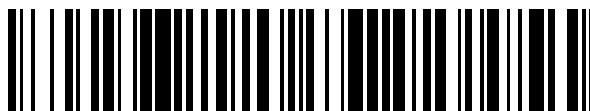


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 456 365**

51 Int. Cl.:

G01N 33/50 (2006.01)

C12Q 1/66 (2006.01)

G01N 33/58 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.05.2010** **E 10721437 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.01.2014** **EP 2430444**

54 Título: **Método para identificación de inhibidores contra el virus del dengue**

30 Prioridad:

12.05.2009 EP 09159994

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

22.04.2014

73 Titular/es:

JANSSEN R&D IRELAND (100.0%)
Eastgate Village
Eastgate, Little Island, County Cork, IE

72 Inventor/es:

GONG, EDWIN YUNHAO;
IVENS, TANIA PAULINE EDUARD;
CLYNHENS, MARLEEN;
LORY, PEDRO MIGUEL JALES y
KRAUS, GUENTER

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 456 365 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

Método para identificación de inhibidores contra el virus del dengue.

La presente invención se refiere a un método para identificación de inhibidores contra el virus del dengue, subtipos 1, 2, 3 ó 4 y su uso en un modo de alta capacidad.

- 5 La familia Flaviviridae incluye aproximadamente 60 virus de RNA envueltos de cadena positiva, la mayor parte de los cuales son transmitidos por un insecto vector. Muchos miembros de esta familia causan problemas importantes de salud pública en diferentes regiones del mundo. Los genomas de todos los flavivirus secuenciados hasta ahora tienen el mismo orden de genes: 5'-C-preM-E-NS1-NS2A-NS2B-NS3-NS4A-NS4B-NS5-3', en los cuales los tres primeros genes codifican las proteínas estructurales de la cápsida (C), el precursor de la proteína de membrana (prM) y la
- 10 proteína de la envoltura (E).

- El dengue es una enfermedad viral transmitida por un mosquito que existe en regiones tropicales y subtropicales de todo el mundo. El dengue se caracteriza por fiebre, erupción, dolor de cabeza severo y dolor en las articulaciones. Su tasa de mortalidad es baja. Sin embargo, a largo de las últimas décadas se ha observado una forma más grave del dengue, caracterizada por hemorragia y shock (fiebre hemorrágica del dengue/síndrome del shock del dengue: DHF/DSS) con frecuencia creciente en niños y adultos jóvenes. El DHF/DSS aparece muy frecuentemente durante la infección por el virus del dengue en individuos infectados previamente con otro serotipo del virus del dengue. Esto ha conducido a la sugerencia de que la mejora inmune de la replicación viral juega un papel en la patogénesis de la forma más grave de la enfermedad.
- 15

- Las epidemias de dengue son un problema importante de salud pública en muchas áreas tropicales y subtropicales en las que las especies del mosquito vector son abundantes. El control de la fiebre del dengue y del DHF/DSS es una preocupación de salud pública importante. Por esta razón, la WHO ha designado los virus del dengue como una diana de alta prioridad para investigación y desarrollo de vacunas acelerada. A pesar de 40 años de investigación intensiva, no están disponibles vacunas seguras y eficaces para la enfermedad del virus del dengue.
- 20

- Poco después de su aislamiento en 1944, los virus del dengue se sometieron repetidamente a pasos en cerebro de ratón, dando como resultado la selección de mutantes neurovirulentos en el ratón. Es interesante que estudios realizados en individuos voluntarios demostraron que los mutantes neurovirulentos adaptados al cerebro del ratón de tres cepas de virus del dengue tipo 1 o tipo 2 estaban atenuados, pero eran todavía inmunógenos para los humanos. Sin embargo, los mutantes no fueron desarrollados ulteriormente como cepas de vacunas candidato debido a la preocupación por antígenos del cerebro de ratón en las preparaciones de vacuna. Desde entonces, virus mutantes que: (i) exhibían el fenotipo de tamaño de placa pequeño, y/o (ii) eran sensibles a la temperatura, y/o (iii) estaban adaptados a cultivos celulares derivados de un hospedador no natural (es decir, mutantes de rango del hospedador) han sido seleccionados y evaluados como candidatos para inclusión en una vacuna de virus vivo atenuado. No obstante, a pesar de 25 años de tales esfuerzos, no están disponibles todavía vacunas del dengue seguras y eficaces para uso general. Se ha demostrado que las vacunas completas del virus del dengue desactivado son insuficientemente inmunógenas. Las vacunas de virus vivos atenuados por pasadas seriadas en cultivo de células han adolecido de inestabilidad genética bajo atenuación o inmunogenicidad deficiente.
- 25
- 30
- 35

- Los cuatro serotipos de virus del dengue (tipo 1 a tipo 4) pueden distinguirse por neutralización por reducción de placas utilizando anticuerpos monoclonales específicos de serotipo y por tests menos específicos que utilizan sueros policlonales. La existencia de serotipos se descubrió por primera vez durante los primeros estudios en voluntarios humanos, que demostraron que la infección con un serotipo del dengue inducía inmunidad homotípica duradera, mientras que la inmunidad heterotípica duraba sólo 3 a 5 meses. Una vacuna eficaz del dengue que contenga los 4 serotipos a fin de inducir inmunidad general a los virus del dengue en general ayudaría a excluir la aparición del DHF/DSS.
- 40

- Las secuencias de nucleótidos completas han sido determinadas para los cuatro serotipos del virus del dengue (Mackow, E. et al. (1987) *Virology* 159:217-228; Zhao, B. et al. (1986) *Virology* 155:77-88; Osatomi, K. & Sumiyoshi, H. (1990) *Virology* 176:643-647; Irie, A. et al. (1989) *Gene* 75:197-211; Mason, P.W. et al. (1987) *Virology* 161:262-267; Hahn, Y. S. et al. (1988) *Virology* 162:167-180). Los resultados de estos estudios indican que los cuatro serotipos del virus del dengue comparten una organización de genoma común. Se encontró que el genoma de la cepa 814.669 del Caribe del dengue tipo 4, contiene 10646 nucleótidos (Mackow, E. et al (1987) *Virology* 159:217-228; Zhao, B. et al. (1986) *Virology* 155:77-88).
- 45
- 50

Los 101 primeros nucleótidos en el extremo 5' y los 384 últimos en el extremo 3' son regiones no codificantes. La secuencia restante codifica una poliproteína de 3386 aminoácidos que incluye las tres proteínas estructurales, a saber, cápsida (C), premembrana (prM), y envoltura (E), en su término N, seguidas por siete proteínas no estructurales en el orden, arriba proporcionado, que es consistente con todos los genomas de Flavivirus identificados hasta

ahora. La poliproteína se procesa para generar 11 o más proteínas virales por peptidasa(s) celulares de señal y por proteasas virales (Markoff, L. (1989) *J. Virol.* 63:3345-3352; Falgout, B. et al. (1989) *J. Virol.* 63:1852-1860; Falgout, B. et al. (1991) *J. Virol.* 65:2467-2476; Hori, H. & Lai, C. J. (1990) *J. Virol.* 64:4573-4577).

- 5 Debido a la carencia de una vacuna para combatir el virus del dengue y su propagación e infección posteriores en toda la población mundial, existe una gran necesidad médica de disponer de moléculas químicas pequeñas, tales como compuestos químicos, que pudieran inhibir los serotipos 1-4 del virus del dengue.

Con objeto de poder encontrar tales moléculas químicas pequeñas, es evidentemente necesario un esfuerzo de cribado para testar varios millares y millones de moléculas químicas presentes en una biblioteca de compuestos en cuanto a su aplicación potencial en la inhibición de la replicación y expresión del virus del dengue.

- 10 MULIAWAN SYLVIA Y ET AL: "Inhibitory potential of *Quercus lusitanica* extract on dengue virus type 2 replication", SOUTHEAST ASIAN JOURNAL OF TROPICAL MEDICINE AND PUBLIC HEALTH, vol. 37, Supl. 3, enero 2006, p.132-135, dan a conocer un ensayo que implica células C6/36. El efecto inhibitorio se determinó por electroforesis en gel 2D.

- 15 NOAH ET AL: "A cell-based luminescence assay is effective for high-throughput screening of potential influenza antivirals", ANTIVIRAL RESEARCH, vol. 73, no. 1, Epub 28.07.2006, p. 50-59, dan a conocer un ensayo en el cual se utilizaron células MDCK.

GONG E ET AL: "Development of robust antiviral assays for profiling compounds against a panel of positive-strand RNA viruses using ATP/luminescence readout", JOURNAL OF VIROLOGICAL METHODS, vol. 151, no. 1, Epub 22.04.2008, p.121-125, dan a conocer ensayos basados en células que implican células Vero y Vero E6.

- 20 Un esfuerzo de cribado puede realizarse únicamente con un ensayo de cribado satisfactorio, rápido y fiable de alta capacidad en el que puedan testarse y analizarse un número muy grande de compuestos químicos en un módulo de alta velocidad.

La presente invención se refiere a un método para identificación de inhibidores contra los serotipos 1, 2, 3 ó 4 del virus del dengue por cribado de compuestos químicos o bibliotecas de compuestos químicos que comprende:

- 25 a) poner aproximadamente 1000 a 2000 células Vero o células Huh 7.5 en contacto con un compuesto químico,
b) añadir virus del dengue a dichas células y compuesto químico del paso a),
c) incubar dichas células, compuesto químico y virus del paso b) a 37°C hasta que el efecto citopático viral (CPE) en el control del virus alcanza aproximadamente 100%,
30 d) añadir enzima luciferasa y sustrato de luciferasa a las células, compuesto, virus,

y medir después de ello la luminiscencia y calcular el valor CE_{50} que es una medida para la actividad inhibidora del compuesto contra el virus del dengue.

- 35 En el método anterior, cuando se utiliza el subtipo 2 del virus del dengue y se somete a test, la cantidad preferida de células Vero es aproximadamente 1500, mientras que cuando se utilizan y someten a test los subtipos 1, 3 ó 4 del virus del dengue, las células preferidas son las denominadas células Huh 7.5.

La MOI (Multiplicidad de Infección) en el método cuando se utiliza y se somete a test el virus del dengue subtipo 2 es 0,1, 0,5 o 1,0, si bien se utiliza preferiblemente una MOI de 0,1. La MOI (Multiplicidad de Infección) en el método cuando se utiliza y se somete a test el virus del dengue subtipo 1, 3 ó 4, cae dentro del intervalo de 1,0 y 10,0, pero preferiblemente es 1,0 ó 5,0.

- 40 En el método según la invención, la incubación de las células (Vero o Huh 7.5) junto con un compuesto químico y el subtipo testado del virus del dengue, tiene lugar hasta que se ha obtenido un efecto citopático (CPE) de 100% en el control del virus. La estimación del tiempo para obtener dicho CPE podría ser 5 ó 6 días de incubación a 37°C.

- 45 El sustrato preferido para la enzima luciferasa es D-luciferina, si bien el método según la invención puede adaptarse y utilizarse fácilmente en un modo de alta capacidad para testar numerosas cantidades de compuestos presentes en una biblioteca química.

En la presente invención, el término "inhibidor" se utiliza para hacer referencia a cualquier entidad química, tal como compuesto químico, molécula pequeña, péptido, proteína y análogos, que inhiba el crecimiento, replicación y/o proliferación del virus del dengue subtipo 1, 2, 3 ó 4.

El término "células Vero" y su línea de células respectiva se refiere a la línea de células que se deriva de células

epiteliales de riñón del Mono Verde Africano. La línea de células fue establecida en 1962 por científicos japoneses (véase Yasumura Y, Kawakita M (1963). "The Research for the SV40 by means of tissue culture technique". *Nippon Rinsho* **21** (6): 1201-1219.)

The term "células Huh 7.5" se refiere a aquéllas células como una sublínea derivada de células de hepatoma Huh-7 (Blight K J, McKeating J A, Rice CM. *J Virol.* 2002; **76**:13001-13014.)

El sistema ATPLite™ (Perkin-Elmer y WO 00/18253) es un sistema de monitorización de Adenosina Trifosfato (ATP) basado en luciferasa de luciérnaga (*Photinus pyralis*). Este ensayo de luminiscencia es una alternativa a los ensayos colorimétricos, fluorométricos y de radioisótopos para la evaluación cuantitativa de la proliferación y citotoxicidad de células de mamífero cultivadas. Puede utilizarse monitorización de ATP para evaluar los efectos citocidas, citostáticos y proliferativos de una extensa gama de fármacos, modificadores de la respuesta biológica y compuestos biológicos. ATPLite es un kit de ensayo de adición de monitorización de ATP de alta sensibilidad realmente homogéneo en un solo paso para la cuantificación de células viables. El kit puede utilizarse para sistemas de proceso continuos tales como sistemas en línea en ambientes de alta capacidad. Estos sistemas en línea no requieren una semivida de señal larga, dado que el tiempo entre la adición del reactivo y la lectura de la luminiscencia resultante es relativamente corto (minutos). La disminución de la producción de luz por luminiscencia es aproximadamente 15% al cabo de 30 minutos. Esta disminución es independiente de los números de células, pero puede diferir entre el tipo de célula y el medio. Se ha determinado que el número máximo de células que puede aplicarse es 50.000 células por pocillo para microplacas de 96 pocillos, y 12.500 células por pocillo para microplacas de 384 pocillos. Dado que el kit no necesita estabilización alguna de la señal de luminiscencia, se preserva la alta capacidad.

El ATP es un marcador para viabilidad celular dado que está presente en todas las células metabólicamente activas, y la concentración disminuye muy rápidamente cuando las células sufren necrosis o apoptosis. El sistema de ensayo ATPLite de un solo paso está basado en la producción de luz causada por la reacción de ATP con adición de luciferasa y D-luciferina añadidas.

Esto se ilustra en el esquema de reacción siguiente:



La luz emitida es proporcional a la concentración de ATP dentro de ciertos límites.

Materiales y métodos

1. Células y virus

Se adquirieron células Vero (células de riñón de mono verde africano) de la European Collection of Cell Cultures (ECACC) y se cultivaron en Medio Esencial Mínimo de Eagle (MEM; Invitrogen) suplementado con 10% de suero de ternero fetal (FCS; Cambrex, Bélgica), 2 mM L-glutamina, y 0,04% gentamicina (50 mg/ml). Para tratamiento con el fármaco, se utilizó el medio idéntico suplementado con 2% FCS.

Todos los virus del dengue se adquirieron de la European Collection of Cell Cultures (ECACC).

2. Stocks de virus y titulaciones

Se prepararon stocks de virus del dengue utilizando las células Vero y se titularon por medida de la dosis infecciosa en cultivo de tejido al 50% (TCID₅₀), la dilución del stock de virus que producía CPE en el 50% de las células en el punto final.

3. Ensayos antivirales (serotipo 2 del dengue)

Se añadieron 15 µl de células Vero (1500 células/pocillo) a una placa blanca de 384 pocillos que contenía 10 µl del compuesto de test diluido serialmente 4 veces en medio de cultivo de células con 2% FCS. Se añadieron luego 15 µl de stock de virus a cada pocillo con una MOI de 0,1. Los controles de células recibieron solamente células y medio, mientras que los controles de virus recibieron virus pero no recibieron cantidad alguna del compuesto de test. Las placas se incubaron a 37°C hasta que la CPE viral en los pocillos de control de virus alcanzó ~ 100% (5-6 días). Se añadió ATPLite (Perkin-Elmer) a todos los pocillos según las instrucciones del suministrador. Resumidamente, se añadieron a cada pocillo 40 µl de la solución sustrato liofilizada reconstituida. La placa se sacudió a 700 rpm durante 2 minutos y se midió la luminiscencia utilizando un aparato Viewlux (Perkin Elmer) tomando una lectura integrada durante 0,1-0,5 segundos de cada placa de test. Los resultados se expresaron como valores CE₅₀ definidos como la concentración de compuesto que alcanzaba 50% de inhibición de las señales de luminiscencia reducidas por el virus en comparación con el control de células no infectadas. La ratio de señal a ruido de un ensayo es la ratio entre las

señales luminiscentes medias de los controles de células y los controles de virus. El intervalo dinámico se define como la ratio entre las señales en el punto final (señal máxima) y el primer punto en el intervalo lineal de la curva dosis-respuesta.

4. Ensayo de citotoxicidad

- 5 Para testar la citotoxicidad, las células se incubaron con diluciones seriadas del compuesto como se ha descrito arriba pero en ausencia de virus. La concentración citotóxica de 50% (CC₅₀) se determinó por comparación de la señal luminiscente de los pocillos tratados con el compuesto con pocillos de control de células.

5. Reproducibilidad del ensayo

- 10 La reproductividad intra-ensayo se midió realizando cada experimento en tres placas idénticas con cada concentración de fármaco por triplicado. La reproducibilidad inter-ensayos se midió realizando tres experimentos independientes en momentos diferentes en las mismas condiciones experimentales.

Tabla: Los valores CE₅₀ de tres (3) compuestos seleccionados

15	CE ₅₀ (μM)						
	Exp. # 1	Exp. # 2	Exp. # 3	Exp. # 4	Exp. # 5	Exp. # 6	Exp. # 7
Ribavirina	51,99	53,80	43,76	42,38	47,71	68,98	67,47
2'-C-metilcitidina	13,49	14,64	10,28	10,43	6,73	14,03	17,41
20 6-Azauridina	5,52	4,85	3,74	4,26	4,60	3,81	5,14

Lo anterior demuestra que el método según la invención puede utilizarse para testar respecto a la selección de compuestos que inhiben el virus del dengue.

- 25 6. Ensayos antivirales (serotipos 1, 3, y 4 del dengue)

Los ensayos antivirales para los serotipos 1, 3, y 4 del dengue son similares al del serotipo 2 del dengue excepto que se utilizaron células Huh7.5 (1000 células/pocillo). La entrada de virus para el serotipo 1 del dengue (cepa TC974) y el serotipo 4 (cepa H241) es MOI de 5, y para el serotipo 3 del dengue (cepa H87) es MOI de 1. El tiempo de incubación es 5 días.

- 30 7. Comparación con el ensayo de absorción de tinte:

- Los ensayos de inhibición del efecto citopático emplean usualmente lecturas de absorción de tinte, v.g. rojo neutro y MTT (bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazolio). Los principales inconvenientes de tales lecturas colorimétricas son baja capacidad, intervalo dinámico bajo, y una ratio baja de señal a ruido. Para el virus del dengue, aunque era evidente un efecto citopático de 100% en las células infectadas, la presencia de residuos celulares causa un ruido de fondo alto, dando como resultado valores extremadamente bajos de la ratio señal a ruido y el intervalo dinámico. Esto hace que el ensayo de absorción de tinte sea inadecuado como ensayo de inhibición del CPE del dengue. Para resolver estas desventajas, se desarrolló y validó un ensayo alternativo que utilizaba la lectura ATP/luminiscencia. En comparación con los ensayos basados en absorción de tinte, los ensayos con lectura basada en ATP/luminiscencia dan inesperadamente un intervalo dinámico mayor y mejor ratio señal a ruido (20-30 veces, véase la Figura 1). Ventajas adicionales de tales ensayos son su alta capacidad y naturaleza homogénea (mezcla y medida). Dado que los programas de cribado basados en lecturas CPE tradicionales se ven dificultados a menudo por ratios problemáticas señal a ruido y baja capacidad, el cambio del punto final a una lectura de luminiscencia puede tener un impacto importante sobre el descubrimiento de fármacos.

8. La exactitud del ensayo:

- 45 La tabla enumera los valores CE₅₀ de los compuestos de referencia y el número de medidas.

Compuesto	EC ₅₀ (μM)	# Datos
Ribavirina	52,97 ± 10,21	53
2'-C-metilcitidina	12,62 ± 3,32	54

6-Azaauridina	4,53 ± 0,83	42
Interferón-α	861,2 UI/ml ± 427,11	30

La robustez del ensayo se determinó por hasta 24 medidas con operadores, experimentos, producciones en placa y stock de virus variables.

9. Cribado de bibliotecas:

- 5 Utilizando este ensayo HTS, se cribaron un total de 150.000 compuestos de bibliotecas diferentes. La tasa de acierto es ~ 0,83% (SI > 4).

10. Precisión del ensayo:

La precisión del ensayo se determina por medida de la variabilidad de los valores CE_{50} de los compuestos de referencia A, B, C y D y se representa en la Figura 2.

- 10
- Dentro de la variabilidad del ensayo
 - Repetibilidad (variabilidad dentro del día)
 - Reproducibilidad (variabilidad interdías)

REIVINDICACIONES

1. Método para identificación de inhibidores contra los serotipos 1, 2, 3 ó 4 del virus del dengue por cribado de compuestos químicos o bibliotecas de compuestos químicos que comprende:
 - 5 a) poner aproximadamente 1000 a 2000 células Vero o células Huh 7.5 en contacto con un compuesto químico,
 - b) añadir virus del dengue a dichas células y compuesto químico del paso a),
 - c) incubar dichas células, compuesto químico y virus del paso b) a 37°C hasta que el efecto citopático viral (CPE) en el control de virus alcanza aproximadamente 100%,
 - d) añadir enzima luciferasa y sustrato de luciferasa a las células, compuesto, virus,
 - 10 e) medir la luminiscencia y calcular el valor CE_{50} que es una medida de la actividad inhibidora del compuesto contra el virus del dengue.
2. Método según la reivindicación 1, en donde el virus del dengue es Virus del dengue subtipo 2 y las células son aproximadamente 1500 células Vero.
3. Método según la reivindicación 1, en donde el virus del dengue es Virus del dengue subtipo 1, 3 ó 4 y las células son células Huh 7.5.
- 15 4. Método según la reivindicación 1 ó 2, en donde el virus del dengue tiene una multiplicidad de infección (MOI) de 0,1, 0,5 o 1,0, preferiblemente 0,1.
5. Método según la reivindicación 1 ó 3, en donde el virus del dengue tiene una multiplicidad de infección (MOI) entre 1,0 y 10,0, preferiblemente 1,0 ó 5,0.
- 20 6. Método según la reivindicación 1-5, en donde el paso c) es aproximadamente 5 ó 6 días.
7. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde el sustrato de luciferasa es D-luciferina.
8. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde el método se realiza en un modo de alta capacidad.

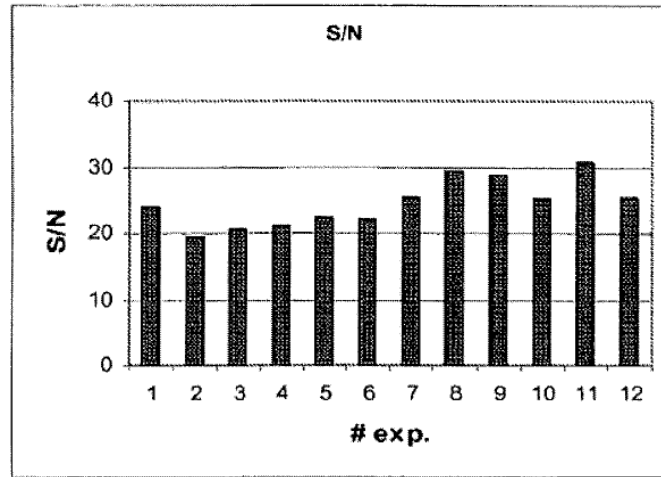


Figura 1

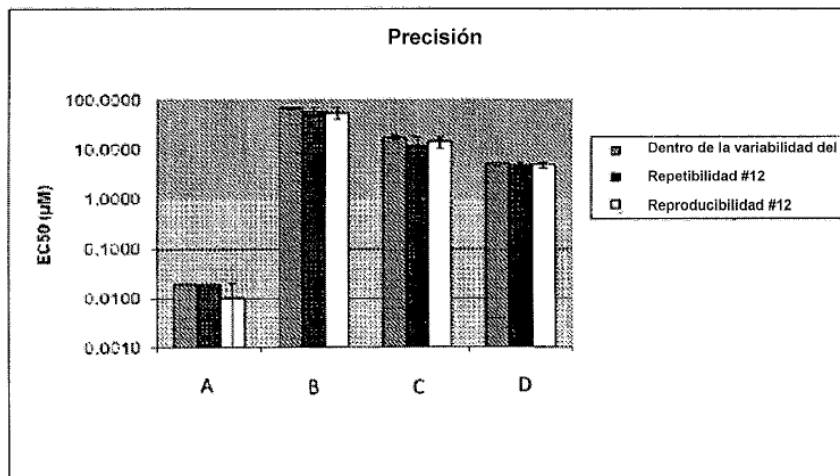


Figura 2