



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 319 959**

51 Int. Cl.:
G01N 33/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **00952321 .8**

96 Fecha de presentación : **31.07.2000**

97 Número de publicación de la solicitud: **1206567**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **22.05.2002**

54 Título: **Procedimiento de cribado *in vivo* de toxicología de alto rendimiento.**

30 Prioridad: **04.08.1999 US 147200 P**
27.12.1999 US 472654

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
18.05.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
18.05.2009

73 Titular/es: **Tosk, Inc.**
Suite B, 2125 Delaware Avenue
Santa Cruz, California 95060, US

72 Inventor/es: **Fogarty, Patrick**

74 Agente: **Ponti Sales, Adelaida**

ES 2 319 959 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

Procedimiento de cribado *in vivo* de toxicología de alto rendimiento.

5 Campo de la invención

El campo de esta invención es la prueba toxicológica, particularmente la prueba toxicológica en investigación y desarrollo farmacéutico.

10 Antecedentes de la invención

Durante el procedimiento de desarrollo de medicamentos, los potenciales agentes terapéuticos o medicamentos candidatos deben demostrar ser seguros y efectivos para su uso pretendido antes de obtener la aprobación de la FDA y la posterior comercialización, al menos en los Estados Unidos. En los procedimientos de desarrollo de medicamentos, los medicamentos candidatos potenciales son sometidos a comprobaciones de de mutagenicidad y toxicología en un esfuerzo para demostrar seguridad. Los análisis de mutagenicidad tienen lugar en bacterias (prueba Ames), *Drosophila* (prueba Mueller-5), y en cultivos celulares de mamíferos. Sin embargo, los análisis toxicológicos están limitados a cultivos celulares de mamíferos y estudios modelo de animales. Este esquema requiere inversiones significativas de tiempo y dinero para analizar la toxicidad de un medicamento candidato. Como tales, los estudios toxicológicos son típicamente realizados después de la comprobación exitosa de eficacia para los medicamentos candidatos.

Con el advenimiento del descubrimiento de la alta producción de medicamentos, hay un gran interés en las industrias farmacéuticas y relacionadas para dinamizar el segmento de pruebas toxicológicas del proceso de desarrollo de medicamentos. Como el número de medicamentos candidatos se ha ampliado desde las decenas por año a miles por año, los programas de comprobación toxicológica se han vuelto un severo cuello de botella en el proceso de desarrollo de medicamentos.

Por consiguiente, existe un gran interés en el desarrollo de nuevos ensayos de alta producción que son capaces de proporcionar rápidamente datos de toxicidad para un gran número de diferentes compuestos. De interés particular sería el desarrollo de un ensayo de alta producción de cribado de toxicidad *in vivo*.

Literatura relevante

Ensayos de alta producción de cribado de toxicidad se discuten en: **Kelly**, "Advances in HTS Toxicology," *Genetic Engineering News*, March 1, 1999, pg. 14; and **Sansome**, *Drug Discovery Today* (1999) 4: 199-201.

Wasserkort & Koller, *J. Applied Tox* 17(2) (1997) 119-125 describe la cribado para efectos tóxicos de compuestos orgánicos volátiles utilizando *Drosophila*. **Foureman et al.**, *Environmental & Molecular Mutagenesis* 23 (1994) 208-227 proporciona los resultados de la prueba de la mutagenicidad de 70 químicos para el National Toxicology Programme usando la prueba vinculada al sexo letal recesiva en *Drosophila*. **Goss & Sabourin**, *J. Applied Tox* 5(4) (1985) 193-219 revisa trabajos previos y proporciona una lista de especies distintas del hombre que satisfacen los criterios de seguridad en términos de ser un organismo deseable para la comprobación de toxicidad/mutagenicidad. La patente WO 00/37938, publicada 29 Junio 2000, describe un procedimiento para la identificación de medicamentos candidatos noveles utilizando *Drosophila* que han sido genéticamente sensibilizados para una trayectoria bioquímica específica elegida, preferentemente una trayectoria de enfermedad humana. Compuestos de bajo peso molecular de interés se monitorizan por su actividad biológica que funciona para interferir con trayectorias de especificación relacionadas con enfermedades.

50 Descripción de la invención

Se proporcionan ensayos de cribado de toxicología de alta producción. En el objeto se ensayan simultáneamente procedimientos de al menos 10 composiciones de compuestos diferentes por su toxicidad mediante:

(a) contactar oralmente dicha composición de compuesto con una pluralidad de organismos multicelulares no mamíferos;

(b) determinar el efecto de dicha composición de compuesto sobre dichos organismos multicelulares no mamíferos;

(c) derivar perfiles de toxicidad para cada uno de dichos al menos 10 composiciones de compuestos basados en dicha determinación;

(d) estimar el efecto de dicha composición de compuestos sobre un organismo mamífero; y

(e) seleccionar una composición de compuesto de dichas al menos 10 diferentes composiciones de compuestos para cribado adicional en un modelo mamífero no humano, donde dicha selección se basa en dichos perfiles de estimación y toxicidad;

ES 2 319 959 T3

en donde cada una de dichas composiciones de compuestos se selecciona a partir de compuestos farmacológicamente activos o análogos químicos de los mismos y nuevos candidatos a agentes farmacológicamente activos.

5 Los organismos multicelulares que encuentran uso en el objeto de ensayos de cribado de alta producción (HTS) son aquellos que son pequeños, tienen tejidos y órganos diferenciados, tienen un tiempo de generación rápido y son prolíficos. Los procedimientos objeto HTS encuentran uso en una variedad de aplicaciones y son particularmente adecuados para el uso en cribado toxicológica para un gran número de compuestos, tales como bibliotecas de compuestos producidas combinatoriamente.

10

Descripción de las realizaciones específicas

15 Se proporciona un procedimiento de cribado de toxicología de alta producción. En el procedimiento objeto, al menos 10 diferentes composiciones de compuestos se evalúan simultáneamente. Cada composición de compuesto se evalúa contactándola oralmente con una pluralidad, por ejemplo 10 a 1000, organismos multicelulares no mamíferos y determinando el efecto de la composición de compuesto sobre los organismos.

20 Antes de describir el procedimiento objeto adicionalmente, debe entenderse que la invención no está limitada a las realizaciones particulares de la invención descrita a continuación, ya que pueden realizarse variaciones de las realizaciones particulares y estar todavía dentro del ámbito de las reivindicaciones adjuntas. También debe entenderse que la terminología empleada es con el propósito de describir realizaciones particulares y no pretenden ser limitativas.

25 En esta especificación y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares “un”, “una” y “el/la” incluyen referencias plurales a menos que el contexto dicte claramente otra cosa. A menos que se defina de otra forma, todos los términos técnicos y científicos utilizados aquí tienen el mismo significado que el comúnmente entendido para alguien con habilidad ordinaria en la técnica a la cual pertenece esta invención.

30 Como se resumió anteriormente, la invención objeto proporciona un procedimiento de cribado de alta producción (HTS) para evaluar simultáneamente la toxicología de una pluralidad de diferentes composiciones de compuestos. Los ensayos objeto HTS son ensayos toxicológicos *in vivo*, mediante lo cual se indica que determinan el efecto de un compuesto sobre un organismo vivo, multicelular. Como tales, los ensayos objeto HTS se distinguen de los ensayos *in vitro*, en los cuales se emplean cultivos celulares.

35 En los ensayos objeto HTS, al menos 10 compuestos diferentes se evalúan simultáneamente. Más específicamente, al menos 10 diferentes composiciones de compuestos se evalúan simultáneamente. Las diferentes composiciones de compuestos difieren entre sí en al menos una de las siguientes características: (a) están formadas por compuestos que difieren en fórmula molecular; o (b) están formadas por compuestos de la misma fórmula molecular pero los compuestos están presentes en diferentes concentraciones. En otras palabras, dos composiciones de compuestos cualesquiera son diferentes si están formadas por compuestos que difieren en su fórmula molecular o están formadas por el mismo tipo de compuesto, pero difieren respecto a la concentración de aquel compuesto. Por ejemplo, una pluralidad de diferentes composiciones de compuestos puede incluir 4 tipos diferentes de compuestos que difieren en fórmula molecular, donde cada tipo específico de compuesto está presente en tres concentraciones diferentes, de forma tal que la pluralidad está formada por 12 diferentes composiciones de compuestos.

45 Por evaluado simultáneamente se entiende que cada una de las composiciones de compuestos en las al menos 10 se evalúan substancialmente al mismo tiempo. Así, todas las composiciones de compuesto en las al menos 10 se ensayan por sus efectos toxicológicos en paralelo. El número de composiciones de compuesto que son evaluadas simultáneamente es, en ciertas realizaciones al menos aproximadamente 100 o al menos aproximadamente 1000, donde el número de composiciones de compuestos evaluado puede ser más alto. En general, el número de composiciones de compuesto que es evaluado simultáneamente en los procedimientos objeto HTS oscila desde aproximadamente 10 a 10.000, usualmente desde aproximadamente 100 a 10.000 y en muchas realizaciones desde aproximadamente 1000 a 5000.

55 En los procedimientos objeto, cada composición de compuestos individual en las al menos 10 se ensaya individualmente por su toxicología. Cada composición de compuestos se ensaya individualmente por su toxicidad contactando la composición de compuestos con una pluralidad de organismos multicelulares no mamíferos y determinando el efecto de la composición de compuestos (o la ausencia de los mismos) sobre los organismos de la pluralidad. Dado que los organismos empleados en los procedimientos objeto son multicelulares, éstos incluyen tejidos y órganos diferenciados. Además están caracterizados por ser relativamente pequeños, donde pequeño indica al menos aproximadamente 60 001 g, usualmente al menos aproximadamente 01 g y más usualmente al menos aproximadamente 1 g, donde la masa promedio de cada organismo en la pluralidad puede ser tan grande como 10 g o mayor, pero típicamente no excede aproximadamente 100 g y usualmente no excede aproximadamente 1.000 g. Los organismos multicelulares empleados en los procedimientos HTS sujeto también están caracterizados por tener un tiempo de regeneración rápido. Un tiempo rápido de regeneración es importante para mantener la colonia de cultivo además de suministrar suficientes organismos que serán suficientemente prolíficos para producir en promedio al menos aproximadamente 100 progenies por día, que es el requerimiento mínimo para una cribado de alta producción. Para *Drosophila*, esta población mínima de moscas puede oscilar desde 10 a 300, usualmente de 50 a 150.

ES 2 319 959 T3

Una serie de diferentes tipos de organismos multicelulares no mamíferos pueden emplearse en los procedimientos objeto, donde dichos tipos de organismo incluyen insectos, anfibios, peces, y similares. Organismos específicos de interés incluyen: *Xenopus*, *Zebrafish*, *Caenorhabditis*, *Drosophila* y similares. De interés particular en muchas realizaciones son animales invertebrados, particularmente miembros del filum artrópodos, y más particularmente miembros de la clase insectos. De interés particular en muchas realizaciones son las moscas. En muchas realizaciones preferidas, las moscas son miembros de la familia *Drosophilidae*, donde el animal es con frecuencia una *Drosophila melanogaster*. Los organismos multicelulares empleados en la invención objeto puede estar en cualquier etapa de su vida, es decir, en el estado larval, en el estado adulto, etc.

Un organismo específico multicelular de interés es un animal transgénico no mamífero que tiene un fenotipo neurodegenerativo de aparición adulta, por ejemplo una *Drosophila melanogaster* transgénica que tiene un fenotipo neurodegenerativo de aparición adulta, como se describe en la Solicitud de Patente U.S. N° de Serie 60/125.586. Otro organismo multicelular de particular interés es el animal transgénico no mamífero para enfermedades celulares proliferativas, por ejemplo una *Drosophila melanogaster* transgénica que tiene un fenotipo neoplástico, como se describe en la Solicitud de Patente N° 60/147.433 publicada el 4 de agosto, 1999. También son de interés los animales no transgénicos no mamíferos.

En los procedimientos de ensayo objeto, cada composición de compuesto se pone en contacto con la población de organismos multicelulares en una forma tal que el agente activo de la composición de compuestos es capaz de ejercer actividad sobre al menos una porción sustancial, si no en todos, los organismos individuales de la población. Mediante porción sustancial se indica al menos 40 número %, usualmente al menos 50 número % y más usualmente 60 número %, donde el número % puede ser substancialmente mayor y en muchas realizaciones puede ser tan alto como 80, 90 o 95 número % o mayor.

Cada agente del compuesto se contacta con los miembros de la población en una forma tal que el agente activo de la composición es internalizado por los organismos, por ejemplo oralmente, de forma tal que cada composición de compuesto generalmente será contactado con una pluralidad de organismos mediante la incorporación de composición de compuestos en el medio nutritivo, por ejemplo, agua, solución acuosa de agentes nutricionales adicionales, etc., de los organismos. Por ejemplo, donde el organismo multicelular es una mosca, el agente candidato generalmente se administra oralmente a la mosca mediante el mezclado del agente en el medio nutriente de la mosca y colocando el medio en presencia de la mosca, (tanto de la larva o de la mosca adulta, usualmente la larva) de forma tal que la mosca se alimenta del medio.

Como tal, la composición de compuesto puede ser contactada con la población de organismos multicelulares en cualquier etapa conveniente durante el ciclo de vida del organismo. Así, dependiendo de los organismos particulares empleados, la composición de compuestos es contactada por los organismos durante una etapa inmadura del ciclo vital, por ejemplo la etapa larval, durante una etapa adulta, y similar.

Un gran número de diferentes tipos de compuestos pueden ensayarse según la invención objeto. Los compuestos que pueden ser ensayados según los procedimientos HTS objeto abarcan numerosas clases químicas, aunque típicamente son moléculas orgánicas, preferentemente pequeños compuestos orgánicos que tienen un peso molecular de más de 50 y de menos de aproximadamente 2.500 daltons. Los compuestos generalmente comprenden grupos funcionales necesarios para la interacción estructural con proteínas, particularmente enlaces hidrógeno, y típicamente incluyen al menos una amina, grupos carbonil, hidroxil o carboxil, preferentemente al menos dos de los grupos químicos funcionales. Los compuestos con frecuencia comprenden estructuras de carbono cíclicas o heterocíclicas y/o estructuras aromáticas o poliaromáticas sustituidas con uno o más de los grupos funcionales anteriores. Los compuestos de interés también se encuentran entre biomoléculas que incluyen, pero no se limitan a: péptidos, sacáridos, ácidos grasos, esteroides, purinas, pirimidinas, derivados, análogos estructurales o combinaciones de los mismos.

Los compuestos de interés se obtienen a partir de una amplia variedad de fuentes que incluyen bibliotecas de compuestos sintéticos o naturales. Por ejemplo, numerosos medios están disponibles para síntesis al azar y dirigida de una amplia variedad de compuestos orgánicos y biomoléculas, que incluyen la expresión de oligonucleótidos y oligopéptidos seleccionados al azar. Alternativamente, bibliotecas de compuestos naturales en la forma de extractos bacterianos, fúngicos, de plantas y de animales están disponibles o son fácilmente producidos. Adicionalmente, las bibliotecas y compuestos natural o sintéticamente producidos son fácilmente modificados a través de medios convencionales químicos, físicos y bioquímicos, y pueden utilizarse para producir bibliotecas combinatorias. Los agentes farmacológicos conocidos pueden someterse a modificaciones químicas dirigidas o al azar, tales como acilación, alquilación, esterificación, amidificación, etc. para producir análogos estructurales. Nuevos agentes terapéuticos potenciales también pueden crearse utilizando procedimientos tales como el diseño racional de medicamentos o modelos por ordenador.

La cribado se orienta a compuestos farmacológicamente activos conocidos y análogos químicos de los mismos, o a nuevos agentes con propiedades desconocidas tales como aquellos creados a través del diseño racional de medicamentos.

A continuación del contacto de la composición del compuesto con la población, se determina el efecto del compuesto sobre los miembros de la población. El efecto del compuesto sobre los miembros de la población generalmente se determina mediante la evaluación de uno o más de un número de diferentes parámetros fenotípicos. Los parámetros fenotípicos que son evaluados en un ensayo HTS dado de la invención objeto pueden variar ampliamente dependien-

ES 2 319 959 T3

do, al menos en parte, de la naturaleza de los organismos multicelulares que se emplean. Típicamente, los parámetros fenotípicos que son evaluados en un ensayo dado incluyen uno o más de los siguientes: (1) viabilidad; (2) defectos morfológicos; y (3) fecundidad. Los parámetros específicos que pueden evaluarse incluyen uno o más de: (1) dosis letal, por ejemplo LD₅₀, LD₁₀, etc.); (2) defectos de crecimiento; (3) dosis de efecto de esterilidad; (4) defectos de desarrollo; (5) debilitación neurológica; (5) modulación de la supervivencia, por ejemplo mejora o acortamiento de la supervivencia; y similares.

Además de los parámetros anteriores que pueden ser evaluados en los procedimientos objeto, pueden ensayarse los niveles de expresión de los genes de los organismos de prueba, por ejemplo puede evaluarse niveles de expresión de genes en larvas, pupas y/o moscas tratadas. Los genes pueden ser genes "de servicio" que proporcionan información metabólica básica para genes de desarrollo y de tejidos específicos para indicar qué tejido o tipo de célula es afectado y cuando. Una variedad de diferentes protocolos de expresión de genes, incluyendo protocolos basados en conjuntos, son conocidos por los entendidos en la técnica, incluyendo aquellos descritos en: EP 0 328 829 B1 y Patentes US Nos. 5.468.613; 5.580.726; 5.599.672; 5.512.462; 5.162.209 y 5.162.209. Procedimientos para analizar expresión de genes diferencial gene también se describen en Maniatis, *et al.*, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY) (1989); Nucleic Acid Hybridization, A Practical Approach (Hames, B.D., and Higgins, S.J. eds, IRL Press, Oxford) (1985); WO 95/21944; Chalifour, *et al.*, Anal. Biochem (1994) 216: 299-304; Nguyen *et al.*, Genomics (1995) 29: 207-216; Pietu *et al.*, Genome Res. (1996) 6: 492-503; y Zhao *et al.*, Gene (1995) 166: 207-213.

El efecto del compuesto en el parámetro o parámetros físicos particulares que se evalúan puede determinarse manual o robóticamente, de forma que en muchas realizaciones la determinación del efecto del compuesto sobre el organismo se consigue a través de un procedimiento automatizado.

El efecto del compuesto sobre el parámetro o parámetros fenotípicos se relaciona entonces con la toxicidad del compuesto. Como tal, el efecto sobre el parámetro(s) fenotípico se emplea para derivar un perfil de toxicidad para el compuesto ensayado, donde el perfil de toxicidad se refiere a la actividad tóxica de un compuesto dado, es decir su colección de una o más actividades, tales como letalidad, actividad causante de esterilidad, etc.

Dado que los procedimientos objeto son procedimientos HTS en los cuales una pluralidad de compuestos se ensayan para toxicidad al mismo tiempo, cualquier monitoreo de HTS dado según la invención objeto proporciona rápidamente perfiles de toxicidad para una pluralidad de compuestos. El número de compuestos para los cuales se proporcionan rápidamente perfiles de toxicidad en cualquier ensayo HTS dado según la invención objeto oscila desde aproximadamente 20 a 50.000, usualmente desde aproximadamente 50 a 10.000 y más usualmente desde aproximadamente 500 a 5.000. Como los perfiles de toxicidad son rápidamente determinados, se determinan generalmente en menos de aproximadamente 14 días, usualmente menos de aproximadamente 10 días. En muchas realizaciones, pueden determinarse en menos de aproximadamente 7 días o en un período de tiempo más corto.

En resumen, la invención objeto como se describió anteriormente proporciona un procedimiento de alta producción para la cribado de toxicidad de un gran número de compuestos y/o diferentes concentraciones de los mismos. Los monitoreos de toxicidad HTS objeto encuentran su uso en una variedad de aplicaciones diferentes en las cuales se desea obtener datos de toxicidad para un gran número de compuestos en un corto período de tiempo. De interés particular en muchas realizaciones es el uso de los procedimientos objeto para proporcionar perfiles de toxicidad *in vivo* para elementos individuales de compuestos de bibliotecas o colecciones de compuestos, incluyendo bibliotecas de compuestos producidas combinatoriamente. Como tales, los ensayos de cribado de toxicología HTS objeto encuentran uso en un número de aplicaciones, incluyendo el descubrimiento de medicamentos y aplicaciones de desarrollo.

Los procedimientos HTS objeto pueden ser parte de un procedimiento de cribado de múltiples etapas de evaluación de agentes terapéuticos candidatos por su eficacia (y seguridad) en el tratamiento de condiciones de enfermedad. En procesos de cribado de múltiples etapas de la invención objeto, una biblioteca de compuestos se somete a cribado para monitorizar en un segundo modelo *in vivo*, por ejemplo un modelo de ratón, siguiendo la cribado a través de los ensayos HTS objeto. Siguiendo al monitorizado inicial de la biblioteca utilizando los procedimientos HTS de la invención objeto, los compuestos positivos identificados mediante el monitorizado (es decir, aquellos compuestos que no tienen perfiles de toxicidad inaceptables) se monitorizan entonces en modelos animales mamíferos no humanos, incluyendo modelos animales mamíferos no humanos transgénicos, donde los modelos animales mamíferos están generalmente correlacionados con la condición de enfermedad objeto particular. Además, puede emplearse una etapa previa de cribado *in vivo*, en la cual la biblioteca de compuestos se somete primero a un ensayo de cribado *in vitro* por su potencial como agente terapéutico en el tratamiento de una condición de enfermedad particular. Puede emplearse cualquier ensayo de cribado *in vivo* conveniente, donde una variedad de ensayos de cribado *in vitro* adecuados son conocidos para aquellos entendidos en la técnica, por ejemplo ensayos de cultivo de células HTS.

Los ensayos de cribado de toxicidad HTS objetos también encuentran uso en la generación de bases de datos de información que incluyen perfiles de toxicidad de una pluralidad de distintos compuestos. Como tal, la invención objeto puede emplearse para producir una base de datos de perfiles de toxicidad para una variedad de compuestos. Dicha base de datos de perfiles de toxicidad típicamente comprenderá información de perfil de toxicidad como se ha descrito anteriormente, para un número de compuestos relacionados. Los compuestos de interés en una base de datos pueden seleccionarse y disponerse según diferentes criterios: los tipos de moléculas que se evalúan, por ejemplo esteroides,

ES 2 319 959 T3

antibióticos, agentes antineoplásicos, etc.; por la fuente de los compuestos, por ejemplo toxinas ambientales, extractos biológicamente activos de un animal o célula particular, biblioteca sintética o natural de compuestos, etc.; y similares.

5 Los perfiles de toxicidad y las bases de datos de los mismos pueden proporcionarse en una variedad de medios para facilitar su uso. “Medios” se refiere a una fabricación que contiene la información del perfil de toxicidad de la presente invención. Las bases de datos de la presente invención puede registrarse sobre medios legibles por ordenador, es decir cualquier medio que pueda ser leído y accedido directamente mediante un ordenador. Tales medios incluyen, pero no están limitados a: medios de almacenamiento magnético, tales como discos blandos, medio de almacenamiento de disco duro, y cinta magnética; medios de almacenamiento óptico tal como CD-ROM; medios de almacenamiento eléctrico tal como RAM y ROM; e híbridos de estas categorías tales como medios de almacenamiento magnético/óptico. Un entendido en la técnica apreciará fácilmente cuántos de los medios legibles por ordenador actualmente conocidos pueden utilizarse para crear una fabricación que comprende un registro de la información de la presente base de datos. “Registrada” se refiere a un procedimiento para almacenar información en un medio legible mediante ordenador, utilizando cualquiera de dichos procedimientos como se conoce en la técnica. Puede elegirse cualquier estructura de almacenamiento de datos, basada en los medios utilizados para acceder a la información almacenada. Puede utilizarse una variedad de programas de proceso de datos y formatos para el almacenamiento, por ejemplo archivos de procesamiento de textos, formato de base de datos, etc.

20 Como se emplea aquí, un “sistema basado en ordenador” se refiere a medios de hardware, medios de software, y medios de almacenamiento de datos utilizados para analizar la información de la presente invención. El hardware mínimo del sistema basado en ordenador de la presente invención comprende una unidad central de procesamiento (CPU), medios de entrada, medios de salida, y medios de almacenamiento de datos. Un operario entendido en la técnica puede apreciar fácilmente que cualquiera de los sistemas basados en ordenador actualmente disponibles son adecuados para utilizar en la presente invención. Los medios de almacenamiento de datos pueden comprender cualquier fabricación que comprende un registro de la presente información como se describió anteriormente, o medios de acceso de memoria que pueden acceder a dicha fabricación.

25 Pueden utilizarse una variedad de formatos estructurales para los medios de entrada y salida para ingresar y extraer la información en los sistemas basados en ordenador de la presente invención. Un formato para un medio de salida jerarquiza perfiles de toxicidad que poseen grados variables de similitud a un perfil de toxicidad de referencia. Dicha presentación proporciona a un operario experto con una jerarquía de similitudes e identifica el grado de similitud contenido en el perfil de toxicidad de prueba.

30 Las bases de datos de perfil de toxicidad objeto encuentran uso en un número de distintas aplicaciones. Por ejemplo, donde hay un compuesto de interés, puede buscarse en la base de datos para determinar si un compuesto está presente en la base de datos, y, si está, identificar fácilmente el perfil de toxicidad del compuesto. Alternativamente, donde se tiene un compuesto nuevo cuyo perfil no está presente en la base de datos, pero se conoce la estructura del compuesto, pueden buscarse en la base de datos compuestos similares de estructura similar y obtener información referente a la toxicidad del compuesto de interés a través de extrapolación. También puede compararse un perfil de toxicidad nuevo del compuesto no presente en la base de datos con perfiles presentes en la base de datos para identificar compuestos de toxicidad similar al compuesto de interés.

35 La comparación de un perfil de toxicidad obtenido a partir de un compuesto de prueba y perfiles de toxicidad presentes en la base de datos, es decir perfiles de toxicidad de referencia, se consigue mediante cualquier protocolo de deducción adecuado, sistema estadístico de comparación AI, etc. Los procedimientos para buscar en bases de datos son conocidos en la técnica. Ver, por ejemplo, la patente U.S. N° 5.060.143, que describe un algoritmo y circuito de secuencia de búsqueda altamente eficiente, utilizando un paralelo de datos candidatos, comparaciones de series de datos objetivo con un mecanismo de detección temprana de discordancias. Para otros ejemplos, ver U.S. 5.720.009 y U.S. 5.752.019.

40 La invención objeto también proporciona procedimientos de cribado de bibliotecas de compuestos por su efecto antitóxico, es decir procedimientos de alta producción para la identificación de compuestos de antitoxina. En tales procedimientos, una biblioteca de compuestos antitoxinas candidatos se monitoriza para la actividad según los procedimientos descritos anteriormente, donde la población de prueba de animales, por ejemplo moscas, habrá sido previamente contactada con la toxina para la cual se busca una antitoxina o será contactada concomitantemente con la toxina. Las toxinas de interés particular en muchas realizaciones son aquellas que son tóxicas tanto en humanos como en los animales de prueba, por ejemplo moscas. La población animal se contacta con la toxina de interés utilizando cualquier procedimiento conveniente, por ejemplo inclusión de la toxina en el medio nutritivo, donde la dosis de toxina contactada con la población es una dosis letal, por ejemplo LD₅₀. Siguiendo al contacto de la biblioteca de prueba de antitoxinas candidatas con la población animal, aquellos animales que sobreviven son indicativos de los animales que fueron suministrados con compuestos de prueba que han internalizado un agente con la actividad antitoxina deseada. Así, también se proporciona por la invención objeto un procedimiento de alta producción para la cribado de compuestos que tienen actividad antitoxina.

65 Los siguientes ejemplos se ofrecen a modo de ilustración y no a modo de limitación.

Experimental

I. Validación del modelo de mosca para toxicología

5 Para determinar la extensión en que el modelo mosca es válido para estudios de evaluación de toxicología, se genera una evaluación de químicos con perfiles toxicológicos y objetivos conocidos utilizando la mosca. Los químicos elegidos no tienen niveles sustanciales de toxicidad (por ejemplo, colorante alimentario, azúcar, etc.) con aquellos que son muy tóxicos. Los muy tóxicos pueden dividirse en tres clases, unos que son generalmente tóxicos, unos que son tóxicos para una célula, tejido, o tipo de órgano que se conoce que es común con los humanos y las moscas, y los que son tóxicos para una célula, tejido, o tipo de órgano que es específico para los humanos.

A. Pruebas de Toxicidad

15 El químico se disuelve en agua en o cerca de su punto de saturación. Se utilizan diluciones seriadas de esta solución inicial para rehidratar el medio instantáneo de mosca (Fisher Scientific). Específicamente, un ensayo de toxicidad comprenderá medio instantáneo para moscas rehidratado con solución inicial pura de un químico, mientras que otro será rehidratado con una solución al 10% del químico (en agua). Este formato se utilizará para generar datos en un rango de 4 a 5 de dosis registrada para cada químico evaluado.

20 Una cantidad conocida de embriones, típicamente entre 40-50, se utiliza como entrada. Específicamente, 40 a 50 embriones se cuentan y se colocan en el receptáculo que contiene la mezcla medio/químico a evaluar. Los embriones pueden contarse manual o automáticamente (por ejemplo, solución líquida de embriones fluyendo a través de un diodo). Las larvas se alimentan en la mezcla de medio/químico. Todos los aspectos de desarrollo desde la etapa de larva hasta adulto deben proceder normalmente en presencia del químico. La única fuente disponible de alimento y agua para la larva y las moscas contiene el químico. Se muestra que la variabilidad de y la cantidad de tomas que puede esperarse utilizando este protocolo alimentando químicos a la larva que son fáciles de probar. Específicamente, se han seleccionado Hierro, Cobre y Zinc. Los equipos sensibles y precisos están comercialmente disponibles para analizar estos químicos hasta una concentración de 1 parte por millón. Esto asignará análisis cuantitativos para determinar la variabilidad entre larvas en un receptáculo de prueba y entre larvas en diferentes receptáculos.

B. Evaluación de Toxicología

35 La larva en desarrollo y la pupa se examinan para su crecimiento y desarrollo normales. Las moscas adultas se analizan luego por su letalidad, esterilidad, defectos de desarrollo, y alteraciones de la duración de la vida. La letalidad se determina dividiendo el número de moscas adultas que eclosionan por el número total de embriones que se colocaron en el receptáculo. La esterilidad se examina tanto para machos como para hembras cruzándolos con moscas normales. Un examen físico de los adultos revela cualquier defecto visible, tales como defectos de miembros, defectos de formación de tejidos, coordinación anormal, etc. Finalmente, se permite que las moscas vivan la duración normal de su vida para determinar si se produjo un efecto que acorte o alargue la duración promedio de la vida de la mosca.

45 II. Ensayos

A. Monitorizaciones de Toxicidad

50 Utilizando protocolos estándar, incluyendo los descritos anteriormente para la administración a moscas, se administraron una variedad de agentes a diferentes dosis a ratones, ratas y moscas y se comparó la LD para cada agente. Los resultados se proporcionan en la Tabla 1.

55

60

65

ES 2 319 959 T3

TABLA 1

Las tendencias de toxicidad de la dosis letal son similares entre mamíferos y moscas

Químico Ensayado	Ratón (oral LD50 mg/ml)	Rata (oral LD50 mg/ml)	Mosca (oral LD50 mg/ml)
<u>Alta toxicidad</u>			
Azida sódica	27	27	0,05
Cloruro de cadmio	60	88	I
clonidina	135	126	0,07
<u>Toxicidad moderada</u>			
Metrifonato	300	560	0,04
4-dimetil aminopiridina	n/d	250	15
Fenilenediamina	366	510	0,2
Cloruro de litio	1165	526	0,4
<u>Baja toxicidad</u>			
Fosfato disódico	n/d	17,000	142
Niacinamida	2500	3500	5
Polivinil pirrolidol	40000	100000	>0,4
Borato de sodio	2000	2660	6,5
L-dopa	2363	1780	0,7
Azul bromofenol	N7d	N7d	10

La tendencia para agentes tóxicos menores a mayores es similar en moscas y mamíferos. Los tóxicos bajos fueron categorizados por tener una LD50 > 1.500 mg/kg en ratones y ratas y esto correspondió a una dosis de más de 4 mg (la dosis de 4 mg para polivinil pirrolidol fue la dosis máxima que era administrable a las moscas y no se observó toxicidad en este nivel). Mientras que el rango moderado se definió como aquel que tenía una dosis de ratón o de rata sobre 150 mg/kg hasta 1400 mg/kg. Esto correspondió con una dosis LD50 que oscila de 15 a 0,4 para la mosca. Finalmente, las sustancias de alta toxicidad en ratones y ratas tenían una LD50 oral de menos de 150 mg/kg. Esto correspondió al rango de mosca que fue de dosis de 1 mg o menos para inducir una LD50 administrada oral. El valor extremo fue el metrifonato. Este químico es de toxicidad moderada en ratones y ratas, mientras que está claramente en el rango de la alta toxicidad para las moscas. Como un cribado de alta producción inicial, este estudio piloto sugiere una correspondencia de evaluación tóxica >90% en ratas y ratones. Esto demuestra claramente el potencial para estimar rápida y precisamente la toxicidad de compuestos desconocidos.

B. Monitorizaciones de Anti-Toxicidad

La actividad del EDTA como una antitoxina fue evaluada mediante la administración a moscas de toxinas en conjunción con EDTA y sin EDTA. Los resultados se proporcionan en la Tabla 2.

ES 2 319 959 T3

TABLA 2

EDTA es una anti-toxina efectiva en la mosca de la fruta

Comida de mosca	Pasta de levadura	% supervivencia
1,1 mM Cobre	Ninguna	0
6,0 mM Zinc	Ninguna	0
Sin químico	25 mM EDTA	0
1,1 mM Cobre	25 mM EDTA	76
6,0 mM Zinc	25 mM EDTA	70
Sin químico	Ninguna	84
0,4 mM Cobre	Ninguna	50
2 mM Zinc	Ninguna	50

El químico EDTA se une a metales pesados, incluyendo cobre y zinc. Esta unión puede producirse *in vitro* o *in vivo*. La unión *in vivo* puede conducir a neutralizar la toxicidad de metales pesados en animales. Sin embargo, dado que el EDTA se une al calcio, por si sólo tiene una razonable cantidad de toxicidad. Los resultados anteriores demuestran que una antitoxina conocida de metales pesados puede identificarse utilizando el objeto en un sistema de antitoxina animal. En la Tabla 2 se muestran los efectos de zinc, cobre, y EDTA sobre la mosca de la fruta. Los datos en la Tabla 2 también muestran que las moscas pueden sobrevivir en la presencia de ambos metales pesados (cobre o zinc) y EDTA. Para asegurar que cualquier efecto antitoxina del EDTA se produciría *in vivo*, el metal pesado y el EDTA se suministraron en dos fuentes de alimento físicamente separadas. Las moscas tenían que comer del alimento de mosca y de la pasta de levadura en la cantidad adecuada para neutralizar los efectos tóxicos, permitiendo la supervivencia.

Es evidente a partir de los resultados y discusiones anteriores que el objeto de la invención proporciona un valioso nuevo procedimiento de cribado de alta producción. Como los procedimientos objeto emplean organismos multicelulares, proporcionan datos valiosos de toxicidad *in vivo* que con frecuencia se correlaciona mejor con la actividad en humanos. Por otra parte, los efectos tóxicos sobre compuestos pueden determinarse en un número de diferentes tipos de células sustancialmente al mismo tiempo. Además, los ensayos objeto HTS son rápidos. Por lo tanto, la invención objeto representa una contribución significativa a la técnica.

La citación de cualquier publicación es para su descripción antes de la fecha de solicitud y no se debe construir como una admisión de que la presente invención no da derecho a preceder esta publicación gracias a la invención previa.

Aunque la invención anterior se ha descrito en algún detalle a modo de ilustración y ejemplo por motivos de claridad de la comprensión, es fácilmente evidente para los expertos en la materia a la vista de las enseñanzas de esta invención que se pueden realizar a la misma ciertos cambios y modificaciones.

Referencias citadas en la descripción

Esta lista de referencias citadas por el solicitante está prevista únicamente para ayudar al lector y no forma parte del documento de patente europea. Aunque se ha puesto el máximo cuidado en su realización, no se pueden excluir errores u omisiones y la OEP declina cualquier responsabilidad en este respecto.

Documentos de patente citados en la descripción

- WO 0037938 A [0006]
- US 125586 P [0017]
- US 14743399 P [0017]
- EP 0328829 B1 [0025]

ES 2 319 959 T3

- US 5468613 A [0025]
- US 5580726 A [0025]
- 5 • US 5599672 A [0025]
- US 5512462 A [0025]
- US 5162209 A [0025] [0025]
- 10 • WO 9521944 A [0025]
- US 5060143 A [0036]
- 15 • US 5720009 A [0036]
- US 5752019 A [0036]

Documentos que no son patentes citados en la descripción

- 20 • **KELLY**. Advances in HTS Toxicology. *Genetic Engineering News*, 01 March 1999, 14 [0005]
- **SANSOME**. *Drug Discovery Today*, 1999, vol. 4, 199-201 [0005]
- 25 • **WASSERKORT; KOLLER**. *J. Applied Tox*, 1997, vol. 17 (2), 119-125 [0006]
- **FOUREMAN et al.** *Environmental & Molecular Mutagenesis*, 1994, vol. 23, 208-227 [0006]
- **GOSS; SABOURIN**. *J. Applied Tox*, 1985, vol. 5 (4), 193-219 [0006]
- 30 • **MANIATIS et al.** *Molecular Cloning*, A Laboratory Manua. Cold Spring Harbor Press, 1989 [0025]
- Nucleic Acid Hybridization, *A Practical Approach*. IRL Press, 1985 [0025]
- 35 • **CHALIFOUR et al.** *Anal. Biochem*, 1994, vol. 216, 299-304 [0025]
- **NGUYEN et al.** *Genomics*, 1995, vol. 29, 207-216 [0025]
- **PIETU et al.** *Genome Res.*, 1996, vol. 6, 492-503 [0025]
- 40 • **ZHAO et al.** *Gene*, 1995, vol. 166, 207-213 [0025]

ES 2 319 959 T3

REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento de cribado de toxicidad de alta producción en el cual al menos 10 composiciones de compuestos se ensayan simultáneamente por su toxicidad, comprendiendo dicho procedimiento:
- (a) ensayar simultáneamente por lo menos 10 composiciones de compuestos diferentes para su toxicidad, donde cada una de dichas 10 composiciones de compuestos diferentes se ensaya para su toxicidad mediante contacto oral de dicha composición del compuesto con una pluralidad de organismos multicelulares no mamíferos;
- 10 (b) determinar el efecto de dicha composición del compuesto en dichos organismos multicelulares no mamíferos;
- (c) derivar los perfiles de toxicidad para cada uno de dichas por lo menos 10 composiciones de compuestos diferentes basados en dicha determinación;
- 15 (d) estimar el efecto de dicha composición del compuesto en un organismo mamífero; y
- (e) seleccionar una composición del compuesto a partir de dichos por lo menos 10 composiciones de compuestos diferentes para el cribado adicional en un modelo mamífero no humano, en el que dicha selección se basa en dicha estimación y dichos perfiles de toxicidad;
- 20 en el que cada una de dichas composiciones de los compuestos se selecciona a partir de compuestos activos farmacológicamente activos o análogos químicos de los mismos y nuevos agentes candidatos farmacológicamente activos.
- 25 2. Procedimiento de cribado según la reivindicación 1, donde dicha pluralidad de organismos multicelulares no mamíferos oscila desde 10 a 1000.
- 30 3. Procedimiento de cribado según la reivindicación 1, donde dichos organismos multicelulares no mamíferos tienen un tiempo rápido de generación.
4. Procedimiento de cribado según la reivindicación 1, donde dichos organismos multicelulares no mamíferos son pequeños.
- 35 5. Procedimiento de cribado según la reivindicación 1, donde dichos organismos multicelulares no mamíferos están **caracterizados** por la presencia de órganos y tejidos diferenciados.
6. Procedimiento según la reivindicación 2, donde dicha población está **caracterizada** por producir al menos 100 progenies al día.
- 40 7. Procedimiento según la reivindicación 2, donde al menos 100 composiciones de compuestos se evalúan simultáneamente.
8. Procedimiento según la reivindicación 2, donde al menos 1000 composiciones de compuestos se evalúan simultáneamente.
- 45 9. Procedimiento según la reivindicación 2, donde dicho organismo multicelular es un insecto.
10. Procedimiento según la reivindicación 9, donde dicho insecto es una mosca.
- 50 11. Procedimiento de cribado de antitoxina de alta producción en el cual al menos 10 composiciones diferentes de compuesto antitoxina candidatas son simultáneamente ensayadas para la actividad antitoxina, comprendiendo dicho procedimiento:
- 55 ensayar simultáneamente por lo menos 10 composiciones de compuestos antitoxina diferentes para la actividad de antitoxina, en el que dichas por lo menos 10 composiciones de los compuestos antitoxina candidatas difieren entre sí en que están hechas de compuestos que difieren mediante la fórmula molecular, y en el que cada una de dichas 10 composiciones de compuestos candidatas diferentes se ensaya para su actividad antitoxina mediante:
- 60 (a) contactar dicha composición de compuesto candidata con una población de entre 10 y 1000 pequeños organismos multicelulares no mamíferos que tienen un rápido tiempo de generación y órganos y tejidos diferenciados que se han contactado con una toxina; y
- (b) determinar el efecto de dicha composición del compuesto en dichos organismos multicelulares no mamíferos.
- 65 12. Procedimiento según la reivindicación 11, donde dicha población está **caracterizada** por producir al menos 100 progenies al día.

ES 2 319 959 T3

13. Procedimiento según la reivindicación 11, donde al menos 100 composiciones de compuestos candidatas se evalúan simultáneamente.

5 14. Procedimiento según la reivindicación 11, donde al menos 1000 composiciones de compuestos candidatas se evalúan simultáneamente.

15. Procedimiento según la reivindicación 11, donde dicho organismo multicelular es un insecto.

10 16. Procedimiento según la reivindicación 1 o la reivindicación 11, que comprende además generar una base de datos de perfiles de toxicidad, comprendiendo dicha base de datos una pluralidad de perfiles de toxicidad para una pluralidad de compuestos.

15 17. Procedimiento según la reivindicación 16 donde dicha base de datos está generada en un medio legible por ordenador.

18. Procedimiento según la reivindicación 16 donde dicha base de datos comprende al menos 10 perfiles de toxicidad diferentes.

20 19. Procedimiento según la reivindicación 1, que comprende además una etapa previa de cribado *in vivo* en la cual al menos 10 composiciones diferentes de compuesto son sometidas primero a un ensayo de cribado *in vitro* para su uso potencial como agentes terapéuticos en el tratamiento de una condición particular de enfermedad.

25

30

35

40

45

50

55

60

65