 回のさらなる洗浄ステップの後で、細胞を PBS で洗浄し、最終的に PBS を添加し、細胞を測定した。

10

【0105】

- 染色プロトコル 2 :

処置の後で、細胞を PBS (Gibco Invitrogen, Karlsruhe, Germany) でリンスし、次いで、細胞培養培地中 10 μM の CellTracker Green 5 - クロロメチルフルオレセイン二酢酸 (CMFDA) (Invitrogen, Karlsruhe, Germany) で 30 分間染色した。CMFDA は、それ自体は非蛍光であり、生細胞中のエステラーゼにより蛍光色素へと加水分解される。チオール基との反応は、細胞に非透過性の蛍光色素付加物をもたらす。エステラーゼ活性は、細胞の生存率についての指標として用いることができる (Papadopoulos et al., 1994, J Immunol Methods 177, 101-11)。その後、細胞を PBS で洗浄し、PBS 中 3.7% のホルムアルデヒド (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany) で 20 分間固定した。その後、細胞を PBS で洗浄し、PBS 中 2% の α 血清 (Millipore, Schwalbach, Germany) および 0.25% の Triton X-100 (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany) で 30 分間、ブロッキングして透過処理した。一次抗体を、ブロッキング / 透過処理溶液中で以下の最終濃度まで希釈し、細胞に添加した: 4 $\mu\text{g} / \text{ml}$ の抗 p-Chk1 (Ser345) ヤギポリクローナル抗体 IgG (Santa Cruz, Santa Cruz, USA)、4 $\mu\text{g} / \text{ml}$ の抗 p-ATM (Ser1981) マウスモノクローナル抗体 IgG1_k (Millipore, Schwalbach, Germany)。16 ~ 18 時間にわたるインキュベーションの後で、細胞を PBS 中 0.05% の Tween 20 (Calbiochem, Darmstadt, Germany) で洗浄し、ブロッキング / 透過処理溶液中の二次抗体 / 16 μM の Hoechst 染色溶液を添加した。二次抗体を 1:400 希釈した (Alexa Fluor 555 α 抗ヤギ、Alexa Fluor 647 α 抗マウス、Invitrogen, Karlsruhe, Germany)。1 時間のインキュベーションと、その後の 0.05% の Tween 20 による 2 回のさらなる洗浄ステップの後で、細胞を PBS で洗浄し、最終的に PBS を添加し、細胞を測定した。

20

30

【0106】

・画像取得および分析

画像取得は、ArrayScan VTI HCS リーダー (Cellomics, Pittsburgh, USA) において、20 \times の対物レンズを用いて行った。十分な細胞を検出するために、50 images 各ウェルの中心から始めてを集めた。

40

【0107】

各色素のための励起 / 発光波長に従って、フィルターを選択した:

- プロトコル 1 :

チャンネル 1 : 365 \pm 25 および 515 \pm 10 nm (XF93 - Hoechst)、Hoescht 33342 に対して

チャンネル 2 : 475 \pm 20 および 515 \pm 10 nm (XF93 - FITC)、Alexa Fluor 488 α 抗ウサギに対して

チャンネル 3 : 549 \pm 4 および 600 \pm 12.5 nm (XF93 - TRITC)、Alexa Fluor 555 α 抗ヤギに対して

チャンネル 4 : 655 \pm 15 および 730 \pm 25 nm (XF110-Cy5 (高感度))、Alexa Flu

50

or 647ロバ抗マウスに対して

- プロトコル 2 :

チャンネル 1 : 365 ± 25 および 515 ± 10 nm (XF93 - Hoechst)、Hoescht 33342に
対して

チャンネル 2 : 475 ± 20 および 515 ± 10 nm (XF93 - FITC)、CMFDAに対して

チャンネル 3 : 549 ± 4 および 600 ± 12.5 nm (XF93 - TRITC)、Alexa Fluor 555
ロバ抗ヤギに対して

チャンネル 4 : 655 ± 15 および 730 ± 25 nm (XF110-Cy5 (高感度))、Alexa Flu
or 647ロバ抗マウスに対して。

【0108】

画像の分析は、ソフトウェアiDevおよびBioapplicationバージョン4により行った (Ce
llomics, Pittsburgh, USA)。両方のアッセイにおいて染色された核を、核および細胞質
の局在のために用いた (核の周囲の輪)。

各ウェルについて、以下の読み出しパラメーターを作製した :

- プロトコル 1 :

チャンネル 2 : p-p53 (Ser15) 核平均強度

チャンネル 3 : p21核平均強度

チャンネル 4 : p-H2A.X (Ser139) 核平均強度

- プロトコル 2 :

チャンネル 1 : 有効視野あたりの選択細胞カウント

チャンネル 2 : CMFDA細胞質平均強度

チャンネル 3 : p-Chk1 (Ser345) 核平均強度

チャンネル 4 : p-ATM (Ser1981) 核平均強度

【0109】

・データ分析および解釈

処置された試料のビヒクル対照に対する調節の倍率を、各化合物および濃度について計
算した。統計学的有意 (p 値 < 0.05) は、スチューデント t 検定を用いて決定した。
各パラメーターについての閾値を、対照値と比較して、対照値に標準偏差の3倍を加算し
たものに基づいて選択した。p-Chk1 (Ser345) およびp-H2A.X (Ser139) について、閾値
を2.1に、p21、p-ATM (Ser1981) については1.8に、p-p53 (Ser15) については1
.9に設定した。5つのタンパク質のうち少なくとも1つがこの閾値よりも高い倍率に
おいて変化を示した場合、化合物を陽性として設定した。そうでない場合、化合物を陰性
として設定した。沈澱または免疫蛍光による濃度、ならびに2つの細胞傷害性パラメータ
ー (有効視野あたりの選択細胞カウントおよびCMFDAの細胞質における強度) のうちの少
なくとも1つにおいて50%の細胞傷害性効果を示した濃度を除外した。

【0110】

研究は、変異原および前駆型変異原についての、in-vitroでHepG2細胞を用いる、新規
の、特異的かつ高感度なハイコンテンツイメージングに基づく試験システムを開発するこ
とを目的とした。それらの限定された代謝能力に起因して、HepG2細胞と代謝活性化シス
テム (MAS - ラット肝臓S9) とを組み合わせたシステムを、前駆型変異原の試験のために
確立した。DNA損傷応答に關与する9つまでの異なるタンパク質は、化合物に誘導される
遺伝毒性についての推定のマーカーとして役立った。タンパク質発現および活性化の变化
を、(前駆型) 遺伝毒性物質 (シクロホスファミド、7,12 - ジメチルベンズアントラ
セン、アフラトキシン B₁、2 - アセチルアミノフルオレン、アクチノマイシン D、メチ
ルメタンスルホン酸、エトポシド) および非遺伝毒性物質 (D - マンニトール、フェンホ
ルミン HCl、プロゲステロン) による処置の48時間後に、HCl技術を用いて定量した
。

【0111】

9つの推定のマーカータンパク質のうち5つを用いて、最良の分類を達成した。前述
の9つのマーカー (p-p53 (Ser15)、p21、p-H2A.X (Ser139)、p-ATM (Ser1981)、p-Ch

10

20

30

40

50

k1 (Ser345)、p-ATR (Ser428)、p-cdc2 (Thr14 / Tyr15)、Gadd45a、p-Chk2 (Thr68))のうちの5つの最も予測的なマーカーを選択した。実験を5つのマーカーp-p53 (Ser15)、p21、p-H2A.X (Ser139)、p-ATM (Ser1981)、p-Chk1 (Ser345) に対して予測しつつ、p-ATR (Ser428)、p-cdc2 (Thr14 / Tyr15)、Gadd45a、p-Chk2 (Thr68) のさらなる分析により、化合物の作用の様式のより詳細な特徴づけが可能となり、それらを補充マーカーとして用いた。

【0112】

9つの推定のマーカーp-p53 (Ser15)、p21、p-H2A.X (Ser139)、p-ATM (Ser1981)、p-Chk1 (Ser345)、p-ATR (Ser428)、p-cdc2 (Thr14 / Tyr15)、Gadd45aおよびp-Chk2 (Thr68) の分析を、(前駆型) 遺伝毒性物質(シクロホスファミド、7,12-ジメチルベンズアントラセン、アフラトキシンB₁、2-アセチルアミノフルオレン、アクチノマイシンD、メチルメタンスルホン酸、エトポシド)および非遺伝毒性物質(D-マンニトール、フェンホルミンHCl、プロゲステロン)による処置の48時間後に、HCl技術を用いて定量した。9つの推定のマーカータンパク質(表2)のうちの5つのマーカー(p-p53 (Ser15)、p21、p-H2A.X (Ser139)、p-ATM (Ser1981)およびp-Chk1 (Ser345))を用いて、最良の分類を達成した。

【0113】

ECVAMにより推奨される群1の化学物質(「in-vitroでの哺乳動物細胞遺伝毒性試験において陽性として検出されるべきである、in-vivo遺伝毒性物質」)の分析は、4つの偽陰性化合物をもたらした。エチルニトロソウレア、ジメチルニトロサミン、2,4-ジアミノトルエンおよび塩化カドミウムは、試験されたタンパク質マーカーのうちのいずれについても、陽性の結果を行わなかった。したがって、試験された20のin-vivo遺伝毒性物質のうち陽性であると分類された18の化合物によるこの試験システムの感度は、80%であった(表6および9)。

【0114】

群2の化学物質(「in-vitroでの哺乳動物細胞遺伝毒性試験において陰性の結果を生じるべきである、非遺伝毒性発癌物質を含む非DNA反応性化学物質」)は、2つの偽陽性と試験された化合物をもたらした。プロゲステロンおよびフェンアントラセン(Phenanthracene)はいずれも、p-ATM (Ser1981)について陽性の結果を生じ、試験された23の化合物のうち、2つの偽陽性と試験された化合物をもたらした。結果として、91.3%の特異度を計算することができた(表7および10)。

【0115】

群3の化学物質(「in-vitroでの哺乳動物細胞遺伝毒性試験において陰性の結果を生じるべきであるが、マウスリンパ腫細胞において、しばしば濃度または高レベルの細胞傷害性において、染色体異常またはtk変異を誘導することが報告されている、非遺伝毒性発癌物質を含む非DNA反応性化学物質、代謝毒およびその他」)は、4つの偽陽性と試験された化合物をもたらした。没食子酸プロピル、p-ニトロフェノール、オイゲノールおよび2,4-ジクロロフェノールは、陽性の結果を生じ、試験された19の化合物のうち4つの偽陽性と試験された化合物をもたらした。結果として、78.9%の特異度を計算することができた(表8および11)。

これらの5つのタンパク質は、薬物発見プロセスの初期における潜在的遺伝子毒の同定のための潜在的候補であった。

【0116】

・Luminex 分析

磁性ビーズキット(Milliplex MAP)を用いて、Luminexシステムシステムを用いる細胞ライセート中のリン酸化されたp53 (Ser15)ならびにp21の合計タンパク質レベルの変化を検出した。

MILLIPLIX MAPは、Luminex xMAP技術に基づく。Luminexは、独自技術を用いて、マイクロスフェアの内部で2つの蛍光色素により色でコードする。これらの色素の正確な濃度を通して、100の区別し得るように色分けされたビーズセットを作製することができ、そ

10

20

30

40

50

これらの各々は、特異的捕捉抗体によりコートされる。試験試料からの分析物をビーズにより捕捉した後、ビオチン化された検出抗体を導入する。反応混合物を次いで、レポーター分子であるストレプトアビジン - フィコエリトリン (SAPE) コンジュゲートと共にインキュベートし、各マイクロスフェアの表面上で反応を完了する。マイクロスフェアおよび内部色素の蛍光に照射し、特定のアッセイにおいて用いられたマイクロスフェアセットを標識する。第2の照射源は、レポーター分子上の蛍光色素であるPEを励起する。最終的に、高速デジタルシグナルプロセッサが、各々の個々のマイクロスフェアを同定し、蛍光レポーターシグナルに基づいて、そのバイオアッセイの結果を定量する。

アッセイの実行は、以下に記載されるように行い、試薬は、MILLIPLEX MAPキット (EMD Millipore カタログ # 46-662および46-621) から用いた。

10

【0117】

- 細胞溶解プロトコル

無菌の96ウェルの組織培養グレードのプレート中で生育された接着性または非接着性細胞は、同じプレート中で試験し、洗浄し、溶解することができるが、別の96ウェルフィルタープレート中で濾過されることを必要とした。プロトコルのステップは、以下のとおりである：非接着性細胞について、組織培養プレートを、2分間、500 x gにおいて遠心分離して、細胞をペレット化した。接着性細胞を用いた場合、それは次のステップから開始した。吸引を介して培地を除去し、100 μLの氷冷PBSまたはTBSを添加した。非接着性細胞について、第1のステップを繰り返した。吸引を介して洗浄液を除去した。それに、ホスファターゼ阻害剤 (1 mMのオルトバナジウム (Na₃VO₄) を含む) および新たに調製したプロテアーゼ阻害剤を含有する35 μL/ウェルの氷冷1 x MILLIPLEX MAP溶解バッファーを添加した。プレートを、オービタルシェイカー (600 ~ 800 rpm) 上で10 ~ 15分間、4において置いた。ライセートを、-70で、使用のために準備が整うまで保存した。

20

【0118】

- イムノアッセイプロトコル

濾過されたライセートを、少なくとも1:1で、MILLIPLEX (登録商標) MAPアッセイバッファー中で希釈した。提案されるアッセイのためのタンパク質濃度の機能的範囲は、合計タンパク質1 ~ 25 μg/ウェル (40 ~ 1000 μg/mLにおいて、25 μL/ウェル) であった。50 μLのアッセイバッファーを、プレートの各ウェル中に添加し、カバーして、プレートシェイカー上で10分間、室温 (20 ~ 25) において混合した。アッセイバッファーをデカントし、プレートを逆さまにして吸収性タオルの上に数回しっかりとタップすることにより、残りの量を全てのウェルから取り除いた。1 x のビーズ懸濁液を10秒間ボルテックスし、25 μLの1 x のビーズ懸濁液を各ウェルに添加した。25 μLのアッセイバッファー、再構成された対照細胞ライセートおよび試料ライセートを、適切なウェルに添加し、一晚 (16 ~ 20時間)、2 ~ 8において、プレートシェイカー (600 ~ 800 rpm) 上で、光から保護してインキュベートした。手で保持した磁性分離ブロックをプレートに接合して、試料および対照をデカントする前に、ビーズを60秒間定着させた。プレートを磁性分離ブロックから取り除き、ウェルあたり100 μLのアッセイバッファーで洗浄した。それを、合計2回の洗浄のために繰り返した。25 μL/ウェルの1 x MILLIPLEX MAP検出抗体を添加した。プレートを密閉し、蓋でカバーして、プレートシェイカー上で攪拌しながら1時間、室温 (20 ~ 25) でインキュベートした。検出抗体をデカントする前に、磁性分離ブロックを接合して、60秒間待った。25 μLの1 x MILLIPLEX MAPストレプトアビジン - フィコエリトリン (SAPE) を添加した。プレートを密閉し、蓋でカバーして、プレートシェイカー上で攪拌しながら15分間、室温 (20 ~ 25) でインキュベートした。25 μLのMILLIPLEX MAP増幅バッファーを各ウェルに添加した。プレートを密閉し、蓋でカバーして、プレートシェイカー上で攪拌しながら15分間、室温 (20 ~ 25) でインキュベートした。SAPE/増幅バッファーをデカントする前に、磁性分離ブロックを接合して、60秒間待った。ビーズを150 μLのMILLIPLEX MAPアッセイバッファー中で懸濁し、プレートシェイカー上で5

30

40

50

分間混合して、その後、Luminexシステムを用いて分析した。

【 0 1 1 9 】

- データ分析および解釈

処置された試料のビヒクル対照に対する調節の倍率を、各化合物および濃度について計算した。各パラメーターについての閾値を、対照値と比較して、対照値に標準偏差の3倍を加算したものに基づいて選択した。p-p53 (Ser 15) およびp21について、閾値を1.5に設定した。タンパク質のうち少なくとも1つがこの閾値より高い倍率での変化を示した場合、化合物を陽性として設定した。そうでない場合、化合物を陰性として設定した。

【 0 1 2 0 】

Luminexシステムを用いて細胞ライセート中のリン酸化されたp53 (Ser15) ならびにp21の合計タンパク質レベルの変化を検出するために用いられたMILLIPLEX MAP磁性ビーズキットの結果を、表12において示す。遺伝毒性化合物であるメチルメタンスルホン酸およびエトポシド、ならびに非遺伝毒性であるD - マンニトールを試験した。

10

【 0 1 2 1 】

【表 1】

表 1

タンパク質 (および翻訳後修飾)	タンパク質名 (代替的名称)	遺伝子名 (代替的名称)	アクセッション 番号
p-p53 (Ser15)	細胞腫瘍抗原 p53、(代替的名称:抗原 NY-CO-13 リンタンパク質 p53 腫瘍抑制因子 p53)	TP53 (P53)	P04637
p21	サイクリン依存性キナーゼ阻害剤 1、(CDK 相互作用タンパク質 1 メラノーマ分化関連タンパク質 6、p21)	CDKN1A, (CAP20, CDKN1, CIP1, MDA6, PIC1, SDI1, WAF1)	P38936
H2A.X (Ser139)	ヒストンH2A.X	H2AFX, (H2AX)	P16104
p-Chk1 (Ser345)	セリン/スレオニン-タンパク質キナーゼChk1、(CHK1チェックポイントホモログ、細胞周期チェックポイントキナーゼ、チェックポイントキナーゼ-1)	CHEK1, (CHK1)	O14757
p-ATM(Ser1981)	セリン-タンパク質キナーゼATM、(毛細血管拡張性運動失調症において変異)	ATM	Q13315
補充マーカー			
p-ATR (Ser428)	セリン/スレオニン-タンパク質キナーゼATR、(毛細血管拡張性運動失調症およびRad3関連タンパク質、FRAP関連タンパク質1)	ATR, (FRP1)	Q13535
p-cdc2 (Thr14/ Tyr15)	サイクリン依存性キナーゼ1、(細胞分裂制御タンパク質ホモログ、細胞分裂タンパク質キナーゼ1、p34タンパク質キナーゼ)	CDK1, (CDC2, CDC28A, CDKN1, P34CDC2)	P06493
Gadd45a	増殖停止およびDNA損傷誘導性タンパク質GADD45アルファ、(DNA損傷誘導性転写物1タンパク質)	GADD45A, (DDIT1, GADD45)	P24522
p-Chk2 (Thr68)	セリン/スレオニン-タンパク質キナーゼChk2、(CHK2チェックポイントホモログ、Cds1ホモログ、チェックポイントキナーゼ2)	CHEK2, (CDS1, CHK2, RAD53)	O96017

10

20

30

40

【 0 1 2 2 】

【表 2】

表 2

エンドポイント	I. 直接的遺伝毒性			II. 前駆型遺伝毒性 + MAS				III. 非遺伝毒性		
	Eto	ActD	MMS	CPA	DMBA	AFB1	AAF	D-Man	Prog	Phen
最大試験濃度 [μM]	2	0.2	1000	200	400	200	1000	1000	1000	1000
<50%細胞傷害性を 試験された最大濃度 [μM]	SCC	0.013	250	100	400	200	1000	1000	15.63	125
	CMFDA	0.2	500	50	400	200	1000	1000	31.25	1000
p-p53 (Ser15)										
p21										
p-Histon H2A.X (Ser139)										
Gadd45a										
p-ATM (Ser1981)										
p-ATR (Ser428)										
p-cdc2 (Thr 14/Tyr 15)	<p>察尔</p>									
p-Chk1 (Ser345)										
p-Chk2 (Thr68)										

10

20

30

40

【表 3】

化合物	略語	CAS番号
I. Ames陽性のin vivo遺伝子毒		
(i) O6およびN7アルキル化剤		
シクロフォスファミド	CPA	6055-19-2
エチルニトロソウレア	ENU	759-73-9
メチルメタンサルホン酸	MMS	66-27-3
(ii)多環式芳香族炭化水素		
ベンゾ[a]ピレン	BaP	50-32-8
7,12-ジメチルベンズ[a]アントラセン	DMBA	57-97-6
(iii)芳香族アミン		
ジメチルニトロソアミン	DMN	62-75-9
2-アセチルアミノフルオレン	AAF	53-96-3
2,4-ジアミノトルエン	DAT	95-80-7
IQ (2-アミノ-3-メチルイミダゾ[4,5-f]キノリン	IQ	76180-96-6
PhIP.HCl (2-アミノ-1-メチル-6-フェニルイミダゾ[4,5-f]ピリジン	PhIP	105650-23-5
(iv)その他		
アフラトキシンB1	AFB1	1162-65-8
塩化カドミウム	CC	10108-64-2
シスプラチン	CP	15663-27-1
p-クロロアニリン	CA	106-47-8
II. Amesにおいて陰性または不確かなIn vivo遺伝子毒		
エトポンド	Eto	33419-42-0
ヒドロキノ	HQ	123-31-9
アジチミジン	AZT	30516-87-1
亜ヒ酸ナトリウム	SA	7784-46-5
タキノール	T	33069-62-4
クロラムフェニコール	CIA	56-75-7

【 0 1 2 4 】

10

20

30

40

【表 4】

略語	CAS番号
(i) 陰性のin vivo遺伝毒性データを有する非発癌物質	
アンピシリン三水合物	7177-48-2
D-マンニトール	69-65-8
(ii) in vivo遺伝毒性データを有さない非発癌物質	
フェンホルミンHCl	834-28-6
n-ブチルクロリド	109-69-3
(2-クロロエチル)トリメチル-塩化アンモニウム	999-81-5
シクロヘキサノン	108-94-1
NN-ジクロロヘキシルチオウレア	1212-29-9
三ナトリウムEDTA三水合物	150-38-9
硫酸エフィドリン	134-72-5
ステアリン酸エリスロマイシン	643-22-1
フルオメロン	2164-17-2
フェナントレン	85-01-8
(iii) 非遺伝毒性発癌物質	
D-リモネン	5989-27-5
Di-(2-エチルヘキシル)フタル酸	117-81-7
アミトロール	61-82-5
Tert-ブチルアルコール	75-65-0
ジエタノールアミン	111-42-2
メラミン	108-78-1
カルバミン酸メチル	598-55-0
プロゲステロン	57-83-0
ピリジン	110-86-1
トリス(2-エチルヘキシル)リン酸	78-42-2
ヘキサクロエタン	67-72-1

【 0 1 2 5 】

10

20

30

40

【表 5】

表 5

(i) in vivoでの遺伝毒性について陰性または不確かである非発癌物質		
D,L-メントール	Men	15356-70-4
無水フタル酸	PhAh	85-44-9
三級ブチルヒドロキノン	TBHQ	1948-33-0
o-アントラニル酸	AA	118-92-3
1,3-ジヒドロキシベンゼン(レゾルシノール)	DB	108-46-3
2-エチル-1,3-ヘキサジオール	EH	94-96-2
スルフィンキサゾール	SO	127-69-5
(ii) in vivoでの遺伝毒性データを有さない非発癌物質		
エチオナミド	EtAm	536-33-4
クルクミン	Cu	458-37-7
ベンジルアルコール	BA	100-51-6
尿素	U	57-13-6
(iii) 非遺伝毒性発癌物質または(ヒトについて)無関係な機構による発癌物質		
サッカリンナトリウム	Ssa	128-44-9
(iv) 補充リスト(in vitroでの遺伝毒性の予測がより不明となったもの)		
没食子酸プロピル	PG	121-79-9
p-ニトロフェノール	NPh	100-02-7
キシレンスルホン酸ナトリウム	SXS	1300-72-7
エチルアクリラート	EtAc	140-88-5
オイゲノール	Eu	97-53-0
イソブチルアルデヒド	IBA	78-84-2
2,4-ジクロロフェノール	DP	120-83-2

10

20

30

40

【表 6】

表 6	最高濃度		SCC		CMFDA		
			-S9	+S9	-S9	+S9	
I. Ames陽性in vivo遺伝子毒							
(i) O6およびN7アルキル化剤	mM	limit	対照に対して<50%細胞傷害性であった最高濃度[μ M]				
シクロフォスファミド	1.00	mM	1000	1000	1000	62.5	
エチルニトロソウレア	1.00	mM	1000	1000	1000	1000	
メチルメタンスルホン酸	1.00	mM	250	500	500	250	
(ii) 多環式芳香族炭化水素							
ベンゾ[a]ピレン	0.125	AF	3.91	125	125	125	
7,12-ジメチルベンズ[a]アントラセン	1.00	mM	125	500	250	1000	
(iii) 芳香族アミン							
ジメチルニトロソアミン	1.00	mM	1000	1000	1000	1000	
2-アセチルアミノフルオレン	1.00	mM	1000	1000	1000	1000	
2,4-ジアミノトルエン	1.00	mM	1000	1000	1000	1000	
IQ (2-アミノ-3-メチルイミダゾ[4,5-f]キノリン	1.00	mM	1000	125	1000	125	
PhIP.HCl (2-アミノ-1-メチル-6-フェニルイミダゾ[4,5-f]ピリジン	1.00	mM	500	1000	500	1000	
(iv) その他							
アフラトキシン B1	1.00	mM	31.25	500	500	500	
塩化カドミウム	1.00	mM	31.25	125	62.5	62.5	
シスプラチン	1.00	mM	1000	1000	1000	1000	
p-クロロアニリン	1.00	mM	1000	1000	1000	1000	
II. Amesにおいて陰性または不確かなIn vivo遺伝子毒							
エトポシド	1/0.005	mM	-/2.5	1000/5	1000/5	1000/5	
ヒドロキノン	1.00	mM	250	1000	250	1000	
アジドチミジン	1.00	mM	1000	1000	1000	1000	
亜ヒ酸ナトリウム	1.00	mM	7.81	125	62.5	125	
タキソール	1.00	mM	1000	500	1000	1000	
クロラムフェニコール	1.00	mM	1000	1000	1000	1000	

10

20

30

【 0 1 2 7 】

【表 7】

表 7

	最高濃度 mM limit		SCC		CMFDA	
			-S9	+S9	-S9	+S9
(i) 陰性のin vivo遺伝毒性データを有する非発癌物質						
アンピシリン三水和物	1.00	mM	1000	1000	1000	1000
D-マンニトール	1.00	mM	1000	1000	1000	1000
(ii) in vivo遺伝毒性データを有さない非発癌物質						
フェンホルミン HCl	1.00	mM	500	1000	1000	1000
n-ブチルクロリド	1.00	mM	1000	1000	1000	1000
(2-クロロエチル)トリメチル-塩化アンモニウム	1.00	mM	1000	1000	1000	1000
シクロヘキサノン	1.00	mM	1000	1000	1000	1000
N,N-ジクロロヘキシルチオウレア	1.00	mM	500	1000	1000	500
三ナトリウム EDTA 三水和物	1.00	mM	500	1000	1000	1000
硫酸エフィドリン	1.00	mM	1000	1000	1000	1000
ステアリン酸エリスロマイシン	1.00	mM	31.25	125	62.5	125
フルオメトロン	1.00	mM	500	1000	1000	1000
フェナントレン	1.00	mM	1000	1000	1000	1000
(iii) 非遺伝毒性発癌物質						
D-リモネン	1.00	mM	1000	1000	1000	1000
Di-(2-エチルヘキシル)フタル酸	1.00	mM	1000	1000	1000	1000
アミトロール	1.00	mM	1000	1000	1000	1000
Tert-ブチルアルコール	1.00	mM	1000	1000	1000	1000
ジエタノールアミン	1.00	mM	1000	1000	1000	1000
メラミン	1.00	mM	1000	1000	1000	1000
カルバミン酸メチル	1.00	mM	1000	1000	1000	1000
プロゲステロン	1.00	mM	125	500	62.5	250
ピリジン	1.00	mM	1000	1000	1000	1000
トリス(2-エチルヘキシル)リン酸	1.00	mM	500	1000	7.813	1000
ヘキサクロロエタン	1.00	mM	1000	1000	1000	1000

10

20

30

【 0 1 2 8 】

【表 8】

表 8

	最高濃度 mM limit		SCC		CMFDA	
			-S9	+S9	-S9	+S9
(i) in vivoでの遺伝毒性について陰性または不確かである非発癌物質						
D,L-メントール	1.00	mM	1000	1000	1000	1000
無水フタル酸	1.00	mM	1000	1000	1000	1000
三級ブチルヒドロキノン	1.00	mM	125	1000	125	1000
o-アントラニル酸	1.00	mM	1000	1000	1000	1000
1,3-ジヒドロキシベンゼン(レゾルシノール)	1.00	mM	1000	1000	1000	500
2-エチル-1,3-ヘキサジオール	1.00	mM	1000	1000	1000	1000
スルフィソキサゾール	1.00	mM	1000	1000	1000	1000
(ii) in vivoでの遺伝毒性データを有さない非発癌物質						
エチオナミド	1.00	mM	1000	1000	1000	1000
クルクミン	0.125	AF	31.25	125	31.25	125
ベンジルアルコール	1.00	mM	1000	1000	1000	1000
尿素	1.00	mM	1000	1000	1000	1000
(iii) 非遺伝毒性発癌物質または(ヒトについて)無関係な機構による発癌物質						
サッカリンナトリウム	1.00	mM	1000	1000	1000	1000
(iv) 補充リスト (in vitroでの遺伝毒性の予測がより不明となったもの)						
没食子酸プロピル	1.00	mM	500	1000	1000	1000
p-ニトロフェノール	1.00	mM	500	1000	500	1000
キシレンスルホン酸ナトリウム	1.00	mM	1000	1000	1000	1000
エチルアクリラート	1.00	mM	1000	1000	1000	1000
オイゲノール	1.00	mM	1000	125	1000	125
イソブチルアルデヒド	1.00	mM	1000	1000	1000	1000
2,4-ジクロロフェノール	1.00	mM	250	500	1000	1000

10

20

30

【 0 1 2 9 】

【表 9】

	p-p53 (Ser15)	p21	p-H2A.X (Ser139)	p-Chk1 (Ser345)	p-ATM (Ser1981)
	-S9 +S9	-S9 +S9	-S9 +S9	-S9 +S9	-S9 +S9
表 9					
I. Ames陽性in vivo遺伝子毒					
(i) O6およびN7アルキル化剤					
シクロオスファミド					
エチルニトロソウレア					
メチルメタンサルホン酸					
(ii) 多環式芳香族炭化水素					
ベンゾ[a]ピレン					
7,12-ジメチルベンズ[a]アントラセン					
(iii) 芳香族アミン					
ジメチルニトロソアミン					
2-アセチルアミノフルオレン					
2,4-ジアミノトルエン					
IQ (2-アミノ-3-メチルイミダゾ[4,5-f]キノリン					
PhIP HCl (2-アミノ-1-メチル-6-フェニルイミ					
ダゾ[4,5-f]ピリジン					
(iv) その他					
アフラトキシン B1					
塩化カドミウム					
シスプラチン					
p-クロロアニリン					
II. Amesにおいて陰性または不確かなIn vivo遺伝子毒					
エトキシド					
ヒドロキノ					
アジドチミジン					
亜ヒ酸ナトリウム					
タキソール					
クロラムフェニコール					

【表 10】

表 10

(i) 陰性のin vivo遺伝毒性データを示す非発癌物質

アンピシリン三水合物
D-マンニトール

p-p53 (Ser15)	p21	p-H2A.X (Ser139)	p-Chk1 (Ser345)	p-ATM (Ser1981)
-S9 +S9	-S9 +S9	-S9 +S9	-S9 +S9	-S9 +S9
[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]

(ii) in vivo遺伝毒性データを示さない非発癌物質

フェンホルミン HCl
 n-ブチルクロリド
 (2-クロロエチル)トリメチル-塩化アンモニウム
 シクロヘキサノン
 NN-ジクロロヘキシルチオウレア
 三ナトリウム EDTA 三水合物
 硫酸エフィドリン
 ステアリン酸エリスロマイシン
 フルオメトロン
 フェナントレン

[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]
------------	------------	------------	------------	------------

(iii) 非遺伝毒性発癌物質

D-リモネン
 Di-(2-エチルヘキシル)フタル酸
 アミトロール
 Tert-ブチルアルコール
 ジエタノールアミン
 メラミン
 カルバミン酸メチル
 プロゲステロン
 ビリジン
 トリス(2-エチルヘキシル)リン酸
 ヘキサクロロエタン

[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]
------------	------------	------------	------------	------------

【表 1 1】

表 11

(i) in vivoでの遺伝毒性について陰性または不確かである非発癌物質

	p-p53 (Ser15)	p21	p-H2A.X (Ser139)	p-Chk1 (Ser345)	p-ATM (Ser1981)
	-S9 +S9	-S9 +S9	-S9 +S9	-S9 +S9	-S9 +S9
D,L-メントール					
無水フタル酸					
三級ブチルヒドロキノン					
o-アントラニル酸					
1,3-ジヒドロキシベンゼン(レゾルシノール)					
2-エチル-1,3-ヘキサジオール					
スルフィノキサゾール					

(ii) in vivoでの遺伝毒性データを有さない非発癌物質

エチオナミド					
クルクミン					
ベンジルアルコール					
尿素					



(iii) 非遺伝毒性発癌物質または(ヒトについて)無関係な機構による発癌物質

サッカリンナトリウム					
------------	--	--	--	--	--

(iv) 補充リスト (in vitroでの遺伝毒性の予測がより不明となったもの)

没食子酸プロピル					
p-ニトロフェノール					
キシレンスルホン酸ナトリウム					
エチルアクリレート					
オイゲノール					
イソブチルアルデヒド					
2,4-ジクロロフェノール					

【表 1 2】

表 12	p-p53 (Ser15) P21	10
エンドポイント	遺伝毒性試験化合物	20
メチルメタンサルホン酸		30
エトポシド	非遺伝毒性試験化合物	
D-マンニトール		

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2013/001575**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

1-15(partially)

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2013/001575

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. G01N33/50 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	STÉPHANIE SOLIER ET AL: "The apoptotic ring", CELL CYCLE, vol. 8, no. 12, 15 June 2009 (2009-06-15), pages 1853-1859, XP055066877, figures 4c,4d	1
A	M. MALMLOF ET AL: "Mdm2 as a Sensitive and Mechanistically Informative Marker for Genotoxicity Induced by Benzo[a]pyrene and Dibenzo[a,l]pyrene", TOXICOLOGICAL SCIENCES, vol. 102, no. 2, 18 October 2007 (2007-10-18), pages 232-240, XP055066879, ISSN: 1096-6080, DOI: 10.1093/toxsci/kfm305 abstract; figure 5	1
----- -/--		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier application or patent but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art *&* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
20 June 2013		17/09/2013
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer
		Rosin, Oliver

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2013/001575

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>WEN-WEN CHOU ET AL: "Arecoline-induced phosphorylated p53 and p21 WAF1 protein expression is dependent on ATM/ATR and phosphatidylinositol-3-kinase in clone-9 cells", JOURNAL OF CELLULAR BIOCHEMISTRY, vol. 107, no. 3, 1 June 2009 (2009-06-01), pages 408-417, XP055066909, ISSN: 0730-2312, DOI: 10.1002/jcb.22137 abstract figures</p>	1,2,6-15
X	<p>----- T. THOMPSON ET AL: "Phosphorylation of p53 on Key Serines Is Dispensable for Transcriptional Activation and Apoptosis", JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 279, no. 51, 6 October 2004 (2004-10-06), pages 53015-53022, XP055067470, ISSN: 0021-9258, DOI: 10.1074/jbc.M410233200 abstract; figures 1-3</p>	1,2,6-15
X	<p>----- ZOE A STEWART ET AL: "Increased p53 phosphorylation after microtubule disruption is mediated in a microtubule inhibitor- and cell-specific manner", ONCOGENE, vol. 20, 15 December 2000 (2000-12-15), pages 113-124, XP055067473, figure 2</p>	1,2,6-15
X	<p>----- XIAOBING LIANG ET AL: "The Role of Wild-Type p53 in Cisplatin-Induced Chk2 Phosphorylation and the Inhibition of Platinum Resistance with a Chk2 Inhibitor", CHEMOTHERAPY RESEARCH AND PRACTICE, vol. 4, no. 3, 1 January 2011 (2011-01-01), pages 216-8, XP055067516, ISSN: 2090-2107, DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-08-0492 abstract; figure 1</p>	1,2,6-15
X	<p>----- Y. ZHU ET AL: "Intra-S-Phase Checkpoint Activation by Direct CDK2 Inhibition", MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY, vol. 24, no. 14, 29 June 2004 (2004-06-29), pages 6268-6277, XP055067572, ISSN: 0270-7306, DOI: 10.1128/MCB.24.14.6268-6277.2004 figures</p> <p>----- -/--</p>	1-3,6-15

1

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2013/001575

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>S. S. PALII ET AL: "DNA Methylation Inhibitor 5-Aza-2'-Deoxycytidine Induces Reversible Genome-Wide DNA Damage That Is Distinctly Influenced by DNA Methyltransferases 1 and 3B", MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY, vol. 28, no. 2, 8 November 2007 (2007-11-08), pages 752-771, XP055067587, ISSN: 0270-7306, DOI: 10.1128/MCB.01799-07 figures 2,4</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-15
T	<p>K. BOEHME ET AL: "Genomic Profiling Uncovers a Molecular Pattern for Toxicological Characterization of Mutagens and Promutagens In Vitro", TOXICOLOGICAL SCIENCES, vol. 122, no. 1, 28 April 2011 (2011-04-28), pages 185-197, XP055066869, ISSN: 1096-6080, DOI: 10.1093/toxsci/kfr090 figures 4C,4D</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	

International Application No. PCT/ EP2013/ 001575

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-15(partially)

Methods, uses and kits for screening compounds with genotoxic activity comprising p-p53(Ser15) and a second claimed biomarker.

2. claims: 1-15(partially)

Methods, uses and kits for screening compounds with genotoxic activity comprising p21 and a second claimed biomarker.

3. claims: 1, 3-15(all partially)

Methods, uses and kits for screening compounds with genotoxic activity comprising p-H2A.X(Ser139) and a second claimed biomarker.

4. claims: 1, 3-15(all partially)

Methods, uses and kits for screening compounds with genotoxic activity comprising p-ATM(Ser1981) and a second claimed biomarker.

5. claims: 1, 3-15(all partially)

Methods, uses and kits for screening compounds with genotoxic activity comprising p-Chk1(Ser345) and a second claimed biomarker.

6. claims: 1, 4-15(all partially)

Methods, uses and kits for screening compounds with genotoxic activity comprising p-ATR(Ser428) and a second claimed biomarker.

7. claims: 1, 4-15(all partially)

Methods, uses and kits for screening compounds with genotoxic activity comprising p-cdc2(Thr14/Tyr15) and a second claimed biomarker.

8. claims: 1, 4-15(all partially)

Methods, uses and kits for screening compounds with

International Application No. PCT/ EP2013/ 001575

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

genotoxic activity comprising Gadd45a and a second claimed biomarker.

9. claims: 1, 4-15(all partially)

Methods, uses and kits for screening compounds with genotoxic activity comprising p-Chk2(Thr68) and a second claimed biomarker.

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC

(72)発明者 ミューラー、シュテファン オットー

ドイツ連邦共和国 6 4 6 2 5 ベンスハイム、アム ヴィンケルバッハ 6

(72)発明者 ディーツ、ヤスミン

ドイツ連邦共和国 6 5 4 6 2 グスタフブルク、ニュルンベルガー シュトラッセ 3 9

Fターム(参考) 2G045 AA13 AA16 AA24 AA25 AA29 AA40 BA13 BB20 BB22 BB24

CA25 CA26 CB01 CB03 CB07 CB17 CB26 DA36 FA12 FA16

FA19 FA29 FA37 FB01 FB03 FB08 FB12 FB13 FB15 GC15

JA01

4B063 QA01 QA20 QQ08 QQ79 QX02

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JP2015521728A5	公开(公告)日	2016-07-21
申请号	JP2015516504	申请日	2013-05-28
申请(专利权)人(译)	默克专利GESELLSCHAFT手套Beshurenkuteru有限公司		
[标]发明人	ミューラーシュテファンオットー ディーツヤスミン		
发明人	ミューラー,シュテファン オットー ディーツ,ヤスミン		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/50 G01N33/15 C12Q1/02		
CPC分类号	G01N33/5017 G01N33/5014 G01N33/5023 G01N2440/14 G01N2500/04 G01N2500/10 G01N2800/50 G01N2800/60		
FI分类号	G01N33/53.D G01N33/50.Z G01N33/15.Z C12Q1/02		
F-TERM分类号	2G045/AA13 2G045/AA16 2G045/AA24 2G045/AA25 2G045/AA29 2G045/AA40 2G045/BA13 2G045 /BB20 2G045/BB22 2G045/BB24 2G045/CA25 2G045/CA26 2G045/CB01 2G045/CB03 2G045/CB07 2G045/CB17 2G045/CB26 2G045/DA36 2G045/FA12 2G045/FA16 2G045/FA19 2G045/FA29 2G045 /FA37 2G045/FB01 2G045/FB03 2G045/FB08 2G045/FB12 2G045/FB13 2G045/FB15 2G045/GC15 2G045/JA01 4B063/QA01 4B063/QA20 4B063/QQ08 4B063/QQ79 4B063/QX02		
优先权	61/659024 2012-06-13 US		
其他公开文献	JP2015521728A JP6301915B2		

摘要(译)

本发明涉及通过提供能够表达一组确定蛋白质的系统，将至少一部分系统与待筛选的化合物一起温育，并比较其表达来筛选具有(亲)基因毒性活性的化合物的方法。系统中的蛋白质与对照系统中的蛋白质表达，从而检测(亲)基因毒性活性。本发明的另一个目的涉及一种用于监测发生生理和/或病理状况的可能性的方法，所述生理和/或病理状况是响应于化合物而由增殖，分化和/或损伤修复的遗传失调引起，介导和/或传播的。通过测定从哺乳动物取出的生物样品中确定的蛋白质的表达水平，给予需要这种治疗的哺乳动物。本发明还涉及用于筛选具有(促)基因毒性活性的化合物的试剂盒，其包含特异性结合标记蛋白的抗体。