



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 284 501**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

C12Q 1/02 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **00940632 .3**

86 Fecha de presentación : **27.06.2000**

87 Número de publicación de la solicitud: **1196634**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **17.04.2002**

54 Título: **Método para identificar un compuesto que modula la función del producto génico de un gen esencial.**

30 Prioridad: **02.07.1999 GB 9915399**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.11.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.11.2007

73 Titular/es: **AstraZeneca UK Limited**
15 Stanhope Gate
London W1Y 6LN, GB

72 Inventor/es: **Schnell, Norbert Friedemann y**
Chavda, Suberna Jini

74 Agente: **Lehmann Novo, María Isabel**

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 identificar un compuesto que modula la función del producto génico de un gen esencial.

5 Esta invención proporciona métodos para identificación de nuevas dianas y/o inhibidores biológicos. Tales métodos proporcionan herramientas útiles y convenientes para selección de alta potencia. En particular, dichos métodos pueden utilizarse para identificar nuevos agentes antimicrobianos.

10 La aparición de resistencia a los agentes terapéuticos actuales, tales como agentes antibacterianos, antifúngicos, y anti-malaria, requiere el desarrollo de nuevos agentes. Si bien las selecciones bioquímicas basadas en dianas pueden ser satisfactorias, la selección anti-microbiana clásica ha superado claramente los procedimientos racionales de selección de dianas en términos de nuevos antimicrobianos descubiertos. Se observa frecuentemente que las selecciones bioquímicas basadas en dianas invocan una falta de actividad celular, a pesar de una inhibición satisfactoria de la enzima diana, debido quizás a baja permeación hacia el interior de o exportación fuera de la célula. Asimismo, la presencia de estructuras inhibitoras para una diana seleccionada a mano dentro de una serie limitada de moléculas disponibles no está garantizada en absoluto.

15 En contraste, la selección antimicrobiana basada en células identifica frecuentemente la acción antimicrobiana pero, o bien revela luego que esta inhibición está causada por toxicidad general, por ejemplo perturbación de la membrana o intercalación de DNA, o falla en la identificación de cualquier interacción específica del fármaco con la maquinaria celular. Esto complica la optimización química de las cabezas de serie ("leads") iniciales, no proporcionando guía alguna para una relación estructura-actividad.

20 Un enfoque particular para identificar el modo de acción basado en dianas ha sido el de la hipersensibilidad.

25 Históricamente, la vía para generar versiones hipersensibles de una proteína de interés ha sido la generación de mutaciones sensibles a la temperatura (ts) en su gen codificante (Schmid *et al.*, Genetics 123, pp 625-633, (1989)). Fenotipos sensibles a la temperatura (Ts) u otros fenotipos condicionales pueden ser generados por mutagénesis orientada (por ejemplo utilizando PCR) o aleatoria (por ejemplo utilizando productos químicos o radiación). Sin embargo, tales mutantes condicionales son frecuentemente hipersensibles a los inhibidores incluso en condiciones permisivas.

30 El documento EP-A-0972847 describe un método para la selección de sustancias antimicóticas en donde se utiliza como diana un gen esencial procedente de micetos, expresándose dicho gen bajo el control de un promotor heterogéneo regulable.

35 Los autores de la presente invención han encontrado ahora que la hipersensibilidad a los inhibidores puede lograrse fácilmente por apagado de una función esencial particular de las células viables seguido por el análisis de los efectos en presencia/ausencia de un inhibidor potencial. Por "apagado" se entiende que la función esencial particular no está disponible para las células para ningún nivel de expresión.

40 Por consiguiente, en un primer aspecto de la presente invención se proporciona un método *in vitro* para identificar un compuesto que modula la función del producto génico de un gen esencial, método que comprende proporcionar células viables en las cuales el gen se expresa bajo el control de un promotor heterogéneo regulable, desactivar la expresión del gen por el promotor, poner en contacto las células con un compuesto de ensayo y determinar cualquier efecto modulador sobre la función del producto génico con referencia al crecimiento de las células viables.

45 El método proporciona un salto progresivo en la factibilidad de un análisis completo del genoma para hipersensibilidad de los compuestos. El mismo proporciona varias ventajas importantes, no siendo la menor de ellas que se utiliza la proteína "normal" inalterada en contraste con, por ejemplo, la extrapolación a partir de la interacción de una proteína mutagenizada alterada con un inhibidor sobre la interacción del mismo producto químico. Asimismo, no es necesario esfuerzo alguno para la sintonización fina de la actividad del promotor a un nivel mayor o menor. La inhibición de una entidad bioquímica específica, por ejemplo, una proteína requerida para crecimiento celular o supervivencia se indica convenientemente por una respuesta hipersensible de la cepa con el gen regulable en comparación con su precursor inalterado.

50 Por "promotor heterogéneo regulable" se entiende un promotor distinto del promotor nativo para el gen esencial y que puede ser regulado por la adición y/o eliminación de materiales específicos o por ejemplo por otros cambios ambientales.

55 Por "hipersensibilidad" se entiende una mayor reducción en el crecimiento celular en presencia de una concentración idéntica de fármaco, en comparación con una célula de tipo salvaje.

60 Adicionalmente, la hipersensibilidad causada por infra-expresión de una enzima específica puede extenderse a un camino bioquímico completo, tal como por ejemplo la biosíntesis de esteroides. Esto se ilustra por los resultados que se muestran en la Fig. 5 de esta invención, en donde la sensibilidad a terbinafina se altera a la vez por apagado de la enzima diana (codificada por ERG1) y por apagado de otra enzima (codificada por ERG11) en el mismo camino.

Por “viables” se entienden células que han crecido suficientemente para que, cuando se interrumpe la expresión génica de un gen esencial, pueden realizarse medidas significativas y análisis cinético. Las células se dejan crecer preferiblemente en una fase estacionaria precoz, durante cuyo tiempo se toma una lectura final de la densidad óptica. Una densidad óptica reducida en comparación con controles sin fármaco o controles no desactivados se interpreta como inhibición del crecimiento.

Por “gen esencial” se entiende un gen requerido por una célula por ejemplo para crecimiento celular y/o viabilidad celular. Esto incluye de hecho genes requeridos sólo en ciertas condiciones ensayables (es decir, esencial condicional). En su manifestación más simple, la esencialidad se define como necesidad para el crecimiento del organismo en medios ricos (para un sumario exhaustivo de tales medios así como de la metodología general de levaduras véase Sherman *et al.* en *Methods in Enzymology*, vol. 194, editores Guthrie y Fink, Academic Press (1991)). Genes convenientes incluyen genes fúngicos y bacterianos.

Por “desactivación de la expresión génica” se da a entender que toda la expresión del gen cambia de ON a OFF. En la posición OFF no existe expresión génica alguna de nivel bajo.

Por “células” se entienden células de cualquier fuente conveniente, incluyendo éstas células humanas, animales o microbianas. Están desarrollándose técnicas nuevas basadas en el genoma que combinan el escrutinio de compuestos con la identificación simultánea de dianas. Si bien esta invención es de uso particular con organismos modelo tratables genéticamente tales como *Schizosaccharomyces pombe* y *Saccharomyces cerevisiae*, la misma es universalmente aplicable y está limitada únicamente por consideraciones prácticas. Utilizando organismos modelo tales como *S. cerevisiae*, *S. pombe*, *C. elegans*, o *D. melanogaster* es posible estudiar funciones conservadas de los eucariotas. La aplicación de genética utilizando líneas de células humanas o animales directamente, extiende después posibilidades adicionales.

Cualquier compuesto de ensayo conveniente tal como un péptido, ácido nucleico y compuesto de peso molecular bajo puede utilizarse en los métodos de la invención. Los compuestos de ensayo preferidos son agentes terapéuticos potenciales o pueden utilizarse en estudios ulteriores para identificar agentes terapéuticos. Compuestos de ensayo particulares son compuestos de peso molecular bajo de, por ejemplo de un peso molecular inferior a 1000, tal como inferior al peso molecular 600.

El efecto modulador de un compuesto sobre el producto génico de un gen esencial se investiga convenientemente tomando lecturas de punto final de la densidad óptica (cuanto mayor es la densidad óptica absoluta del cultivo, tanto menos inhibición se cree que ha ocurrido. Dicho análisis se efectúa convenientemente a lo largo de períodos típicamente de 24 horas para células de levadura. Las bacterias pueden requerir tiempos significativamente menores (v.g. 12 horas), en tanto que las células eucariotas superiores requerirán varios días para alcanzar la fase de crecimiento estacionario precoz. El análisis es convenientemente fotométrico (densidad óptica del cultivo a 600 nm de longitud de onda).

Es importante que la combinación de técnicas muy recientes para la integración orientada de DNA (por ejemplo con un promotor cambiante que reemplace directamente al promotor nativo) con el análisis de densidad óptica puntual observado para momentos fijos de la respuesta hipersensible (como se detalla adicionalmente más adelante) es nueva y permite la explotación para selección de fármacos en gran escala, así como para la determinación del perfil de compuestos y dianas. Además, tales cepas pueden obtenerse también muy fácilmente en cantidad muy alta (a saber, millares de genes en *S. cerevisiae*).

Algunos ejemplos de promotores cambiables para uso en *S. cerevisiae* incluyen MET3 (reprimible por adición de metionina) y GAL1 (reprimido por glucosa inducida por galactosa); para uso en *S. pombe*: NMT1 (reprimido por tiamina); para uso en *C. albicans*: MALI (reprimido por glucosa, inducido por maltosa, sacarosa); para uso en *E. coli*: araB (reprimido por glucosa, inducido por arabinosa); para uso en materias Gram-positivas tales como estafilococos, enterococos, estreptococos y bacilos: xy1A/xy1R (de *S. xylosus*) (reprimido por glucosa, inducido por xilosa); para uso en *E. coli* y *B. subtilis* pSPAC (un promotor artificial derivado de *E. coli* lac, regulado por IPTG, véase Vagner *et al.* Microbiology (1998), 144, 3097-3104); y para la totalidad de los organismos anteriores más hongos no especificados adicionales, bacterias y líneas de células de mamífero: tetA/tetR (de diversas casetes bacterianas de resistencia a la tetraciclina) este sistema existe en diversas versiones, véase Gossen *et al.* Current Opin. Biotechnol. 5, pp. 516-520 (1994), que son reprimibles o inducibles por diversos análogos de tetraciclina.

En el Ejemplo y las Figuras que siguen se ilustra que es posible generar hipersensibilidad hacia cualquier agente que inhiba una función bioquímica poniendo el gen que codifica dicha función (proteína o RNA) bajo control de un promotor fuertemente regulable y cambiándolo del estado ON al estado OFF al tiempo que se añade simultáneamente la sustancia interactiva (para ilustración de un cambio de este tipo véase la Figura 1). Si bien es conocida la colocación de promotores externos frente a genes de interés para alcanzar sobre- o infra-expresión de la proteína codificada, este proceso requiere sintonización fina y ajuste intensivos en mano de obra. Debido a niveles de expresión muy variables, cada gen de interés requeriría una sintonización diferente de su fuerza promotora para alcanzar un nivel limitante justo de la velocidad de crecimiento. Por esta razón, es improbable que un protocolo de este tipo basado en sintonización fina permita la implementación a la escala de alta potencia necesaria para análisis genómico.

Los nuevos descubrimientos de los autores de la presente invención, que se detallan en los experimentos que se muestran más adelante, demuestran que un protocolo simple y estándar que utiliza un solo promotor en estados ON y OFF definidos claramente (es decir, explícitamente sin modulación más fina alguna del nivel de expresión) es capaz de generar medidas exactas de hipersensibilidad específica debida a infra-expresión de la diana. La infra-expresión está causada por i) degradación del RNA, ii) degradación de la proteína diana, iii) dilución de la molécula diana en varias células hijas durante el crecimiento celular en ausencia de cualquier re-síntesis.

Los ejemplos que siguen demuestran, verbigracia, que proteínas diana fúngicas desconocidas que pueden ser inhibidas por los compuestos pueden identificarse poniendo sus genes esenciales bajo control de un promotor regulable, desactivándolo y exponiéndolo a niveles de compuestos que no inhiben la célula de tipo salvaje correspondiente. Actualmente se ha demostrado que 814 genes de *S. cerevisiae* son esenciales para crecimiento incluso en medios ricos (fuente YPDTM). Una respuesta hipersensible observada (v.g. en un hongo tal como *S. cerevisiae*) demuestra: i) que la diana es esencial, ii) que el compuesto es un agente antifúngico o un punto de partida para el desarrollo de un análogo más potente, iii) que el par (o pares) compuesto-diana coincidente(s) establece el modo de acción para el compuesto antifúngico. Para más de un compuesto detectado contra una diana, puede obtenerse una información valiosa de la relación estructura-actividad (SAR). La comparación y el análisis de reconocimiento de patrones de los efectos de muchos compuestos sobre muchas dianas establecerán una base de datos valiosa útil para agrupar nuevas dianas en caminos inmediatamente. La hipersensibilidad permite también la detección específica de la diana de compuestos de baja potencia no identificables utilizando la cepa parental.

Una ventaja adicional de la invención es que la actividad bioquímica identificada de la molécula diana no es un requisito previo para los métodos de la invención. La hipersensibilidad como tal puede proporcionar una característica ensayable ligada intrínsecamente a una diana específica. Los constructos genómicos de desactivación pueden generarse e integrarse en el genoma de los organismos con una potencia muy alta utilizando metodología publicada basada en PCR sin la implicación de paso de clonación alguno (Longtine *et al.* Yeast, 14, pp. 953-961 (1998); Zhang *et al.* Nature Genetics, 20, pp. 123-128 (1998). Por consiguiente, los métodos de la invención pueden utilizarse para ensayar tantos compuestos como sea posible contra cualquier diana antifúngica potencial, por ejemplo hasta 10, hasta 20, hasta 50, hasta 100, hasta 500 o hasta 1000 dianas utilizando tecnología moderna de selección de alta capacidad.

Por consiguiente, en un método adicional de la invención, se proporciona un método para identificar la hipersensibilidad a fármacos de un camino metabólico, método que comprende proporcionar células viables en las cuales en gen esencial en el camino metabólico se expresa bajo control de un promotor regulable heterogéneo, conmutación de la expresión del gen por el promotor, puesta en contacto de grupos de las células con compuestos de ensayo, determinación y comparación de cualquier efecto modulador sobre el crecimiento de las células viables. Se ha demostrado que la infra-expresión de un elemento de un camino bioquímico y la inhibición química de otra parte es sinérgica (véase Fig. 5) generando con ello información específica del camino por infra-expresión de un solo elemento de dicho camino.

La invención se ilustrará a continuación, pero sin carácter limitante, con referencia al Ejemplo y las Figuras siguientes, en donde:

la Figura 1 muestra la generación de un alelo controlable del gen, Gen1, por reemplazamiento de su promotor nativo con una conmutación ON/OFF bien definida y fuerte; en este caso GAL1;

la Figura 2 muestra la actividad de Erg11p en cepas de tipo salvaje (wt) y cepas GAL1-erg11, e ilustra de qué modo la actividad catalítica desciende tanto con el tiempo como con la concentración incrementada de un inhibidor. El cultivo se desplaza desde galactosa a glucosa en el tiempo 0, con lo cual la nueva síntesis de Erg11p (lanosterol-C-14-desmetilasa) se detiene. La concentración de fluconazol es sub-inhibidora (por ejemplo 10 mg/l) para una cepa de tipo salvaje (wt); -: ausencia de fluconazol,: fluconazol; el umbral se encuentra donde la actividad de Erg11p es limitante de la velocidad para el crecimiento.

La Figura 3 muestra el crecimiento de cepas de tipo salvaje (JK9-3da, Kunz *et al.* Cell, 73, pp. 585-596 (1993)), GAL1-ERG11 y GAL1-AUR1 (generadas como se describe en Longtine *et al.* Yeast, 14, pp. 953-961 (1998)) en presencia de fluconazol;

la Figura 4 muestra el crecimiento de las cepas wt, GAL1-ERG11, y GAL1-AUR1 en presencia de aureobasidina;

la Figura 5 muestra el crecimiento de las cepas wt, GAL1-ERG11, y GAL1-AUR1 en presencia de terbinafina;

la Figura 6 muestra un protocolo para reemplazamiento de promotores en *S. cerevisiae* (sustancialmente como se describe en Longtine *et al.* Yeast, 14, pp. 953-971 (1998)).

Ejemplo

Los caminos biosintéticos de ergosterol y esfingolípido de S. cerevisiae: un estudio con inhibidores conocidos

La base racional en la utilización de una desactivación completa en lugar de un expresante bajo se detalla como sigue, ilustrada para Erg11p (p = proteína), la lanosterol C-14-desmetilasa, una enzima fúngica en el camino biosintético del ergosterol: el fármaco fluconazol, como otros antifúngicos de azol, inhibe Erg11p conduciendo a una actividad total reducida en la célula. Sin embargo, no se observa reducción alguna del crecimiento con tal que la cantidad de Erg11p activo sea suficientemente alta para no ser limitante de la velocidad de crecimiento (por encima del umbral, véase la Figura 2). En el ejemplo presentado, la concentración de fluconazol es insuficiente para reducir la actividad de Erg11p por debajo de este umbral. La situación para un gen ERG11 dirigido por GAL1 es diferente, sin embargo: en el tiempo 0, el promotor del gen modificado por ingeniería genética se cambia del estado ON (debido a la alta expresión de un promotor GAL1, este nivel es usualmente mayor que para el promotor nativo) al estado OFF por cambio de la fuente de carbono en el cultivo). A partir de este momento, no se transcribe cantidad alguna de mRNA nuevo y - después de la degradación del mRNA - no se sintetiza cantidad nueva alguna de la proteína Erg11. Las concentraciones de Erg11p disminuyen ahora debido a la dilución de la enzima en las nuevas células hijas y la degradación de la proteína de Erg11p. Tan pronto como se cruza la línea umbral (Figura 2) Erg11p llega a ser limitante de la velocidad, es decir que la cepa exhibe una velocidad de crecimiento reducida comparada con la cepa parental inalterada (wt). Esto se refleja por una densidad óptica final inferior del cultivo. La presencia del inhibidor fluconazol titula las moléculas de Erg11p activas haciéndolas inactivas. Por esta razón, la línea umbral se cruza antes, dado que no puede sintetizarse cantidad alguna de Erg11p nueva. Comparada con la célula de tipo salvaje, esto se observa como hipersensibilidad (mayor reducción en el crecimiento en presencia de una concentración idéntica de fármaco). De modo simplificado, esto puede explicarse como una cantidad reducida de duplicaciones celulares antes que se alcancen las condiciones limitantes de la velocidad.

Para la evaluación de dianas y compuestos, la hipersensibilidad tiene que ser específica para ciertas combinaciones farmaco-diana. Por esta razón, el método se ensayó y validó con otra combinación farmaco-diana no relacionada conocida: el gen AUR1 codifica la inositolfosforil-ceramida (IPC)-sintasa, una enzima esencial del camino biosintético de los esfingolípidos fúngicos (Nagiec *et al.*, J. Biol. Chem., 1997, 272, 15, 9809-9817). La enzima es inhibida por el producto natural aureobasidinA con potencia sub-nanomolar, conduciendo a una acción antifúngica del fármaco. Al igual que ERG11, AUR1 se sometió a un intercambio de promotor y las cepas de levadura resultantes eran la progenitora (wt), GAL1-ERG11 y GAL1-AUR1. Se ensayaron las mismas respecto a su sensibilidad para ambos fármacos, fluconazol y aureobasidinA. Como había sido predicho por la teoría de los autores de la invención, ambas cepas dirigidas por GAL1 exhibían una notable respuesta hipersensible hacia sus fármacos cognados (véanse las Figuras 3 y 4). Llamativamente, no tenía lugar reacción cruzada alguna, es decir que GAL1-ERG11 no exhibía sensibilidad incrementada frente a aureobasidinA, ni GAL1-AUR1 exhibía hipersensibilidad para fluconazol. Este resultado confirma la teoría de los autores de la invención y demuestra la aplicabilidad y utilidad del método descrito como herramienta para descubrimiento de fármacos y dianas.

De ello se sigue que la reacción de hipersensibilidad para un inhibidor de una enzima en un camino puede extenderse a los inhibidores del camino total. Esto es debido a la configuración lineal de las enzimas en una cascada bioquímica de reacciones donde una sola enzima proporciona el sustrato para la siguiente. Un suministro reducido de sustrato puede actuar sinérgicamente con un nivel de enzima reducido. Así, la actividad de la enzima Erg11p cuasilimitante de la velocidad (después de la desactivación) se reducirá ulteriormente por retirada de su sustrato proporcionado normalmente por Erg1p, escualeno-epoxidasa, otra enzima del camino biosintético de los esteroides, a lo largo de varios pasos bioquímicos. Erg1p está inhibida ahora por terbinafina. Cualquier hipersensibilidad específica de dicho camino permite la clasificación de genes (no clasificados) en el mismo camino que el gen desactivado. Para investigar esto, se examinó Erg1p. Se ha demostrado que esta enzima es inhibida por la terbinafina antifúngica, pero Erg11p no lo es. Como se muestra en la Figura 5, GAL1-ERG11 es tan hipersensible a terbinafina como GAL1-Erg1, demostrando la hipersensibilidad de caminos cruzados propuesta. Esta herramienta de análisis específica del camino será extremadamente útil para la clasificación de nuevos inhibidores (con modo de acción desconocido).

Se comprenderá que, si bien se ha ilustrado particularmente para *S. cerevisiae*, esta invención es universalmente aplicable en todos los organismos genéticamente manipulables, tales como bacterias.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método de identificación *in vitro* de un compuesto que modula la función del producto génico de un gen esencial, método que comprende proporcionar células viables en las cuales el gen se expresa bajo el control de un promotor heterogéneo regulable, desactivar la expresión del gen por el promotor, poner en contacto las células con un compuesto de ensayo y determinar cualquier efecto modulador sobre la función del producto génico tomando como referencia el crecimiento de las células viables.
- 10 2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, y en el cual las células viables se han desarrollado hasta la fase estacionaria precoz.
3. Un método de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el cual el gen es un gen bacteriano.
- 15 4. Un método de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, y en el cual el gen es un gen fúngico.
5. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores y en el cual cualquier efecto modulador se determina por medidas de la densidad óptica.
- 20 6. Un método de selección de fármacos que comprende utilizar un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5 para ensayar compuestos contra productos génicos de más de un gen esencial.
7. Un método de acuerdo con la reivindicación 6, y en el cual los compuestos se ensayan contra los productos génicos de más de 20 genes esenciales.
- 25 8. Un método *in vitro* para identificar la hipersensibilidad de fármacos a caminos metabólicos, método que comprende proporcionar células viables en las cuales un gen esencial en el camino metabólico se expresa bajo el control de un promotor heterogéneo regulable, desactivar la expresión del gen por el promotor, poner en contacto grupos de las células con compuestos de ensayo, y determinar y comparar luego cualquier efecto modulador sobre el crecimiento de las células viables.
- 30

35

40

45

50

55

60

65

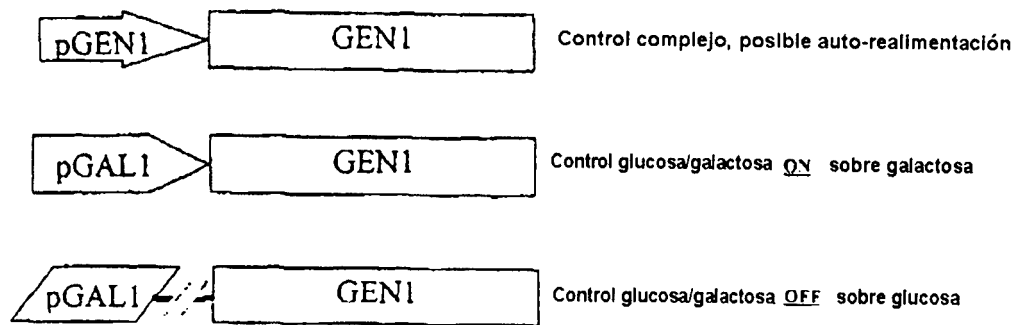


Figura 1

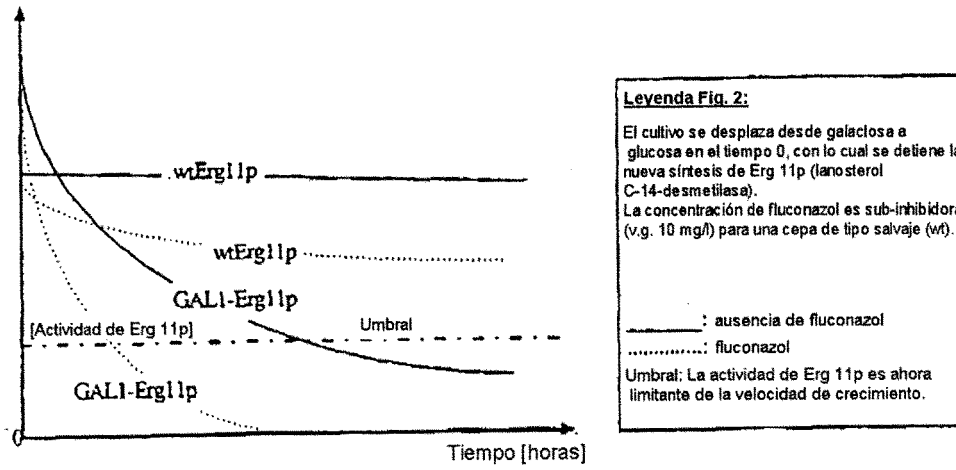


Figura 2

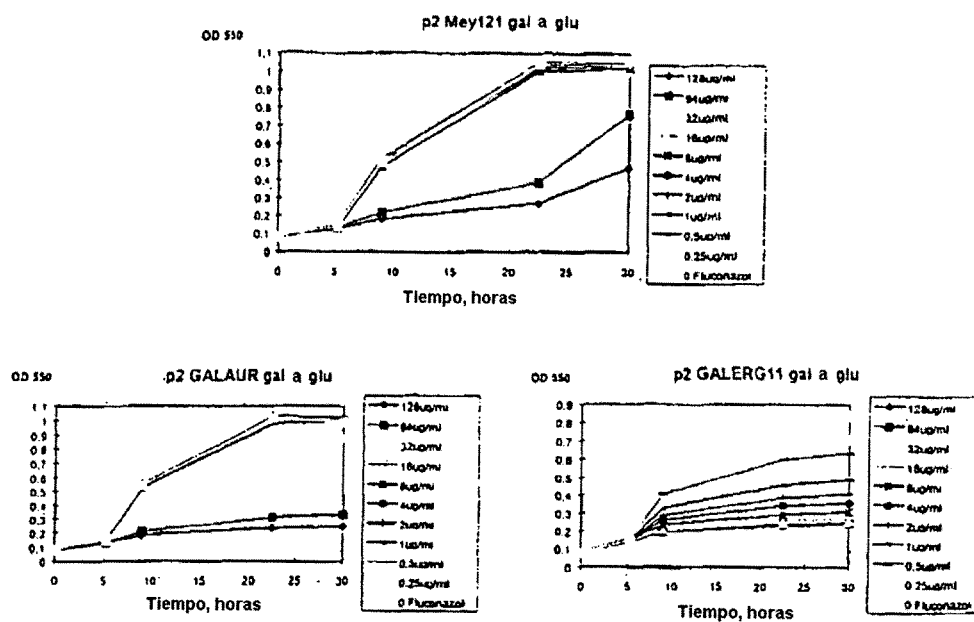


Figura 3

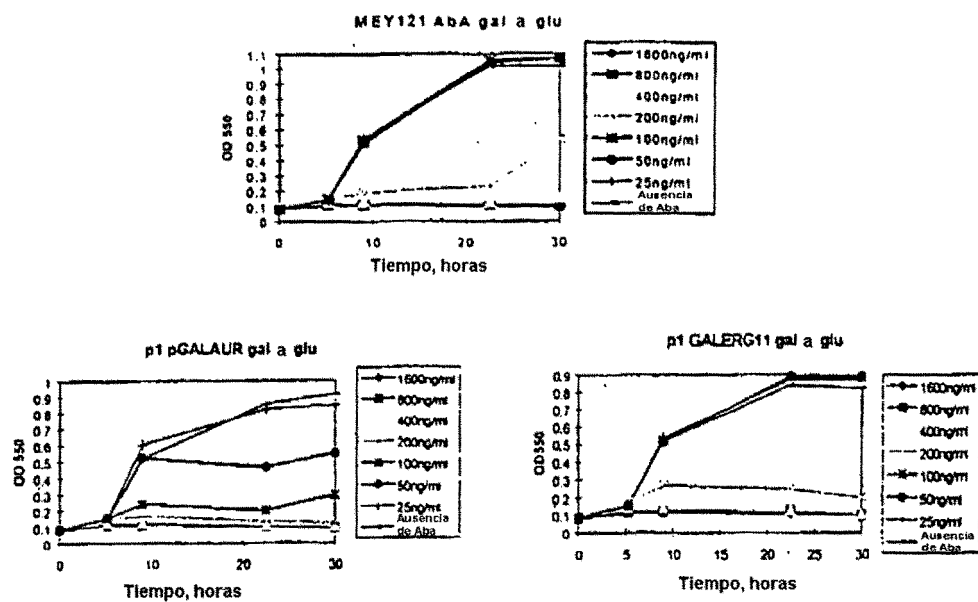


Figura 4

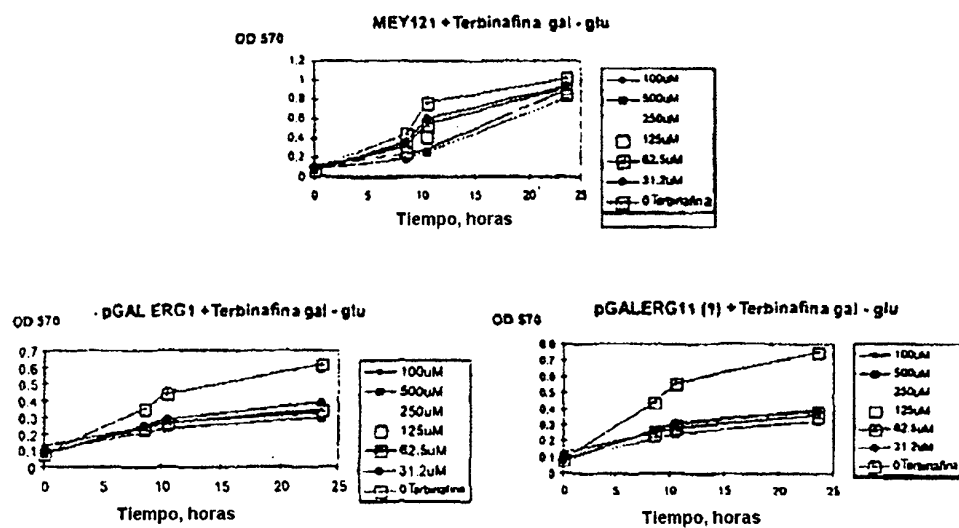


Figura 5

Nuestro protocolo modificado para reemplazamiento del promotor en *S. cerevisiae*

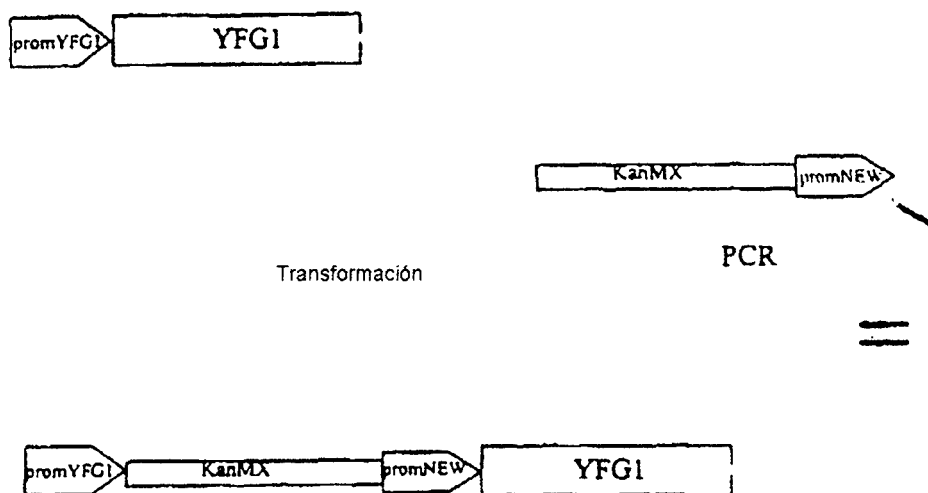


Figura 6