

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 389 201**

51 Int. Cl.:
C07K 14/18 (2006.01)
C12Q 1/37 (2006.01)
G01N 33/50 (2006.01)
G06F 17/50 (2006.01)
C12N 15/51 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **04817468 .4**
96 Fecha de presentación: **27.10.2004**
97 Número de publicación de la solicitud: **1678202**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **12.07.2006**

54 Título: **Mutantes de resistencia de la proteasa NS3/4A de HCV**

30 Prioridad:
27.10.2003 US 514740 P
26.11.2003 US 525222 P
13.04.2004 US 561662 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
24.10.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
24.10.2012

73 Titular/es:
VERTEX PHARMACEUTICALS INCORPORATED
(100.0%)
130 WAVERLY STREET
CAMBRIDGE, MA 02139-4242, US

72 Inventor/es:
LIN, CHAO y
LIN, KAI

74 Agente/Representante:
DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 389 201 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Mutantes de resistencia de la proteasa NS3/4A de HCV.

Campo de la invención

La presente invención se refiere a mutantes de resistencia de la proteasa NS3/4A del virus de la hepatitis C.

5 Antecedentes de la técnica relacionada

La infección por el virus de la hepatitis C ("HCV") es un problema médico humano apremiante. Se reconoce al HCV como el agente causativo de la mayoría de los casos de hepatitis no-A, no-B, con una seroprevalencia en humanos calculada del 3% a nivel global [A. Alberti *et al.*, "Natural History of Hepatitis C", *J. Hepatology*, 31 (supl. 1), pp. 17-24 (1999)]. Casi cuatro millones de individuos pueden estar infectados sólo en EEUU [M.J. Alter *et al.*, "The Epidemiology of Viral Hepatitis in the United States", *Gastroenterol. Clin. North Am.*, 23, pp. 437-455 (1994); M.J. Alter, "Hepatitis C Virus Infection in the United States", *J. Hepatology*, 31 (supl. 1), pp. 88-91 (1999)].

Tras la primera exposición al HCV sólo aproximadamente 20% de los individuos infectados desarrollan una hepatitis clínica aguda, mientras que otros no desarrollan síntomas externos significativos de la infección. Sin embargo, en casi 70% de los casos, el virus establece una infección crónica que persiste durante décadas [S. Iwarson, "The Natural Course of Chronic Hepatitis", *FEMS Microbiology Reviews*, 14, pp. 201-204 (1994); D. Lavanchy, "Global Surveillance and Control of Hepatitis C", *J. Viral Hepatitis*, 6, pp. 35-47 (1999)]. Esto habitualmente produce una inflamación hepática recurrente y progresivamente agravante que a menudo conduce a estados de la enfermedad más graves, tales como cirrosis y carcinoma hepatocelular [M.C. Kew, "Hepatitis C and Hepatocellular Carcinoma", *FEMS Microbiology Reviews*, 14, pp. 211-220 (1994); I. Saito *et al.*, "Hepatitis C Virus Infection is Associated with the Development of Hepatocellular Carcinoma", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, pp. 6547-6549 (1990)]. Por desgracia, no existen tratamientos ampliamente eficaces para el avance debilitante del HCV crónico.

El genoma de HCV codifica una poliproteína de 3010-3033 aminoácidos [Q.L. Choo *et al.*, "Genetic Organization and Diversity of the Hepatitis C Virus", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, pp. 2451-2455 (1991); N. Kato *et al.*, "Molecular Cloning of the Human Hepatitis C Virus Genome From Japanese Patients with Non-A, Non-B Hepatitis", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, pp. 9524-9528 (1990); A. Takamizawa *et al.*, "Structure and Organization of the Hepatitis C Virus Genome Isolated From Human Carriers", *J. Virol.*, 65, pp. 1105-1113 (1991)]. Se cree que las proteínas no estructurales (NS) del HCV proporcionan la maquinaria catalítica esencial para la replicación vírica. Las proteínas NS surgen por la ruptura proteolítica de la poliproteína [R. Bartenschlager *et al.*, "Nonstructural Protein 3 of the Hepatitis C Virus Encodes a Serine-Type Proteinase Required for Cleavage at the NS3/4 and NS4/5 Junctions", *J. Virol.*, 67, pp. 3835-3844 (1993); A. Grakoui *et al.*, "Characterization of the Hepatitis C Virus-Encoded Serine Proteinase: Determination of Proteinase-Dependent Polyprotein Cleavage Sites", *J. Virol.*, 67, pp. 2832-2843 (1993); A. Grakoui *et al.*, "Expression and Identification of Hepatitis C Virus Polyprotein Cleavage Products", *J. Virol.*, 67, pp. 1385-1395 (1993); L. Tomei *et al.*, "NS3 is a serine protease required for processing of hepatitis C virus polyprotein", *J. Virol.*, 67, pp. 4017-4026 (1993)].

La proteína NS 3 (NS3) de HCV contiene actividad serina proteasa que procesa la poliproteína vírica para generar la mayoría de las enzimas víricas, y es fundamental para la replicación y la infectividad vírica. Se ha demostrado que los primeros 181 aminoácidos de NS3 (restos 1027-1207 de la poliproteína vírica) contienen el dominio de serina proteasa de NS3 que procesa los cuatros sitios cadena debajo de la poliproteína de HCV [C. Lin *et al.*, "Hepatitis C Virus NS3 Serine Proteinase: *Trans*-Cleavage Requirements and Processing Kinetics", *J. Virol.*, 68, pp. 8147-8157 (1994)]. Las sustituciones de la tríada catalítica de la serina proteasa NS3 de HCV producen la pérdida de la replicación y la infectividad víricas en chimpancés [A.A. Kolykhalov *et al.*, "Hepatitis C virus-encoded enzymatic activities and conserved RNA elements in the 3' nontranslated region are essential for virus replication in vivo", *J. Virol.*, 74:2046-2051]. Se sabe que las mutaciones en la proteasa NS3 del virus de la fiebre amarilla disminuyen la infectividad vírica [Chambers, T.J., *et al.*, "Evidence that the N-terminal Domain of Nonstructural Protein NS3 From Yellow Fever Virus is a Serine Protease Responsible for Site-Specific Cleavages in the Viral Polyprotein", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, pp. 8898-8902 (1990)].

La serina proteasa NS3 de HCV y su cofactor asociado, NS4A, procesa la región de las proteínas no estructurales víricas para producir proteínas no estructurales individuales [C. Failla *et al.*, "An amino-terminal domain of the hepatitis C virus NS3 protease is essential for interaction with NS4A", *J. Virol.*, 69, pp. 1769-1777; Y. Tanji *et al.*, "Hepatitis C virus-encoded nonstructural protein NS4A has versatile functions in viral protein processing", *J. Virol.*, 69, pp. 1575-1581; C. Lin *et al.*, "A central region in the hepatitis C virus NS4A protein allows formation of an active NS3-NS4A serine proteinase complex *in vivo* and *in vitro*", *J. Virol.*, 69, pp. 4373-4380], y es fundamental para la replicación vírica. Este procesamiento parece ser análogo al que lleva a cabo la aspartil proteasa del virus de la inmunodeficiencia humana, que también está implicada en el procesamiento de proteínas víricas. Los inhibidores de la proteasa del VIH, que inhiben el procesamiento de proteínas víricas, son potentes agentes antivíricos en seres humanos, lo cual indica que la interrupción de esta etapa del ciclo vital del virus produce agentes terapéuticamente activos. Por consiguiente, es una diana atractiva para el descubrimiento de fármacos. Véase, por ejemplo, Lahm *et al.*, *Curr. Drug Targets*, 3, pp. 281-296 (2002), que describe la proteasa NS3 de HCV como una diana potencial para

el desarrollo de inhibidores de molécula pequeña.

En la técnica anterior se han descritos varios inhibidores de la proteasa de HCV potenciales [publicaciones PCT nº WO 02/18369, WO 02/08244, WO 00/09588, WO 00/09543, WO 99/64442, WO 90/07733, WO 99/07734, WO 99/50230, WO 98/46630, WO 98/17679 y WO 97/43310, patente de EEUU 5.990.276, M. Llinas-Brunet *et al.*, Bioorg. Med. Chem. Lett., 8, pp. 1713-1718 (1998); W. Han *et al.*, Bioorg. Med. Chem. Lett., 10, 711-713 (2000); R. Dunsdon *et al.*, Bioorg. Med. Chem. Lett., 10, pp. 1571-1579 (2000); M. Llinas-Brunet *et al.*, Bioorg. Med. Chem. Lett., 10, pp. 2267-2270 (2000); y S. LaPlante *et al.*, Bioorg. Med. Lett., 10, pp. 2271-2274 (2000)]. Sin embargo, no se sabe si estos compuestos tendrían los perfiles apropiados para ser fármacos aceptables. Además, es posible que la proteasa de HCV se haga resistente a un fármaco que, por lo demás, sea aceptable. Se han descrito mutantes de proteasa. Véase, por ejemplo, Trozzi *et al.*, J. Virol., 77, pp. 3669-3679 (2003), que describe una proteasa NS3/4A de HCV que tiene una mutación puntual en la posición 168, y la publicación de patente internacional WO 2004/039970, que describe proteasas NS3/4A de HCV que tienen sustituciones, por ejemplo, en las posiciones de los aminoácidos, 26, 41, 71, 89, 101, 150, 155, 168, 176 o 179.

Por tanto, el conocimiento actual del HCV no ha conducido a ningún agente o tratamiento anti-HCV satisfactorio. La única terapia establecida para la enfermedad del HCV es un tratamiento basado en interferón alfa. Sin embargo, los interferones alfa tienen significativos efectos secundarios [M.A. Walker *et al.*, "Hepatitis C Virus: An Overview of Current Approaches and Progress", DDT, 4, pp. 518-529 (1999); D. Moradpour *et al.*, "Current and Evolving Therapies for Hepatitis C", Eur. J. Gastroenterol. Hepatol., 11, pp. 1199-1202 (1999); H.L.A. Janssen *et al.*, "Suicide Associated with Alpha-Interferon Therapy for Chronic Viral Hepatitis", J. Hepatol., 21, pp. 241-243 (1994); P.F. Renault *et al.*, "Side Effects of Alpha Interferon", Seminars in Liver Disease, 9, pp. 273-277 (1989)] e inducen una remisión a largo plazo sólo en una parte (aproximadamente 25%) de los casos [O. Weiland, "Interferon Therapy in Chronic Hepatitis C Virus Infection", FEMS Microbiol. Rev., 14, pp. 279-288 (1994)]. El estado actual de la atención, consistente en el interferón alfa pegilado en combinación con ribavirina, produce aproximadamente 40-50% de respuesta vírica sostenida (SVR) en pacientes infectados con el genotipo 1, que constituye 70% de los pacientes con hepatitis C crónica en los países desarrollados, y 80% de SVR en pacientes infectados con HCV de genotipo 2 o 3 [J.G. McHutchison *et al.*, N. Engl. J. Med., 339:1485-1492 (1998); G.L. Davis *et al.*, N. Engl. J. Med., 339:1493-1499 (1998)]. Además, la perspectiva de vacunas anti-HCV eficaces sigue siendo incierta.

Por tanto, son necesarias terapias anti-HCV más eficaces, en particular compuestos que inhiban la proteasa NS3 de HCV. Estos compuestos pueden ser útiles como agentes antivíricos, en particular como agentes anti-HCV. Un conocimiento de los mutantes de resistencia de HCV supondría un avance hacia tratamientos del HCV eficaces.

Sumario de la invención

La presente invención se refiere a mutantes de resistencia a la proteasa NS3/4A del virus de la hepatitis C.

Así, en ciertos aspectos, la invención se refiere a polinucleótidos de HCV aislados que codifican proteasas NS3/4A de HCV mutantes, o sus análogos o fragmentos biológicamente activos, en los que el codón que corresponde al codón 156 del polinucleótido de tipo salvaje y/o el codón que corresponde al codón 168 del polinucleótido de tipo salvaje está mutado de modo que no codifica una alanina en 156 y/o un ácido aspártico en 168. Los ejemplos de dichas mutaciones se describen en la presente, e incluyen polinucleótidos en los que el codón que corresponde al 156 del polinucleótido de tipo salvaje codifica una serina, una valina o una treonina. Otros ejemplos de realizaciones incluyen polinucleótidos en los que el codón del polinucleótido que corresponde al codón 168 del polinucleótido de tipo salvaje codifica un ácido aspártico, un ácido glutámico, una alanina, una glicina, o una tirosina. Se contempla específicamente cualquier combinación de mutaciones en el codón 156 y 168. La proteasa NS3/4A del HCV de tipo salvaje es muy conocida por los expertos en la técnica. Está codificada por una secuencia polinucleotídica de SEQ ID NO:1. Esta secuencia polinucleotídica codifica una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2.

También se contemplan en la presente los polipéptidos, o sus fragmentos biológicamente activos, que son codificados por los polinucleótidos descritos en la presente. Además, la invención incluye vectores que comprenden estos polinucleótidos, células hospedantes que se han transformado o transfectado con dichos polinucleótidos, y líneas celulares que comprenden dichos polinucleótidos. Los métodos y las composiciones para fabricar dichos vectores, para transformar células hospedantes, y para preparar líneas celulares son técnicas habituales y convencionales conocidas por los expertos en la técnica. Los variantes de HCV aislados que comprenden las proteínas o los polinucleótidos mutantes descritos en la presente también son parte de la presente invención.

En la presente también se contemplan composiciones que comprenden los polinucleótidos o las proteínas por sí solos, o en combinación con otras composiciones y componentes.

La invención describe un método para detectar la presencia de HCV resistente a fármacos en una muestra biológica, que comprende detectar la presencia de un polinucleótido descrito en el presente. Generalmente, dichos métodos comprenden obtener o aislar el polinucleótido de la muestra; determinar la secuencia del polinucleótido; y evaluar si está presente en el polinucleótido una mutación asociada a la resistencia, tal como una o más de las mutaciones descritas en la presente (por ejemplo, una que codifique serina, valina o treonina en un resto que se corresponde con el resto 156 y/o que codifique ácido glutámico, valina, alanina, glicina o tirosina en un resto que se corresponde

con el resto 168 de la proteasa NS3/4A de HCV de tipo salvaje).

También se contemplan métodos para determinar o diagnosticar si una infección por HCV en un paciente es resistente a fármacos, que comprenden recoger una muestra biológica del paciente infectado por HCV; y evaluar si la muestra plasmática contiene ácidos nucleicos que codifican una proteasa NS3/4A de HCV mutante, en el que la presencia de la proteasa NS3/4A de HCV mutante indica que el paciente tiene una infección de HCV resistente a fármacos.

Otros aspectos contemplan métodos para evaluar si un paciente infectado por HCV tiene una menor sensibilidad o susceptibilidad a VX-950, que comprenden evaluar si el paciente tiene un ADN de proteasa NS3/4A del virus de la hepatitis C que tenga una mutación en el codón que codifica el resto 156 de la proteasa NS3/4A del virus de la hepatitis C de tipo salvaje.

Otros aspectos se dirigen a métodos para evaluar si un paciente infectado por HCV tiene una menor sensibilidad o susceptibilidad a un inhibidor de proteasas, que comprenden evaluar si el paciente tiene un ADN de proteasa NS3/4A del virus de la hepatitis C que tenga una mutación en el codón que codifica el resto 156 de la proteasa NS3/4A del virus de la hepatitis C de tipo salvaje.

La invención también contempla métodos para evaluar un inhibidor de HCV candidato o potencial, que comprenden introducir un vector que comprende un polinucleótido de la invención y un gen indicador que codifica un indicador en una célula hospedante; cultivar la célula hospedante; y medir el indicador en presencia del inhibidor y en ausencia del inhibidor.

Otros métodos ensayan compuestos para su actividad contra HCV proporcionando una proteasa mutante descrita en la presente y un sustrato de proteasa; poniendo en contacto la proteasa con un inhibidor candidato o potencial en presencia del sustrato; y evaluando o midiendo la inhibición de la actividad proteolítica de la proteasa.

Otros aspectos proporcionan métodos para identificar un compuesto como inhibidor de una proteasa resistente a fármacos descrita en la presente, ensayando la actividad dicha proteasa en ausencia del compuesto; ensayando la actividad de la proteasa en presencia del compuesto; comparando los resultados del ensayo realizado en presencia y en ausencia del compuesto, en los que cualquier disminución en la actividad proteasa como resultado de la presencia del compuesto indica que el compuesto es un inhibidor de la proteasa.

También se describen métodos para identificar compuestos que son capaces de rescatar la actividad de VX-950, cuando una proteasa NS3/4A se ha hecho resistente a VX-950, en los que la proteasa resistente se pone en contacto con el compuesto; y se evalúa la capacidad de VX-950 para inhibir la actividad de la proteasa en presencia de ese compuesto.

La presente invención aprovecha el hecho de que la estructura tridimensional de la proteasa NS3/4A ha sido resuelta (véase, por ejemplo, el documento WO 98/11134). Utilizando estas técnicas y las indicaciones de la presente invención se obtiene un modelo tridimensional de la proteasa resistente de la invención; se diseñan o se seleccionan compuestos para que interaccionen con la estructura tridimensional de la proteasa mutante, y se evalúa la capacidad del compuesto para unirse o interaccionar con la proteasa (por ejemplo, mediante la formación de modelos moleculares). Los ejemplos de modelos tridimensionales se basan en la estructura cristalina de rayos X (figura 1 y figura 2) de la proteasa NS3/4A. Estos modelos pueden obtenerse mediante métodos informáticos o mediante cristalografía de rayos X. Estas evaluaciones pueden compararse con las evaluaciones determinadas a partir de una proteasa de tipo salvaje.

El compuesto puede identificarse a partir de un banco de química combinatoria o puede prepararse mediante un diseño racional de fármacos. En ejemplos de realizaciones, el compuesto es un compuesto preparado mediante un diseño racional de fármacos y se deriva de la estructura de VX-950. En ejemplos de realizaciones, el compuesto identificado se formula en una composición que comprende el compuesto y un vehículo, adyuvante o portador farmacéuticamente aceptable. Preferiblemente, la composición contiene el compuesto en una cantidad eficaz para inhibir la serina proteasa NS3/4A. Aún más preferiblemente, la composición se formula para la administración a un paciente. Las composiciones también pueden comprender un agente adicional seleccionado de un agente inmunomodulador; un agente antivírico; un segundo inhibidor de la proteasa de HCV; un inhibidor de otra diana en el ciclo vital del HCV; un inhibidor del citocromo P450; o sus combinaciones.

Otros métodos de la invención contemplan la inhibición de la actividad de una proteasa NS3/4A de la hepatitis C, que comprende la etapa de poner en contacto la serina proteasa con dicho compuesto o composición. Otros aspectos contemplan métodos para tratar una infección por HCV en un paciente, que comprende la etapa de administrar al paciente dicho compuesto o composición.

Otros aspectos adicionales contemplan métodos para tratar o reducir una infección por HCV en un paciente, que comprenden determinar si el paciente tiene una infección por HCV que sea resistente a la terapia utilizando un método descrito en la presente que se basa en la detección de las mutaciones descritas, y tratar al paciente con una composición o una terapia dirigida al tratamiento del HCV resistente a fármacos.

Otros aspectos adicionales describen métodos para eliminar o reducir la contaminación por HCV de una muestra biológica o un equipo médico o de laboratorio, que comprenden la etapa de poner en contacto la muestra biológica o el equipo médico o de laboratorio con un compuesto identificado según se describe en la presente. En otras realizaciones, la muestra biológica o el equipo médico o de laboratorio está contaminado con una cepa resistente a fármacos de HCV, según se determina mediante los métodos de determinación descritos en la presente.

Otras características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada. Sin embargo, debe entenderse que la descripción detallada y los ejemplos específicos, aunque indican las realizaciones preferidas de la invención, se ofrecen sólo como ilustración, ya que diversos cambios y modificaciones dentro del alcance de la invención serán evidentes para los expertos en la técnica a partir de esta descripción detallada.

10 Breve descripción de los dibujos

Los siguientes dibujos forman parte de la presente memoria descriptiva y se incluyen para ilustrar más a fondo los aspectos de la presente invención. La invención puede entenderse mejor haciendo referencia a los dibujos, en combinación con la descripción detallada de las realizaciones específicas presentadas en la presente.

15 Figura 1: Estructura de rayos X de los dos complejos de inhibidor de proteasas (PI)-proteasa NS3 de HCV de BILN 2061 y VX-950. Se resolvieron dos estructuras co-complejas y se superpusieron (VX-950 en azul y BILN 2061 en rojo). Tres restos mostrados con el modelo de bolas y varillas (R123, R155 y D168) forman puentes salinos en la estructura BILN 2061, pero no en la estructura de VX-950. La eliminación de la carga negativa en D168 da como resultado la falta de restricción de R155 y la consiguiente pérdida del apilamiento con el P2 grande de BILN 2061 y un aumento en el coste de la desolvatación. R155 no es restringido por D168 en la estructura de VX-950, y la mutación de D168V no afecta a su unión.

20 Figura 2: La mutación A156S provoca la falta de unión debido a un choque estérico con VX-950, pero no con BILN 2061. Se muestran las estructuras de rayos X de VX-950 (arriba a la izquierda, en azul) o BILN 2061 (abajo a la izquierda, en rojo), con A156 de tipo salvaje destacada en amarillo. Se muestran modelos de la mutación A156S (en gris) con VX-950 (arriba a la derecha, en azul) o BILN 2061 (abajo a la derecha, en rojo). Se consideraron todos los ángulos torsionales permitidos para la cadena lateral de la serina en el resto mutado.

Figura 3: La mutación A156V provoca la falta de unión de los PI debido a un choque estérico con VX-950 o BILN 2061. Se muestran modelos de la mutación A156V (en verde) con VX-950 (izquierda, en azul) o BILN 2061 (derecha, en rojo).

Figura 4: Estructuras químicas de VX-950 (A) y BILN 2061 (B).

30 Figura 5: Desarrollo de células con replicones de HCV que son resistentes a VX-950. Células con replicones subgenómicos de Con1 HCV se transfirieron en serie en presencia de G418 y concentraciones crecientes de VX-950 (A), tal como se describe en la sección de materiales y métodos. Las células con replicones se dividieron y se añadió PI fresco al medio dos veces semanales. El área sombreada indica el periodo de tiempo en el que las células con replicones no crecieron o presentaron un pequeño crecimiento global, acompañado de una muerte celular masiva concurrente. Se extrajo el ARN celular total de las células con replicones en diversos momentos (indicados por las flechas) durante la selección de resistencia, y el producto de una RT-PCR que cubre la serina proteasa NS3 de HCV se secuenció directamente o después de ser subclonado en el vector TA. Se determinaron los valores de CI50 de VX-950 contra la serie A o las células con replicones de tipo salvaje en el día 56, con un ensayo de 48 horas convencional (B).

40 Figura 6: Desarrollo de células con replicones de HCV que son resistentes a BILN 2061. Células con replicones subgenómicos de Con1 HCV se transfirieron en serie en presencia de G418 y concentraciones crecientes de BILN 2061 (A), tal como se describe en la sección de materiales y métodos. Las células con replicones se dividieron y se añadió PI fresco al medio dos veces semanales. El área sombreada indica el periodo de tiempo en el que las células con replicones no crecieron o presentaron un pequeño crecimiento global, acompañado de una muerte celular masiva concurrente. Se extrajo el ARN celular total de las células con replicones en diversos momentos (indicados por las flechas) durante la selección de resistencia, y el producto de una RT-PCR que cubre la serina proteasa NS3 de HCV se secuenció directamente o después de ser subclonado en el vector TA. Se determinaron los valores de CI50 de BILN 2061 contra la serie B o las células con replicones de tipo salvaje en el día 59, con un ensayo de 48 horas convencional (B).

50 Figura 7: Modelos de complejos de proteasa:inhibidor. La proteína se muestra como una ilustración basada en su estructura secundaria en color gris claro. Los inhibidores se muestran utilizando el modelo de bolas y varillas (VX-950 en morado, y BILN 2061 en amarillo) con los nitrógenos de color azul, los oxígenos de color rojo, y el azufre de color naranja. Las cadenas laterales de los restos clave se muestra como varillas con diferentes colores: Ala156 (verde), Asp168 (naranja), y Arg123 (naranja). La cadena lateral de Arg155 del modelo de BILN 2061:proteasa se muestra en azul cian y la del modelo de VX-950:proteasa en naranja. Estas cadenas laterales están destacadas mediante superficies punteadas. La tríada catalítica, Ser139, His57 y Asp81, se muestra en gris (la figura ha sido creada por PyMOL Molecular Graphics Systems, DeLano Scientific LLC, San Carlos, California, EEUU, Copyright© 1998-2003).

Figura 8: Desarrollo de replicones de resistencia doble a partir de células con replicones resistentes a VX-950. (A) Las células con replicones resistentes a VX-950 se transfirieron en serie en presencia de G418 0,25 mg/ml, VX-950 14 μ M, y concentraciones crecientes de BILN 2061. Las células con replicones se dividieron y se añadió VX-950 y BILN 2061 fresco al medio dos veces semanales, según indican los rectángulos y los triángulos negros, respectivamente. Se extrajo el ARN celular total de las células con replicones en el día 32 durante la selección de resistencia, y el producto de una RT-PCR que cubre la serina proteasa NS3 de HCV se secuenció directamente o después de ser subclonado en el vector TA. (B) Se muestra la titulación de VX-950 contra células con replicones de la serie A (resistente a VX-950) (rectángulos negros) o la serie C (resistencia doble) (rectángulos blancos) en el día 52 por VX-950. Se determinó el nivel de ARN de HCV después de una incubación durante 48 h con VX-950. (C) Se muestra la titulación de BILN 2061 contra células con replicones de la serie A (resistente a VX-950) (triángulos negros) o la serie C (resistencia doble) (triángulos blancos) en el día 52 por BILN 2061. Se determinó el nivel de ARN de HCV después de una incubación durante 48 h con BILN 2061.

Figura 9: Desarrollo de replicones de resistencia doble a partir de células con replicones resistentes a BILN 2061. (A) Las células con replicones resistentes a BILN 2061 se transfirieron en serie en presencia de G418 0,25 mg/ml, VX-950 7 o 14 μ M, y concentraciones crecientes de BILN 2061. Las células con replicones se dividieron y se añadió VX-950 y BILN 2061 fresco al medio dos veces semanales, según indican los rectángulos y los triángulos negros, respectivamente. Se extrajo el ARN celular total de las células con replicones en el día 32 durante la selección de resistencia, y el producto de una RT-PCR que cubre la serina proteasa NS3 de HCV se secuenció directamente o después de ser subclonado en el vector TA. (B) Se muestra la titulación de VX-950 contra células con replicones de la serie B (resistente a BILN 2061) (rectángulos negros) o la serie D (resistencia doble) (rectángulos blancos) en el día 52 por VX-950. Se determinó el nivel de ARN de HCV después de una incubación durante 48 h con VX-950. (C) Se muestra la titulación de BILN 2061 contra células con replicones de la serie B (resistente a BILN 2061) (triángulos negros) o la serie D (resistencia doble) (triángulos blancos) en el día 52 por BILN 2061. Se determinó el nivel de ARN de HCV después de una incubación durante 48 h con BILN 2061.

Figura 10: Desarrollo de replicones de resistencia doble a partir de células con replicones sin estimular. Las células con replicones subgenómicos de HCV se transfirieron en serie en presencia de G418 0,25 mg/ml, y concentraciones crecientes de VX-950 y BILN 2061. Las células con replicones se dividieron y se añadió VX-950 y BILN 2061 fresco al medio dos veces semanales, según indican los rectángulos y los rombos negros, respectivamente. El área dentro del rectángulo indica el periodo de tiempo en el que las células con replicones no crecieron o presentaron un pequeño crecimiento global, acompañado de una muerte celular masiva concurrente. Se extrajo el ARN celular total de las células con replicones en diversos momentos, indicados por las flechas, durante la selección de resistencia, y el producto de una RT-PCR que cubre la serina proteasa NS3 de HCV se secuenció directamente o después de ser subclonado en el vector TA.

Figura 11: Esquemas de las conformaciones de la cadena lateral de Thr156 con relación a la unión del inhibidor. Las líneas más gruesas representan la cadena lateral de Thr156 de la enzima mutante y la cadena lateral de P2 del inhibidor o sustrato. También se consideran las mismas conformaciones para la cadena lateral de Val156. Las últimas conformaciones (-60/180°) tienen la menor energía para cualquiera de las mutaciones, pero siguen rechazando a ambos inhibidores.

Descripción de las realizaciones preferidas

Los presentes inventores han determinado que las cepas de HCV sufren mutaciones particulares en presencia de ciertos compuestos terapéuticos que hacen que las cepas de HCV se vuelvan resistentes al potencial terapéutico de estos compuestos. En realizaciones concretas, se ha determinado que la proteasa NS3/4A del virus de la hepatitis C está mutada en estos mutantes de resistencia de HCV, de modo que los mutantes se hacen resistentes a compuestos inhibidores de proteasas. Estos descubrimientos pueden aprovecharse para diseñar terapias para el tratamiento de una infección por HCV.

En realizaciones concretas, se ha determinado que el resto aminoácido 156 de NS3/4A de HCV de tipo salvaje (cuya secuencia se proporciona en SEQ ID NO:2) es susceptible a la mutación. La mutación de este resto conduce a la resistencia de HCV a la intervención terapéutica con inhibidores de proteasas. En una realización, se ha demostrado que el codón 156 de tipo salvaje, que en NS3/4A de HCV de tipo salvaje codifica una alanina, muta a un codón que codifica una serina en esa posición relativa en el polipéptido de NS3/4A de HCV. En otra realización, el codón está mutado a un codón que codifica una valina en esa posición relativa en el polipéptido de NS3/4A de HCV. En otra realización, en esa posición relativa de NS3/4A de HCV se codifica una treonina.

A la vista de los anteriores descubrimientos, la invención proporciona un ADN de HCV que codifica una proteasa NS3/4A de HCV (o su fragmento o análogo), en el que el codón 156 del ADN codifica una serina. Otra realización de esta invención proporciona un ADN de HCV que codifica una proteasa NS3/4A de HCV (o su fragmento o análogo), en el que el codón 156 del ADN codifica una valina. Otra realización de esta invención proporciona un ADN de HCV que codifica una proteasa NS3/4A de HCV (o su fragmento o análogo), en el que el codón 156 del ADN codifica una treonina.

En otras realizaciones se ha determinado que, en ciertas realizaciones, el codón en 156 codifica una valina, serina o

- 5 treonina en el resto 156 que normalmente es un resto alanina en NS3/4A de HCV de tipo salvaje/nativa, y existe otra mutación en el que el codón en el resto 168 de NS3/4A de HCV de tipo salvaje/nativa, que normalmente es un resto ácido aspártico, está mutado a un resto valina, alanina, glicina o tirosina. Aunque en ciertas realizaciones se contempla que la proteasa NS3/4A de HCV mutante posee mutaciones en ambas posiciones 156 y 165, se contempla que los mutantes que contienen las mutaciones individuales también sean parte de la presente invención.
- 10 Aspectos específicos de la invención incluyen un ADN de HCV que codifica una proteasa NS3/4A de HCV (o su fragmento o análogo), en el que el codón 156 del ADN codifica una valina o una treonina, y el codón 168 codifica un ácido aspártico o un ácido glutámico. Otra realización de esta invención proporciona un ADN de HCV que codifica una proteasa NS3/4A de HCV (o su fragmento o análogo), en el que el codón 168 del ADN codifica una valina. Otra realización de esta invención proporciona un ADN de HCV que codifica una proteasa NS3/4A de HCV (o su fragmento o análogo), en el que el codón 168 del ADN codifica una alanina, una glicina o una tirosina.
- 15 El sistema de numeración para el ADN de esta invención está de acuerdo con la secuencia SEQ ID NO:1. El ADN según esta invención puede provenir de SEQ ID NO:1. El ADN puede obtenerse mediante una síntesis en fase sólida o por medios recombinantes. En realizaciones específicas, se contempla en particular una mutagénesis dirigida específica de sitio de la secuencia SEQ ID NO:2 para generar uno u otro de los mutantes descritos en la presente.
- 20 Debe reconocerse que las mutaciones de las proteínas pueden ser completas (es decir, toda o aproximadamente toda la proteína se convierte en la proteína mutante), parciales, o ausentes (es decir, no hay o aproximadamente no hay mutaciones). Por tanto, una composición o un método de esta invención puede comprender una mezcla de proteínas de tipo salvaje y mutantes.
- Según otra realización de esta invención, se proporciona una proteína de proteasa NS3/4A de HCV (o su fragmento o análogo) que comprende el aminoácido 156 de la proteasa, en la que el aminoácido 156 es serina.
- Otra realización de esta invención proporciona una proteína de proteasa NS3/4A de HCV (o su fragmento o análogo) que comprende el aminoácido 156 de la proteasa, en la que el aminoácido 156 es valina.
- 25 Otra realización de esta invención proporciona una proteína de proteasa NS3/4A de HCV (o su fragmento o análogo) que comprende el aminoácido 156 de la proteasa, en la que el aminoácido 156 es treonina.
- Otra realización de esta invención proporciona una proteína de proteasa NS3/4A de HCV (o su fragmento o análogo) que comprende el aminoácido 156 de la proteasa, en la que el aminoácido 156 es valina o treonina, y el aminoácido 168 es ácido aspártico o ácido glutámico.
- 30 Otra realización de esta invención proporciona una proteína de proteasa NS3/4A de HCV (o su fragmento o análogo) que comprende el aminoácido 156 de la proteasa, en la que el aminoácido 168 es valina.
- Otra realización de esta invención proporciona una proteína de proteasa NS3/4A de HCV (o su fragmento o análogo) que comprende el aminoácido 156 de la proteasa, en la que el aminoácido 168 es alanina, glicina o tirosina.
- 35 El ADN y las proteínas según esta invención pueden modificarse utilizando técnicas habituales. Por ejemplo, el ADN puede comprender una modificación para unir el ADN a un soporte sólido. Las proteínas pueden comprender un compuesto marcador unido de modo covalente.
- El ADN y las proteínas según esta invención pueden estar en una forma que puede leerse con ordenador que incluye, pero no se limita a vehículos de lectura por ordenador y/o bases de datos de lectura por ordenador (véase, por ejemplo, el documento WO 98/11134).
- 40 Para ciertos usos, el ADN según esta invención puede insertarse en un vector. Cualquier vector adecuado puede incluirse dentro del alcance de esta invención. Los vectores adecuados son conocidos en la técnica. Una realización proporciona un vector de expresión. Otra realización proporciona un vector vírico. Un vector puede ser una herramienta de clonación o puede comprender también secuencias reguladoras, tales como promotores, potenciadores y terminadores, o señales de poliadenilación.
- 45 Por consiguiente, esta invención también proporciona un vector que comprende un ADN de proteasa NS3/4A de HCV (o su fragmento o análogo), en el que:
- el codón 156 del ADN codifica una serina;
- el codón 156 del ADN codifica una valina;
- el codón 156 del ADN codifica una treonina;
- 50 el codón 156 del ADN codifica una valina o una treonina, y el codón 168 codifica un ácido aspártico o un ácido glutámico;

el codón 168 del ADN codifica una valina;

el codón 168 del ADN codifica una alanina;

el codón 168 del ADN codifica una glicina; y/o

el codón 168 del ADN codifica una tirosina.

- 5 Otra realización proporciona un vector de expresión. Otra realización proporciona un vector vírico. Un vector puede ser una herramienta de clonación o puede comprender además secuencias reguladoras, tales como promotores, potenciadores y terminadores, o señales de poliadenilación. Estos vectores pueden utilizarse en cualquier célula hospedante apropiada. Las células hospedantes son conocidas en la técnica.

10 Por consiguiente, la invención también proporciona una célula hospedante que comprende un ADN de proteasa NS3/4A en el que el codón 156 del ADN codifica una serina; el codón 156 del ADN codifica una valina; el codón 156 del ADN codifica una treonina; el codón 156 del ADN codifica una valina o una treonina, y el codón 168 codifica un ácido aspártico o un ácido glutámico; el codón 168 del ADN codifica una valina; el codón 168 del ADN codifica una alanina; el codón 168 del ADN codifica una glicina; y/o el codón 168 del ADN codifica una tirosina. La expresión del ADN proporciona una célula hospedante que comprende una proteasa que tiene una mutación de A156 a serina; 15 una mutación de A156 a valina; una mutación de A156 a treonina; una mutación de A156 a valina o treonina, y una mutación de D168 a ácido glutámico; una mutación de D168 a valina; una mutación de D168 a alanina; una mutación de D168 a glicina; y/o una mutación de D168 a tirosina. También se proporcionan líneas celulares que comprenden ADN o proteínas según esta invención.

20 La invención también proporciona un variante de HCV que comprende un ADN según esta invención o una proteína según esta invención, y composiciones que comprenden el ADN y las proteínas.

Los variantes de HCV, así como el ADN y/o las proteínas según esta invención, pueden ser útiles para el descubrimiento de fármacos, así como para controlar las terapias de HCV apropiadas.

25 Por consiguiente, otra realización de esta invención proporciona un método que detecta la presencia de HCV en una muestra biológica, que comprende detectar la presencia de un ADN según esta invención. Estos métodos pueden comprender las etapas de obtener (o extraer) un ADN; b) determinar la secuencia del ADN; C) determinar o inferir si, en el ADN, el codón 156 codifica una serina, el codón 156 codifica una valina, el codón 156 del polinucleótido codifica una treonina, el codón 156 codifica una valina o una treonina y el codón 168 codifica un ácido aspártico o un ácido glutámico, el codón 168 codifica una valina, o el codón 168 codifica una alanina, una glicina o una tirosina. En 30 ciertas realizaciones, la muestra biológica que contiene el HCV se deriva de un mamífero que ha sido infectado por HCV. La detección de la presencia de dicho ADN puede utilizarse de modo diagnóstico para orientar al médico sobre si, en ese individuo, es probable que la infección de HCV sea resistente o de otra forma refractaria a un tratamiento con inhibidores de proteasas. Con esta orientación, los expertos en la técnica pueden modificar la terapia del sujeto que tiene esta infección, por ejemplo aumentando la dosis de la terapia o proporcionando terapias adicionales que empleen agentes para los que la cepa de HCV que infecta al sujeto no es resistente.

35 Los métodos de esta invención pueden requerir la obtención de ciertas cantidades de ADN. Como reconocerán los expertos en la técnica, el ADN se obtiene y después se amplifica. Pueden utilizarse técnicas convencionales (por ejemplo, PCR, hibridación) para practicar esta invención. Estas técnicas son muy conocidas por los expertos en la técnica.

40 La invención también proporciona métodos para tratar o prevenir una infección por HCV controlando las mutaciones proporcionadas en la presente. Si un mutante de resistencia está presente en el HCV, entonces el paciente puede tratarse en consecuencia. Este método comprendería: a) recoger una muestra (por ejemplo, una muestra plasmática, PBMC, células hepáticas u otra muestra) del paciente infectado por HCV; y b) evaluar si la muestra plasmática contiene un ácido nucleico que codifica una proteasa NS3/4A de HCV que tiene una mutación en el codón 156; y si la mutación produce una sustitución de alanina por serina. Pueden emplearse métodos similares 45 sustituyendo la mutación de alanina-156 a serina por otras mutaciones indicadas en la presente. Además, otros métodos pueden implicar identificar la mutación de A156 a serina (u otra mutación identificada en la presente) y otra mutación de la proteasa. Estos métodos implicarían obtener el ADN, amplificar el ADN, y determinar la secuencia del ADN.

50 La invención también proporciona métodos para evaluar la eficacia de un tratamiento con un inhibidor de la proteasa NS3/4A de un paciente infectado por HCV. Estos métodos comprenden: a) recoger una muestra (por ejemplo, una muestra plasmática) de un paciente infectado por HCV; y b) evaluar si la muestra plasmática contiene un ácido nucleico que codifica una proteasa NS3/4A de HCV que tiene una mutación en el codón 156; y en el que la mutación produce una sustitución de alanina por serina. Pueden realizarse métodos similares con las otras mutaciones de esta invención.

55 Los métodos de esta invención pretenden identificar mutantes de resistencia en pacientes a los que se les han administrado inhibidores de proteasas de HCV. Este método puede realizarse en un paciente que esté recibiendo

tratamiento o que haya recibido tratamiento. Estas y otras técnicas de diagnóstico son conocidas en la técnica (véanse, por ejemplo, los documentos US 5.631.128 y US 6.489.098).

5 Por consiguiente, una realización proporciona un método para evaluar si un paciente infectado por HCV comprende ADN de proteasa NS3/4A del virus de la hepatitis C que tenga una mutación en el codón 156. Es probable que dicho paciente sea resistente a una terapia con un agente, tal como VX-950. Por consiguiente, el paciente puede tratarse con una terapia que emplee un sustituto para VX-950. Otra realización proporciona un método para evaluar si un paciente infectado por HCV comprende ADN de proteasa NS3/4A del virus de la hepatitis C que tenga una mutación en el codón 168.

10 Ciertas de estas mutaciones producen una disminución en la sensibilidad o la susceptibilidad a VX-950. De manera similar, ciertas mutaciones se correlacionan o producen una disminución en la sensibilidad o la susceptibilidad a BILN 2061 (documentos WO 00/59929; US 6.608.027).

15 Otras mutaciones producen una disminución en la sensibilidad o la susceptibilidad a ambos VX-950 y BILN 2061. La disminución en la sensibilidad o la susceptibilidad a cualquiera o a ambos compuestos puede evaluarse según esta invención. Conociendo los patrones de mutaciones de resistencia pueden desarrollarse regímenes de tratamiento más eficaces.

Por ejemplo, esta invención permite el diseño y/o el descubrimiento de compuestos que son activos frente a los mutantes de resistencia indicados en la presente.

Por consiguiente, esta invención proporciona un método para evaluar un inhibidor candidato o potencial de HCV, que comprende:

- 20 a) introducir un vector que comprende un ADN según esta invención y un gen indicador que codifica un indicador, en una célula hospedante;
- b) cultivar la célula hospedante; y
- c) medir el indicador en presencia del inhibidor y en ausencia del inhibidor.

En este método, el compuesto de ensayo puede añadirse en una cualquiera o en más de las etapas a)-c).

25 Otra realización de esta invención proporciona un método para ensayar compuestos para su actividad contra HCV, que comprende:

- a) proporcionar una proteasa según esta invención y un sustrato para la proteasa;
- b) poner en contacto la proteasa con un inhibidor candidato o potencial en presencia del sustrato; y
- d) evaluar o medir la inhibición de la actividad proteolítica de la proteasa.

30 Otra realización de esta invención proporciona un método para identificar un inhibidor de una proteasa según esta invención, que comprende:

- a) ensayar la actividad de la proteasa en ausencia del compuesto;
- b) ensayar la actividad de la proteasa en presencia del compuesto; y
- c) comparar los resultados de a) y los resultados de b). Este método puede comprender también:
- 35 d) ensayar la actividad de una proteasa de tipo salvaje en ausencia del compuesto;
- e) ensayar la actividad de una proteasa de tipo salvaje en presencia del compuesto; y
- f) comparar los resultados de d) y los resultados de e). Los datos de estos métodos después pueden analizarse, por ejemplo, comparando los resultados de a) y/o b) y los resultados de d) y/o e).

También se proporcionan métodos que comprenden:

- 40 d) ensayar la actividad de una segunda proteasa NS3/4A que comprende el aminoácido 168 de la proteasa, en el que el aminoácido 168 es valina, alanina, glicina o tirosina, en ausencia del compuesto;
- e) ensayar la actividad de la segunda proteasa en presencia del compuesto; y
- f) comparar los resultados de d) y e). El método puede comprender también:
- g) ensayar la actividad de una proteasa de tipo salvaje en ausencia del compuesto;
- 45 h) ensayar la actividad de una proteasa de tipo salvaje en presencia del compuesto;

i) comparar los resultados de g) y los resultados de h). En una realización más específica, el método comprende comparar los resultados de a) y/o b) y los resultados de d) y/o e); y/o los resultados de g) y/o h).

Después de que los virus se hayan hecho resistentes a un fármaco, es posible que el virus pueda mutar otra vez y de nuevo hacerse susceptible al fármaco. Una forma de que esto ocurra es cuando el virus se pone en contacto con un segundo fármaco. Por consiguiente, esta invención también proporciona un método para identificar un compuesto capaz de rescatar la actividad de VX-950, en el que una proteasa NS3/4A se ha hecho resistente a VX-950, que comprende:

a) poner en contacto una proteasa mutante descrita en la presente con el compuesto de interés;

b) ensayar la capacidad de VX-950 para inhibir la actividad de la proteasa de a). También se proporcionan métodos similares para rescatar la actividad de BILN 2061 contra mutantes resistentes y/o de mutantes de doble resistencia a VX-950 y BILN 2061.

Otro aspecto de los virus resistentes a fármacos es que el virus puede tratarse con otro fármaco. Por tanto, los métodos para identificar compuestos que son activos frente al virus resistente a fármacos son herramientas de descubrimiento de fármacos muy útiles. Los métodos descritos en la presente pueden aplicarse en técnicas de selección de alta capacidad de procesamiento. Como alternativa, la invención también proporciona métodos para realizar técnicas racionales de diseño de fármacos, utilizando la información estructural sobre la proteasa NS3/4A de HCV elucidada en la presente (es decir, la mutación de restos concretos en 156 y/o 168 de la proteína de tipo salvaje) como base para el diseño de inhibidores de proteasa eficaces. De modo más específico, la presente invención identifica, por primera vez, las cepas de HCV que son resistentes al tratamiento con inhibidores de proteasas, tales como VX-950 y BILN 2061.

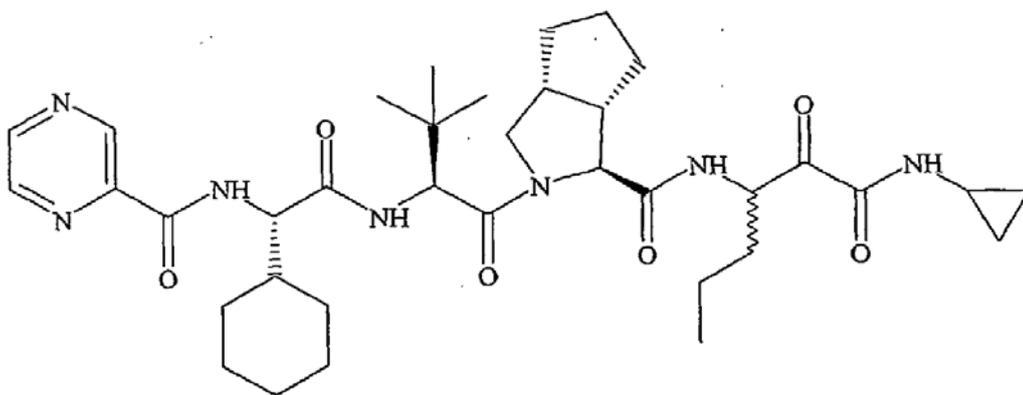
El diseño racional de fármacos también puede combinarse con un método sistemático de experimentos de selección a gran escala, en los que las dianas del fármaco inhibidor de proteasas potencial se ensayan con compuestos procedentes de bancos combinatorios.

El diseño racional de fármacos es una estrategia enfocada que emplea la información acerca de la estructura de un receptor de un fármaco, o uno de sus ligandos naturales, para identificar o crear fármacos candidatos. Puede determinarse la estructura tridimensional de una proteína utilizando métodos, tales como la cristalografía de rayos X o la espectroscopía de resonancia magnética nuclear. En la presente invención, la estructura tridimensional de una proteasa NS3/4A de HCV mutante que contiene una o ambas mutaciones de los restos 156 o 168 puede ahora determinarse con facilidad utilizando técnicas habituales cristalográficas de rayos X y/o de espectroscopía de RMN.

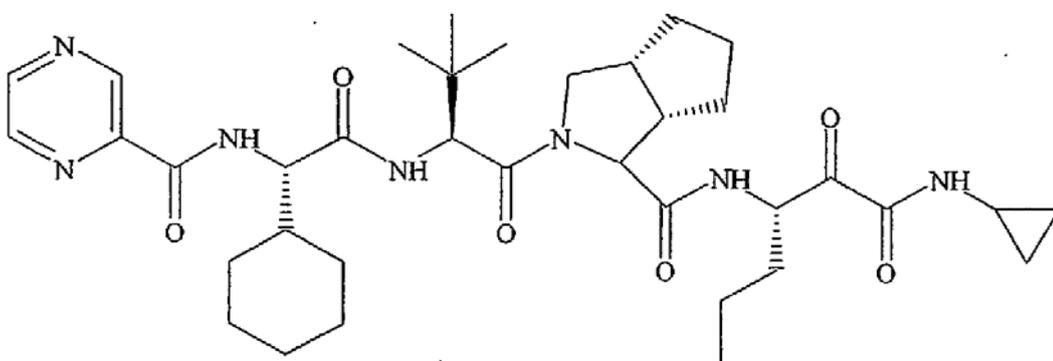
El diseño racional de fármacos también puede combinarse con un método sistemático de experimentos de selección a gran escala, en los que las dianas del fármaco inhibidor de proteasas potencial se ensayan con compuestos procedentes de bancos combinatorios. Armados con la información proporcionada en la presente, los expertos en la técnica pueden emplear programas informáticos para buscar en bases de datos que contengan las estructuras de muchos compuestos químicos diferentes. El ordenador puede seleccionar los compuestos que tengan más probabilidad de interaccionar con la proteasa NS3/4A de HCV a partir de los mutantes resistentes a fármacos, y ensayar dicho compuesto identificado en ensayos de laboratorio habituales para inhibidores de proteasas, tales como los ensayos descritos en la presente.

En ciertas realizaciones, se contempla que la estructura de VX-950 o BILN 2061 (véase la figura 4) pueda utilizarse como estructura de partida a partir de la cual puedan diseñarse otras moléculas. En la presente se demuestra que las proteasas mutantes son de tal forma que se reduce la interacción de VX-950. Las estructuras derivadas de VX-950 que con más facilidad se ajustan e interaccionan con la estructura tridimensional creada cuando el resto 156 es una valina, serina o treonina y/o el resto 168 es una valina, alanina, glicina o ácido glutámico, serán nuevos inhibidores de proteasas útiles que pueden emplearse contra las cepas resistentes de HCV en las que exista una mutación en la proteasa NS3/4A de HCV. Estos compuestos también pueden ser eficaces contra cepas de HCV de tipo salvaje en las que la proteasa NS3/4A de HCV no está mutada. Las indicaciones de la presente invención permiten a los expertos en la técnica centrarse y estrechar la búsqueda lo más posible para limitar el gasto de una selección a gran escala.

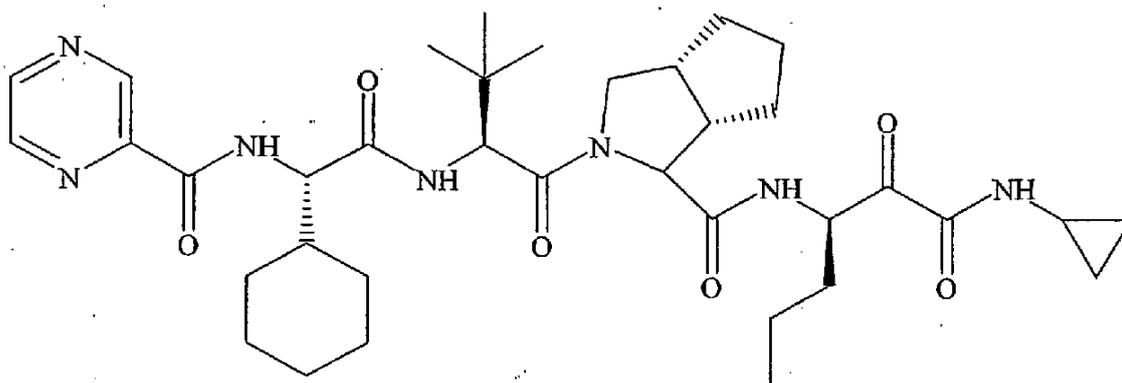
En realizaciones concretas, la estructura del compuesto de partida tiene una estructura de VX-950 (mostrado a continuación en la estructura B). Aunque se utiliza VX-950 como ejemplo, puede utilizarse cualquier estereoisómero de 950, incluyéndose expresamente las mezclas de D- y L-isómeros en la cadena lateral de n-propilo. La siguiente estructura A muestra este diastereómero. Es una mezcla de compuestos de estructura B (VX-950) y estructura C.



Estructura A



Estructura B



Estructura C

5

10

15

El diseño racional de fármacos puede utilizarse para modificar en serie las diferentes posiciones sobre esta molécula para producir derivados de esta que pueden ser útiles como inhibidores de proteasas. Las estructuras cristalinas de la proteasa NS3/4A de HCV de tipo salvaje con VX-950 unido a ellas se muestran en la figura 1. Los datos mostrados en esta figura demuestran que la eliminación de la carga negativa en D168 de la proteasa NS3/4A de HCV da como resultado la falta de restricción de R155 y la consecuente falta de apilamiento con el P2 grande de BILN 2061 y el aumento en el coste de desolvatación. R155 no es restringido por D168 en la estructura resuelta por VX-950 y la mutación D168V no afecta a su unión. Estos estudios de unión pueden realizarse con facilidad con derivados elucidados mediante el diseño racional de fármacos para identificar agentes que tienen una capacidad de unión y/o eficacia terapéutica en los mutantes.

El diseño racional de fármacos ha sido previamente utilizado para identificar el Relenza, que se utiliza para tratar la gripe. El diseño que condujo al descubrimiento del Relenza se desarrolló eligiendo moléculas que era más probable que interaccionasen con la neuraminidasa, una enzima producida por el virus que es necesaria para liberar los virus

recién formados desde las células infectadas. Muchos fármacos recientes para el tratamiento de infecciones por VIH (por ejemplo, Ritonivir™, Indinavir™) también han sido identificados mediante esquemas de diseño racional de fármacos, en los que se diseñan fármacos para que interactúen con la proteasa vírica, la enzima de rompe las proteínas víricas y permite que se ensamblen de forma correcta.

- 5 Otro fármaco muy conocido que se ha producido mediante el diseño racional basado en ligandos es Viagra™. Este fármaco se diseñó para parecerse a GMPc, un ligando que se une a la fosfodiesterasa.

Puesto que las técnicas de diseño racional de fármacos han demostrado ser eficaces una vez se conoce la estructura de la diana del fármaco, se contempla que los descubrimientos de la presente invención, que revelan las estructuras de la proteasa NS3/4A de HCV que aparecen en las cepas de HCV que son resistentes a inhibidores de proteasas de HCV conocidos, ayuden a que los expertos en la técnica sean capaces de utilizar el diseño racional de fármacos para identificar fármacos que son útiles para el tratamiento de HCV.

Por consiguiente, esta invención también proporciona un método para identificar un compuesto eficaz contra una proteasa de esta invención, que comprende:

- a) obtener un modelo tridimensional de la proteasa;
- 15 b) diseñar o seleccionar un compuesto;
- c) evaluar la capacidad del compuesto para unirse o interactuar con la proteasa.

En estos métodos, el modelo tridimensional se basa en la estructura cristalina de rayos X (figura 1 y figura 2) de la proteasa NS3/4A. Se conocen métodos para desarrollar modelos a partir de la estructura cristalina, por ejemplo, métodos informáticos de formación de modelos moleculares (véanse, por ejemplo, los documentos US 6.162.613, WO 98/11134 y/o WO 02/068933). También puede obtenerse un modelo tridimensional mediante cristalografía de rayos X de una proteína según la invención. Tal como se reconoce en la técnica, una proteína puede cristalizarse en presencia o en ausencia de un ligando (tal como un compuesto que se está evaluando).

La evaluación de la capacidad del compuesto para unirse o interactuar con la proteasa es conocida en la técnica (véanse, por ejemplo, los documentos US 6.162.613, WO 98/11134 y/o WO 02/068933). La evaluación puede realizarse, por ejemplo, mediante la formación de modelos moleculares. Después de seleccionar el compuesto, este puede ensayarse con ensayos convencionales, o con los ensayos proporcionados en la presente, para determinar los efectos de los compuestos con diversas proteasas de HCV.

Así, con las indicaciones de la presente invención, será posible realizar ensayos de selección para identificar inhibidores de proteasas que sean eficaces contra infecciones de HCV resistentes a fármacos. La presente invención demuestra que se induce la resistencia a fármacos en aquellas cepas de HCV que tienen una mutación en el resto 156 o 168 de la proteasa NS3/4A de HCV. Más en concreto, se ha demostrado en la presente que una mutación de A156 a serina, valina o treonina y/o una mutación de D168 a valina, alanina, glicina o ácido glutámico tiene como resultado que el HCV se vuelva resistente al tratamiento con fármacos.

Se contempla que las composiciones que actúan como inhibidores de proteasas NS3/4A de HCV mutantes que comprenden una o más de las mutaciones anteriormente mencionadas serán útiles en realizaciones terapéuticas para el tratamiento de HCV. Los compuestos pueden ser los que se han diseñado para imitar la acción de VX-950 o BILN 2061, o se derivan de VX-950 o BILN 2061. En los ensayos de selección para identificar estos compuestos, la sustancia candidata puede seleccionarse, en primer lugar, para la actividad bioquímica básica *in vitro*, y después ensayarse para su capacidad para reducir, mejorar o intervenir terapéuticamente de otra forma en una infección por HCV en un modelo *in vivo* de la infección por HCV. Las proteasas mutantes de la invención poseen actividad proteasa. Cualquiera de los ensayos de selección puede construirse para determinar la actividad de la proteasa NS3/4A de HCV mutante utilizando cualquier ensayo convencional empleado para determinar la actividad de la proteasa NS3/4A de HCV de tipo salvaje. En realizaciones preferidas, la actividad de los inhibidores contra la proteasa NS3/4A de HCV mutante se compara con la actividad de los inhibidores contra la proteasa NS3/4A de HCV de tipo salvaje.

La capacidad de la sustancia candidata para inhibir la proteasa se determina obteniendo una muestra que comprende una proteasa NS3/4A de HCV; y poniendo en contacto la muestra con la sustancia candidata. Se determina la actividad proteasa de HCV en presencia y en ausencia de la sustancia candidata. La proteasa puede ser una proteína aislada, una fracción de membranas que comprende la proteína aislada, o puede estar dentro de una célula que expresa la proteasa. Así, la actividad proteasa se determina generalmente en una muestra que contiene proteasa en ausencia de la sustancia candidata. Después se añade la sustancia candidata a la misma composición o a una composición similar de la muestra que contiene proteasa, y se determina la actividad proteasa. Cualquier sustancia candidata que disminuya la actividad proteasa de la muestra es indicativa de que la sustancia candidata tiene la actividad inhibidora deseada.

55 En los ensayos de selección *in vivo*, el compuesto se administra a un modelo animal, a lo largo de un periodo de tiempo y en diversas dosificaciones, y se controla el alivio de los síntomas asociados con la infección por HCV.

Cualquier mejora en uno o más de estos síntomas será indicativa de que la sustancia candidata es un agente útil.

Tal como se emplea en la presente, la expresión "sustancia candidata" se refiere a cualquier molécula que puede actuar potencialmente como un inhibidor de las proteasas de HCV, independientemente de si las proteasas son de tipo salvaje o de la variedad mutante. Este agente puede ser una proteína o un fragmento de esta, un inhibidor de molécula pequeña, o incluso una molécula de un ácido nucleico. Puede resultar el caso de que los compuestos farmacológicos más útiles serán compuestos que estén relacionados desde el punto de vista estructural con otros inhibidores conocidos de proteasas de HCV tales como, por ejemplo, VX-950 o BILN 2061, u otros inhibidores analizados en la presente. El diseño racional de fármacos incluye no sólo comparaciones con dichos inhibidores conocidos, sino también predicciones relacionadas con la estructura de las moléculas diana de dichos inhibidores.

Por otra parte, simplemente se pueden adquirir, de diversas fuentes comerciales, bancos de moléculas pequeñas que se crea que cumplan los criterios básicos para los fármacos útiles para intentar la identificación de compuestos útiles mediante la "fuerza bruta". La selección de estos bancos, incluyendo bancos generados de modo combinatorio (por ejemplo, bancos peptídicos), es una manera rápida y eficaz para seleccionar un gran número de compuestos relacionados (y no relacionados) para la actividad. Las estrategias combinatorias también se prestan a una rápida evolución de fármacos potenciales mediante la creación de una segunda, tercera y cuarta generación de compuestos moldeados a partir de compuestos activos, pero por lo demás indeseables.

Los compuestos candidatos pueden incluir fragmentos o partes de compuestos naturales o pueden encontrarse como combinaciones activas de compuestos conocidos que por lo demás son inactivos. Se propone que los compuestos aislados a partir de fuentes naturales, tales como animales, bacterias, hongos, fuentes vegetales, incluyendo hojas y corteza, y muestras marinas puedan ensayarse como candidatos para la presencia de agentes farmacéuticos potencialmente útiles. Se entenderá que los agentes farmacéuticos que se van a seleccionar también pueden derivarse o sintetizarse a partir de composiciones químicas o compuestos fabricados por el ser humano.

Unas "cantidades eficaces" del agente candidato en ciertas circunstancias son las cantidades eficaces para producir, de manera reproducible, una alteración en la inhibición de la expresión o actividad de la proteasa NS3/4A de HCV, la inhibición de la virulencia o la producción de HCV, la inhibición de una infección por HCV, o una mejora o alivio de uno o más síntomas de una infección por HCV en comparación con los niveles de estos parámetros en ausencia de dicho agente. Se utilizarán los compuestos que logran unos cambios apropiados significativos en dicho parámetro. Los cambios significativos en la actividad y/o expresión serán los que representan alteraciones en la actividad en al menos aproximadamente 30-40%, y lo más preferiblemente unos cambios de al menos aproximadamente 50%, siendo posible, por supuesto, valores más altos.

El mutante resistente a VX-950 dominante, A156S, sigue siendo susceptible a BILN 2061. Para confirmar si las mutaciones observadas en Ala156 o Asp168 son suficientes para conferir resistencia contra VIX-950 o BILN 2061, respectivamente, se empleó una mutagénesis dirigida específica de sitio para introducir cada mutación individual en la posición 156 o 168 en el dominio de proteasa NS3 de tipo salvaje.

La mutagénesis dirigida específica de sitio es otra técnica útil para la preparación de las proteínas de proteasas mutantes utilizadas en los métodos de la invención. Esta técnica emplea la mutagénesis específica del ADN subyacente (que codifica la secuencia de aminoácidos a la que se dirige la modificación). La técnica además proporciona la capacidad sencilla de preparar y analizar variantes de secuencia, incorporando una o más de las consideraciones anteriores, introduciendo uno o más cambios de secuencia de nucleótidos en el ADN. Una mutagénesis dirigida específica de sitio permite la producción de mutantes mediante el uso de secuencias oligonucleotídicas específicas que codifican la secuencia de ADN de la mutación deseada, así como un número suficiente de nucleótidos adyacentes, para proporcionar una secuencia de cebador con el tamaño y la complejidad de secuencia suficientes para formar un dúplex estable en ambos lados de la unión de delección que se está atravesando. Generalmente, se prefiere un cebador de aproximadamente 17 a 25 nucleótidos de longitud, con aproximadamente 5 a 10 restos a ambos lados de la unión de la secuencia que se está alterando.

La técnica habitualmente emplea un vector de bacteriófago que existe en forma monocatenaria y bicatenaria. Los vectores típicos útiles en la mutagénesis dirigida específica de sitio incluyen vectores tales como el fago M13. Estos vectores de fagos están disponibles en el mercado y su uso en general es muy conocido por los expertos en la técnica. Los plásmidos bicatenarios también se emplean habitualmente en la mutagénesis dirigida específica de sitio, lo cual elimina la etapa de transferir el gen de interés desde un fago a un plásmido.

En general, la mutagénesis dirigida específica de sitio se realiza obteniendo en primer lugar un vector monocatenario, o fundiendo dos hebras de un vector bicatenario que incluye, dentro de su secuencia, una secuencia de ADN que codifica la proteína deseada. Un cebador oligonucleotídico que porta la secuencia mutada deseada se prepara de modo sintético. Este cebador entonces se hibrida con una preparación de ADN monocatenario, tomando en cuenta el grado de desapareamiento cuando se seleccionan las condiciones de hibridación, y se somete a enzimas polimerizantes del ADN, tales como el fragmento de Klenow de la polimerasa I de *E. coli*, para completar la síntesis de la hebra que porta la mutación. Así, se forma un heterodúplex en el que una hebra codifica la secuencia no mutada original y la segunda hebra porta la mutación deseada. Este vector de heterodúplex entonces se emplea para transformar las células apropiadas, tales como células de *E. coli*, y se seleccionan los clones que incluyan los

vectores recombinantes que portan la disposición de secuencia mutada.

Por supuesto, la estrategia descrita anteriormente para la mutagénesis dirigida específica de sitio no es el único método para generar especies de proteasas mutantes potencialmente útiles, y así no pretende ser limitante. La presente invención también contempla otros métodos para lograr la mutagénesis tales como, por ejemplo, tratar los

5 vectores recombinantes que portan el gen de interés con agentes mutagénicos, tales como hidroxilamina, para obtener variantes de secuencia.

Los parámetros cinéticos para el sustrato FRET para los dominios de proteasa NS3 de tipo salvaje a partir del genotipo 1a y 1b son idénticos [tabla 1A y 1B] bajo las condiciones de ensayo de los inventores. Aunque el cofactor del péptido de NS4A procede del genotipo 1a de HCV, no se observaron diferencias perceptibles en los parámetros

10 cinéticos. Esto es coherente con la formación de modelos moleculares, lo cual sugiere que las variaciones conservativas en la región central de NS4A entre el genotipo 1a y 1b no afectan a la interacción entre el péptido central de NS4A y el dominio de proteasa NS3. Los valores de K_i de VX-950 y BILN 2061 se determinaron utilizando los genotipos 1a y 1b de la proteasa de tipo salvaje, y no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las dos proteasas de tipo salvaje (tabla 2).

15 Los parámetros cinéticos del sustrato FRET para la proteasa mutante A156S fueron prácticamente los mismos que los de la proteasa de tipo salvaje (tabla 1A y 1B). Sin embargo, el valor de K_i de VX-950 es de 2,9 μM contra la proteasa mutante A156S, que es 29 veces mayor que contra la proteasa de tipo salvaje (0,1 μM) (tabla 2). BILN 2061 tiene un valor de K_i de 112 nM contra el mutante A156S, que es 6 veces mayor que contra la proteasa de tipo salvaje, 19 nM (tabla 2).

20 El nivel de ARN de HCV en las células con replicones que contienen la sustitución A156S es similar al de las células con replicones de tipo salvaje (los datos no se muestran), lo cual es coherente con la eficacia catalítica enzimática similar del mutante A156S y las serina proteasas NS3 de tipo salvaje. El valor de CI_{50} de VX-950 contra las células con replicones A156S es de 4,65 μM , que es 12 veces mayor que contra las células con replicones de tipo salvaje (0,40 μM) (tabla 3). La diferencia entre los valores de CI_{50} de BILN 2061 contra las células A156S (7 nM) y con

25 replicones de tipo salvaje (4 nM) no fue significativa (tabla 3).

Los principales mutantes resistentes a BILN 2061, D168V y D168A, siguen siendo totalmente susceptibles a VX-950.

Los parámetros cinéticos del sustrato no fueron afectados por la mutación D168V, y muestran sólo cambios pequeños (menores que en 10 veces) para el mutante D168A, según indica la comparación de los valores de k_{cat} y k_{cat}/K_m de las serina proteasas NS3 de tipo salvaje y las dos mutantes (tabla 1A y 1B). De manera similar, no se observó un efecto significativo de cualquiera de las sustituciones en Asp168 sobre el valor de K_i de VX-950 (tabla 2). Sin embargo, la sustitución de valina o alanina por ácido aspártico en la posición 168 produjo una proteasa NS3 mutante que no fue inhibida por BILN 2061 hasta 1,2 μM (tabla 2). Estos datos indican que cualquiera de las proteasas mutantes es al menos 63 veces susceptible a BILN 2061, cuando se compara con la proteasa de tipo salvaje. La magnitud real de la resistencia no puede determinarse, puesto que BILN 2061 no es soluble a

35 concentraciones mayores que 1,2 μM en el tampón de ensayo, según se mide mediante la absorbancia a 650 nm. La mutación D168V o D168A también se introdujo en el replicón de HCV de tipo salvaje mediante mutagénesis dirigida específica de sitio, y se generó una línea de células con replicones estable que porta cada una de las sustituciones. BILN 2061 tiene una CI_{50} de 5,09 μM contra las células con replicones D168V, que es más de 1.300 veces mayor que contra las células con replicones de tipo salvaje (4 nM) (tabla 3). La CI_{50} de BILN 2061 es de 1,86 μM contra el replicón mutante D168A. Hubo pocos cambios en los valores de CI_{50} de VX-950 contra las células con replicones D168V y de tipo salvaje (tabla 3).

Por consiguiente, también se proporcionan compuestos identificados mediante los métodos de esta invención, en los que el compuesto es un inhibidor de una proteasa NS3/4A de HCV. Estos compuestos pueden generarse, por ejemplo, mediante el diseño racional de fármacos, según se analizó anteriormente.

45 La invención también proporciona composiciones que comprenden los anteriores compuestos y su uso. Estas composiciones pueden utilizarse para pretratar dispositivos invasivos que van a ser insertados en un paciente, para tratar muestras biológicas, tales como sangre, antes de la administración a un paciente, y para la administración directa a un paciente. En cada caso, la composición se utilizará para inhibir la replicación de HCV y para disminuir el riesgo o la gravedad de una infección por HCV.

50 Otra realización de esta invención proporciona una composición que comprende un compuesto identificado según esta invención, o su sal farmacéuticamente aceptable. Según una realización preferida, el compuesto identificado según esta invención está presente en una cantidad eficaz para disminuir la carga vírica en una muestra o en un paciente, en el que dicho virus codifica una serina proteasa necesaria para el ciclo vital vírico, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

55 Si se utilizan las sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos de esta invención en estas composiciones, estas sales se originan preferiblemente a partir de ácidos y bases orgánicos e inorgánicos. Se incluyen entre dichas sales de ácidos las siguientes: acetato, adipato, alginato, aspartato, benzoato, bencensulfonato, bisulfato, butirato,

5 citrato, canforato, canforsulfonato, ciclopentanpropionato, digluconato, dodecilsulfato, etansulfonato, fumarato, glucoheptanoato, glicerofosfato, hemisulfato, heptanoato, hexanoato, clorhidrato, bromhidrato, yodhidrato, 2-hidroxietansulfonato, lactato, maleato, metansulfonato, 2-naftalensulfonato, nicotinato, oxalato, pamoato, pectinato, persulfato, 3-fenilpropionato, picrato, pivalato, propionato, succinato, tartrato, tiocianato, tosilato y undecanoato. Las sales de bases incluyen sales de amonio, sales de metales alcalinos, tales como sales de sodio y potasio, sales de metales alcalinotérreos, tales como sales de calcio y magnesio, sales con bases orgánicas, tales como sales de dicitlohexilamina, N-metil-D-glucamina, y sales con aminoácidos, tales como arginina, lisina, etc.

10 Además, los grupos que contienen nitrógeno básico pueden cuaternizarse con agentes tales como haluros de alquilo inferior, tales como cloruros, bromuros y yoduros de metilo, etilo, propilo y butilo, sulfatos de dialquilo, tales como sulfatos de dimetilo, dietilo, dibutilo y diamilo, haluros de cadena larga, tales como cloruros, bromuros y yoduros de decilo, laurilo, miristilo y estearilo, haluros de aralquilo, tales como bromuros de bencilo y fenetilo, y otros. Con ello se obtienen productos dispersables o solubles en agua o aceite.

15 Los compuestos utilizados en las composiciones y los métodos de esta invención también pueden modificarse agregando funcionalidades apropiadas para potenciar propiedades biológicas selectivas. Estas modificaciones son conocidas en la técnica e incluyen las que aumentan la penetración biológica en un sistema biológico dado (por ejemplo, sangre, sistema linfático, sistema nervioso central), las que aumentan la disponibilidad oral, las que aumentan la solubilidad para permitir la administración mediante inyección, las que alteran el metabolismo, y las que alteran la velocidad de excreción.

20 Los vehículos farmacéuticamente aceptables que pueden utilizarse en estas composiciones incluyen, pero no se limitan a intercambiadores iónicos, alúmina, estearato de aluminio, lecitina, proteínas séricas, tales como albúmina de suero humana, sustancias tamponantes, tales como fosfatos, glicina, ácido sórbico, sorbato de potasio, mezclas de glicéridos parciales de ácidos grasos vegetales saturados, agua, sales o electrolitos, tales como sulfato de protamina, bifosfato de disodio, bifosfato de potasio, cloruro de sodio, sales de cinc, sílice coloidal, trisilicato de magnesio, polivinilpirrolidona, sustancias basadas en celulosa, polietilenglicol, carboximetilcelulosa de sodio, poliácridatos, ceras, polímeros en bloque de polietileno-polioxipropileno, polietilenglicol, y lanolina.

25 Según una realización preferida, las composiciones de esta invención se formulan para la administración farmacéutica a un mamífero, preferiblemente un ser humano.

30 Estas composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden administrarse por vía oral, parenteral, mediante pulverización para inhalación, tópica, rectal, nasal, bucal, vaginal, o mediante un depósito implantado. El término "parenteral", tal como se emplea en la presente, incluye técnicas de infusión o inyección subcutánea, intravenosa, intramuscular, intraarticular, intrasinovial, intraesternal, intratecal, intrahepática, intralesional e intracraneal. Preferiblemente, las composiciones se administran por vía oral o intravenosa.

35 Las formas inyectables estériles de las composiciones de esta invención pueden ser suspensiones acuosas u oleaginosas. Estas suspensiones pueden formularse según técnicas conocidas en la técnica utilizando agentes dispersantes o humectantes y agentes suspensores adecuados. La preparación inyectable estéril también puede ser una disolución o una suspensión inyectable estéril en un diluyente o disolvente parenteralmente aceptable no tóxico, por ejemplo, como una disolución en 1,3-butandiol. Entre los vehículos y disolventes aceptables que pueden utilizarse se encuentra el agua, disolución de Ringer, y disolución de cloruro de sodio isotónica. Además se emplean habitualmente aceites estériles no volátiles como disolvente o medio de suspensión. Para este objetivo, puede emplearse cualquier aceite fijo suave, incluyendo mono- o diglicéridos sintéticos. Los ácidos grasos, tales como el ácido oleico y sus derivados glicéridos, son útiles para la preparación de inyectables, al igual que los aceites naturales farmacéuticamente aceptables, tales como aceite de oliva o aceite de ricino, en especial en sus versiones polioxietiladas. Estas disoluciones o suspensiones oleosas también pueden contener un diluyente o dispersante de alcohol de cadena larga, tal como carboximetilcelulosa o agentes dispersantes similares que se emplean habitualmente en la formulación de formas de dosificación farmacéuticamente aceptables, incluyendo emulsiones y suspensiones. Otros tensioactivos que se emplean habitualmente, tales como Tween, Span y otros agentes emulgentes o potenciadores de la biodisponibilidad que se emplean normalmente para la fabricación de formas de dosificación sólidas, líquidas u otras formas de dosificación farmacéuticamente aceptables, también pueden utilizarse para la formulación.

40 45 50 55 60 Unos niveles de dosificación entre aproximadamente 0,01 y aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal diarios, preferiblemente entre aproximadamente 0,5 y aproximadamente 75 mg/kg de peso corporal diarios de los compuestos inhibidores de proteasas descritos en la presente son útiles en una monoterapia para la prevención y el tratamiento con antivíricos, en particular con anti-HCV para una enfermedad mediada por HCV. Generalmente, las composiciones farmacéuticas de esta invención se administran de aproximadamente 1 a aproximadamente 5 veces diarias o, como alternativa, como una infusión continua. Esta administración puede utilizarse como una terapia crónica o aguda. La cantidad de ingrediente activo que puede combinarse con los materiales vehículo para producir una única forma de dosificación variará dependiendo del hospedante tratado y de la vía de administración concreta. Una preparación típica contendrá de aproximadamente 5% a aproximadamente 95% del compuesto activo (en p/p). Preferiblemente, estas preparaciones contienen de aproximadamente 20% a aproximadamente 80% del compuesto activo.

5 Cuando las composiciones de esta invención comprenden una combinación de un compuesto identificado según esta invención, y uno o más agentes terapéuticos o profilácticos adicionales, tanto el compuesto como el agente adicional deben estar presentes a unos niveles de dosificación entre aproximadamente 10% y 100%, y más preferiblemente entre aproximadamente 10% y 80% de la dosificación que normalmente se administra en un régimen de monoterapia.

10 Las composiciones farmacéuticas de esta invención pueden administrarse por vía oral en cualquier forma de dosificación oralmente aceptable que incluye, pero no se limita a cápsulas, comprimidos, suspensiones o disoluciones acuosas. En el caso de los comprimidos para un uso oral, los vehículos que se utilizan habitualmente incluyen lactosa y almidón de maíz. También se añaden generalmente agentes lubricantes, tales como estearato de magnesio. Para la administración oral en forma de cápsula, los diluyentes útiles incluyen lactosa y almidón de maíz secado. Cuando se requieran suspensiones acuosas para un uso oral, el ingrediente activo se combina con agentes emulgentes y suspensores. Si se desea, también pueden añadirse ciertos agentes edulcorantes, aromatizantes o colorantes.

15 Como alternativa, las composiciones farmacéuticas de esta invención pueden administrarse en forma de supositorios para la administración rectal. Estos pueden prepararse mezclando el agente con un excipiente no irritante adecuado que es sólido a temperatura ambiente pero líquido a temperatura rectal y, por tanto, se funden en el recto para liberar el fármaco. Estos materiales incluyen mantequilla de cacao, cera de abejas y polietilenglicoles.

20 Las composiciones farmacéuticas de esta invención también pueden administrarse por vía tópica, en especial cuando la diana del tratamiento incluye áreas u órganos fácilmente accesibles mediante aplicación tópica, incluyendo enfermedades del ojo, la piel, o el tracto intestinal inferior. Las formulaciones tópicas adecuadas pueden prepararse con facilidad a partir de estas áreas u órganos.

La aplicación tópica para el tracto intestinal inferior puede realizarse mediante una formulación de supositorio rectal (véase anteriormente) o en una formulación en enema adecuada. También pueden utilizarse parches transdérmicos tópicos.

25 Para aplicaciones tópicas, las composiciones farmacéuticas pueden formularse en un ungüento adecuado que contenga el componente activo suspendido o disuelto en uno o más vehículos. Los vehículos para la administración tópica de los compuestos de esta invención incluyen, pero no se limitan a aceite mineral, vaselina líquida, vaselina blanca, propilenglicol, polioxietileno, compuesto de polioxipropileno, cera emulgente, y agua. Como alternativa, las composiciones farmacéuticas pueden formularse en una loción o una crema adecuada que contenga los componentes activos suspendidos o disueltos en uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables. Los vehículos adecuados incluyen, pero no se limitan a aceite mineral, monoestearato de sorbitán, polisorbato 60, cera de ésteres de cetilo, alcohol cetearílico, 2-octildodecanol, alcohol bencílico y agua.

30 Para un uso oftálmico, las composiciones farmacéuticas pueden formularse como suspensiones micronizadas en disolución salina estéril isotónica de pH ajustado o, preferiblemente, como disoluciones en disolución salina estéril isotónica de pH ajustado con o sin un conservante, tal como cloruro de benzalconio. Como alternativa, para usos oftálmicos, las composiciones farmacéuticas pueden formularse en un ungüento, tal como vaselina.

40 Las composiciones farmacéuticas de esta invención también pueden administrarse mediante inhalación o aerosol nasal. Estas composiciones se preparan según técnicas muy conocidas en la técnica de la formulación farmacéutica, y pueden prepararse como disoluciones en disolución salina, empleando alcohol bencílico u otros conservantes, promotores de la absorción para potenciar la biodisponibilidad, fluorocarbonos y/o otros agentes solubilizantes o dispersantes convencionales adecuados.

Lo más preferido son las composiciones farmacéuticas formuladas para la administración oral.

45 En otra realización, las composiciones de esta invención también comprenden otro agente antivírico, preferiblemente un agente anti-HCV. Estos agentes antivíricos incluyen, pero no se limitan a agentes inmunomoduladores, tales como α -, β - y γ -interferones, compuestos de α -interferón derivatizados pegilados, y timosina; otros agentes antivíricos, tales como ribavirina, amantadina y telbivudina; otros inhibidores de proteasas de la hepatitis C (inhibidores de NS2-NS3 e inhibidores de NS3-NS4A); inhibidores de otras dianas en el ciclo vital del HCV, incluyendo inhibidores de helicasa y polimerasa; inhibidores de la entrada de ribosomas interna; inhibidores víricos de amplio espectro, tales como inhibidores de IMPDH (por ejemplo, los compuestos de las patentes de EEUU 5.807.876, 6.498.178, 6.344.465, 6.054.472, y los documentos WO 97/40028, WO 98/40381, y WO 00/56331, y ácido micofenólico y sus derivados que incluyen, pero no se limitan a VX-497, VX-148 y/o VX-944); o combinaciones de cualquiera de los anteriores. Véase también W. Markland *et al.*, *Antimicrobial & Antiviral Chemotherapy*, 44, p. 859 (2000), y patente de EEUU 6.541.496.

55 En la presente se utilizan las siguientes definiciones (las marcas comerciales se refieren a productos disponibles a la fecha de presentación de esta solicitud).

"Peg-Intron" significa PEG-Intron®, peginterferón alfa-2b, disponible en Schering Corporation, Kenilworth, NJ; "Intron" significa Intron-A®, interferón alfa-2b, disponible en Schering Corporation, Kenilworth, NJ; "ribavirina"

significa ribavirina (1-beta-D-ribofuranosil-1H-1,2,4-triazol-3-carboxamida), disponible en ICN Pharmaceuticals, Inc., Costa Mesa, CA; descrita en Merck Index, entrada 8365, 12ª edición; también disponible como Rebetol®, en Schering Corporation, Kenilworth, NJ, o como Copegus®, en Hoffmann-La Roche, Nutley, NJ; "Pagasys" significa Pegasys®, peginterferón alfa-2a, disponible en Hoffmann-La Roche, Nutley, NJ; "Roferon" significa Roferon®, interferón alfa-2a recombinante, disponible en Hoffmann-La Roche, Nutley, NJ; "Berefor" significa Berefor®, interferón alfa-2, disponible en Boehringer Ingelheim Pharmaceutical, Inc., Ridgefield, CT; Sumiferon®, una mezcla purificada de interferones alfa naturales, tal como Sumiferon, disponible en Sumitomo, Japón; Wellferon®, interferón alfa-n1, disponible en Glaxo-Wellcome LTD., Reino Unido; Alferon®, una mezcla de interferones alfa naturales fabricada por Interferon Sciences, y disponible en Purdue Frederick Co., CT.

El término "interferón", tal como se emplea en la presente, significa un miembro de una familia de proteínas específicas de especie muy homólogas que inhiben la replicación vírica y la proliferación celular, y modulan la respuesta inmunológica, tales como interferón alfa, interferón beta, e interferón gamma, The Merck Index, entrada 5015, 12ª edición. Según una realización de la presente invención, el interferón es α -interferón. Según otra realización, una combinación terapéutica de la presente invención utiliza el interferón alfa-2a natural. Como alternativa, la combinación terapéutica de la presente invención utiliza el interferón alfa-2b natural. En otra realización, la combinación terapéutica de la presente invención utiliza el interferón alfa-2a o 2b recombinante.

En otra realización, el interferón es interferón alfa-2a o 2b pegilado. Los interferones adecuados para la presente invención incluyen:

- (a) Intron (interferón alfa-2B, Schering Plough),
- (b) Peg-Intron,
- (c) Pegasys,
- (d) Roferon,
- (e) Berefor,
- (f) Sumiferon,
- (g) Wellferon,
- (h) interferón alfa consenso, disponible en Amgen, Inc., Newbury Park, CA,
- (i) Alferon,
- (j) Viraferon®,
- (k) Infergen®.

Como saben los expertos en la técnica, un inhibidor de proteasas se administra preferiblemente por vía oral. El interferón generalmente no se administra por vía oral. No obstante, nada en la presente limita los métodos o las combinaciones de esta invención a ninguna forma o régimen de dosificación específico. Así, cada componente de una combinación según esta invención puede administrarse por separado, junto con los demás componentes, o en cualquier combinación de estos.

En una realización, el inhibidor de proteasas y el interferón se administran en formas de dosificación separadas. En una realización, cualquier agente adicional se administra como parte de una forma de dosificación individual con el inhibidor de proteasas, o como una forma de dosificación separada. Puesto que esta invención implica una combinación de compuestos, las cantidades específicas de cada compuesto pueden depender de las cantidades específicas de cada uno de los demás compuestos en la combinación. Tal como reconocen los expertos en la técnica, las dosificaciones de interferón se miden generalmente en UI (por ejemplo, de aproximadamente 4 millones de UI a aproximadamente 12 millones de UI).

Por consiguiente, los agentes (como agente inmunomodulador o actuando de otra forma) que pueden utilizarse en combinación con un compuesto de esta invención incluyen, pero no se limitan a interferón alfa-2b (Intron A, Schering Plough); Rebatron (Schering Plough, interferón alfa-2B + Ribavirin); interferón alfa pegilado (Reddy, K.R. *et al.*, "Efficacy and Safety of Pegylated (40-kd) interferon alpha-2a compared with interferon alpha-2a in noncirrhotic patients with chronic hepatitis C", *Hepatology*, 33, pp. 433-438 (2001)); interferón consenso (Kao, J.H. *et al.*, "Efficacy of Consensus Interferon in the Treatment of Chronic Hepatitis", *J. Gastroenterol. Hepatol.*, 15, pp. 1418-1423 (2000), interferón alfa-2A (Roferon A, Roche), interferón linfoblastoide o "natural"; interferón tau (Clayette, P. *et al.*, "IFN-tau, A New Interferon Type I with Antiretroviral activity", *Pathol. Biol. (Paris)*, 47, pp. 553-559 (1999); interleuquina 2 (Davis, G.L. *et al.*, "Future Options for the Management of Hepatitis C", *Seminars in Liver Disease*, 19, pp. 103-112 (1999); interleuquina 6 (Davis *et al.*, "Future Options for the Management of Hepatitis C", *Seminars in Liver Disease*, 19, pp. 103-112 (1999); interleuquina 12 (Davis *et al.*, "Future Options for the Management of

Hepatitis C”, *Seminars in Liver Disease*, 19, pp. 103-112 (1999); Ribavirin; y compuestos que potencian el desarrollo de una respuesta de células T auxiliares de tipo I (Davis *et al.*, “Future Options for the Management of Hepatitis C”, *Seminars in Liver Disease*, 19, pp. 103-112 (1999)). Los interferones pueden mejorar las infecciones víricas ejerciendo efectos antivíricos directos y/o modificando la respuesta inmunológica a una infección. Los efectos antivíricos de los interferones a menudo están mediados a través de la inhibición de la penetración vírica o retirada del revestimiento, de la síntesis de ARN vírico, de la traducción de las proteínas víricas y/o del ensamblaje y liberación de los virus.

Los compuestos que estimulan la síntesis de interferón en células (Tazulakhova, E.B., *et al.*, “Russian Experience in Screening, Analysis, and Clinical Application of Novel Interferon Inducers”, *J. Interferon Cytokine Res.*, 21, pp. 65-73) incluyen, pero no se limitan a ADN bicatenario, por sí solo o en combinación con tobramicina, e Imiquimod (3M Pharmaceuticals; Sauder, D.N., “Immunomodulatory and Pharmacologic Properties of Imiquimod”, *J. Am. Acad. Dermatol.*, 43, pp. S6-11 (2000)).

Pueden utilizarse otros compuestos inmunomoduladores o no inmunomoduladores en combinación con un compuesto de esta invención que incluyen, pero no se limitan a los especificados en el documento WO 02/18369 (véase, por ejemplo, p. 273, líneas 9-22, y p. 274 a p. 276, línea 11).

Los compuestos que estimulan la síntesis de interferón en células (Tazulakhova, *et al.*, *J. Interferon Cytokine Res.*, 21, pp. 65-73) incluyen, pero no se limitan a ADN bicatenario, por sí solo o en combinación con tobramicina e Imiquimod (3M Pharmaceuticals) (Sauder, *J. Am. Acad. Dermatol.*, 43, pp. S6-11 (2000)).

Otros compuestos conocidos por tener, o que pueden tener, actividad antivírica contra HCV en virtud de mecanismos no inmunomoduladores incluyen, pero no se limitan a Ribavirin (ICN Pharmaceuticals); inhibidores de inosina 5'-monofosfato deshidrogenasa (fórmula de VX-497 proporcionada en la presente); amantadina y rimantadina (Younossi *et al.*, en *Seminars in Liver Disease*, 19, 95-102 (1999)); LY217896 (patente de EEUU 4.835.168) (Colacino *et al.*, *Antimicrobial Agents & Chemotherapy*, 34, 2156-2163 (1990)); y éster metílico del ácido 9-hidroxiimino-6-metoxi-1,4a-dimetil-1,2,3,4,4a,9,10,10a-octahidro-fenantren-1-carboxílico; clorhidrato del éster metílico del ácido 6-metoxi-1,4a-dimetil-9-(4-metilpiperazin-1-ilimino)-1,2,3,4,4a,9,10,10a-octahidro-fenantren-1-carboxílico; 1-(2-clorofenil)-3-(2,2-bifeniletil)urea (patente de EEUU 6.127.422).

Las formulaciones, las dosis y las vías de administración para las anteriores moléculas se indican en las referencias bibliográficas citadas a continuación, o son muy conocidas en la técnica según se describen, por ejemplo, en F.G. Hayden, en Goodman & Gilman's *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 9ª edición, Hardman *et al.*, eds., McGraw-Hill, Nueva York (1996), capítulo 50, pp. 1191-1223, y las referencias citadas allí. Como alternativa, cuando un compuesto que muestra actividad antivírica contra HCV, en particular actividad antivírica contra una cepa resistente a fármacos de HCV, se ha identificado, puede determinarse una cantidad farmacéuticamente eficaz del compuesto utilizando técnicas que son muy conocidas por los expertos en la técnica. Véase, por ejemplo, Benet *et al.*, en Goodman & Gilman's *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 9ª edición, Hardman *et al.*, eds., McGraw-Hill, Nueva York (1996), capítulo 1, pp. 3-27, y las referencias citadas allí. Así, las formulaciones, el intervalo de dosis y los regímenes de dosis apropiados de dicho compuesto pueden determinarse con facilidad mediante métodos habituales.

Las combinaciones de fármacos de la presente invención pueden proporcionarse a una célula o células, o a un paciente humano, en formulaciones farmacéuticamente aceptables separadas administradas de modo simultáneo o secuencial, en formulaciones que contienen más de un agente terapéutico, o mediante una diversidad de formulaciones de un solo agente y de múltiples agentes. Independientemente de la vía de administración, estas combinaciones de fármacos forman una cantidad anti-HCV eficaz de componentes de las formulaciones farmacéuticamente aceptables.

Un gran número de otros inmunomoduladores e inmunoestimulantes que pueden utilizarse en los métodos de la presente invención están disponibles en la actualidad e incluyen AA-2G; adamantilamida dipéptido; adenosina desaminasa, adyuvante de Enzon, Alliance; adyuvantes, Rib; adyuvantes, Vaxcel; Adjuvax; agelasfina-11; terapia del SIDA, Chiron; algal glucano, SRI; alganunulina, Anutech; Anginlyc; factores anticelulares, Yeda; Anticort; inmunógeno de antigestrina-17, Ap; sistema de administración de antígenos, Vac; formulación de antígenos, IDBC; inmunógeno de antiGnRH, Apton; Antiherpin; Arbidol; azarol; Bay-q-8939; Bay-r-1005; BCH-1393; Betafectin; Biostim; BL-001; BL-009; Broncostat; Cantastim; CDRI-84-246; cefodizima; inhibidores de quimioquinas, ICOS; péptidos de CMV, City of Hope; CN-5888; agente liberador de citoquinas, St; DHEAS, Paradigm; DISC TA-HSV; J07B; I01A; I01Z; ditiocarb sodio; ECA-10-142; ELS-1; endotoxina, Novartis; FCE-20696; FCE-24089; FCE-24578; ligando de FLT-3, Immunex; FR-900483; FR-900494; FR-901235; FTS-Zn; proteínas G, Cadus; gludapcina; glutaurina; glicofosfopeptical; GM-2; BM-53; GMDP; vacuna del factor del crecimiento, EntreM; H-BIG, NABI; H-CIG, NABI; HAB-439; vacuna de *Helicobacter pylori*; factor inmunológico específico del herpes; terapia del VIH, United Biomed; HyperGAM+CF; ImmuMax; Immu BCG; terapia inmunológica, Connective; inmunomodulador, Evans; inmunomoduladores, Novacell; imreg-1; imreg-2; Indomune; inosina pranobex; interferón, Dong-A (alfa2); interferón, Genentech (gamma); interferón, Novartis (alfa); interleuquina-12, Genetics Ins.; interleuquina-15, Immunex; interleuquina-16, Research Cor.; ISCAR-1; J005X; L-644257; ácido licomarasmínico; LipoTher; LK-409, LK-410; LP-2307; LT (R1926); LW-50020; MAF, Shionogi; derivados de MDP, Merck; met-enkefalina, TNI;

metilfurilbutirolactonas; MIMP; mirimostimo; vacunas bacterianas mixtas, Tem, MM-1; moniliasato; MPLA, Ribí; MS-705; murabutida; marabutida, Vacsyn; derivado de muramil dipéptido; derivados de muramil dipéptido mielopid; -563; NACOS-6; NH-765; NISV, Proteus; NPT-16416; NT-002; PA-485; PEFA-814; péptidos, Scios; peptidoglicano, Pliva; Perthon, Advanced Plant; derivado de PGM, Pliva; Pharmaprojects nº 1099; nº 1426; nº 1549; nº 1585; nº 1607; nº 1710; nº 1779; nº 2002; nº 2060; nº 2795; nº 3088; nº 3111; nº 3345; nº 3467; nº 3668; nº 3998; nº 3999; nº 4089; nº 4188; nº 4451; nº 4500; nº 4689; nº 4833; nº 494; nº 5217; nº 530; pidotimod; pimelautida; pinafida; PMD-589; podofilotoxina, Conpharm; POL-509; poli-ICLC; poli-ICLC, Yamasa Shoyu; poliA-poliU; polisacárido A; proteína A, Berlux Bioscience; PS34W0; MAb de *Pseudomonas*, Teijin; Psomaglobin; PTL-78419; Pyrexol; piriferona; Retrogen; Retropep; RG-003; Rhinostat; rifamaxilo; RM-06; Rollin; romurtida; RU-40555; RU-41821; anticuerpos de *Rubella*, ResCo; S-27649; SB-73; SDZ-280-636; SDZ-MRL953; SK&F-107647; SL04; SL05; SM-4333; Solutein; SRI-62-834; SRL-172; ST-570; ST-789; lisado de estafago; Stimulon; supresina; T-150R1; T-LCEF; tabilautida; temurtida; Theradigm-HBV; Theradigm-HSV; THF, Pharm & Upjohn; THF, Yeda; timalfasina; fracciones de la hormona tímica; timocartina; timolinofotrofina; timopentina; análogos de timopentina; timopentina, Peptech; fracción 5 de timosina, Alpha; timoestimulina; timotrinano; TMD-232; TO-115; factor de transferencia, Viragen; tuftsina, Selavo; ubenimex; Ulsastat; ANGG-; CD-4+; Collag+; COLSF+; COM+; DA-A+; GAST-; GF-TH+; GP-120-; IF+; IF-A+; IF-A-2+; IF-B+; IF-G+; IF-G-1B+; IL-2+; IL-15+; IM+; LHRH-; LIPCOR+L LYM-B+; LYM-NK+; LYM-T+; OPI+; PEP+; PHG-MA+; RNA-SYN-; SY-CW-; TH-A-I+; TH-5+; TNF+; UN.

Los compuestos de nucleósidos y nucleótidos representativos útiles en la presente invención incluyen, pero no se limitan a (+)-cis-5-fluoro-1-[2-(hidroximetil)-[1,3-oxatolano-5-il]citosina; (-)-2'-desoxi-3'-tiocitidin-5'-trifosfato (3TC); (-)-cis-5-fluoro-1-[2-(hidroximetil)-[1,3-oxatolano-5-il]citosina (FTC); (-)-2',3'-didesoxi-3'-tiacitidin[(-)-SddC]; 1-(2'-desoxi-2'-fluoro-beta-D-arabinofuranosil)-5-yodocitosina (FIAC); 1-(2'-desoxi-2'-fluoro-beta-D-arabinofuranosil)-5-yodocitosina trifosfato (FIACTP); 1-(2'-desoxi-2'-fluoro-beta-D-arabinofuranosil)-5-metiluracilo (FMAU); 1-beta-D-ribofuranosil-1,2,4-triazol-3-carboxamida; 2',3'-didesoxi-3'-fluoro-5-metildesoxicitidina (FddMeCyt); 2',3'-didesoxi-3'-cloro-5-metildesoxicitidina (ClddMeCyt); 2',3'-didesoxi-3'-amino-5-metildesoxicitidina (AddMeCyt); 2',3'-didesoxi-3'-fluoro-5-metilcitidina (FddMeCyt); 2',3'-didesoxi-3'-cloro-5-metilcitidina (ClddMeCyt); 2',3'-didesoxi-3'-amino-5-metilcitidina (AddMeCyt); 2',3'-didesoxi-3'-fluorotimidina (FddThd); 2',3'-didesoxi-beta-L-5-fluorotimidina (beta-L-FddC); 2',3'-didesoxi-beta-L-5-tiacitidina; 2',3'-didesoxi-beta-L-5-citidina (beta-L-ddC); 9-(1,3-dihidroxi-2-propoximetil)guanina; 2'-desoxi-3'-tia-5-fluorocitosina; 3'-amino-5-metildesoxicitidina (AddMeCyt); 2-amino-1,9-[[2-hidroximetil-1-(hidroximetil)etoxi]metil]-6H-purin-6-ona (ganciclovir); diacetato de 2-[2-(2-amino-9H-purin-9-il)etil]-1,3-propanilo (famciclovir); 2-amino-1,9-dihidro-9-[[2-hidroxietoxi]metil]-6H-purin-6-ona (aciclovir); 9-(4-hidroxi-3-hidroximetilbut-1-il)guanina (penciclovir); diacetato de 9-(4-hidroxi-3-hidroximetilbut-1-il)-6-desoxiguanina (famciclovir); 3'-azido-3'-desoxitimidina (AZT); 3'-cloro-5-metildesoxicitidina (ClddMeCyt); 9-(2-fosfonilmetoxietil)-2',6'-diaminopurin-2'-3'-didesoxirribosida; 9-(2-fosfonilmetoxietil)adenina (PMEA); aciclovir trifosfato (ACVTP); D-carbocíclico-2'-desoxiguanosina (CdG); didesoxicitidina; didesoxicitosina (ddC); didesoxiguanina (ddG); didesoxiinosina (ddl); E-5-(2-bromovinil)-2'-desoxiuridina trifosfato; fluoroarabinofuranosilyodouracilo; 1-(2'-desoxi-2'-fluoro-1-beta-D-arabinofuranosil)-5-yodouracilo (FIAU); estavudina; 9-beta-D-arabinofuranosil-9H-purin-6-amina monohidrato (Ara-A); 9-beta-D-arabinofuranosil-9H-purin-6-amina-5'-monofosfato monohidrato (Ara-AMP); 2-desoxi-3'-tia-5-fluorocitidina; 2',3'-didesoxiguanina; y 2',3'-didesoxiguanosina.

Los métodos sintéticos para la preparación de nucleósidos y nucleótidos útiles en la presente invención son muy conocidos en la técnica, según se describe en Acta Biochim Pol., 43, 25-36 (1996); Swed. Nucleosides Nucleotides, 15, 361-3678 (1996); Synthesis, 12, 1465-1479 (1995); Carbohydr. Chem., 27, 242-276 (1995); Chena Nucleosides Nucleotides, 3, 421-535 (1994); Ann. Reports in Med. Chem., Academic Press; y Exp. Opin. Invest. Drugs, 4, 95-115 (1995).

Las reacciones químicas descritas en las referencias citadas anteriormente se describen en general en términos de su aplicación más amplia para la preparación de los compuestos de esta invención. A veces las reacciones pueden no ser aplicables según se describen para cada compuesto incluido dentro del alcance de los compuestos descritos en la presente. Los compuestos en los que esto sucede serán reconocidos con facilidad por los expertos en la técnica. En todos estos casos, las reacciones pueden realizarse con éxito mediante modificaciones convencionales conocidas por los expertos en la técnica, por ejemplo, mediante la protección apropiada de grupos implicados, cambiando a reactivos convencionales alternativos, mediante modificación habitual de las condiciones de reacción, y similares, o podrán aplicarse otras reacciones descritas en la presente o por lo demás convencionales para la preparación de los correspondientes compuestos de esta invención. En todos los métodos preparativos, todos los materiales de partida son conocidos o pueden ser preparados con facilidad a partir de materiales de partida conocidos.

Aunque en general se emplean análogos de nucleósidos como agentes antivíricos, a veces los nucleótidos (nucleósidos fosfato) deben convertirse en nucleósidos para facilitar su transporte a través de las membranas celulares. Un ejemplo de un nucleótido químicamente modificado capaz de entrar en las células es S-1-3-hidroxi-2-fosfonilmetoxipropilcitosina (HPMPC, Gilead Sciences). Los compuestos de nucleósidos y nucleótidos utilizados en esta invención que son ácidos pueden formar sales. Los ejemplos incluyen sales con metales alcalinos o metales alcalinotérreos, tales como sodio, potasio, calcio, o magnesio, o sales con bases orgánicas o sales de amonio cuaternario básicas.

Los expertos en la técnica también pueden querer administrar un inhibidor de la citocromo P450 monooxigenasa.

Estos inhibidores pueden ser útiles para aumentar las concentraciones hepáticas y/o aumentar los niveles sanguíneos de los compuestos que son inhibidos por el citocromo P450.

Si una realización de esta invención implica un inhibidor de CYP, puede utilizarse cualquier inhibidor de CYP que mejore la farmacocinética de la proteasa NS3/4A pertinente, en un método de esta invención. Estos inhibidores de CYP incluyen, pero no se limitan a ritonavir (documento WO 94/14436), cetoconazol, troleandomicina, 4-metilpirazol, ciclosporina, clometiazol, cimetidina, itraconazol, fluconazol, miconazol, fluvoxamina, fluoxetina, nefazodona, sertralina, indinavir, nelfinavir, amprenavir, fosamprenavir, saquinavir, lopinavir, delavirdina, eritromicina, VX-944, y VX-497. Los inhibidores de CYP preferidos incluyen ritonavir, cetoconazol, troleandomicina, 4-metilpirazol, ciclosporina, y clometiazol. Para las formas de dosificación preferidas del ritonavir, véase la patente de EEUU 6.037.157, y los documentos citados allí: patente de EEUU 5.484.801, solicitud de EEUU 08/402.690, y solicitudes internacionales WO 95/07696 y WO 95/09614.

Se conocen métodos para medir la capacidad de un compuesto para inhibir la actividad citocromo P50 monooxigenasa (véase el documento US 6.037.157, y Yun *et al.*, Drug Metabolism & Disposition, vol. 21, pp. 403-407 (1993)).

Pueden administrarse inmunomoduladores, inmunoestimulantes y otros agentes útiles en los métodos de terapia de combinación de la presente invención, en cantidades menores que las convencionales en la técnica. Por ejemplo, el interferón alfa se administra generalmente a seres humanos para el tratamiento de infecciones por HCV en una cantidad de aproximadamente 1×10^6 unidades/persona tres veces semanales a aproximadamente 10×10^6 unidades/persona tres veces semanales (Simon *et al.*, Hepatology, 25:445-448 (1997)). En los métodos y las composiciones de la presente invención, esta dosis puede estar en el intervalo de aproximadamente $0,1 \times 10^6$ unidades/persona tres veces semanales a aproximadamente $7,5 \times 10^6$ unidades/persona tres veces semanales; más preferiblemente, de aproximadamente $0,5 \times 10^6$ unidades/persona tres veces semanales a aproximadamente 5×10^6 unidades/persona tres veces semanales; lo más preferiblemente, de aproximadamente 1×10^6 unidades/persona tres veces semanales a aproximadamente 3×10^6 unidades/persona tres veces semanales. Debido a la mayor eficacia antivírica contra el virus de la hepatitis C de los inmunomoduladores, los inmunoestimulantes u otros agentes anti-HCV en presencia de los inhibidores de serina proteasas de HCV de la presente invención, pueden emplearse cantidades reducidas de estos inmunomoduladores/inmunoestimulantes en los métodos de tratamiento y las composiciones contemplados en la presente. De manera similar, debido a la mayor eficacia antivírica contra el virus de la hepatitis C de los presentes inhibidores de serina proteasas de HCV en presencia de inmunomoduladores e inmunoestimulantes, pueden emplearse cantidades reducidas de estos inhibidores de serina proteasas de HCV en los métodos y las composiciones contemplados en la presente. Estas cantidades reducidas pueden ser determinadas mediante el control normal de las titulaciones del virus de la hepatitis C en paciente infectados que están sometidos a terapia. Esto puede realizarse, por ejemplo, controlando el ARN de HCV en el suero del paciente mediante técnicas de transferencia por ranuras, transferencia por puntos, o RT-PCR, o midiendo los antígenos de la superficie de HCV u otros antígenos. De modo similar, los pacientes pueden controlarse durante la terapia de combinación empleando los inhibidores de serina proteasas de HCV descritos en la presente y otros compuestos que tengan actividad anti-HCV, por ejemplo, agentes antivíricos de nucleósidos y/o nucleótidos, para determinar las dosis eficaces menores de cada uno cuando se emplean en combinación.

En los métodos de terapia de combinación descritos en la presente, pueden administrarse compuestos antivíricos de nucleósidos o nucleótidos, o sus mezclas, a seres humanos en una cantidad en el intervalo de aproximadamente 0,1 mg/persona/día a aproximadamente 500 mg/persona/día; preferiblemente de aproximadamente 10 mg/persona/día a aproximadamente 300 mg/persona/día; más preferiblemente de aproximadamente 25 mg/persona/día a aproximadamente 200 mg/persona/día; aún más preferiblemente, de aproximadamente 50 mg/persona/día a aproximadamente 150 mg/persona/día; y lo más preferiblemente, en el intervalo de aproximadamente 1 mg/persona/día a aproximadamente 50 mg/persona/día.

Las dosis de los compuestos pueden administrarse a un paciente en una sola dosis o en dosis proporcionadas. En este último caso, las composiciones de unidad de dosificación pueden contener unas cantidades de submúltiplos de esta de modo que se forme la dosis diaria. La dosis múltiple diaria también puede ser mayor que la dosis diaria total, si la persona que receta el fármaco así lo desea.

El régimen para tratar a un paciente que padece una infección por HCV con los compuestos y/o las composiciones de la presente invención se selecciona según una diversidad de factores, incluyendo la edad, el peso, el sexo, la dieta y la condición médica del paciente, la gravedad de la infección, la vía de administración, según consideraciones farmacológicas, tales como la actividad, la eficacia, la farmacocinética y los perfiles toxicológicos de los compuestos concretos empleados, y si se utiliza un sistema de transporte del fármaco. La administración de combinaciones de fármacos descrita en la presente en general se continuará a lo largo de un periodo de varias semanas a varios meses o años, hasta que las titulaciones del virus alcancen unos niveles aceptables, lo cual indica que la infección ha sido controlada o erradicada. Los pacientes que están sometidos a un tratamiento con las combinaciones de fármacos descritas en la presente pueden controlarse de modo habitual midiendo el ARN del virus de la hepatitis en el suero del paciente mediante técnicas de transferencia por ranuras, transferencia por puntos, o RT-PCR, o midiendo los antígenos del virus de la hepatitis C, tales como antígenos de la superficie, en el suero para determinar la eficacia de la terapia. El análisis continuo de los datos obtenidos mediante estos métodos permite la

modificación del régimen de tratamiento durante la terapia, de modo que pueden administrarse las cantidades óptimas de cada componente en la combinación, y así también puede determinarse la duración del tratamiento. Así, el programa de régimen de tratamiento/dosificación puede modificarse de modo racional a lo largo de la terapia para administrar las menores cantidades de cada uno de los compuestos antivíricos utilizados en combinación que juntos muestran una eficacia anti-virus de la hepatitis C satisfactoria, y de modo que la administración de dichos compuestos antivíricos en combinación continúe sólo hasta sea necesario para tratar con éxito la infección.

La presente invención incluye el uso de los inhibidores de serina proteasas de HCV descritos en la presente en diversas combinaciones con los tipos de compuestos anteriores o similares que tienen actividad anti-HCV para tratar o prevenir infecciones por HCV en pacientes, en particular en pacientes que tienen infecciones por HCV que han desarrollado resistencia al tratamiento con VX-950 y otros inhibidores de proteasas convencionales. Por ejemplo, uno o más inhibidores de serina proteasas de HCV pueden utilizarse en combinación con uno o más interferones o derivados de interferón que tienen actividad anti-HCV; uno o más compuestos que no son interferones que tienen actividad anti-HCV; o uno o más interferones o derivados de interferón que tienen actividad anti-HCV y uno o más compuestos que no son interferones que tienen actividad anti-HCV. Cuando se utilizan en combinación para tratar o prevenir una infección por HCV en un paciente humano, cualquiera de los inhibidores de serina proteasas de HCV descritos en la presente y los anteriores compuestos que tienen actividad anti-HCV pueden estar presentes en una cantidad farmacéuticamente eficaz o anti-HCV eficaz. En virtud de sus efectos aditivos o sinérgicos, cuando se emplean las combinaciones descritas anteriormente, cada una también puede estar presente en una cantidad subclínica farmacéuticamente eficaz o anti-HCV eficaz, es decir, una cantidad que, si se emplea sola, proporciona menos eficacia farmacéutica para inhibir completamente o reducir la acumulación de viriones de HCV y/o para reducir o mejorar los trastornos o los síntomas asociados con la patogénesis o la infección por HCV en pacientes, comparado con dichos inhibidores de serina proteasas de HCV y compuestos que tienen actividad anti-HCV cuando se usan en cantidades farmacéuticamente eficaces. Además, la presente invención comprende el uso de combinaciones de inhibidores de serina proteasas de HCV y compuestos que tienen actividad anti-HCV, según se describió anteriormente, para tratar o prevenir infecciones por HCV, en las que uno o más de estos inhibidores o compuestos está presente en una cantidad farmacéuticamente eficaz, y el otro u otros están presentes en una cantidad subclínica farmacéuticamente eficaz o anti-HCV eficaz, debido a sus efectos aditivos o sinérgicos. Tal como se emplea en la presente, la expresión "efecto aditivo" describe el efecto combinado de dos (o más) agentes farmacéuticamente activos que es igual a la suma del efecto de cada agente administrado por sí solo. Un efecto sinérgico se produce cuando el efecto combinado de dos (o más) agentes farmacéuticamente activos es mayor que la suma del efecto de cada agente administrado por sí solo.

Tras mejorar la condición de un paciente, puede administrarse una dosis de mantenimiento de un compuesto, una composición o una combinación de la invención, si es necesario. Después puede reducirse la dosificación o la frecuencia de la administración, o ambas, en función de los síntomas, hasta un nivel en el que la condición mejorada se mantiene. Cuando los síntomas se han aliviado hasta el nivel deseado, el tratamiento debe cesar. Sin embargo, los pacientes pueden requerir un tratamiento intermitente a largo plazo si vuelven a aparecer síntomas de la enfermedad.

Debe entenderse que la dosificación y el régimen de tratamiento específicos para cualquier paciente concreto dependerán de una diversidad de factores, incluyendo la actividad del compuesto específico empleado, la edad, el peso corporal, la salud general, el sexo, la dieta, el momento de la administración, la velocidad de excreción, la combinación de fármacos, y el criterio del médico encargado, y la gravedad de la enfermedad concreta que se está tratando. La cantidad de los ingredientes activos también dependerá del compuesto particular descritos, y de la presencia o la ausencia y la naturaleza del agente antivírico adicional en la composición.

Según otra realización, la invención proporciona un método para tratar un paciente infectado por un virus que se caracteriza por una serina proteasa codificada por el virus que es necesaria para el ciclo vital del virus, administrando a dicho paciente una composición farmacéuticamente aceptable de esta invención. Preferiblemente, los métodos de esta invención se emplean para tratar a un paciente que padece una infección por HCV. Este tratamiento puede erradicar completamente la infección vírica o reducir su gravedad. Más preferiblemente, el paciente es un ser humano.

En una realización alternativa, los métodos de esta invención comprenden además la etapa de administrar a dicho paciente un agente antivírico, preferiblemente un agente anti-HCV. Estos agente antivíricos incluyen, pero no se limitan a agentes inmunomoduladores, tales como α -, β - y γ -interferones, compuestos de α -interferón derivatizados pegilados, y timosina; otros agentes antivíricos, tales como ribavirina, y amantadina; otros inhibidores de proteasas de la hepatitis C (inhibidores de NS2-NS3 e inhibidores de NS3-NS4A); inhibidores de otras dianas en el ciclo vital del HCV, incluyendo inhibidores de helicasa y polimerasa; inhibidores de la entrada de ribosomas interna; inhibidores víricos de amplio espectro, tales como inhibidores de IMPDH (por ejemplo, VX-497 y otros inhibidores de IMPDH descritos en la patente de EEUU 5.807.876, ácido micofenólico y sus derivados); o combinaciones de cualquiera de los anteriores.

Este agente adicional puede administrarse a dicho paciente como parte de una forma de dosificación individual que comprende un compuesto de esta invención y un agente antivírico adicional. Como alternativa, el agente adicional puede administrarse por separado del compuesto de esta invención, como parte de una forma de dosificación múltiple,

en la que dicho agente adicional se administra antes, al mismo tiempo o después de una composición que comprende un compuesto de esta invención.

5 En otra realización, la presente invención proporciona un método para pretratar una sustancia biológica prevista para la administración a un paciente, que comprende la etapa de poner en contacto dicha sustancia biológica con una composición farmacéuticamente aceptable que comprende un compuesto de esta invención. Estas sustancias biológicas incluyen, pero no se limitan a sangre y sus componentes, tales como plasma, plaquetas, subpoblaciones de células sanguíneas y similares; órganos, tales como riñones, hígado, corazón, pulmón, etc.; esperma y huevos; médula ósea y sus componentes, y otros fluidos que vayan a ser infundidos al paciente, tales como disolución salina, dextrosa, etc.

10 Según otra realización, la invención proporciona métodos para tratar materiales que potencialmente pueden ponerse en contacto con un virus que se caracteriza por una serina proteasa codificada por el virus que es necesaria para su ciclo vital. Este método comprende la etapa de poner en contacto dicho material con un compuesto según la invención. Estos materiales incluyen, pero no se limitan a instrumentos y prendas quirúrgicos; instrumentos y prendas de laboratorio; aparatos y materiales para la recogida de sangre; y dispositivos invasivos, tales como
15 implantes de bypass, de estenosis, etc.

En otra realización, los compuestos de esta invención pueden utilizarse como herramientas de laboratorio para ayudar a aislar una serina proteasa codificada por un virus. Este método comprende las etapas de proporcionar un compuesto de esta invención unido a un soporte sólido; poner en contacto dicho soporte sólido con una muestra que
20 contiene una serina proteasa vírica bajo condiciones que provoquen que dicha proteasa se una a dicho soporte sólido; y eluir dicha serina proteasa de dicho soporte sólido. Preferiblemente, la serina proteasa vírica aislada mediante este método es la proteasa NS3-NS4A de HCV. Más en concreto, es una proteasa NS3-NS4A de HCV mutante que es resistente al tratamiento con VX-905 y/o BILN 2061, según se describe en la presente. Los ejemplos de dichas proteasas incluyen los descritos en la presente que tienen restos mutantes (es decir, no son de tipo salvaje) en las posiciones 156 y/o 168 de una proteína de SEQ ID NO:2.

25 Tal como se emplea en la presente, a menos que se indique lo contrario, el término "comprende" y sus variaciones indican la inclusión del elemento mencionado, pero no la exclusión de cualquier otro elemento.

Pueden utilizarse las técnicas habituales que son conocidas por los expertos en la técnica en la práctica de esta invención. Estas técnicas pueden encontrarse en documentos publicados. Por ejemplo, la técnicas de ADN recombinante y de clonación molecular convencionales son muy conocidas en la técnica. Véase, por ejemplo, F.M. Ausubel, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc., Media, PA; Sambrook, J., Fritsch, E.F., y Maniatis, T., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 1989, y los documentos bibliográficos citados en las patentes de EEUU 6.617.156 y 6.617.130.

Ejemplos

35 Para entender mejor la invención, se ofrecen los siguientes ejemplos preparativos y de ensayo. Los siguientes ejemplos se incluyen para demostrar ciertas realizaciones preferidas de la invención. Los expertos en la técnica apreciarán que las técnicas descritas en los siguientes ejemplos representan técnicas descubiertas por el inventor que funcionan bien en la práctica de la invención y, por tanto, puede considerarse que constituyen modos preferidos para la práctica. Sin embargo, los expertos en la técnica, a la luz de la presente descripción, deberían apreciar que pueden realizarse muchos cambios en las realizaciones específicas que se describen y todavía obtener un resultado
40 similar sin apartarse del alcance de la invención.

Ejemplo 1: Construcción de plásmidos

Se obtuvo un fragmento de ADN que codifica los restos Ala¹-Ser¹⁸¹ de la proteasa NS3 de HCV (GenBank CAB46913) mediante PCR a partir del plásmido con replicones de Con1 HCV, I₃₇₇neo/NS3-3'/wt (renombrado como pBR322-HCV-Neo en este estudio) [V. Lohmann *et al.*, *Science*, 285, pp. 110-113 (1999)] y se inserta en pBEV11
45 (S. Chamber *et al.*, comunicación personal) para la expresión de las proteínas de HCV con una cola de hexahistidina C-terminal en *E. coli*. Se introdujeron mutaciones de resistencia contra el PI de NS3/4A de HCV en esta construcción mediante mutagénesis dirigida específica de sitio basada en PCR. Para generar el replicón de HCV que contenía las mutaciones resistentes a PI, se subclonó un fragmento HindIII/BstXI de 1,2 kb derivado del replicón de Con1 HCV en un vector de clonación TA, pCR2.1 (Invitrogen). Las mutaciones resistentes a PI en el dominio de la serina proteasa
50 NS3 se introdujeron en el vector pCR2.1 que contenía el fragmento HindIII/BstXI de HCV mediante PCR, y se subclonó un fragmento BsrGI/BstXI de 579 pb que contenía el resto mutado de nuevo en un plásmido con replicones de Con1 de segunda generación que contenía tres mutaciones adaptativas, pBR322-HCV-Neo-mADE (véase a continuación). Todas las construcciones se confirmaron mediante secuenciación.

Ejemplo 2: Generación de células con replicones de HCV

55 El plásmido con replicones subgenómicos de Con1 pBR322-HCV-Neo [Lohmann *et al.*, *Science*, 285, pp. 110-113 (1999)] se digirió con Scal (New England Biolabs). Se generó ARN de replicón subgenómico de HCV de longitud completa a partir del molde de ADN linealizado utilizando un kit T7 Mega-script (Ambion) y se trató con ADNasa para

eliminar el ADN molde. Los transcritos de ARN de salida se electroporaron en células Huh-7 y se seleccionaron líneas celulares con replicones de HCV estables con 0,25 o 1 mg por ml de G418 (Geneticin) en medio esencial mínimo modificado de Dulbecco (DMEM) que contenía suero bovino fetal (FBS) al 10%. Las células con replicones de HCV estables se mantuvieron en DMEM, FBS al 10%, y 0,25 mg por ml de G418.

5 Durante el desarrollo de la generación de las líneas celulares estables con replicones subgenómicos de HCV, se identificaron varios patrones diferentes de mutaciones adaptativas. Un patrón tenía tres sustituciones en las proteínas no estructurales de HCV, que se introdujeron en el plásmido pBR322-HCV-Neo original mediante mutagénesis dirigida específica de sitio para generar un plásmido con replicones subgenómicos de segunda generación, pBR322-HCV-Neo-mADE. Cuando los transcritos de ARN de salida de T7 procedentes del plásmido
10 pBR322-HCV-Neo-mADE linealizado con Scal se electroporaron en células Huh7, se formaron colonias de células con replicones estables con una eficacia mucho mayor que con el ARN de replicones de Con1 original. Las mutaciones de resistencia identificadas en este estudio se introdujeron en el plásmido con replicones pBR322-HCV-Neo-mADE mediante mutagénesis dirigida específica de sitio. Se generaron líneas celulares con replicones estables utilizando los transcritos de T7 derivados de pBR322-HCV-Neo-mADE de tipo salvaje o de los que tienen las
15 mutaciones de resistencia.

Ejemplo 3: Protocolo de ensayo de células con replicones de HCV

Se mantuvieron células que contenían replicones del virus de la hepatitis C (HCV) en DMEM que contenía suero bovino fetal (FBS) al 10%, 0,25 mg por ml de G418, con los suplementos apropiados (medio A).

20 En el día 1, la monocapa de células con replicones se trató con una mezcla de tripsina:EDTA, se retiró, y luego se diluyó medio A hasta una concentración final de 100.000 células por ml. Se cultivaron 10.000 células en 10 ul en cada pocillo de una placa de cultivo de tejidos de 96 pocillos, y se cultivó durante la noche en un incubador de cultivos de tejidos a 37 °C.

25 En el día 2, los compuestos (en DMSO al 100%) se diluyeron en serie en DMEM que contenía FBS al 2%, DMSO al 0,5%, con suplementos apropiados (medio B). La concentración final de DMSO se mantuvo a 0,5% a lo largo de la serie de dilución.

Se retiró el medio de la monocapa de células con replicones, y después se añadió medio B que contenía diversas concentraciones de compuestos. Se añadió medio B sin compuesto a otros pocillos como controles sin compuesto.

30 Las células se incubaron con compuesto o DMSO al 0,5% en medio B durante 48 horas en un incubador de cultivo de tejidos a 37 °C. Al final de la incubación de 48 horas, el medio se retiró y la monocapa de células con replicones se lavó una vez con PBS y se conservó a -80 °C antes de la extracción del ARN.

35 Las placas de cultivo con monocapas de células con replicones tratadas se descongelaron, y se añadió una cantidad fija de ARN de otro virus, tal como el virus de la diarrea vírica bovino (BVDV), a las células en cada pocillo. Se añadieron reactivos de extracción de ARN (tales como reactivos de kits RNeasy) a las células inmediatamente para evitar la degradación del ARN. El ARN total se extrajo según las instrucciones del fabricante con modificaciones para mejorar la eficacia y la uniformidad de extracción. Por último, el ARN celular total, incluyendo el ARN de replicones de HCV, se eluyó y se conservó a -80 °C hasta su posterior procesamiento.

40 Se constituyó un ensayo de cuantificación de RT-PCR a tiempo real Taqman con dos conjuntos de sondas y cebadores específicos. Uno correspondía a HCV y el otro a BVDV. Se añadieron los extractantes de ARN total de las células con replicones de HCV tratadas a las reacciones de PCR para la cuantificación del ARN de HCV y BVDV en el mismo pocillo de PCR. Se marcaron los fallos experimentales y se rechazaron basándose en el nivel de ARN de BVDV en cada pocillo. Se calculó el nivel de ARN de HCV en cada pocillo según un ensayo de curva patrón en la misma placa de PCR. El porcentaje de inhibición o disminución del nivel de ARN de HCV debido al tratamiento con el compuesto se calculó utilizando DMSO o control sin compuesto como 0% de inhibición. Se midió la citotoxicidad de los compuestos utilizando un ensayo de viabilidad celular basado en enzimas mitocondriales, CellTiter 96
45 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega). Se calcularon los valores de CI_{50} (concentración en la que se observa 50% de inhibición del nivel de ARN de HCV) y CC_{50} (concentración en la que se observa 50% de reducción de la viabilidad celular) a partir de la curva de titulación de cualquier compuesto dado utilizando un ajuste de curva de cuatro parámetros (SoftMax Pro).

Ejemplo 4: Selección de células con replicones de HCV resistentes a PI

50 Las células con replicones subgenómicos de Con1 HCV estables se transfirieron en serie en presencia de G418 0,25 mg por ml, y concentraciones lentamente crecientes de VX-950 (serie A), BILN 2061 (serie B), o una combinación de VX-950 y BILN 2061 (serie C, D y E). Las concentraciones de VX-950 varían de 3,5 μ M (o 10x CI_{50}) en el ensayo de 48 horas (véase anteriormente) a 28 μ M (80x CI_{50}). Para BILN 2061, la concentración de partida fue de 80 nM (80x CI_{50}), y la concentración final fue de 12,5 μ M (12.500x CI_{50}). Durante el desarrollo de la selección, las
55 células con replicones se dividieron dos veces cada semana cuando se alcanzaba una confluencia del 70-90%. Se añade PI de HCV fresco cada 3 a 4 días independientemente de haber dividido o no el cultivo celular.

Ejemplo 5: Identificación de mutaciones de resistencia a PI de HCV

Durante la selección de células con replicones resistentes a PI de HCV se recogieron sedimentos celulares cada vez que se dividió el cultivo celular. Se extrajo el ARN celular total utilizando el kit de minipreparación RNeasy (Qiagen). Se amplificó un fragmento de ADNc con una longitud de 1,7 kb que incluye la región de la serina proteasa NS3 de HCV, con una pareja de oligonucleótidos específicos de HCV (5'-CCTTCTATCGCCTTCTTG-3' (SEQ ID NO:3) y 5'-CTTGATGGTCTCGATGG-3' (SEQ ID NO:4)) utilizando el kit de RT-PCR Titan One-Step (Roche Applied Science). Los productos amplificados se purificaron utilizando el kit de purificación de PCR QIA-quick (Qiagen). Para controlar el surgimiento de las mutaciones relacionados con PI de HCV en el dominio de la serina proteasa NS3 de HCV durante la selección, los productos de RT-PCR de 1,7 kb purificados de replicones tratados con PI procedentes de diferentes momentos del cultivo se sometieron a la determinación de la secuencia. Para determinar la frecuencia de mutaciones resistentes a PI, los productos de la RT-PCR de 1,7 kb del ARN de HCV de las células con replicones resistentes a VX-950 o BILN 2061 se acoplaron en el vector de clonación TA pCR2.1 (Invitrogen). Para cada momento del tiempo, se aislaron múltiples colonias bacterianas individuales y se secuenció la región codificadora de la proteasa NS3 de HCV del ADN plasmídico purificado.

Ejemplo 6: Expresión y purificación del dominio de serina proteasa NS3 de HCV

Cada una de las construcciones de expresión para el dominio de serina proteasa NS3 de HCV que contenía la secuencia de tipo salvaje o las mutaciones de resistencia (A156S, D168V, o D168A) se transformó en células de *E. coli* BL21/DE3 pLysS (Stratagene). Las células recién transformadas se cultivaron a 37 °C en medio BHI (Difco Laboratories) suplementado con 100 µg por ml de carbenicilina y 35 µg por ml de cloranfenicol hasta una densidad óptica de 0,75 a 600 nm. Se realizó una inducción con IPTG 1 mM durante cuatro horas a 24 °C. Las pastas celulares se recogieron mediante centrifugación y se congelaron instantáneamente a -80 °C antes de la purificación de las proteínas. Todas las etapas de purificación se realizaron a 4 °C. Para cada una de las proteasas NS3 de HCV se lisaron 100 g de la pasta celular en 1,5 l de tampón A (HEPES 50 mM (pH 8,0), NaCl 300 mM, n-octil-β-D-glucopiranosido al 0,1%, β-mercaptoetanol 5 mM, glicerol al 10% (en v/v)) y se agitó durante 30 min. Los lisados se homogeneizaron utilizando un microfluidificador (Microfluidics, Newton, MA), seguido de una ultracentrifugación a 54.000 x g durante 45 min. Se añadió imidazol a los sobrenadantes hasta una concentración final de 5 mM, junto con 2 ml de resina de Ni-NTA preequilibrada con el tampón A que contenía imidazol. Las mezclas se agitaron con balanceo durante tres horas y se lavaron con 20 volúmenes de columna de tampón A más imidazol 5 mM. Las mezclas se agitaron con balanceo durante tres horas y se lavaron con 20 volúmenes de columna de tampón A más imidazol 5 mM. Las proteínas NS3 de HCV se eluyeron en tampón A que contenía imidazol 300 mM. Los eluatos se concentraron y se cargaron en una columna Hi-Load 16/60 Superdex 200, preequilibrada con tampón A. Las fracciones apropiadas de las proteínas de HCV purificadas se reunieron y se conservaron a -80 °C.

Ejemplo 7: Ensayos enzimáticos para el dominio de serina proteasa NS3 de HCV*A. Protocolo de ensayo enzimático con HPLC*Método de HPLC Microbore para la separación del sustrato 5AB y los productos**Sustrato:**

NH₂-Glu-Asp-Val-Val-(alfa)Abu-Cys-Ser-Met-Ser-Tyr-COOH

Se preparó una disolución madre de 5AB 20 mM (o la concentración que se elija) en DMSO/DTT 0,2 M. Esto se conservó en partes alícuotas a -20 °C.

Tampón: HEPES 50 mM, pH 7,8, glicerol al 20%, NaCl 100 mM

El volumen total de ensayo fue de 100 µl.

	µl de XI	Conc. en el ensayo
Tampón	86,5	véase anteriormente
KK4A 5 mM	0,5	25 µM
DTT 1 M	0,5	5 mM
DMSO o inhibidor	2,5	al 2,5% en v/v
tNS3 50 µM	0,05	25 nM
5AB 250 µM (inicial)	20	25 µM

Se reunieron el tampón, KK4A, DTT y tNS3, y se distribuyeron 78 µl en cada uno de los pocillos de una placa de 96

pocillos. Esto se incubó a 30 °C durante aproximadamente 5-10 mn.

Se disolvieron 2,5 µl de la concentración apropiada del compuesto de ensayo en DMSO (sólo DMSO para el control) y se añadió a cada pocillo. Esto se incubó a temperatura ambiente durante 15 min.

- 5 La reacción se inició mediante la adición de 20 µl de sustrato 5AB 250 µM (una concentración de 25 µM es equivalente o ligeramente inferior que la Km para 5AB). La reacción se incubó durante 20 min a 30 °C y después se terminó mediante la adición de 25 µl de TFA al 10%. Se trasladaron partes alícuotas de 120 µl del producto final de la reacción a viales de HPLC. El producto de SMSY se separó del sustrato y KK4A mediante el siguiente método:

Método de separación Microbore:

- 10 **Intrumento: Agilent 1100.** Desgasificador G1322A; bomba binaria G1312A; automuestreador G1313A; cámara termostatazada de la columna G1316A; detector de matriz de diodos G1315A.

Columna: Phenomenex Jupiter, C18 de 5 micrómetros, 300 angstroms, 150 x 2 mm, P/O 00F-4053-B0; termostato de la columna, 40 °C; volumen de inyección, 100 µl; disolvente A = agua de calidad HPLC + TFA al 0,1%; disolvente B = acetonitrilo de calidad HPLC + TFA al 0,1%.

Tiempo (min)	% de B	Flujo (ml/min)	Pres. máxima
0	5	0,2	400
12	60	0,2	400
13	100	0,2	400
16	100	0,2	400
17	5	0,2	400
Tiempo de detención: 17 min			
Tiempo después del ensayo: 10 min			

B. Protocolo de ensayo enzimático FRET

- 15 Se determinó la actividad enzimática utilizando una modificación del ensayo descrito por Taliani *et al.* [Taliani *et al.*, Anal. Biochem., 240, pp. 60-67 (1996)]. Se adquirió un péptido fluorogénico internamente extinguido (sustrato FRET), Ac-DED(EDANSE)EE α bu ψ [COO]ASK(DABCYL)-NH₂, de AnaSpec Incorporated (San José, CA). El ensayo se realizó en un modo continuo en un formato de placa de microtitulación de 96 pocillos. El tampón estaba compuesto de HEPES 50 mM (pH 7,8), NaCl 100 mM, glicerol al 20%, DTT 5 mM, y péptido KK4A 25 µM
- 20 (KKGSVVIVGRIVLSGK, SEQ ID NO:5). El péptido KK4A representa la región central del cofactor de NS4A procedente del genotipo 1a con restos lisina añadidos para mejorar la solubilidad [Landro *et al.*, Biochemistry, 36, pp. 9340-9348 (1997)]. La reacción se inició mediante la adición del sustrato FRET después de una preincubación de 10 min de los componentes del tampón con 2 nM de la proteasa NS3 a temperatura ambiente. La reacción se controló a 30 °C durante 20 min utilizando un lector de placas fluorométrico de fmax Molecular Devices. Los filtros para las
- 25 longitudes de onda de excitación y de emisión fueron de 355 nm y 495 nm, respectivamente. Para la determinación de los parámetros cinéticos del sustrato, las concentraciones del péptido FRET variaron de 0,5-7,0 µM. No se observó extinción intermolecular en este intervalo. Los parámetros cinéticos del sustrato, Km y Vmax, se determinaron ajustando los datos a la ecuación de Michaelis-Menten. Se determinaron las constantes de inhibición (Ki) mediante la titulación de la actividad enzimática utilizando el ensayo descrito anteriormente, excepto que el
- 30 compuesto disuelto en DMSO (no más de DMSO al 2% en v/v; se utilizó como control el disolvente por sí solo) se añadió a los componentes del tampón y enzima después de la preincubación inicial de 10 min según se describió anteriormente. Esta mezcla se incubó durante 15 min más a temperatura ambiente antes de una incubación con el sustrato FRET durante 20 min más a 30 °C. Se ensayaron de siete a ocho concentraciones del compuesto, y los datos resultantes se ajustaron a la forma integrada de la ecuación de Morrison para la inhibición de la unión fuerte
- 35 [J.F. Morrison, Biochim. Biophys. Acta, 185, pp. 269-286 (1969)]. Todos los datos del sustrato y del inhibidor se ajustaron utilizando una regresión no lineal de Marquardt-Levenberg con el programa informático GraphPad Prism.

Ejemplo 8: Desarrollo de resistencia a VX-950 en células con replicones de HCV

- 40 VX-950 (figura 4A, estructura química) es un candidato clínico para el tratamiento de la hepatitis C. VX-950 es un inhibidor covalente y reversible de la serina proteasa NS3/4A de HCV. Aunque es competitivo con el sustrato peptídico en el sitio activo, muestra una inhibición no competitiva aparente como resultado de sus propiedades de unión fuerte y mecanismo de inhibición dependiente del tiempo (C. Gates y Y.-P. Luong). La incubación de células con replicones subgenómicos de Con1 HCV con VX-950 produce una disminución dependiente de la concentración del nivel de ARN de HCV, según se mide mediante el método de RT-PCR a tiempo real (Taqman) (figura 5B). El

valor de CI50 de VX-950 es de 354 nM en el ensayo de 48 horas.

Para identificar las mutaciones de resistencia a VX-950, las células con replicones subgenómicos de Con1 se transfirieron en serie (es decir, se subcultivaron) en presencia de 0,25 ml por ml de G418 y concentraciones gradualmente crecientes de VX-950 (serie A) (figura 5A, curva de selección). La concentración inicial de VX-950 fue de 3,5 μ M o 10 veces la CI50, y la concentración mayor fue de 28 μ M o 80 veces la CI50. Las células con replicones se dividieron o el medio se repuso cada 3 o 4 días, y se añadió VX-950 fresco. Puesto que VX-950 inhibe la actividad serina proteasa NS3 de HCV y, por consiguiente, bloquea la replicación del ARN de HCV, el nivel de estado estacionario de las proteínas de HCV y la proteína de neomicina transferasa gradualmente disminuye y por último se hace indetectable en presencia de una concentración alta de VX-950. Las células con poca o ninguna proteína de neomicina transferasa proliferan a una velocidad gradualmente decreciente y por último mueren en presencia de G418. Sólo el ARN de HCV con mutaciones que son resistentes a VX-950 puede replicarse en presencia de altas concentraciones de VX-950 y apoya el crecimiento de las células con replicones que lo portan. Las células con replicones en la serie A crecieron normalmente durante los primeros 10 días en presencia de VX-950 3,5 μ M. Después de 10 días, las células de la serie A crecieron mucho más lentamente y se observó una muerte celular masiva entre los días 10 y 17 (figura 5A, curva de selección). El crecimiento normal no se reanudó hasta el día 21. Se determinó que la CI50 de VX-950 contra las células con replicones de la serie A en el día 56 era de 8,1 a 12,0 μ M, que es de 23 a 34 veces mayor que la CI50 (354 nM) contra las células con replicones de tipo salvaje (figura 5B, curva de CI50).

Se extrajeron los ARN celulares totales de las células de la serie A en los días 7, 21 y 56 y se sometieron a RT-PCR para amplificar la región codificadora del dominio de la serina proteasa NS3. El producto de la RT-PCR se secuenció en bloque para identificar la posición o posiciones de las mutaciones potenciales que podrían ser responsables de la reducción observada en la sensibilidad a VX-950. Las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de la proteasa de HCV de tipo salvaje a partir de las células con replicones originales se muestran en SEQ ID NO:1 y SEQ ID NO:2. No se observó ninguna mutación relacionada con VX-950 en el dominio de la serina proteasa NS3 de las células con replicones de la serie A en el día 7, cuando se compara con las células con replicones de Con1 de tipo salvaje cultivadas en ausencia de VX-950.

En los días 21 y 56 en la serie A, se observaron sustituciones en Ala156 en el dominio de la proteasa, lo cual sugiere que las mutaciones en el resto 156 pueden ser críticas para la sensibilidad reducida a VX-950. No se encontró ninguna mutación en ninguno de los cuatros sitios proteolíticos en la región de la proteína no estructural de HCV que son rotos por la serina proteasa NS3/4A. Para definir la identidad y la frecuencia de las sustituciones, un producto de la RT-PCR de 1,7 kb de las células con replicones de la serie A en el día 7 o 98 se subclonó en el vector TA y se secuenciaron múltiples clones para ambas muestras. Todos los clones derivados de las muestras del día 7 contenían Ala156 de tipo salvaje. En la muestra del día 98 de las células con replicones de la serie A, que se habían cultivado en presencia de VX-950 28 μ M durante 63 días, 79% o 60 de 76 clones tenían una sustitución de alanina a serina (A156S).

Además, se seleccionaron células resistentes a VX-950 bajo una concentración constante de VX-950 y G418. En este caso, se observaron múltiples colonias de células resistentes después de un periodo de cultivo prolongado con VX-950 y G418. Se determinaron las secuencias de la serina proteasa NS3 de HCV a partir de estas colonias resistentes y se encontraron mutaciones similares en el aminoácido 156 de la serina proteasa de HCV.

40 **Ejemplo 9: Desarrollo de resistencia a BILN 2061 en células con replicones de HCV**

Otro inhibidor de la proteasa NS3/4A de HCV, BILN 2061 (figura 4B, estructura química) (documentos WO 00/59929, US 6.608.027), ha demostrado ser eficaz en pacientes con hepatitis C (Lamarre *et al.*, Nature Medicine, 2003). Se seleccionaron células con replicones de HCV resistentes a BILN 2061 (serie B) de una manera similar a VX-950. De nuevo, células con replicones subgenómicos de Con1 HCV de tipo salvaje se transfirieron en serie en presencia de 0,25 mg por ml de G418 y concentraciones lentamente crecientes de BILN 2061 (figura 6A, curva de selección). Las células con replicones de la serie B crecieron con normalidad durante los primeros 7 días en presencia de BILN 2061 80 nM u 80 veces mayor que la CI50. Sin embargo, la proliferación de células de la serie B se frenó significativamente después del día 7, y se observó una muerte celular masiva entre los días 7 y 17. Al igual que antes, el crecimiento normal no se reanudó hasta el día 21. BILN 2061 tiene un valor de CI50 de 10 a 1,8 μ M contra las células de la serie B en el día 59, que es de 1.000 a 1.800 veces mayor que la CI50 (1 nM) contra las células con replicones de tipo salvaje (figura 6B, curva de CI50).

No se observaron mutaciones relacionadas con BILN 2061 en el dominio de la serina proteasa NS3 en el día 7. En el día 24, se observó una diversidad de sustituciones en el aminoácido 168 de la proteína NS3, lo cual sugiere que las sustituciones en el resto 168 pueden ser responsables de la resistencia contra BILN 2061. No se encontró ninguna mutación en los cuatros sitios en la región de la proteína no estructural de HCV que son rotos por la serina proteasa NS3/4A. Para determinar la frecuencia de las diversas sustituciones en el resto 168 de NS3, se secuenció la serina proteasa NS3 del replicón de la serie B en el día 98, que había sido cultivado en presencia de BILN 2061 3,2 μ M. De los 94 clones, 60 o 64% tenían una sustitución de Asp168 a Val (D168V), y 23 clones o 24% tenían una mutación de Asp168 a Ala (D168A).

Además, se seleccionaron células resistentes a BILN 2061 bajo una concentración constante de BILN 2061 y G418. En este caso, se observaron múltiples colonias de células resistentes después de un periodo de cultivo prolongado con BILN 2061 y G418. Se determinaron las secuencias de la serina proteasa NS3 de HCV a partir de estas colonias resistentes y se encontraron mutaciones similares en el aminoácido 168 de la serina proteasa de HCV.

5 Ejemplo 10: Selección de células con replicones resistentes a VX-950 y BILN 2061

A. Desarrollo de replicones de HCV con resistencia cruzada a partir de células resistentes a VX-950

Para identificar las mutaciones de resistencia que tienen resistencia cruzada a VX-950 y BILN 2061 se emplearon varios esquemas de selección. En primer lugar, una línea de células con replicones resistente a VX-950 [serie A en C. Lin *et al.*, J. Biol. Chem., 279, pp. 17508-17514 (2004)] se transfirió en serie en presencia de 0,25 mg/ml de G418, VX-950 14 μM , y concentraciones lentamente crecientes de BILN 2061 (serie C) (figura 8A). Para BILN 2061, la concentración inicial fue de 40 nM, y la concentración final fue de 6,4 μM . Las células con replicones se dividieron o el medio se repuso cada 3 o 4 días, y se añadió VX-950 y BILN 2061 fresco. Puesto que los PI de HCV inhiben la actividad serina proteasa NS3/4A de HCV y, por consiguiente, bloquean la replicación del ARN de HCV, el nivel de estado estacionario de las proteínas de HCV y la proteína de neomicina transferasa gradualmente disminuye y por último se hace indetectable en presencia de una concentración alta de PI de HCV (los datos no se muestran). Las células con poca o ninguna proteína de neomicina transferasa proliferan a una velocidad gradualmente decreciente y por último mueren en presencia de G418. Se espera que las células con replicones con la principal mutación de resistencia a VX-950, A156S, mueran en presencia de concentraciones crecientes de BILN 2061, puesto que han demostrado ser susceptibles a la inhibición de BILN 2061 [C. Lin *et al.*, J. Biol. Chem., 279, pp. 17508-17514 (2004)]. Sólo el ARN de HCV con mutaciones que provocan una resistencia cruzada frente a VX-950 y BILN 2061 puede replicarse en presencia de altas concentraciones de ambos PI de HCV y apoya el crecimiento de las células con replicones que lo portan. Sin embargo, las células con replicones en la serie C crecieron normalmente durante todo el proceso de selección, que duró 56 días. Se determinó que los valores de CI50 de BILN 2061 contra las células con replicones de la serie C en el día 52 eran de aproximadamente 3 μM , que es 300 veces mayor que la CI50 contra las células con replicones de la serie A (resistentes a VX-950) (aproximadamente 10 nM) (figura 8B). Puesto que VX-950 30 μM no produjo más de 50% de reducción en el ARN de HCV en las células con replicones de la serie C en el día 52, los valores de CI50 reales de VX-950 no pueden determinarse, lo cual indica que las células con replicones de la serie C en el día 52 siguen siendo resistentes a VX-950 (figura 8C).

Se extrajo el ARN celular total de las células de la serie C en el día 32, que habían sido cultivadas en presencia de VX-950 14 μM y BILN 2061 0,32 μM , y se sometió a RT-PCR para amplificar la región codificadora del dominio de la serina proteasa NS3. El producto de la RT-PCR se secuenció en bloque para identificar la posición o posiciones de las mutaciones potenciales que podrían ser responsables de la reducción observada en la sensibilidad a ambos PI de HCV. Se observaron sustituciones en Ala156 en el dominio de la proteasa, lo cual sugiere que las mutaciones en el resto 156 pueden ser críticas para la sensibilidad reducida a ambos PI. Esta observación es algo inesperada, puesto que se descubrió que la principal mutación de resistencia a VX-950 era A156C [C. Lin *et al.*, J. Biol. Chem., 279, pp. 17508-17514 (2004)]. No se encontró ninguna mutación en ninguno de los cuatro sitios proteolíticos en la región de la proteína no estructural de HCV que son rotos por la serina proteasa NS3/4A. Para definir la identidad y la frecuencia de las sustituciones, un producto de la RT-PCR de 1,7 kb de las células con replicones de la serie C en el día 32 se subclonó en el vector TA, y diez colonias individuales se sometieron a una secuenciación. Seis clones tenían una sustitución de Ala156 a Thr (A156T), y tres clones tenían una sustitución de Ala156 con Val (A156V). El décimo clon mantiene la mutación A156S.

B. Desarrollo de replicones de HCV con resistencia cruzada a partir de células resistentes a BILN 2061

El segundo esquema de selección consistió en cultivar células con replicones resistentes a BILN 2061 en presencia de BILN 2061 y VX-950. En este caso, una línea de células con replicones resistente a BILN 2061 [serie B en C. Lin *et al.*, J. Biol. Chem., 279, pp. 17508-17514 (2004)] se transfirió en serie en presencia de 0,25 mg/ml de G418, y concentraciones lentamente crecientes de VX-950 y BILN 2061 (serie D) (figura 9A). Para BILN 2061, la concentración inicial fue de 160 nM, y la concentración final fue de 6,4 μM . Sólo se emplearon dos concentraciones de VX-950: 7 μM y 14 μM . Se espera que las células con replicones con la principal mutación de resistencia a BILN 2061, D168V o D168A, mueran en presencia de altas concentraciones de VIX-950, puesto que han demostrado ser susceptibles a la inhibición de VX-950 [C. Lin *et al.*, J. Biol. Chem., 279, pp. 17508-17514 (2004)]. De nuevo, sólo el ARN de HCV con mutaciones que provocan una resistencia cruzada a VX-950 y BILN 2061 puede replicarse en presencia de altas concentraciones de ambos PI de HCV y apoya el crecimiento de las células con replicones que lo portan. Sin embargo, las células con replicones en la serie D crecieron normalmente durante la mayor parte del proceso de selección, que también duró 56 días. Puesto que VX-950 30 μM no produjo más de 50% de reducción en el ARN de HCV en las células con replicones de la serie D en el día 52, los valores de CI50 reales de VX-950 no pueden determinarse, pero serán al menos 100 veces mayores que la CI50 (aproximadamente 0,3 μM) contra las células con replicones de la serie B (resistentes a BILN 2061) (figura 9B). Se determinó que los valores de CI50 de BILN 2061 contra las células con replicones de la serie D en el día 52 eran de aproximadamente 4 μM , lo cual indica que las células con replicones de la serie D en el día 52 siguen siendo resistentes a BILN 2061 (figura 9C).

Se extrajo el ARN celular total de las células de la serie D en el día 32, que también habían sido cultivadas en presencia de VX-950 14 μM y BILN 2061 0,32 μM , y se sometió a RT-PCR para amplificar la región codificadora del dominio de la serina proteasa NS3. El producto de la RT-PCR se secuenció en bloque para identificar la posición o posiciones de las mutaciones potenciales que podrían ser responsables de la reducción observada en la sensibilidad a ambos PI de HCV. De nuevo, se observaron sustituciones en Ala156 en el dominio de la proteasa, lo cual confirma que las mutaciones en el resto 156 pueden ser críticas para la sensibilidad reducida a ambos PI. No se encontró ninguna mutación en ninguno de los cuatros sitios proteolíticos en la región de la proteína no estructural de HCV que son rotos por la serina proteasa NS3/4A. Para definir la identidad y la frecuencia de las sustituciones, un producto de la RT-PCR de 1,7 kb de las células con replicones de la serie A en el día 32 se subclonó en el vector TA, y 14 colonias individuales se sometieron a una secuenciación. Doce clones tenían la sustitución A156V, mientras que un clon tenía la mutación A156T. El decimocuarto clon tenía dos mutaciones, A156S y D168V.

C. Desarrollo de replicones de HCV con resistencia cruzada a partir de células con replicones sin estimular

En los estudios previos de los inventores sobre mutaciones de resistencia frente a un único PI de HCV, VX-950 o BILN 2061, el crecimiento celular se detuvo durante varios días, durante los cuales se observó una masiva muerte celular [C. Lin *et al.*, J. Biol. Chem., 279, pp. 17508-17514 (2004)], lo cual señala el surgimiento de células con replicones mutantes de resistencia y la muerte concurrente de replicones no resistentes. Sin embargo, no se observó esta muerte celular ni una disminución en el crecimiento celular en la selección de los replicones con resistencia cruzada de la serie C o D, según se describió anteriormente. Es posible que las mutaciones de resistencia cruzada, A156T y A156V, puedan ya existir en las células con replicones resistentes a VX-950 (serie A) o BILN 2061 (serie B), como una pequeña población. Si esto es así, estos dos esquemas de selección pueden proporcionar una desviación hacia la mutación A156T o A156V frente a otras mutaciones de resistencia cruzada potenciales. Así, se realizó un tercer esquema de selección utilizando las células con replicones de HCV sin estimular que son sensibles a cualquiera de los dos inhibidores.

Las células con replicones subgenómicos de Con1 obtenida de pBR322-HCV-Neo-mADE [C. Lin *et al.*, J. Biol. Chem., 279, pp. 17508-17514 (2004)] se transfirió en serie en presencia de 0,25 mg/ml de G418, y concentraciones lentamente crecientes de VX-950 y BILN 2061 (serie E) (figura 10). La concentración inicial de VX-950 fue de 3,5 μM , y la concentración mayor fue de 14 μM . Para BILN 2061, la concentración inicial fue de 80 nM, y la concentración final fue de 3,2 μM . Las células con replicones se dividieron o el medio se repuso cada 3 o 4 días, y se añadió VX-950 y BILN 2061 fresco. Las células con replicones de la serie E crecieron con normalidad durante los primeros 10 días en presencia de VX-950 3,5 μM y BILN 2061 160 nM. Después de 10 días, las células de la serie E crecieron mucho más lentamente y se observó una muerte celular masiva entre los días 10 y 21 (figura 10). El crecimiento normal no se reanudó hasta el día 21. Se extrajo el ARN celular total de las células de la serie C en los días 10, 21, y 48, y se sometió a RT-PCR para amplificar la región codificadora del dominio de la serina proteasa NS3. No se observó ninguna mutación relacionada con PI de HCV en el dominio de la serina proteasa NS3 de las células con replicones de la serie E en el día 10 cuando se compara con las células con replicones de Con1 de tipo salvaje cultivadas en ausencia de ambos PI de HCV. Para definir la identidad y la frecuencia de las sustituciones, un producto de la RT-PCR de 1,7 kb de las células con replicones de la serie E en el día 21 o 48 se subclonó en el vector TA, y se secuenciaron múltiples clones para ambas muestras. En la muestra del día 21 de la serie E de células con replicones, que se habían cultivado en presencia de VX-950 3,5 μM y BILN 2061 0,32 μM durante 14 días, 65% o 30 de 46 clones tenían una sustitución de Ala156 a Thr (A156T), mientras que se encontró otra sustitución de Ala156 a Val (A156V) en 35% o 16 de 46 clones. Para la muestra del día 48 de la serie E, que se había cultivado en presencia de VX-950 14 μM y BILN 2061 1,6 μM durante 14 días, 80% o 35 de 44 clones tenían una sustitución A156T, mientras que se encontró la sustitución A156V en 20% o 9 de 44 clones. En ambos casos, no se encontraron más mutaciones en el dominio de la serina proteasa NS3 en más del 10% de los clones del plásmido TA, lo cual indica que A156T y A156V son sólo dos mutaciones que confieren una resistencia cruzada a VX-950 y BILN 2061.

Ejemplo 11: Demostración y confirmación de mutaciones de resistencia en el aminoácido 156 o 168 en los ensayos de células con replicones y enzimáticos

Para confirmar si las mutaciones observadas en Ala156 o Asp168 son suficientes para conferir resistencia frente a VX-950 o BILN 2061, respectivamente, se utilizó una mutagénesis dirigida específica de sitio para introducir cada mutación individual en la posición 156 o 168 en el dominio de la proteasa NS3 de tipo salvaje.

La mutagénesis dirigida específica de sitio es otra técnica útil para la preparación de proteínas de proteasas mutantes utilizada en los métodos de la invención. Esta técnica emplea la mutagénesis específica del ADN subyacente (que codifica la secuencia de aminoácidos que a la que se dirige la modificación). La técnica además proporciona la capacidad sencilla de preparar y analizar variantes de secuencia, incorporando una o más de las consideraciones anteriores, mediante la introducción de uno o más cambios de la secuencia de nucleótidos en el ADN. Una mutagénesis dirigida específica de sitio permite la producción de mutantes mediante el uso de secuencias oligonucleotídicas específicas que codifican la secuencia de ADN de la mutación deseada, así como un número suficiente de nucleótidos adyacentes, para proporcionar una secuencia de cebador con el tamaño y la complejidad de secuencia suficientes para formar un dúplex estable en ambos lados de la unión de delección que se está atravesando. Generalmente, se prefiere un cebador de aproximadamente 17 a 25 nucleótidos de longitud, con

aproximadamente 5 a 10 restos a ambos lados de la unión de la secuencia que se está alterando.

La técnica habitualmente emplea un vector de bacteriófago que existe en forma monocatenaria y bicatenaria. Los vectores típicos útiles en la mutagénesis dirigida específica de sitio incluyen vectores tales como el fago M13. Estos vectores de fagos están disponibles en el mercado y su uso en general es muy conocido por los expertos en la técnica. Los plásmidos bicatenarios también se emplean habitualmente en la mutagénesis dirigida específica de sitio, lo cual elimina la etapa de transferir el gen de interés desde un fago a un plásmido.

En general, la mutagénesis dirigida específica de sitio se realiza obteniendo en primer lugar un vector monocatenario, o fundiendo dos hebras de un vector bicatenario que incluye, dentro de su secuencia, una secuencia de ADN que codifica la proteína deseada. Un cebador oligonucleotídico que porta la secuencia mutada deseada se prepara de modo sintético. Este cebador entonces se hibrida con una preparación de ADN monocatenario, tomando en cuenta el grado de desapareamiento cuando se seleccionan las condiciones de hibridación, y se somete a enzimas polimerizantes del ADN, tales como el fragmento de Klenow de la polimerasa I de *E. coli*, para completar la síntesis de la hebra que porta la mutación. Así, se forma un heterodúplex en el que una hebra codifica la secuencia no mutada original y la segunda hebra porta la mutación deseada. Este vector de heterodúplex entonces se emplea para transformar las células apropiadas, tales como células de *E. coli*, y se seleccionan los clones que incluyan los vectores recombinantes que portan la disposición de secuencia mutada.

Por supuesto, la estrategia descrita anteriormente para la mutagénesis dirigida específica de sitio no es el único método para generar especies de proteasas mutantes potencialmente útiles, y así no pretende ser limitante. La presente invención también contempla otros métodos para lograr la mutagénesis tales como, por ejemplo, tratar los vectores recombinantes que portan el gen de interés con agentes mutagénicos, tales como hidroxilamina, para obtener variantes de secuencia.

A. El mutante de resistencia a VX-950 dominante, A156S, sigue siendo susceptible a BILN 2061

Para confirmar que la sustitución observada de Ala156 por Ser es suficiente para conferir resistencia frente a VX-950 pero no frente a BILN 2061, se empleó una mutagénesis dirigida específica de sitio para sustituir Ala156 por Ser en el dominio de proteasa NS3 de tipo salvaje.

Los parámetros cinéticos para el sustrato FRET para los dominios de la proteasa NS3 de tipo salvaje del genotipo 1a y 1b fueron idénticos (tabla 1) bajo las condiciones de ensayo de los inventores. Aunque el cofactor del péptido de NS4A procede del genotipo 1a de HCV, no se observaron diferencias perceptibles en los parámetros cinéticos. Esto es coherente con la formación de modelos moleculares, lo cual sugiere que las variaciones conservativas en la región central de NS4A entre el genotipo 1a y 1b no afectan a la interacción entre el péptido central de NS4A y el dominio de proteasa NS3. Los valores de K_i de VX-950 y BILN 2061 se determinaron utilizando los genotipos 1a y 1b de la proteasa de tipo salvaje, y no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las dos proteasas de tipo salvaje (tabla 2).

Los parámetros cinéticos del sustrato FRET para la proteasa mutante A156S fueron prácticamente los mismos que los de la proteasa de tipo salvaje (tabla 1). Sin embargo, el valor de K_i de VX-950 es de 2,9 μM contra la proteasa mutante A156S, que es 29 veces mayor que contra la proteasa de tipo salvaje (0,1 μM) (tabla 2). BILN 2061 tiene un valor de K_i de 112 nM contra el mutante A156S, que es 6 veces mayor que contra la proteasa de tipo salvaje, 19 nM (tabla 2).

El nivel de ARN de HCV en las células con replicones que contienen la sustitución A156S es similar al de las células con replicones de tipo salvaje (los datos no se muestran), lo cual es coherente con la eficacia catalítica enzimática similar del mutante A156S y las serina proteasas NS3 de tipo salvaje. El valor de CI_{50} de VX-950 contra las células con replicones A156S es de 4,65 μM , que es 12 veces mayor que contra las células con replicones de tipo salvaje (0,40 μM) (tabla 3). La diferencia entre los valores de CI_{50} de BILN 2061 contra las células A156S (7 nM) y con replicones de tipo salvaje (4 nM) no fue significativa (tabla 3).

B. Los principales mutantes resistentes a BILN 2061, D168V y D168A, siguen siendo totalmente susceptibles a VX-950

Para confirmar que la sustitución observada de Asp168 por Val o Ala es suficiente para conferir resistencia frente a BILN 2061 pero no VX-950, se empleó una mutagénesis dirigida específica de sitio para sustituir Asp168 por Val o Ala en el dominio de proteasa NS3 de tipo salvaje.

Los parámetros cinéticos del sustrato no fueron afectados por la mutación D168V, y muestran sólo cambios pequeños (menores que en 10 veces) para el mutante D168A, según indica la comparación de los valores de k_{cat} y k_{cat}/K_m de las serina proteasas NS3 de tipo salvaje y las dos mutantes (tabla 1). De manera similar, no se observó un efecto significativo de cualquiera de las sustituciones en Asp168 sobre el valor de K_i de VX-950 (tabla 2). Sin embargo, la sustitución de valina o alanina por ácido aspártico en la posición 168 produjo una proteasa NS3 mutante que no fue inhibida por BILN 2061 hasta 1,2 μM (tabla 2). Estos datos indican que cualquiera de las proteasas mutantes es al menos 63 veces susceptible a BILN 2061, cuando se compara con la proteasa de tipo salvaje. La magnitud real de la resistencia no puede determinarse, puesto que BILN 2061 no es soluble a concentraciones

mayores que 1,2 μM en el tampón de ensayo, según se mide mediante la absorbancia a 650 nm. La mutación D168V o D168A también se introdujo en el replicón de HCV de tipo salvaje mediante mutagénesis dirigida específica de sitio, y se generó una línea de células con replicones estable que porta cada una de las sustituciones. BILN 2061 tiene una CI_{50} de 5,09 μM contra las células con replicones D168V, que es más de 1.300 veces mayor que contra las células con replicones de tipo salvaje (4 nM) (tabla 3). La CI_{50} de BILN 2061 es de 1,86 μM contra el replicón mutante D168A. Hubo pocos cambios en los valores de CI_{50} de VX-950 contra las células con replicones D168V y de tipo salvaje (tabla 3).

La tabla 1 muestra la caracterización de las propiedades enzimáticas de los dominios de la serina proteasa NS3 de HCV de tipo salvaje o mutante. Se expresan cinco proteínas del dominio de la serina proteasa NS3 de HCV, que incluyen las proteasas de genotipo 1a y 1b de tipo salvaje (wt), y tres mutantes (A156S, D168V, y D168A) del genotipo 1b, y se purificaron según se describe en la sección de materiales y métodos. Se determinaron los valores de k_{cat} y K_{M} de estas proteasas NS3 utilizando el péptido central KK-NS4A y el sustrato FRET.

Tabla 1. Caracterización enzimática de las serina proteasas NS3 de HCV de tipo salvaje o mutantes

Proteasa de HCV	K_{M} (μM)	k_{cat} (s^{-1})	$k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)
Wt (1a)	1,3	1,2	$8,97 \times 10^5$
Wt (1b)	1,1	1,0	$9,47 \times 10^5$
A156S (1b)	0,9	0,6	$6,64 \times 10^5$
D168V (1b)	1,2	0,6	$4,98 \times 10^5$
D168A (1b)	2,0	0,3	$1,50 \times 10^5$

La tabla 2 muestra la confirmación de la resistencia en un ensayo enzimático. Los valores de K_{i} de VX-950 y BILN 2061 se determinaron frente a los cinco dominios de la serina proteasa NS3 de HCV purificados, incluyendo las proteasas de tipo salvaje (wt) del genotipo 1a o 1b, así como tres mutantes, A156S, D168V, y D168A, del genotipo 1b, utilizando el péptido KK-NS4A y el sustrato FRET. La solubilidad de BILN 2061 en el tampón de reacción se limitó a concentraciones mayores que 1,2 μM . No se observó inhibición para la proteasa NS3 mutante D168V o D168A en presencia de BILN 2061 1,2 μM .

Tabla 2. Valores de K_{i} de VX-950 y BILN 2061 contra proteasas NS3 de tipo salvaje y mutantes

Mutante	K_{i} (μM)	
	BILN 2061	VX-950
Wt (1a)	0,006	0,047
Wt (1b)	0,019	0,100
A156S	0,112	2,9
D168V	>1,2	0,043
D168A	>1,2	0,150

La tabla 3 muestra la confirmación de la resistencia en replicones de HCV. Se generaron cuatro líneas de células con replicones subgenómicos de HCV estables, que incluyen el tipo salvaje (wt) y tres mutantes, A156S, D168V, y D168A, utilizando los transcritos de salida de ARN de T7 a partir de los correspondientes plásmidos de replicón de Con1 de alta eficacia. Se determinaron los valores de CI_{50} de VX-950 y BILN 2061 contra las cuatro líneas de células con replicones de HCV en el ensayo de 48 horas convencional.

Tabla 3. Valores de CI_{50} de VX-950 y BILN 2061 contra las células con replicones de HCV con las proteasas NS3 de tipo salvaje y mutantes

Mutante	CI_{50} del replicón (μM)	
	BILN 2061	VX-950
Wt	0,004	0,402
A156S	0,007	5,09

	CI ₅₀ del replicón (μM)	
D168V	4,65	0,163
D168A	1,86	0,193

C. Las mutaciones A156T y A156V presentan resistencia cruzada frente a VX-950 y BILN 2061

Para confirmar que las mutaciones observadas en Ala156 son suficientes para conferir resistencia cruzada frente a BILN 2061 pero no VX-950, se empleó una mutagénesis dirigida específica de sitio para sustituir Ala159 por Val o Thr en el dominio de la proteasa NS3 de tipo salvaje.

- 5 La eficacia catalítica (kcat/Km) de la proteasa mutante A156T o A156V contra el sustrato FRET es de aproximadamente 5 a 7 veces mayor que la de la proteasa de tipo salvaje (tabla 4). El valor de Ki de VX-950 es de 9,9 μM o 33 μM contra la proteasa mutante A156T o A156V, respectivamente, que es 99 o 330 veces mayor que contra la proteasa de tipo salvaje (0,1 μM), respectivamente (tabla 5). Ninguna de las proteasas mutantes fue inhibida por BILN 2061 hasta 1,2 μM (tabla 5). Estos datos indican que cada proteasa mutante es al menos 63 veces
 10 menos susceptible a BILN 2061, comparado con la proteasa de tipo salvaje. La magnitud real de la resistencia no puede determinarse, porque BILN 2061 no es soluble a concentraciones mayores que 1,2 μM en el tampón de ensayo, según se mide mediante la absorbancia a 650 nm (los datos no se muestran).

Tabla 4: Propiedades enzimáticas de los dominios de la serina proteasa NS3 de HCV de tipo salvaje o mutante

Proteasa de HCV	Km (μM)	kcat (s ⁻¹)	kcat/Km (M ⁻¹ s ⁻¹)
Tipo salvaje	1,1	1,0	9,47 x 10 ⁵
A156T	1,3	0,2	1,36 x 10 ⁵
A156T	2,6	0,6	2,34 x 10 ⁵

- 15 Resumen de la tabla 4: Tres proteínas del dominio de la serina proteasa NS3 de HCV de la cepa Con1, que incluyen las proteasas de tipo salvaje y dos mutantes, A156T y A156V, se expresaron y se purificaron. Se determinaron los valores de kcat y Km de estas proteasas NS3 utilizando el péptido central KK-NS4A y el sustrato FRET, y se muestra la media de dos ensayos independientes.

Tabla 5: Confirmación de la resistencia en un ensayo enzimático

Mutante	Ki (μM)	
	BILN 2061	VX-950
Tipo salvaje	0,019	0,100
A156T _(n=2)	>1,2	9,9
A156V _(n=1)	>1,2	33

- 20 Resumen de la tabla 5: Se determinaron los valores de Ki de VX-950 y BILN 2061 contra los cinco dominios de serina proteasa NS3 de HCV purificados, que incluyen la proteasa de tipo salvaje, así como dos mutantes, A156T y A156V, utilizando el péptido KK-NS4A y el sustrato FRET. La solubilidad de BILN 2061 en el tampón de reacción es limitada a concentraciones mayores que 1,2 μM. No se observó inhibición por la proteasa NS3 mutante A156T o A156V en presencia de BILN 2061 1,2 μM.

- 25 El nivel de ARN de HCV en las células con replicones que contienen la sustitución A156T o A156V es menor que el de las células con replicones de tipo salvaje (los datos no se muestran), lo cual es coherente con la menor eficacia catalítica enzimática de los dos mutantes, comparado con el de las serina proteasas NS3 de tipo salvaje. No se observó una reducción significativa del ARN del replicón de HCV con VX-950 hasta 30 μM en ninguna de las líneas de células con replicones mutantes, lo cual indica una disminución en al menos 75 veces de la sensibilidad conferida por cualquiera de las mutaciones (tabla 6). El valor de CI₅₀ de BILN 2061 contra las células con replicones A156T es de 1,09 μM, que es aproximadamente 272 veces mayor que contra las células con replicones de tipo salvaje (4 nM). Para los replicones mutantes A156V, BILN 2061 tiene un valor de CI₅₀ de 5,76 μM, lo cual indica una
 30 disminución en más de 1.400 veces de la sensibilidad conferida por la mutación A156V (tabla 6).

Tabla 6: Confirmación de la resistencia en replicones de HCV

Mutante	CI ₅₀ de los replicones (μM)	
	BILN 2061	VX-950
Tipo salvaje	0,004	0,402
A156T	1,09	>30
A156V	5,76	>30

Resumen de la tabla 6: Se generaron tres líneas de células con replicones subgenómicos de HCV estables, que incluyen el tipo salvaje y dos mutantes, A156T y A156V, utilizando los transcritos de salida de ARN de T7 a partir de los correspondientes replicones de Con1 de alta eficacia. Se determinaron los valores de CI₅₀ de VX-950 y BILN 2061 contra las tres líneas de células con replicones de HCV en el ensayo de 48 horas, y se muestra la media de dos ensayos independientes.

Ejemplo 12: Formación de modelos - I

Se modelaron VX-950 y BILN 2061 en el sitio activo del dominio de la serina proteasa NS3 utilizando la estructura de la proteína NS3 de HCV de longitud completa publicada por Yao [Yao *et al.*, Structure Fold Des., 7, pp. 1353-1363 (1999)] (código PDB: 1CU1). Las coordinadas del dominio de proteasa del segmento A en esta estructura demuestran que la hebra C-terminal de la proteína NS3 se une en el sitio de unión al sustrato de la proteasa. El grupo carboxilo terminal de esta hebra se localiza cerca de los restos del sitio activo His57, Asp81 y Ser139, de modo que forma enlaces de hidrógeno con las cadenas laterales de His57 y Ser139, así como las amidas del esqueleto de los restos 137 y 139, que forman el hueco de oxianión. Además, los últimos seis restos (626 a 631) de la proteína NS3 forman una hebra β antiparalela extendida a lo largo del borde de la hebra E2 del barril β de la proteasa y forman doce enlaces de hidrógeno de esqueleto a esqueleto. Se espera que un inhibidor basado en el producto, tal como BILN 2061, se una a la proteasa NS3 de una manera similar. Por tanto, los inventores utilizaron las coordenadas de esta estructura cristalina para construir sus modelos de co-complejos de inhibidor-proteasa. Se construyó la molécula de BILN 2061 con el programa informático de formación de modelos moleculares QUANTA (Accelrys Inc., San Diego, California, EEUU), y se acopló de forma manual al sitio activo de modo que su grupo carboxilo se solapa con el carboxilato C-terminal de NS3 de la proteína de NS3 de longitud completa. Entonces la molécula inhibidora se rotó de tal forma que formaron todos los siguientes enlaces de hidrógeno del esqueleto: NH de P1 con el carbonilo de Arg155, el carbonilo de P3 con NH de Ala157, y NH de P3 con el carbonilo de Ala157. Este modo de unión coloca el grupo P2 grande de BILN 2061 en choque directo con la cadena lateral de Arg155. Para evitar el choque, la cadena lateral de Arg155 se modeló en una conformación extendida, según sugiere la descripción de la estructura cristalina de un complejo de proteasa NS3 con un inhibidor que es análogo a BILN 2061 [Y.S. Tsantrizos, Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 42, pp. 1356-1360 (2003)]. Se minimizó la energía del inhibidor en dos etapas. En la primera etapa, sólo se dejó que los átomos del inhibidor y los átomos de la cadena lateral de Arg155, Asp168 y Arg123 de la proteasa se moviesen durante la minimización de la energía durante 1000 pasos. En la segunda etapa, se dejó que todos los átomos de la cadena lateral del sitio activo se moviesen junto con el inhibidor durante 1000 pasos adicionales. Esta estructura modelada se parece mucho a la estructura publicada del análogo de BILN 2061 [Y.S. Tsantrizos, Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 42, pp. 1356-1360 (2003)].

Se adoptó un procedimiento similar para modelar el VX-950 en el sitio activo de la proteasa. El inhibidor se modeló como un aducto covalente con una unión si-cara de la cadena lateral de Ser139 al cetocarbonilo del inhibidor. Este modo de unión se ha observado para inhibidores de cetoamida análogos [Perni *et al.*, Bioorg. Med. Chem. Lett., 14, en imprenta (2004)] e inhibidores de cetoácidos [Di Marco *et al.*, J. Biol. Chem., 275, pp. 7152-7157 (2000)]. La cadena principal del inhibidor se solapó con los restos 626 a 631 de la hebra C-terminal de NS3, de modo que se formaron todos los siguientes enlaces de hidrógeno del esqueleto: NH de P1 con el carbonilo de Arg155, el carbonilo de P3 con NH de Ala157 y NH de P3 con el carbonilo del casquete de P4 con el NH de Cys159. En este modo de unión, el grupo P2 de VX-950 se coloca en el bolsillo S2 sin necesidad de mover la cadena lateral de Arg155. Los grupos t-butilo y ciclohexilo se colocaron en los bolsillos S3 y S4, respectivamente. Para ser coherentes, los inventores utilizaron el mismo protocolo de minimización de la energía de dos etapas utilizado para el modelo de BILN 2061. Estos dos modelos de co-complejos se utilizaron para predecir el efecto de las mutaciones en Ala156 y Asp168 sobre la unión de los inhibidores de proteasas.

La cadena lateral de Asp68 se expone al disolvente. La cadena lateral de valina del mutante D168V puede adoptar tres conformaciones canónicas con $\chi_1 = 60^\circ$, -60° o 180° . Se modelaron las tres orientaciones de la cadena lateral de Val168. La energía de interacción de la enzima mutante D168V y del inhibidor se minimizó permitiendo que los átomos del inhibidor y Val168 se movieran mientras se fijaban las posiciones de todos los demás átomos de la molécula de proteína. En todos los casos, la cadena lateral de Val168 no provoca choque estérico con los átomos del inhibidor. La mutación de serina en Ala156 se modeló mediante el siguiente procedimiento. La cadena lateral de Ala156 está en contacto de Van der Waals con el grupo P2 de ambos inhibidores (figura 9). La cadena lateral de

serina del mutante A156S se modela en tres conformaciones canónicas de $\chi_1 = 60^\circ$, -60° y 180° , y la energía se minimizó manteniendo fijada la conformación del resto de la proteína. Se utilizaron estos modelos para estudiar los efectos de esta mutación sobre la unión del inhibidor. Se descubrió que la conformación de -60° tenía la menor energía, puesto que forma un enlace de hidrógeno con el carbonilo de Arg155 vecino, pero provoca el máximo número de contactos desfavorables con ambos inhibidores. Las conformaciones de 60° y 180° son energéticamente equivalentes, pero la conformación de 60° tiene menos contactos desfavorables y se utilizó en el análisis de los inventores.

Ala156 está localizada en la hebra E2 de la estructura de la proteasa NS3/4A de HCV [R.A. Love *et al.*, Cell, 87, pp. 331-342 (1996)]. Varios átomos del esqueleto de esta hebra (principalmente el carbonilo de Arg155 y ambos carbonilo y nitrógeno de la cadena principal de Ala157) forman enlaces de hidrógeno con los átomos del esqueleto de los sustratos o de los inhibidores basados en el sustrato. En el modelo estructural de los inventores del co-complejo de VX-950:proteasa (figura 9), se forman tres enlaces de hidrógeno entre NH de PI y el carbonilo de Arg155, el carbonilo de P3 y NH de Ala157, y NH de P3 y el carbonilo de Ala157. También se forman los mismos enlaces de hidrógeno en el modelo del co-complejo de BILN 2061. La cadena lateral de Ala156 está en contacto de Van der Waals con el grupo P2 de estos inhibidores. En el modelo de los inventores del mutante A156S, el oxígeno terminal de Ser156 está demasiado cerca del grupo ciclohexilo de P4 de VX-950, y también está demasiado cerca del casquete de ciclopentilo terminal de BILN 2061. Puesto que el casquete de ciclopentilo de BILN 2061 está en el extremo flexible del inhibidor, puede retirarse de este contacto desfavorable sin perder gran parte de la unión. Un movimiento similar del grupo ciclohexilo de P4 de VX-950 provoca la desestabilización de las interacciones entre el inhibidor y los subsitos S4 y S5 de la proteasa. Por tanto, se espera una pérdida mayor en la unión para VX-950 que para BILN 2061 con la proteasa mutante A156S.

Asp168 se localiza en la hebra F2 de la estructura de la proteasa NS3 y está implicada en las interacciones de puente salino con las cadenas laterales de Arg123 y Arg155 (figura 9) [R.A. Love *et al.*, Cell, 87, pp. 331-342 (1996)]. También es parte del bolsillo de unión de S4. La parte alifática de esta cadena lateral está en contacto de Van der Waals con el grupo ciclopentilo terminal de BILN 2061, que no se espera que se vea afectado por la mutación D168V, puesto que una cadena lateral de valina en esta posición no provoca ningún choque estérico con el inhibidor. Sin embargo, esta sustitución D168V produce la pérdida de la interacción de puente salino con la cadena lateral de Arg155 en la hebra E2 vecina (figura 1) que, a su vez, provoca múltiples contactos con el grupo P2 grande de BILN 2061 en el modelo descrito en la presente. La conformación de Arg155 (figura 9, con el código de color azul cian) en el modelo del complejo de BILN 2061:proteasa de NS3 de tipo salvaje ya no se ve energéticamente favorecida en el mutante D168V por dos razones. En primer lugar, no puede permanecer cerca de los esqueletos de la hebra E2 en ausencia de la interacción de puente salino entre Arg155 y Asp168. En segundo lugar, una carga positiva no compensada y expuesta al disolvente de la cadena lateral de Arg155 buscará una mayor cubierta de solvatación, tal como se observa en las estructuras cristalinas de la apoproteasa y los dos complejos de proteasa:inhibidor que están disponibles en el Protein Data Bank (código: 1DY8 y 1DY9) [S. Di Marco *et al.*, J. Biol. Chem., 275, pp. 7152-7157 (2000)]. Esta conformación de Arg155 está en choque directo con el grupo quinolina de P2 de BILN 2061 y desestabiliza su unión. Por tanto, la sustitución de Asp168 por cualquier aminoácido, distinto del glutamato, romperá las interacciones de puente salino con Arg155 y producirá una reducción en la unión de BILN 2061. Por otra parte, la conformación de Arg155 en las dos estructuras cristalinas publicadas del complejo de proteasa NS3:inhibidor es similar a la del modelo de los inventores del complejo de VX-950:proteasa (con el código de color naranja en la figura 9). Además, esta conformación de Arg155 confiere estabilización de la unión de VX-950, puesto que permite el máximo número de contactos de Van der Waals entre la cadena lateral de Arg155 y el inhibidor. Por tanto, no se espera que VX-950 se vea afectado por las sustituciones en Asp168, comparado con BILN 2061.

45 Ejemplo 13: Formación de modelos - II

La formación de modelos de VX-950 y BILN 2061 en el sitio activo del dominio de la serina proteasa NS3 utilizando la estructura cristalina de la proteína NS3 de HCV de longitud completa [N. Yao *et al.*, Structure Fold Des., 7, pp. 1353-1363 (1999)] (código de Protein Data Base: 1CU1) ha sido previamente descrita [C. Lin *et al.*, J. Biol. Chem., 279, 17508-17514 (2004)]. La cadena lateral de Ala156 en la cadena β de E2 de la proteasa NS3/4A de HCV separa los bolsillos S4 y S2 del sitio activo de la enzima y está en contacto de Van der Waals con el grupo P2 de los dos inhibidores (figura 7). La sustitución con Val o Thr de Ala156 extiende la cadena lateral con dos grupos adicionales (metilo o hidroxilo) hacia el espacio compacto entre la enzima de tipo salvaje y los inhibidores. La cadena lateral de Val156 o Thr156 se modeló en las tres conformaciones canónicas posibles de $\chi_1 = 60^\circ$, -60° y 180° , siguiendo el procedimiento indicado previamente para la formación del modelo de la mutación A156S [C. Lin *et al.*, J. Biol. Chem., 279, pp. 17508-17514 (2004)]. Se minimizó la energía de las conformaciones de la cadena lateral manteniendo fijada la conformación del resto de la proteína. Los inhibidores, VX-950 y BILN 2061, se acoplaron a estos sitios activos de la enzima mutante para aclarar el efecto de las mutaciones sobre la unión del inhibidor.

De las tres posibles conformaciones de la cadena lateral de Ser en la posición 156 (figura 11), la conformación con $\chi_1 = 60^\circ$ tiene el menor número de contactos desfavorables con VX-950 y BILN 2061. Los otros dos conformeros (con $\chi_1 = 180^\circ$ y -60°) tienen múltiples contactos desfavorables con ambos inhibidores en la cadena lateral de P2 o en el grupo carbonilo de P3. En la mutación A156T o A156V, se obliga a que el grupo adicional en el átomo C β de la

cadena lateral ocupe una de estas dos posiciones con $\chi_1 = 180^\circ$ o -60° , lo cual produce interacciones desfavorables con los inhibidores. Las tres posibles conformaciones de Thr se muestran de modo esquemático en la figura 11. En todos los casos, el grupo adicional tiene una interacción repulsiva con los átomos del inhibidor y/o del esqueleto de la enzima. Mediante la minimización de la energía se descubrió que la conformación $-60/180^\circ$ tenía la interacción menos repulsiva y que la principal causa de la repulsión era el choque cercano entre el grupo hidroxilo o metilo terminal de la cadena lateral mutante y el grupo carbonilo de P3 de los inhibidores. Por tanto, las mutaciones A156T y A156V son resistentes a ambos inhibidores.

Todas las composiciones y/o los métodos descritos y reivindicados en la presente pueden prepararse y ejecutarse sin experimentación indebida a la luz de la presente descripción. Aunque las composiciones y los métodos de esta invención se han descrito en términos de las realizaciones preferidas, será evidente para los expertos en la técnica que pueden aplicarse variaciones a las composiciones y/o los métodos, y en las etapas o en la secuencia de etapas del método descrito en la presente, sin apartarse del concepto, espíritu y alcance de la invención. De modo más concreto, será evidente que ciertos agentes que estén química y fisiológicamente relacionados pueden sustituirse por los agentes descritos en la presente, obteniéndose los mismos resultados o unos resultados similares. Se considera que todos estos sustitutos similares y modificaciones evidentes para los expertos en la técnica están dentro del alcance y del concepto de la invención, según se define mediante las reivindicaciones adjuntas.

Algunas referencias bibliográficas citadas a lo largo de la presente proporcionan ejemplos relativos a procedimientos u otros detalles suplementarios a los indicados en la presente.

Alter, H.J., y Seeff, L.B. (2000), *Semin. Liver Dis.*, 20, 17-35.

Alter, M.A. (1997), *Hepatology*, 26:62. (enfermedad)

Babine, R.E. *et al.* (2002), en el documento WO 0218369, Eli Lilly and Company.

Barbato *et al.* (1999), *J. Mol. Biol.*, 289:371-384. (estructura mediante RMN de la proteasa NS3/4A)

Bartenschlager, R. *et al.* (1993), *J. Virol.*, 67, 3835-3844.

Bartenschlager, R. *et al.* (1995), *J. Virol.*, 69, 7519-7528.

Bartenschlager, R. *et al.* (1993), *J. Virol.*, 3835-3844. (serina proteasa NS3)

Beaulieu, P.-L., y M. Llinas-Brunet (2002), *Curr. Med. Chem.*, 1:163-176. (terapia con diana de NS de HCV)

Behrens, S.E. *et al.* (1996), *EMBO J.*, 15:12-22. (polimerasa NS5B)

Benhamou, Y. *et al.* (2002), *Hepatology*, 36(4), p. 106A.

Benhamou, Y. *et al.* (2002), *Hepatology*, 36(4), resumen 463 (BILN 2061 en la clínica)

Beyer, B.M. *et al.* (2001), *Proteins*, 43:82-88. (GT3)

Blight *et al.* (2000), *Science*, 290:1972-1974. (adaptativo)

Blight, K.J. *et al.* (1998), *Antiviral Ther.*, 3, supl. 3, 71-81.

Blight, K.J. *et al.* (2000), *Science*, 290, 1972-1974.

Chander, G. *et al.* (2002), *Hepatology*, 36:S135-144. (informe del tratamiento del HCV)

Choo, Q.L. (1989), *Science*, 244:359-362. (descubrimiento de las secuencias de HCV)

Davies, G.L. *et al.* (1998), *N. Eng. J. Med.*, 339:1493-1499. (pegIFN + RBV)

De Francesco, R. *et al.* (2003), *Antiviral Res.*, 58, 1-16. (informe de un inhibidor de NS de HCV)

De Francesco, R., y C. Steinkuhler (2000), *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 242:149-169. (informe sobre la estructura y la función de la proteasa NS3/4A de HCV)

Di Marco, S. *et al.* (2000), *J. Biol. Chem.*, 275:7152-7157. (coestructura de PI)

Failla, C. *et al.* (1995), *J. Virol.*, 69, 1769-1777.

Frese, M. *et al.* (2001), *J. Gen. Virol.*, 82:723-733.

Grakoui, A. *et al.* (1993), *J. Virol.*, 67, 1385-1395.

Grakoui, A. *et al.* (1993), *J. Virol.*, 67:2832-2843. (serina proteasa NS3)

- Grakoui, A. *et al.* (1993), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:10583-10587. (autoproteasa NS2-3)
- Hijikata, M. *et al.* (1993), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90, 10773-10777.
- Hijikata, M. *et al.* (1993), *J. Virol.*, 67:4665-4675. (dos proteasas de HCV)
- Hinrichsen, H. *et al.* (2002), *Hepatology*, 36(4), p. 145A.
- 5 Hinrichsen, H. *et al.* (2002), *Hepatology*, 36(4), resumen 866. (BILN 2061 en la clínica)
- Hirsch, M.S. *et al.* (2003), *Clin. Infect. Dis.*, 37, 113-128.
- Houghton, M. (1996), libro *Field Virology*, pp. 1035-1058.
- Kenny-Walsh, E. (2001), *Clin. Liver Dis.*, 5:969-977. (historia natural de la hepatitis C)
- Kim, D.W. *et al.* (1995), *Biochim. Biophys. Res. Com.*, 215:160-166. (NS3 helicasa)
- 10 Kim, J.L. *et al.* (1996), *Cell*, 87:343-355. (estructura de la proteasa NS3/4A)
- Kolykhalov, A.A. *et al.* (1997), *Science*, 277:570-574. (ARN infeccioso en el chimpancé)
- Kolykhalov, A.A. *et al.* (2000), *J. Virol.*, 74:2046-2051. (mutantes de enzima inactiva en chimpancés)
- Krieger *et al.* (2001), *J. Virol.*, 75:4614-4624. (adaptativa)
- Lai, C.L. *et al.* (2003), *Clin. Infect. Dis.*, 36, 687-696.
- 15 Lamarre, D. *et al.* (2003), *Nature*, 426, 186-189.
- Lamarre, D. *et al.* (2002), *Hepatology*, 36 (supl. 4), resumen 464. (descubrimiento de BILN 2061)
- Lamarre, D. *et al.* (2003), *Nature Medicine*.
- Landro, J.A. *et al.* (1997), *Biochemistry*, 36, 9340-9348. (ensayo enzimático)
- Lin, C., y Rice, C.M. (1995), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92, 7622-7626. (ensayo *in vitro* de NS3/4A)
- 20 Lin, C. *et al.* (1995), *J. Virol.*, 69, 4373-4380. (cofactor de NS4A)
- Lin, C. *et al.* (2004), *J. Biol. Chem.*, 279, 17508-17514.
- Lin, K. *et al.*, VX-950: A Tight-Binding HCV Protease Inhibitor with a Superior Sustained Inhibitory Response in HCV Replicon Cells, presentado en la 54ª Reunión Anual de AASLD, 27 de octubre, 2003, Boston, MA.
- Lin, C. *et al.* (2003), *Hepatology*, 38 (supl. 1), resumen 137.
- 25 Lohmann, V. *et al.* (1999), *Science*, 285:110-113. (replicón)
- Lohmann, V. *et al.* (2001), *J. Virol.*, 75, 1437-1449.
- Love, R.A. *et al.* (1996), *Cell*, 87:331-342. (estructura de la proteasa NS3/4A)
- McCoy, M.A. *et al.* (2001), *J. Mol. Biol.*, 305:1099-1110. (estructura mediante RMN de la proteasa NS3/4A)
- McHuntchinson, J.G. *et al.* (1998), *N. Eng. J. Med.*, 339:1485-1492. (pegIFN + RBV)
- 30 McHuntchinson, J.G. *et al.* (2002), *Hepatology*, 36 (supl. 1), S245-252. (terapia futura para la hepatitis C)
- Migliaccio, G. *et al.* (2003), *J. Biol. Chem.*, 278, 49164-49170.
- Morrison, J.F. (1969), *Biochim. Biophys. Acta*, 185, 269-286. (ensayo enzimático)
- Narjes, H. *et al.* (2002), *Hepatology*, 36 (supl. 4), resumen 800 (PK de BILN 2061)
- Neumann, A.U. *et al.* (1998), *Science*, 282, 103-107.
- 35 Neumann, A.U. *et al.* (1998), *Science*, 285:110-113. (dinámica del HCV)
- Nguyen, T.T. *et al.* (2003), *Antimicrob. Agents Chemother.*, 47, 3525-3530.
- Pause, A. *et al.* (2003), *J. Biol. Chem.*, 278:20374-20380. (primer PI en replicón)

- Perni, B. *et al.* (2003), *Hepatology*, 38 (supl. 1), resumen 972.
- Perni *et al.* (2004), *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 14, en imprenta.
- Perni, R.B. *et al.*, VX-950: The Discovery of an Inhibitor of the Hepatitis C NS3/4A Protease and a Potential Hepatitis C Virus Therapeutic, presentado en la 54ª Reunión Anual de AASLD, 27 de octubre, 2003, Boston, MA.
- 5 Perni, R.B. *et al.* (2003), *Hepatology*, 38, resumen 972.
- Pietschmann y Bartenschlager (2001), *J. Virol.*, 75:1252-1264.
- Rice, C.M. (1996), libro *Field Virology*, pp. 931-959.
- Steinkuhler, C. *et al.* (2001), *Curr. Med. Chem.*, 8:919-932. (informe sobre PI de HCV)
- Taliani, M. *et al.* (1996), *Anal. Biochem.*, 240(1):60-67. (ensayo FRET)
- 10 Tanji, Y. *et al.* (1995), *J. Virol.*, 69,1575-1581.
- Tomei, L. *et al.* (1993), *J. Virol.*, 67:4017-4026. (serina proteasa NS3)
- Trozzi, C. *et al.* (2003), *J. Virol.*, 77:3669-3679. (resistencia del HRV)
- Tsantrizos *et al.* (2003), *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 42, 1356-1360.
- Wasley, A., y M.J. Alter (2000), *Semin. Liver Dis.*, 20, 1-16. (epidemiología de la hepatitis C)
- 15 Yan *et al.* (1998), *Protein Sci.*, 7:837-847. (estructura de la proteasa NS3/4A)
- Yao, N. *et al.* (1999), *Structure Fold Des.*, 7, 1353-1363.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Lin, *et al.*

<120> MUTANTES DE RESISTENCIA DE LA PROTEASA NS3-NS4A DE HCV

<130> 30852/40505

5 <140> pendiente de asignación
<141> 27 de octubre de 2004

<150> documento US 60/514.740
<151> 27 de octubre de 2003

10 <150> documento US 60/525.222
<151> 26 de noviembre de 2003

<150> documento US 60/561.662
<151> 13 de abril de 2004

<160> 5

<170> PatentIn versión 3.3

15 <210> 1
<211> 2055
<212> ADN
<213> virus de la hepatitis C

<400> 1

```

gcgcctatta cggcctactc ccaacagacg cgaggcctac ttggetgcat catcactagc      60
ctcacaggcc gggacaggaa ccaggctcgag ggggaggtcc aagtgggtctc caccgcaaca      120
caatctttcc tggcgacctg cgtcaatggc gtgtgttggga ctgtctatca tggtgccggc      180
tcaaagaccc ttgccggccc aaagggccca atcacccaaa tgtacaccaa tgtggaccag      240
gacctcgtcg gctggcaagc gccccccggg gcgcgttctc tgacaccatg cacctgcggc      300
agctcggacc ttactttggt caccgagcat gccgatgtca ttccgggtgcg ccggcggggc      360
gacagcaggg ggagcctact ctccccaggg ccctctctct acttgaaggg ctcttcgggc      420
gggtccactgc tctgcccctc ggggcaagct gtgggcatct ttccgggtgc cgtgtgcacc      480
cgaggggttg cgaaggcggt ggactttgta ccctgcgagt ctatggaaac cactatgcgg      540
tccccggtct tcacggacaa ctctctccct ccggccgtac cgcagacatt ccaggtggcc      600
catctacacg ccctactgg tagcggcaag agcactaagg tgccgggtgc gtatgcagcc      660
caagggata aggtgcttgt cctgaacccg tccgtgcgag ccaccctagg ttccggggcg      720
tatatgtcta aggcacatgg tctcgacct aacatcagaa ccggggtaag gaccatcacc      780
acgggtgccc ccatcaogta ctccacctat ggcaagttc ttgccgacgg tggttgctct      840
gggggcgcct atgacatcat aatatgtgat gagtgcact caactgactc gaccactatc      900
ctgggcatcg gcacagtcct ggaccaagcg gagacggctg gagcgcgact cgtcgtgctc      960
gccaccgcta cgcctccggg atcggtcacc gtgccacatc caaacatcga ggaggtggct     1020
    
```

20

ES 2 389 201 T3

ctgtccagca ctggagaaat ccccttttat ggcaaagcca tccccatcga gaccatcaag 1080
 ggggggaggc acctcatttt ctgccattcc aagaagaaat gtgatgagct cgccgcgaag 1140
 ctgtccggcc tcggactcaa tgctgtagca tattaccggg gccttgatgt atccgtcata 1200
 ccaactagcg gagacgtcat tgtcgtagca acggacgctc taatgacggg ctttaccggc 1260
 gatttcgact cagtgatcga ctgcaataca tgtgtcacc agacagtoga cttcagcctg 1320
 gacccgacct tcaccattga gacgacgacc gtgccacaag acgcggtgtc acgctcgcag 1380
 cggcgaggca ggactggtag gggcaggatg ggcatttaca ggtttgtgac tccaggagaa 1440
 cggccctcgg gcatgttoga ttctcgggt ctgtgcgagt gctatgacgc gggctgtgct 1500
 tggtagcagc tcacgcccgc cgagacctca gttagggtgc gggettacct aaacacacca 1560
 gggttgcccg tctgccagga ccatctggag ttctgggaga gcgtctttac aggctcacc 1620
 cacatagacg cccatttctt gtcccagact aagcaggcag gagacaactt cccctacctg 1680
 gtagcatacc aggetacggg gtgcccagg gctcaggetc cacctccatc gtgggaccaa 1740
 atgtggaagt gtctcatacg gctaaagcct acgctgcacg ggccaacgcc cctgctgtat 1800
 aggctgggag ccgttcaaaa cgaggttact accacacacc ccataaccaa atacatcatg 1860
 gcatgcatgt cggctgacct ggaggtcgtc acgagcaact gggctgctggt aggcggagtc 1920
 ctagcagctc tggccgcgta ttgcctgaca acaggcagcg tggtcattgt gggcaggatc 1980
 atcttgtccg gaaagccggc catcattccc gacagggaaag tcctttaccg ggagttcgat 2040
 gagatggaag agtgc 2055

<210> 2

<211> 685

<212> ADN

5 <213> virus de la hepatitis C

<400> 2

Ala Pro Ile Thr Ala Tyr Ser Gln Gln Thr Arg Gly Leu Leu Gly Cys
 1 5 10 15

Ile Ile Thr Ser Leu Thr Gly Arg Asp Arg Asn Gln Val Glu Gly Glu
 20 25 30

Val Gln Val Val Ser Thr Ala Thr Gln Ser Phe Leu Ala Thr Cys Val
 35 40 45

Asn Gly Val Cys Trp Thr Val Tyr His Gly Ala Gly Ser Lys Thr Leu
 50 55 60

Ala Gly Pro Lys Gly Pro Ile Thr Gln Met Tyr Thr Asn Val Asp Gln
 65 70 75 80

ES 2 389 201 T3

Asp Leu Val Gly Trp Gln Ala Pro Pro Gly Ala Arg Ser Leu Thr Pro
 85 90 95
 Cys Thr Cys Gly Ser Ser Asp Leu Tyr Leu Val Thr Arg His Ala Asp
 100 105 110
 Val Ile Pro Val Arg Arg Arg Gly Asp Ser Arg Gly Ser Leu Leu Ser
 115 120 125
 Pro Arg Pro Val Ser Tyr Leu Lys Gly Ser Ser Gly Gly Pro Leu Leu
 130 135 140
 Cys Pro Ser Gly His Ala Val Gly Ile Phe Arg Ala Ala Val Cys Thr
 145 150 155 160
 Arg Gly Val Ala Lys Ala Val Asp Phe Val Pro Val Glu Ser Met Glu
 165 170 175
 Thr Thr Met Arg Ser Pro Val Phe Thr Asp Asn Ser Ser Pro Pro Ala
 180 185 190
 Val Pro Gln Thr Phe Gln Val Ala His Leu His Ala Pro Thr Gly Ser
 195 200 205
 Gly Lys Ser Thr Lys Val Pro Ala Ala Tyr Ala Ala Gln Gly Tyr Lys
 210 215 220
 Val Leu Val Leu Asn Pro Ser Val Ala Ala Thr Leu Gly Phe Gly Ala
 225 230 235 240
 Tyr Met Ser Lys Ala His Gly Ile Asp Pro Asn Ile Arg Thr Gly Val
 245 250 255
 Arg Thr Ile Thr Thr Gly Ala Pro Ile Thr Tyr Ser Thr Tyr Gly Lys
 260 265 270
 Phe Leu Ala Asp Gly Gly Cys Ser Gly Gly Ala Tyr Asp Ile Ile Ile
 275 280 285
 Cys Asp Glu Cys His Ser Thr Asp Ser Thr Thr Ile Leu Gly Ile Gly
 290 295 300
 Thr Val Leu Asp Gln Ala Glu Thr Ala Gly Ala Arg Leu Val Val Leu
 305 310 315 320
 Ala Thr Ala Thr Pro Pro Gly Ser Val Thr Val Pro His Pro Asn Ile
 325 330 335

ES 2 389 201 T3

Glu Glu Val Ala Leu Ser Ser Thr Gly Glu Ile Pro Phe Tyr Gly Lys
 340 345 350
 Ala Ile Pro Ile Glu Thr Ile Lys Gly Gly Arg His Leu Ile Phe Cys
 355 360 365
 His Ser Lys Lys Lys Cys Asp Glu Leu Ala Ala Lys Leu Ser Gly Leu
 370 375 380
 Gly Leu Asn Ala Val Ala Tyr Tyr Arg Gly Leu Asp Val Ser Val Ile
 385 390 395 400
 Pro Thr Ser Gly Asp Val Ile Val Val Ala Thr Asp Ala Leu Met Thr
 405 410 415
 Gly Phe Thr Gly Asp Phe Asp Ser Val Ile Asp Cys Asn Thr Cys Val
 420 425 430
 Thr Gln Thr Val Asp Phe Ser Leu Asp Pro Thr Phe Thr Ile Glu Thr
 435 440 445
 Thr Thr Val Pro Gln Asp Ala Val Ser Arg Ser Gln Arg Arg Gly Arg
 450 455 460
 Thr Gly Arg Gly Arg Met Gly Ile Tyr Arg Phe Val Thr Pro Gly Glu
 465 470 475 480
 Arg Pro Ser Gly Met Phe Asp Ser Ser Val Leu Cys Glu Cys Tyr Asp
 485 490 495
 Ala Gly Cys Ala Trp Tyr Glu Leu Thr Pro Ala Glu Thr Ser Val Arg
 500 505 510
 Leu Arg Ala Tyr Leu Asn Thr Pro Gly Leu Pro Val Cys Gln Asp His
 515 520 525
 Leu Glu Phe Trp Glu Ser Val Phe Thr Gly Leu Thr His Ile Asp Ala
 530 535 540
 His Phe Leu Ser Gln Thr Lys Gln Ala Gly Asp Asn Phe Pro Tyr Leu
 545 550 555 560
 Val Ala Tyr Gln Ala Thr Val Cys Ala Arg Ala Gln Ala Pro Pro Pro
 565 570 575
 Ser Trp Asp Gln Met Trp Lys Cys Leu Ile Arg Leu Lys Pro Thr Leu
 580 585 590

ES 2 389 201 T3

His Gly Pro Thr Pro Leu Leu Tyr Arg Leu Gly Ala Val Gln Asn Glu
 595 600 605

Val Thr Thr Thr His Pro Ile Thr Lys Tyr Ile Met Ala Cys Met Ser
 610 615 620

Ala Asp Leu Glu Val Val Thr Ser Thr Trp Val Leu Val Gly Gly Val
 625 630 635 640

Leu Ala Ala Leu Ala Ala Tyr Cys Leu Thr Thr Gly Ser Val Val Ile
 645 650 655

Val Gly Arg Ile Ile Leu Ser Gly Lys Pro Ala Ile Ile Pro Asp Arg
 660 665 670

Glu Val Leu Tyr Arg Glu Phe Asp Glu Met Glu Glu Cys
 675 680 685

5 <210> 3
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

<220>
 <223> cebador sintético

<400> 3

10 ccttctatcg ccttcttg 18

<210> 4
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

15 <220>
 <223> cebador sintético

<400> 4

ccttgatggtc tcgatgg 17

20 <210> 5
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

<220>
 <223> péptido sintético

25 <400> 5

Lys Lys Gly Ser Val Val Ile Val Gly Arg Ile Val Leu Ser Gly Lys
 1 5 10 15

REIVINDICACIONES

- 5 1.- Un polinucleótido aislado que comprende una secuencia de un ácido nucleico que codifica una proteasa NS3/4A de HCV, o su fragmento biológicamente activo o su análogo biológicamente activo, en el que el codón que corresponde al codón 156 de un polinucleótido de NS3/4A de HCV de tipo salvaje está mutado de modo que codifica una serina.
- 2.- El polinucleótido aislado de la reivindicación 1, en el que el polinucleótido codifica una proteasa NS3/4A de HCV, o su fragmento biológicamente activo o su análogo biológicamente activo, que es resistente a un inhibidor de proteasas.
- 10 3.- El polinucleótido aislado de la reivindicación 1, en el que el polinucleótido de HCV de tipo salvaje comprende una secuencia de SEQ ID NO:1.
- 4.- El polinucleótido aislado de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, que comprende una secuencia de un ácido nucleico que codifica una proteasa NS3/4A de HCV, en el que el codón que corresponde al codón 156 de un polinucleótido de NS3/4A de HCV de tipo salvaje está mutado de modo que codifica una serina.
- 15 5.- Una proteína de la proteasa NS3/4A de HCV aislada, o su fragmento biológicamente activo o su análogo biológicamente activo, que comprende una secuencia de aminoácidos en la que el resto aminoácido que corresponde al aminoácido 156 de la proteasa NS3/4A de HCV de tipo salvaje es una serina.
- 6.- La proteína de la proteasa NS3/4A de HCV aislada de la reivindicación 5, que comprende una secuencia de aminoácidos en la que el resto aminoácido que corresponde al aminoácido 156 de la proteasa NS3/4A de HCV de tipo salvaje es una serina.
- 20 7.- La proteína de la proteasa NS3/4A de HCV aislada, o su fragmento biológicamente activo o su análogo biológicamente activo, de la reivindicación 5, en la que la proteína de la proteasa NS3/4A de HCV aislada, o su fragmento biológicamente activo o su análogo biológicamente activo, es resistente a un inhibidor de proteasas.
- 8.- La proteína de la proteasa NS3/4A de HCV aislada de una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, en la que dicha proteasa NS3/4A de HCV de tipo salvaje comprende una secuencia de SEQ ID NO:2.
- 25 9.- Un vector que comprende un polinucleótido según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4.
- 10.- Una célula o una línea celular hospedante, que comprende:
- a) el polinucleótido según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, o
- b) la proteína, el fragmento o el análogo según una cualquiera de las reivindicaciones 5-8.
- 11.- Una célula hospedante transformada o transfectada con un vector de la reivindicación 9.
- 30 12.- Un HCV aislado, que comprende:
- a) el polinucleótido según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, o
- b) la proteína, el fragmento o el análogo según una cualquiera de las reivindicaciones 5-8.
- 13.- Una composición que comprende:
- a) el polinucleótido según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, o
- 35 b) la proteína, el fragmento o el análogo según una cualquiera de las reivindicaciones 5-8.
- 14.- Un método para detectar la presencia de un HCV resistente a fármacos en una muestra biológica, que comprende detectar la presencia del polinucleótido según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 en dicha muestra biológica.
- 15.- El método según la reivindicación 14, que comprende:
- 40 a) obtener dicho polinucleótido a partir de dicha muestra,
- b) determinar la secuencia del polinucleótido, y
- c) determinar si un codón de dicho polinucleótido que corresponde al codón 156 del polinucleótido de la proteasa NS3/4A de HCV de tipo salvaje codifica una serina.
- 16.- Un método para determinar si una infección por HCV en un paciente es resistente a fármacos, que comprende:
- 45 evaluar si una muestra biológica recogida de un paciente infectado por HCV contiene un polinucleótido según una

cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que la presencia de un polinucleótido según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 es indicativa de que dicho paciente tiene una infección por HCV resistente a fármacos.

- 5 17.- Un método para evaluar si un paciente infectado por HCV tiene una menor sensibilidad o susceptibilidad a VX-950, que comprende evaluar *in vitro* si dicho paciente tiene un ADN de la proteasa NS3/4A del virus de la hepatitis C que tiene una mutación en el codón que codifica el aminoácido 156 de la proteasa NS3/4A del virus de la hepatitis C de tipo salvaje.
- 10 18.- Un método para evaluar si un paciente infectado por HCV tiene una menor sensibilidad o susceptibilidad a un inhibidor de proteasas, que comprende evaluar *in vitro* si dicho paciente tiene un ADN de la proteasa NS3/4A del virus de la hepatitis C que tiene una mutación en el codón que codifica el aminoácido 156 de la proteasa NS3/4A del virus de la hepatitis C de tipo salvaje.
- 19.- El método según una cualquiera de las reivindicaciones 17-18, en el que la mutación se correlaciona o produce una menor sensibilidad o susceptibilidad a BILN 2061.
- 20.- El método según una cualquiera de las reivindicaciones 17-18, en el que la mutación se correlaciona o produce una menor sensibilidad o susceptibilidad a VX-950 y a BILN 2061.
- 15 21.- Un método para evaluar un inhibidor de HCV candidato o potencial, que comprende:
- a) introducir un vector que comprende un polinucleótido según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, y un gen indicador que codifica un indicador, en una célula hospedante;
 - b) cultivar la célula hospedante; y
 - c) medir el indicador en presencia del inhibidor y en ausencia del inhibidor.
- 20 22.- Un método para ensayar un inhibidor de HCV candidato o potencial para la actividad contra HCV, que comprende:
- a) proporcionar una proteína de proteasa, o su fragmento o su análogo según una cualquiera de las reivindicaciones 5-8, y un sustrato de proteasa;
 - 25 b) poner en contacto la proteína de proteasa, o su fragmento o su análogo, con un inhibidor candidato o potencial en presencia del sustrato; y
 - c) evaluar o medir la inhibición de la actividad proteolítica de la proteína de proteasa, o su fragmento o su análogo.
- 23.- Un método para identificar un compuesto eficaz como inhibidor de una proteína de proteasa, o su fragmento o su análogo según una cualquiera de las reivindicaciones 5-8, que comprende:
- a) ensayar la actividad de la proteína de proteasa, o su fragmento o su análogo, en ausencia del compuesto;
 - 30 b) ensayar la actividad de la proteína de proteasa, o su fragmento o su análogo, en presencia del compuesto; y
 - c) comparar los resultados de a) y los resultados de b).
- 24.- Un método para identificar un compuesto capaz de rescatar la actividad de VX-950, en el que una proteasa NS3/4A de HCV se ha hecho resistente a VX-950, que comprende:
- 35 a) poner en contacto una proteína de proteasa, o su fragmento o su análogo según una cualquiera de las reivindicaciones 5-8, con el compuesto;
 - b) ensayar la capacidad de VX-950 para inhibir la actividad de la proteína de proteasa, o su fragmento o su análogo de a), en presencia del compuesto.
- 25.- Un método para identificar un compuesto eficaz contra una proteína de proteasa, o su fragmento o su análogo según una cualquiera de las reivindicaciones 5-8, que comprende:
- 40 a) obtener un modelo tridimensional de la proteína de proteasa, o su fragmento o su análogo, en el que el modelo tridimensional está basado en la estructura cristalina de rayos X (figura 1 y figura 2) de la proteasa NS3/4A;
 - b) diseñar o seleccionar un compuesto que interacciona con el modelo tridimensional; y
 - c) evaluar la capacidad del compuesto para unirse o interaccionar con la proteína de proteasa, o su fragmento o su análogo.
- 45 26.- El método según la reivindicación 25, en el que el modelo se obtiene mediante métodos informáticos.

27.- El método según la reivindicación 25 o la reivindicación 26, en el que la evaluación se realiza mediante la formación de modelos moleculares.

28.- El método según una cualquiera de las reivindicaciones 25-27, en el que dicho compuesto es un compuesto preparado mediante el diseño racional de fármacos y se deriva de la estructura de VX-950.

FIGURA 1

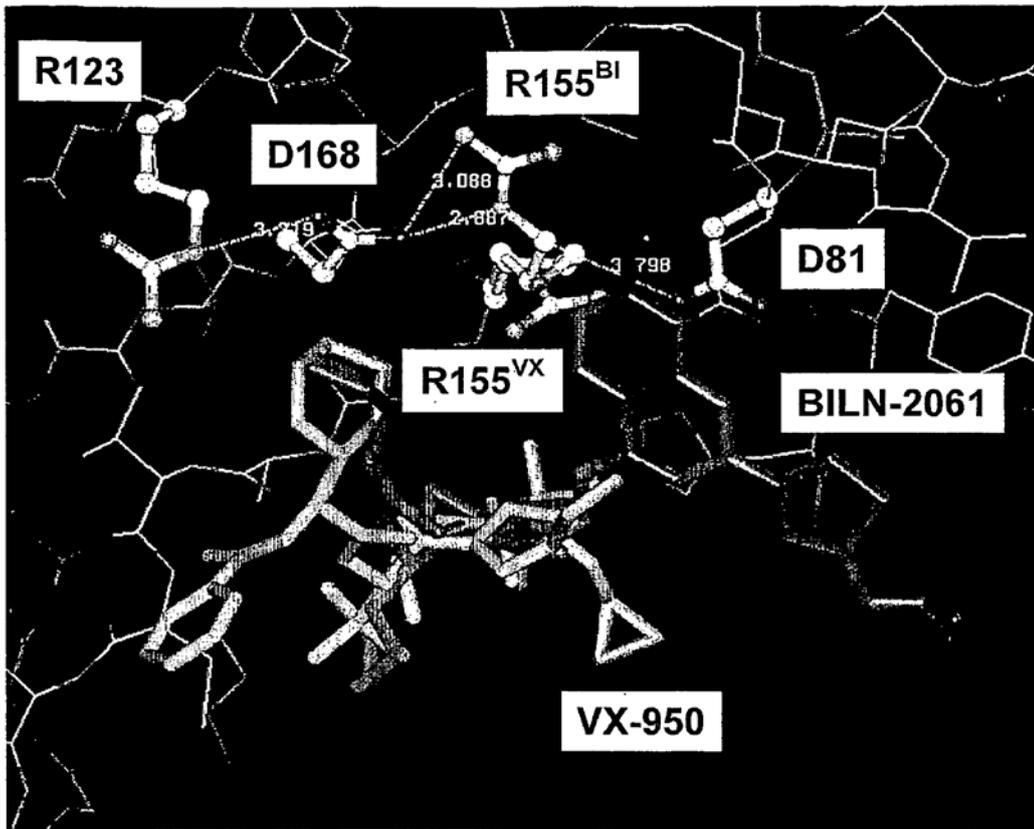


FIGURA 2

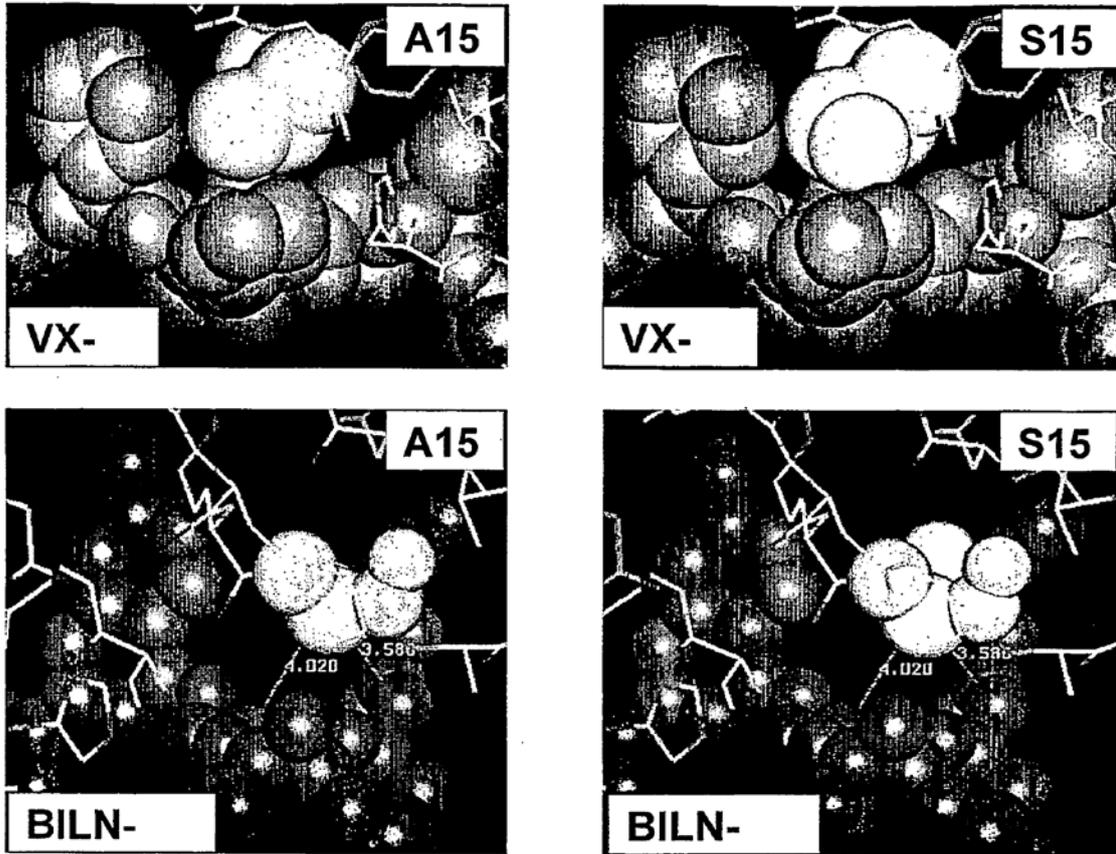
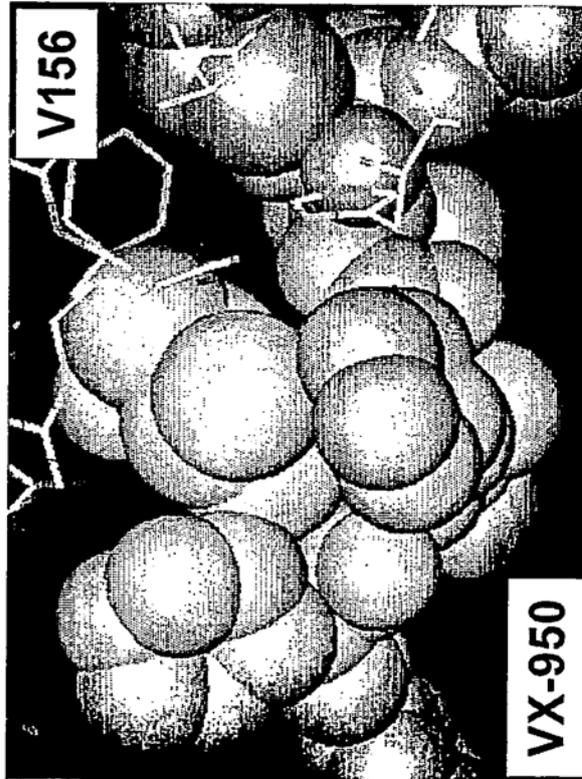
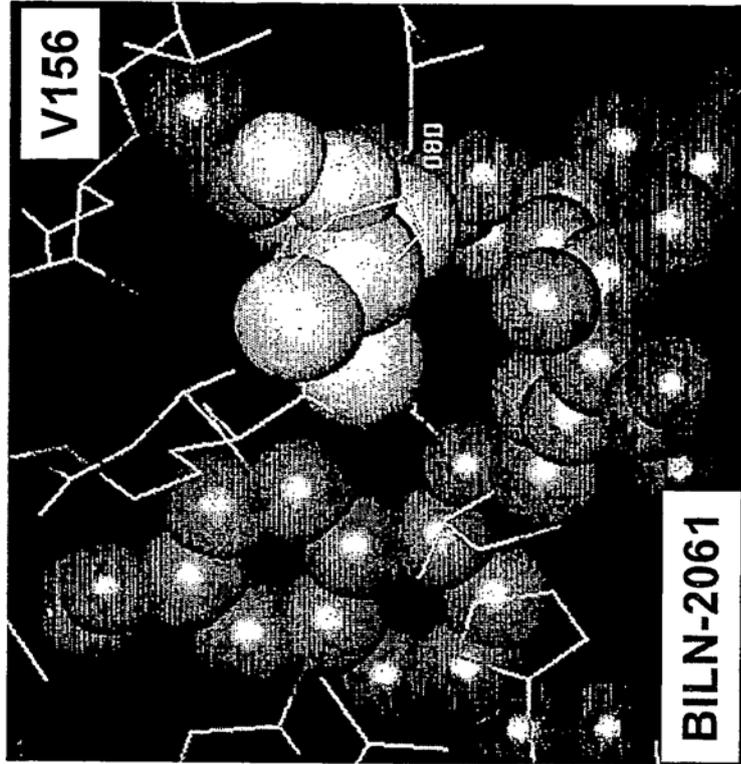
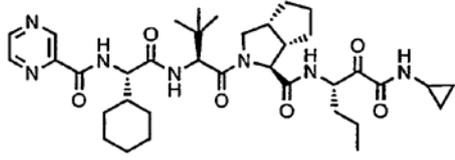
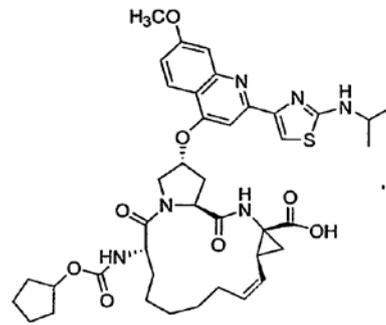


FIGURA 3





VX-950 (**PM** . 680)



BILN 2061 (**PM** . 775)

FIGURA 4

FIGURA 5A

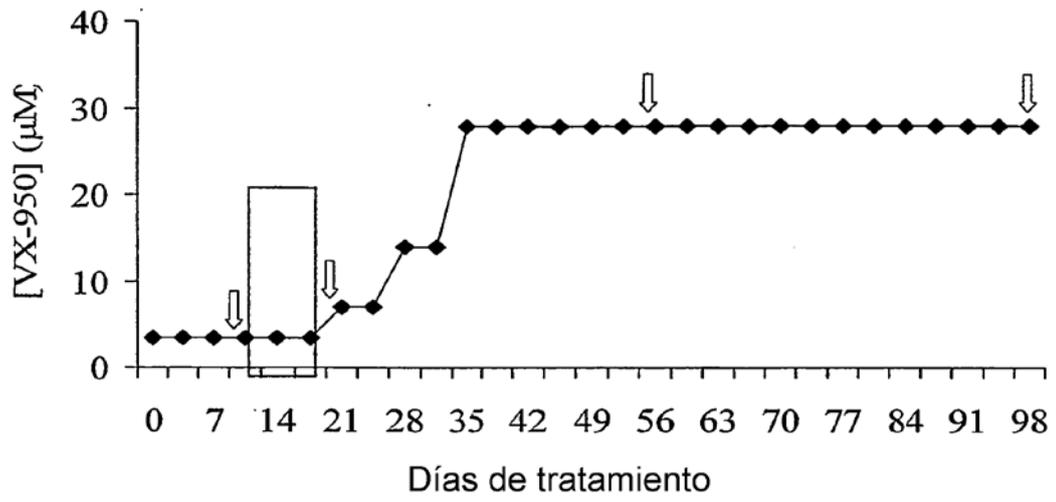


FIGURA 5B

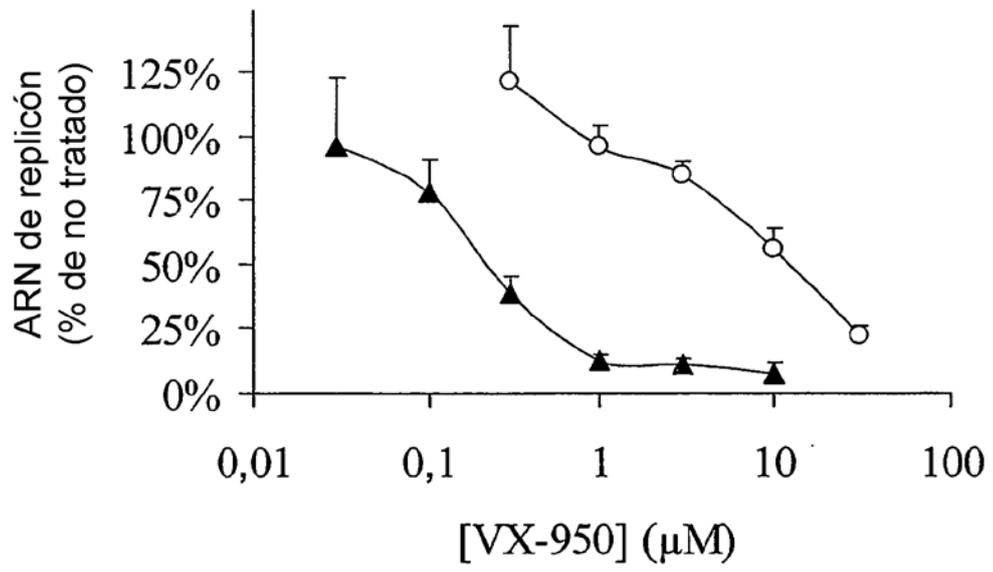


FIGURA 6A

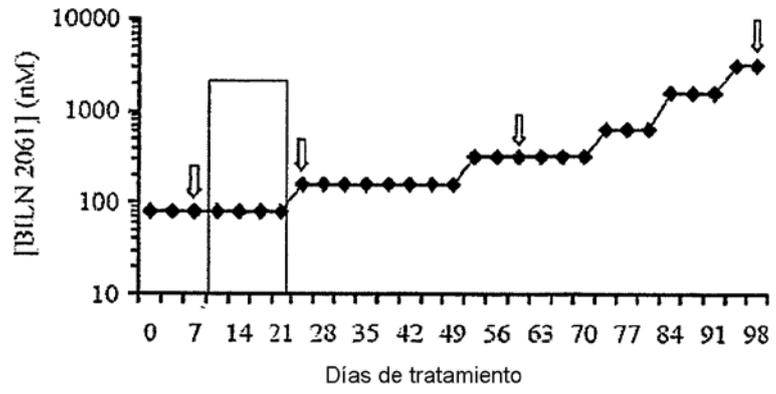


FIGURA 6B

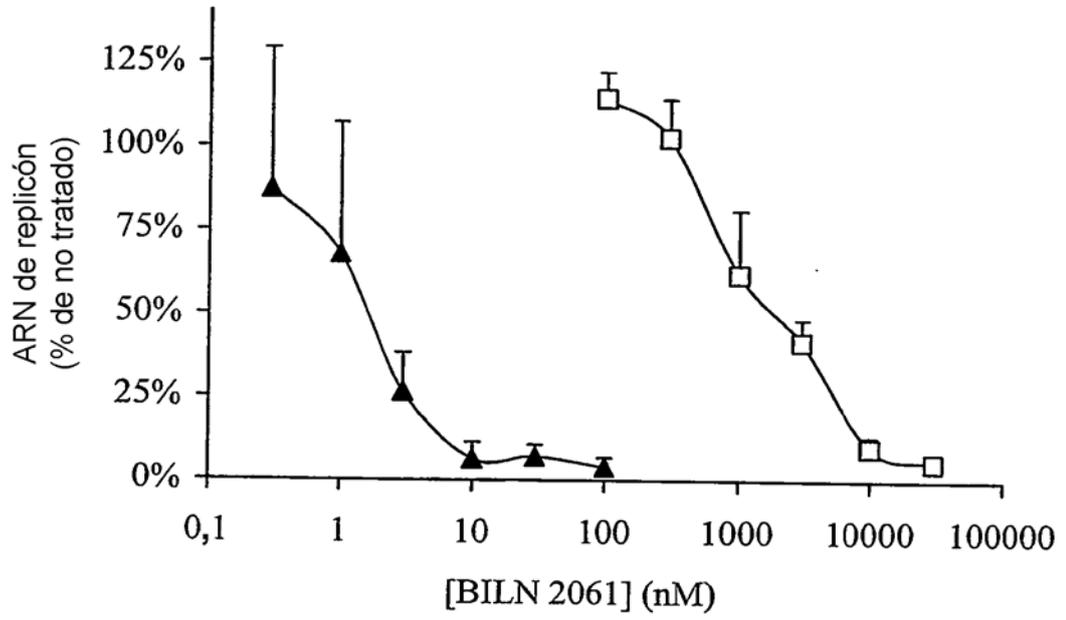


FIGURA 7

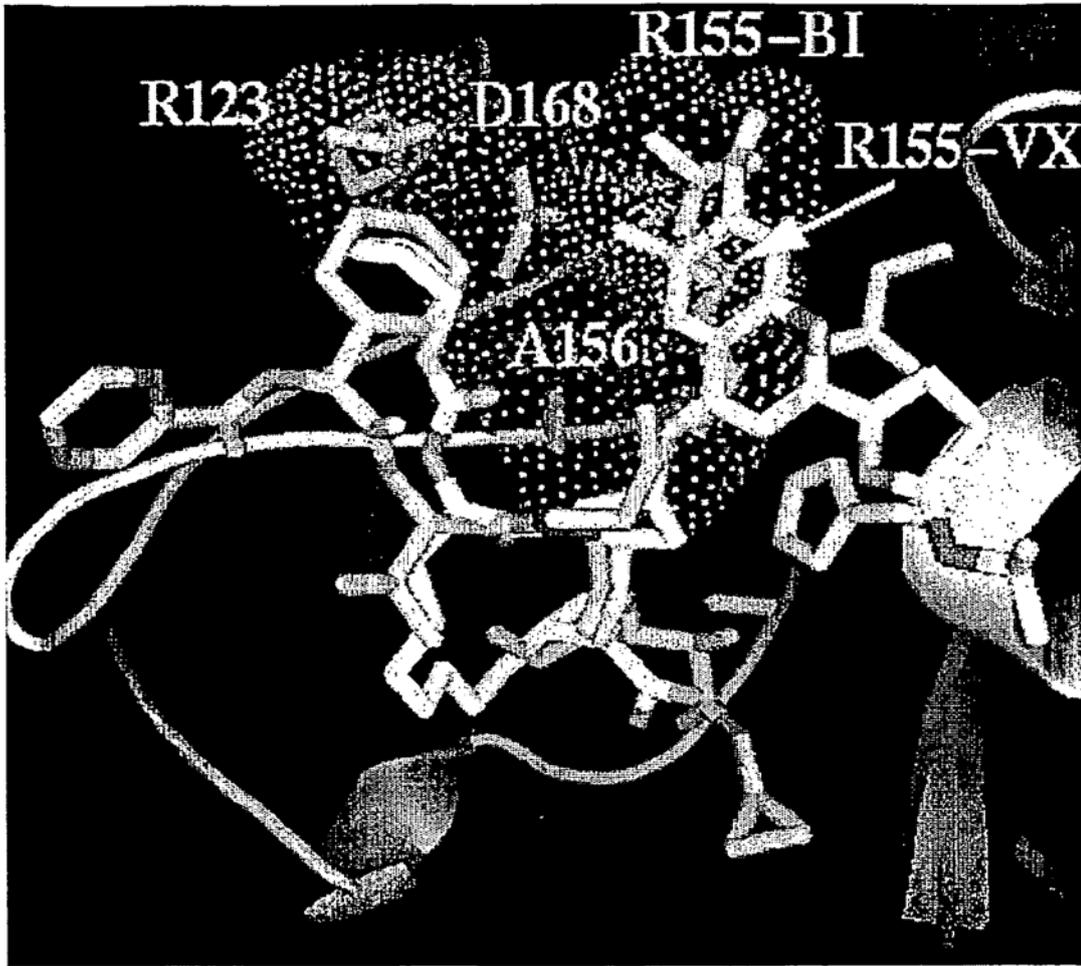


FIGURA 8A-8C

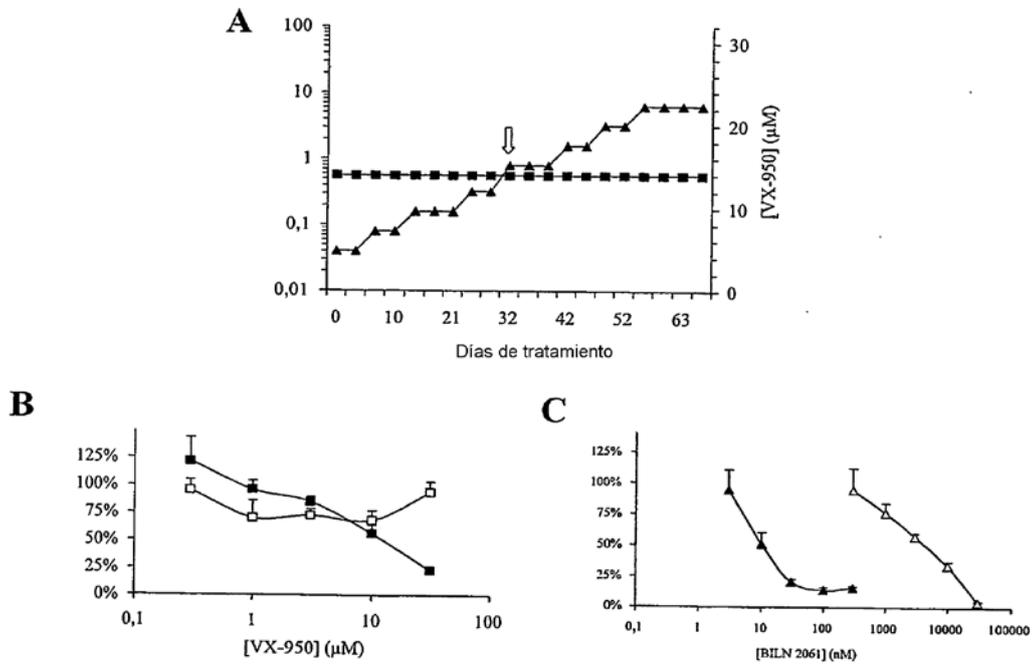


FIGURA 9A-9C

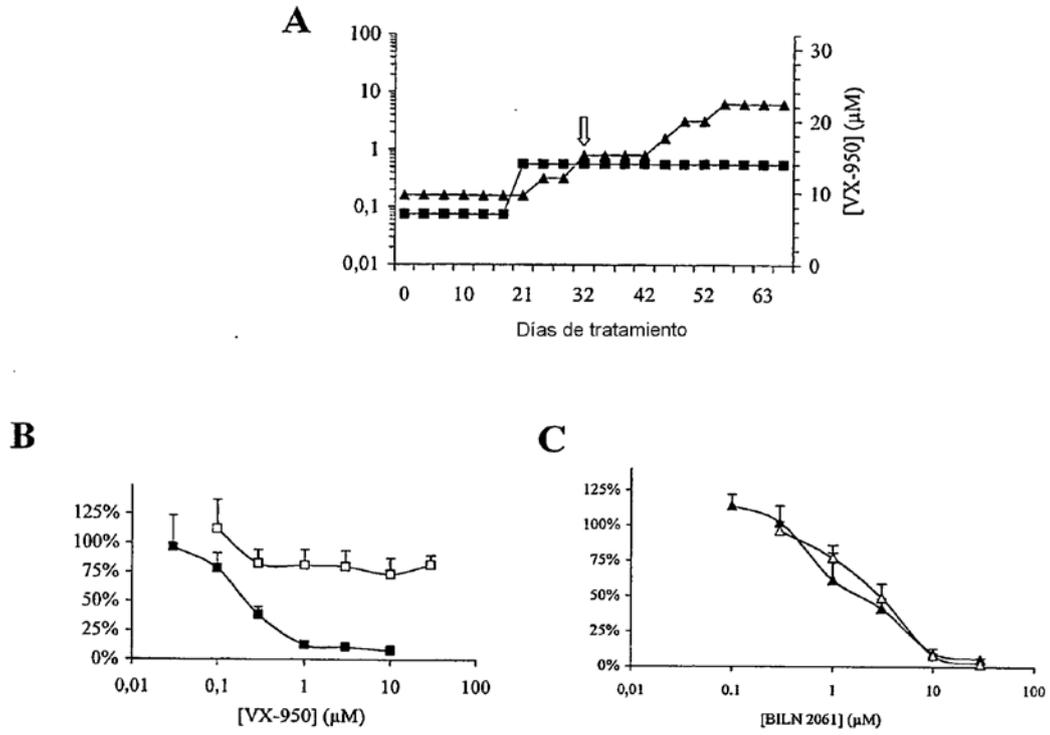


FIGURA 10

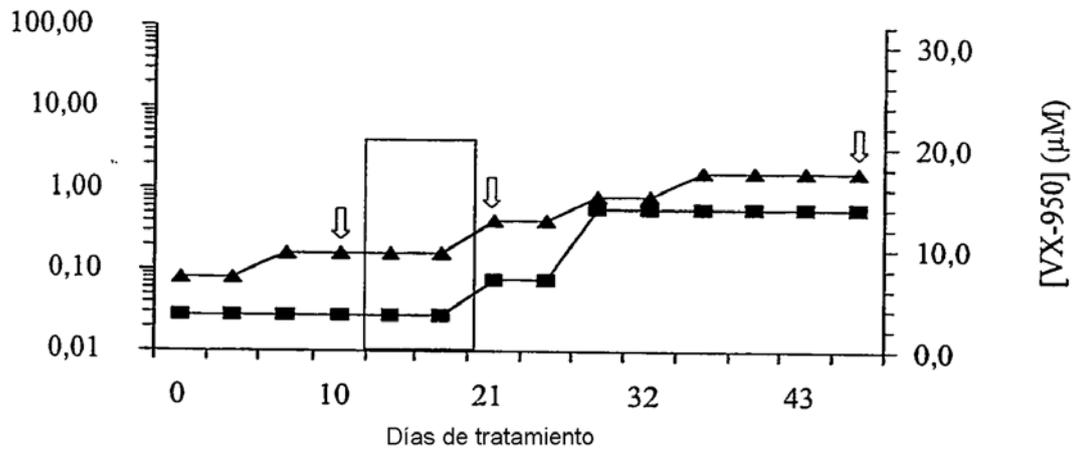


FIGURA 11

