



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) **PI0619497-4 A2**

(22) Data de Depósito: 08/12/2006
(43) Data da Publicação: 04/10/2011
(RPI 2126)



(51) *Int.Cl.:*
G01N 33/50
C12Q 1/70

(54) Título: MÉTODO PARA IDENTIFICAÇÃO DE UM AGENTE QUE INIBE INFECÇÃO POR HIV, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA PARA INIBIÇÃO DE INFECÇÃO POR HIV EM UM INDIVÍDUO, BEM COMO USO DO REFERIDO AGENTE

(30) Prioridade Unionista: 08/12/2005 US 60/748,759

(73) Titular(es): IRM LLC

(72) Inventor(es): Deborah Nguyen, Jeremy Caldwell, Kelli L. Kuhen

(74) Procurador(es): Dannemann ,Siemens, Bigler & Ipanema Moreira

(86) Pedido Internacional: PCT US2006046866 de 08/12/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2007/067737de 14/06/2007

(57) Resumo: MÉTODO PARA IDENTIFICAÇÃO DE UM AGENTE QUE INIBE INFECÇÃO POR HIV, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA PARA INIBIÇÃO DE INFECÇÃO POR HIV EM UM INDIVÍDUO, BEM COMO USO DO REFERIDO AGENTE. A presente invenção refere-se a novos fatores hospedeiros de interação com HIV. A invenção também provê métodos de uso dos fatores hospedeiros de interação com HIV para avaliar compostos que inibem infecção por HIV. Os métodos compreendem primeiro avaliação de compostos de teste para moduladores de um fator hospedeiro de interação com HIV descrito aqui e então avaliação adicional dos compostos de modulação identifica- dos quanto à habilidade em inibir infecção por HIV. A invenção provê ainda métodos e composições farmacêuticas para tratamento de doenças e condições associadas com infecção por HIV.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "**MÉTODO PARA IDENTIFICAÇÃO DE UM AGENTE QUE INIBE INFECÇÃO POR HIV, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA PARA INIBIÇÃO DE INFECÇÃO POR HIV EM UM INDIVÍDUO, BEM COMO USO DO REFERIDO AGENTE**".

5 REFERÊNCIA CRUZADA A PEDIDOS RELACIONADOS

O presente pedido reivindica o benefício de prioridade sob 35 U.S.C. §119(e) para o Pedido de Patente Provisório U.S. N. 60/748.759 depositado em 8 de dezembro de 2005. A descrição do pedido de prioridade é incorporada aqui a título de referência em sua totalidade e para todos os propósitos.

10 CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se em geral à inibição de infecções por HIV. Mais particularmente, a invenção refere-se à identificação de novos fatores hospedeiros de interação com HIV e a métodos de uso de tais fatores hospedeiros para identificar novos compostos que inibem infecção por HIV.

15 ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

Vírus da imunodeficiência humana (HIV) são lentivírus da família dos *retroviridae*. Foi estimado que a transmissão de HIV através de contato sexual e durante a gravidez seja responsável por até 90% de casos de AIDS em todo o mundo. Esta transmissão é iniciada pela passagem do vírus através da barreira mucosal de órgãos sexuais ou placentas quando expostos a fluidos do corpo infecciosos tal como sêmen, secreções vaginais ou sangue. Os casos de AIDS que restam são devido à transfusão de sangue contaminado por HIV, agulha compartilhada entre usuários de droga intravenosa, exposição acidental a fluidos do corpo contaminados com HIV durante procedimentos invasivos e outras situações onde vírus infeccioso pode entrar em contato direto com tecidos humanos suscetíveis.

Os fármacos atualmente disponíveis para tratamento de infecção por HIV e AIDS não são satisfatórios. Toxidez ou efeitos colaterais indesejados dos fármacos comuns para tratamento de infecção por HIV, por exemplo, AZT ou inibidores de protease de HIV, são incompatíveis com sua atividade antiviral quando usados em uma concentração farmacêutica eficaz. Devido à alta mutabilidade do genoma viral, resistência aos fármacos atual-

mente disponíveis é rapidamente gerada e então se espalha por toda a população. Então, existe ainda uma necessidade na técnica de compostos alternativos melhores e novos alvos terapêuticos para prevenção e tratamento de AIDS e infecções por HIV. A presente invenção se refere a essas e outras necessidades.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

Em um aspecto, a invenção provê métodos para identificação de agentes que inibem infecção por HIV. Os métodos envolvem avaliação de compostos de teste para identificar um ou mais compostos de modulação que sub-regulam uma atividade biológica ou nível de expressão de um fator hospedeiro interagindo com HIV codificado por um polinucleotídeo selecionado dos membros listados nas Tabelas 2-4, e então teste dos compostos de modulação identificados quanto à habilidade em inibir infecção por HIV. Em alguns dos métodos, o fator hospedeiro interagindo com HIV empregado são repetições de tetratricopeptídeo 1 (IFIT1), proteína alfa de transferência de fosfatidilinositol (PITPN α) ou cinase de linhagem mista 3 (MLK3). Alguns desses métodos empregam MLK3, e os compostos de teste são avaliados quanto à habilidade em inibir a atividade de cinase de MLK3 ou sua expressão.

Em alguns dos métodos, a habilidade em inibir infecção por HIV pelos compostos de modulação é examinada através do monitoramento da expressão de um gene-repórter sob o controle do promotor LTR de HIV em uma célula infectada por HIV. Por exemplo, a célula infectada por HIV pode ser uma célula HeLa-CD4- β gal que expressa o gene-repórter de beta-galactosidase. Em alguns desses métodos, a célula é infectada por uma linhagem de vírus HIV-IIIb.

Em alguns outros métodos, a habilidade em inibir infecção por HIV-1 por um composto de modulação é examinada comparando replicação de HIV em uma célula permissiva para HIV engenheirada que foi contatada com o composto de modulação com replicação de HIV em uma célula controle que não foi contatada com o composto. Em alguns métodos, a célula permissiva para HIV empregada é célula de HIV HeLa-T4- β Gal. Em alguns

métodos, replicação de HIV é monitorada através do ensaio ELISA de antígeno p24 ou um ensaio de atividade de transcriptase reversa.

Em alguns outros métodos, a habilidade em inibir infecção por HIV pelo composto é examinada através da comparação da produção de pseudovírus em uma célula hospedeira tratada com o composto com produção de pseudovírus em uma célula hospedeira controle que não foi tratada com o composto. Em alguns desses métodos, a célula hospedeira usada é célula HEK 293T. Em alguns desses métodos, a célula hospedeira é transfectada com plasmídeos de pseudovírus que produzem pseudovírus HIV na célula.

Alguns dos métodos de avaliação empregam um fator hospedeiro de interação com HIV que é uma enzima. Nesses métodos, a atividade biológica ensaiada é tipicamente sua atividade enzimática. Alguns desses empregam um fator hospedeiro de interação por HIV que é uma cinase, por exemplo, MLK3.

Em outro aspecto, a invenção provê métodos para inibição de infecção por HIV em um indivíduo. Esses métodos envolvem administração ao indivíduo de uma composição farmacêutica que compreende uma quantidade eficaz de um composto que inibe uma atividade biológica ou expressão de um fator hospedeiro de interação com HIV. O fator de interação de HIV é codificado por um polinucleotídeo selecionado dos membros listados nas Tabelas 2-4. Alguns dos métodos empregam um composto que inibe uma atividade biológica ou expressão de repetições de tetratricopeptídeo 1 (FIT1), proteína alfa de transferência de fosfatidilinositol (PITPN α) ou cinase de linhagem mista 3 (MLK3). Em alguns desses métodos, o composto terapêutico empregado inibe a atividade de cinase de MLK3, por exemplo, K252a ou CEP1347.

Uma compreensão adicional da natureza e vantagens da presente invenção pode ser concretizada através de referência às porções restantes do relatório e reivindicações.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

A Figura 1 mostra o efeito de MLK3 inativa em cinase (K144R)

sobre infecção por HIV de células HeLaCD4 β gal. Células foram co-transfectadas com cDNA codificando MLK3 do tipo selvagem, MLK3 inativa em cinase (K144R) ou plasmídeo de controle junto com um repórter de luciferase sob o controle do HIV-LTR seguido após 24 horas por infecção com HIV-IIIb. Infecção foi avaliada após 3 dias através de medição da atividade de luciferase usando Brite Glo.

O mutante inativo em quinase não foi capaz de aumentar a infecção, realçando a necessidade da função quinase para o aumento visto pelo "Wild type" MLK3. Dados são mostrados como o dobro do aumento sobre plasmídeo de controle negativo e é o resumo de quatro análises independentes com duas replicatas em cada análise

A Figura 2 mostra o efeito de superexpressão de MLK3 sob transcrição de HIV. Células HeLaCD4 β gal foram co-transfectadas com cDNA codificando MLK3 do tipo selvagem ou plasmídeo de controle (pcDNA3) junto com um repórter de luciferase sob o controle de HIV-LTR (LTRLuc) e ou um vetor de expressão TAT (Tat) ou vetor de controle Sport6-GFP (S6G) para avaliar ou a transcrição dependente de Tat ou independente de Tat. Transcrição foi avaliada após 2 dias através da medição da atividade de luciferase usando Brite Glo. Expressão de MLK3 aumentou a transcrição dependente de Tat de luciferase, mas teve efeito mínimo sobre transcrição independente de Tat. Dados são mostrados como o aumento de vezes médio com MLK3 (por exemplo, MLK3/Tat/LTRLuc) sobre plasmídeo de controle negativo (por exemplo, pcDNA3/Tat/LTRLuc) e é o sumário de dois ensaios independentes com duas réplicas em cada ensaio.

As Figuras 3A-3D mostram eficácia de siRNA se direcionando a MLK3 contra infecção por HIV. A: Efeito sobre infecção por HIV pelos siRNAs de MLK3 transfectados em células HeLaCD4 β gal; B: Depleção significativa de nível de MLK3 endógena em células HeLaCD4 β gal pelos siRNAs se direcionando a MLK3; C: Efeito sobre infecção por HIV pelos siRNAs de MLK3 eletroporados em células Jurkat e D: Depleção do nível de MLK3 endógena em células Jurkat pelos siRNAs se direcionando a MLK3. Dados são mostrados como a inibição de infecção ou citotoxicidade percentual comparado

com desvio de siRNA GL2 controle e é o desvio-padrão médio +/- de pelo menos três experimentos independentes com doze cavidades de réplica por experimento.

DESCRIÇÃO DETALHADA

5 I. Visão geral

A invenção é baseada em parte nos encontros pelos presentes inventores de novos fatores hospedeiros envolvidos em infecção por HIV. Conforme detalhado nos Exemplos abaixo, os presentes inventores avaliaram ambas biblioteca de siRNA focada (Qiagen) e uma biblioteca de cDNA representando 15.000 genes únicos (Origene) usando células HeLa-CD4- β gal e HIV-IIIb. 96 genes dos "hits" de avaliação de siRNA cujo "knockdown" inibiu infecção por HIV foram escolhidos para estudos de acompanhamento. Esses incluíam os dois fatores hospedeiros de interação com HIV conhecidos, Furina e Rad23. Outro *hit* identificado a partir da avaliação é Pak3, que
10 foi descrito no Pedido de Patente Provisório US Nº 60/650.789. Quase todos os *hits* de siRNA selecionados reconfirmaram no ensaio original, no entanto, 62,5% tinham citotoxicidade severa. Dos 96 hits originais, 36 reconfirmaram e exibiram eficácia contra HIV que era muito maior do que os efeitos citotóxicos em células HeLa-CD4 β gal. Esses *hits* são mostrados na Tabela 2. A
15 partir da avaliação de cDNA, 89 aumentadores de infecção por HIV foram escolhidos para acompanhamento, que incluía teste de preparações adicionais dos cDNAs e confirmação de sequência. Dos 89 *hits*, 13 continuaram a mostrar aumento de infecção por HIV durante a reconfirmação. Esses *hits* confirmados são mostrados na Tabela 3.

25 Fatores hospedeiros adicionais que poderiam desempenhar um papel em infecção por HIV são também identificados pelos presentes inventores a partir de uma avaliação de dois híbridos de levedura. Conforme detalhado no Exemplo 4 abaixo, os presentes inventores avaliaram uma biblioteca de cDNA de leucócito humano clonada no vetor de expressão GAL4
30 (Clontech) para identificar novos fatores de célula hospedeira de interação, usando HXB2 Vpr HIV-1 como a isca. Vpr é uma proteína acessório de HIV que é essencial para replicação viral em monócitos e macrófagos, e aumen-

ta replicação viral em células T e linhagens de célula T. Colônias positivas da avaliação foram avaliadas quanto à atividade de β -galactosidase usando um ensaio de "filter lift" para confirmação adicional da interação proteína-proteína. Um coadjuvante de interação de Vpr identificado a partir da avaliação é isopeptidase T (IsoT), descrito em mais detalhes no Pedido de Patente Provisório US Nº 60/673.623. Os outros "hits" de avaliação são mostrados na Tabela 4 aqui.

As moléculas hospedeiras identificadas através da avaliação de siRNA, avaliação de cDNA e avaliação de dois híbridos de levedura são chamadas aqui "fatores hospedeiros de interação com HIV". Esses fatores hospedeiros poderiam desempenhar papéis importantes em vários estágios de infecção por HIV. Eles também provêem novos alvos que podem ser usados para avaliar compostos que inibem infecções por HIV. As seções que seguem provêem orientação adicional para emprego desses fatores hospedeiros para identificar novos agentes anti-HIV.

II. Definições

A menos que de outro modo definido, todos os termos técnicos e científicos usados aqui têm os mesmos significados conforme geralmente conhecido por aqueles versados na técnica à qual a invenção pertence. As referências que seguem provêem um versado na técnica com uma definição geral de muitos dos termos usados nesta invenção: *Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology*, Smith e outros (Eds.), Oxford University Press (Ed. revisada, 2000); *Dictionary of Microbiology and Molecular Biology*, Singleton e outros (Eds.), John Wiley & Sons (3ª Ed., 2002); e *A Dictionary of Biology* (Oxford Paperback Reference), Martin e Hine (Eds.), Oxford University Press (4ª Ed., 2000). Ainda, as definições que seguem são providas para auxiliar o leitor na prática da invenção.

O termo "agente" ou "agente de teste" inclui qualquer substância, molécula, elemento, composto, entidade ou uma combinação deles. Ele inclui, mas não está limitado a, por exemplo, proteína, polipeptídeo, molécula orgânica pequena, polissacarídeo, polinucleotídeo e similar. Ele pode ser um produto natural, um composto sintético ou um composto químico ou uma

combinação de duas ou mais substâncias. A menos que de outro modo especificado, os termos "agente", "substância" e "composto" podem ser usados intercomutavelmente.

O termo "análogo" é usado aqui para se referir a uma molécula que estruturalmente lembra uma molécula de referência, mas que foi modificada de uma maneira direcionada e controlada, substituindo um substituinte específico da molécula de referência com um substituinte alternativo. Comparado com a molécula de referência, um análogo seria esperado, por um versado na técnica, exibir a mesma utilidade, similar ou aperfeiçoada. Síntese e avaliação de análogos, para identificar variantes de compostos conhecidos tendo traços aperfeiçoados (tal como afinidade de ligação maior para uma molécula alvo), é uma abordagem que é bem-conhecida na química farmacêutica.

Conforme aqui usado "contato" tem seu significado normal e refere-se à combinação de duas ou mais moléculas (por exemplo, um agente de teste e um polipeptídeo) ou combinação de moléculas e células (por exemplo, um agente de teste e uma célula). Contato pode acontecer *in vitro*, por exemplo, combinando dois ou mais agentes ou combinando um agente de teste e uma célula ou um lisato de célula em um tubo de teste ou outro recipiente. Contato pode também acontecer em uma célula ou *in situ*, por exemplo, contato de dois polipeptídeos em uma célula através de co-expressão na célula de polinucleotídeos recombinantes codificando os dois polipeptídeos, ou em um lisato de célula.

Uma "seqüência heteróloga" ou um "polinucleotídeo heterólogo", conforme aqui usado, é um que se origina de uma fonte estranha para a célula hospedeira particular ou, se da mesma fonte, é modificada de sua forma original. Deste modo, um polinucleotídeo heterólogo em uma célula hospedeira inclui um polinucleotídeo que, embora sendo endógeno para a célula hospedeira particular, foi modificado. Modificação da seqüência heteróloga pode acontecer, por exemplo, através de tratamento do polinucleotídeo com uma enzima de restrição para gerar um fragmento de polinucleotídeo que é capaz de ser operavelmente ligado ao promotor. Técnicas tal como mutagê-

nese direcionada a sítio são também úteis para modificação de um polinucleotídeo heterólogo.

O termo "homólogo" quando se referindo a proteínas e/ou seqüências de proteína indica que elas são derivadas, naturalmente ou artificialmente, de uma proteína ou seqüência de proteína ancestral comum. Similarmente, ácidos nucleicos e/ou seqüências de ácido nucleico são homólogos quando eles são derivados, naturalmente ou artificialmente, de um ácido nucleico ou seqüência de ácido nucleico ancestral comum. Homologia é geralmente inferida da similaridade de seqüência entre dois ou mais ácidos nucleicos ou proteínas (ou suas seqüências). A porcentagem precisa de similaridade entre seqüências que é útil no estabelecimento de homologia varia com o ácido nucleico e proteína em debate, mas apenas 25% de similaridade de seqüência são rotineiramente usados para estabelecer homologia. Níveis mais altos de similaridade de seqüência, por exemplo 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% ou 99% ou mais podem ser também usados para estabelecer homologia.

Uma "célula hospedeira", conforme aqui usado, refere-se a uma célula procariótica ou eucariótica onde um polinucleotídeo heterólogo (por exemplo, um vetor de expressão) deve ser introduzido. O polinucleotídeo heterólogo pode ser introduzido na célula hospedeira através de qualquer meio, por exemplo, transfecção, eletroporação, precipitação de fosfato de cálcio, microinjeção, transformação, infecção viral e/ou similar.

O termo "fator hospedeiro de interação com HIV" refere-se a genes hospedeiros ou seus polipeptídeos codificados que são identificados pelos presentes inventores desempenhar um papel na facilitação de infecção de HIV ou ciclo de vida. Conforme mostrado nas Tabelas 2-4, esses fatores incluem moléculas hospedeiro cuja inativação leva à supressão de replicação de HIV e também moléculas cuja superexpressão resulta em infecção por HIV aumentada. Em adição, o termo também compreende fatores hospedeiros que interagem fisicamente com proteína acessório de HIV Vpr que é essencial para infecção viral por HIV.

O termo "identidade de seqüência" no contexto de duas seqüên-

cias de ácido nucléico ou seqüências de aminoácido refere-se aos resíduos nas duas seqüências que são iguais quando alinhados para correspondência máxima em uma janela de comparação especificada. Uma "janela de comparação" refere-se a um segmento de pelo menos cerca de 20 posições con-

5 tínuas, geralmente cerca de 50 a cerca de 200, mais geralmente cerca de 100 a cerca de 150, onde uma seqüência pode ser comparada com uma seqüência de referência do mesmo número de posições contíguas após as duas seqüências serem otimamente alinhadas. Métodos de alinhamento de seqüências para comparação são bem-conhecidos na técnica. Alinhamento

10 ótimo de seqüências para comparação pode ser conduzido pelo algoritmo de homologia local de Smith e Waterman (1981) e *Adv. Appl. Math.* 2:482; pelo algoritmo de alinhamento de Needleman e Wunsch (1970) *J. Mol. Biol.* 48:443; pela pesquisa para método de similaridade de Pearson e Lipman (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85:2444; através de implementações

15 computadorizadas desses algoritmos (incluindo, mas não limitado a, CLUSTAL no programa PC/gene pela Intelligentics, Mountain View, CA; e GAP, BESTFIT, BLAST, FASTA ou TFASTA no Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group (GCG), 575 Science Dr., Madison, Wis., U.S.A.). Alinhamento pode ser também realizado através de inspeção e ali-

20 nhamento manual.

Uma seqüência de ácido nucléico ou aminoácido "substancialmente idêntica" refere-se a uma seqüência de ácido nucléico ou aminoácido que tem pelo menos 90% de identidade de seqüência para uma seqüência de referência usando os programas descritos acima (por exemplo, BLAST)

25 usando parâmetros-padrão. A identidade de seqüência é de preferência pelo menos 95%, com mais preferência pelo menos 98% e com mais preferência pelo menos 99%. De preferência, a identidade substancial existe em uma região da seqüência que é pelo menos de cerca de 50 resíduos de comprimento, com mais preferência em uma região de pelo menos cerca de 100

30 resíduos e com mais preferência as seqüências são substancialmente idênticas em pelo menos cerca de 150 resíduos. Em uma modalidade mais preferida, as seqüências são substancialmente idênticas em todo o comprimen-

to das regiões de codificação.

O termo "modular" com relação a uma atividade biológica de uma proteína de referência ou seu fragmento refere-se a uma mudança no nível de expressão ou outras atividades biológicas da proteína. Por exemplo, modulação pode causar um aumento ou uma diminuição no nível de expressão da proteína de referência, modificação enzimática (por exemplo, fosforilação) da proteína, características de ligação (por exemplo, ligação a um polinucleotídeo-alvo) ou quaisquer outras propriedades biológica, funcional ou imunológica da proteína de referência. A mudança na atividade pode surgir de, por exemplo, um aumento ou diminuição em expressão de um ou mais genes que codificam a proteína de referência, da estabilidade de um mRNA que codifica a proteína, eficiência de tradução ou de uma mudança nas outras atividades biológicas da proteína de referência. A mudança pode ser também devido à atividade de outra molécula que modula a proteína de referência (por exemplo, uma cinase que fosforila a proteína de referência). Modulação de uma proteína de referência pode ser supra-regulagem (isto é, ativação ou estimulação) ou sub-regulagem (isto é, inibição ou supressão). O modo de ação de um modulador da proteína de referência pode ser direto, por exemplo, através da ligação à proteína ou a genes codificando a proteína, ou indireta, por exemplo, através da ligação a e/ou modificação (por exemplo, enzimaticamente) de outra molécula que de outro modo modula a proteína de referência.

O termo "indivíduo" inclui mamíferos, especialmente seres humanos. Ele também compreende outros animais não-humanos tal como vacas, cavalos, ovelha, porcos, gatos, cachorros, camundongos, ratos, coelhos, porquinhos-da-índia, macacos.

Uma "variante" de uma molécula de referência refere-se a uma molécula substancialmente similar em estrutura e atividade biológica a ou a molécula de referência inteira ou um fragmento dela. Deste modo, contanto que duas moléculas possuam uma atividade similar, elas são consideradas variantes como este termo é usado aqui mesmo se a composição ou estrutura secundária, terciária ou quaternária de uma das moléculas não for idênti-

ca àquela encontrada na outra, ou se a seqüência de resíduos de aminoácido não for idêntica.

III. Avaliação de Novos Moduladores de infecções por HIV – Esquema Geral

Os fatores hospedeiros de interação de HIV identificados pelos presentes inventores provêm novos alvos para avaliação de compostos que inibem infecções por HIV. Várias técnicas bioquímicas e de biologia molecular ou ensaios bem-conhecidos na técnica podem ser empregados para praticar a presente invenção. Tais técnicas são descritas em, por exemplo, *Handbook of Drug Screening*, Seethala e outros (Eds.), Marcel Dekker (1ª Ed., 2001); *High Throughput Screening: Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology*, 190), Janzen (ed.), Humana Press (1a ed., 2002); *Current Protocols in Immunology*, Coligan e outros (Ed.), John Wiley & Sons, Inc. (2002); Sambrook e outros, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press (3a Ed., 2001); e Brent e outros, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc. (Ringbou ed., 2003).

Tipicamente, agentes de teste são primeiro avaliados quanto à sua habilidade em modular uma atividade biológica de um fator hospedeiro de interação com HIV codificado pelos polinucleotídeos mostrados nas Tabelas 2-4 ("a primeira etapa do ensaio"). Agentes de modulação então identificados são então submetidos à avaliação adicional quanto à habilidade em inibir infecção por HIV, tipicamente na presença do fator hospedeiro de interação com HIV ("a segunda etapa de teste"). Dependendo do fator hospedeiro de interação com HIV empregado no método, modulação de atividades biológicas diferentes do fator hospedeiro de interação com HIV pode ser ensaiada na primeira etapa. Por exemplo, um agente de teste pode ser ensaiado quanto à ligação ao fator hospedeiro de interação com HIV. O agente de teste pode ser ensaiado quanto à atividade para modular expressão do fator hospedeiro de interação com HIV, por exemplo, transcrição ou tradução. O agente de teste pode ser também ensaiado quanto a atividades na expressão de modulação ou nível celular do fator hospedeiro de interação de HIV, por exemplo, modificação pós-traducional ou proteólise.

Os agentes de teste podem ser avaliados quanto à habilidade

em ou supra-regular ou sub-regular uma atividade biológica do fator hospedeiro de interação com HIV na primeira etapa do ensaio. Uma vez os agentes que inibem o fator hospedeiro de interação com HIV sendo identificados, eles são tipicamente testados mais quanto à habilidade em inibir infecção por HIV. Esta etapa de teste adicional é freqüentemente necessária para confirmar que seu efeito modulador sobre o fator hospedeiro de interação com HIV poderia na verdade levar à inibição de infecção por HIV. Por exemplo, um agente de teste que inibe uma atividade biológica de um fator hospedeiro de interação com HIV mostrado nas Tabelas 2-4) precisa ser testado mais a fim de confirmar que tal modulação pode resultar em infecção por HIV suprimida ou reduzida.

Em ambas a primeira etapa de ensaio e a segunda etapa de teste, ou um fator hospedeiro de interação com HIV intacto, ou um fragmento dele, pode ser usado. Moléculas com seqüências que são substancialmente idênticas àquelas do fator hospedeiro de interação com HIV podem ser também empregadas. Análogos ou derivados funcionais do fator hospedeiro de interação com HIV poderiam similarmente ser usados na avaliação. Os fragmentos ou análogos que podem ser empregados nesses ensaios geralmente retêm uma ou mais das atividades biológicas do fator hospedeiro de interação com HIV (por exemplo, atividade de cinase se o fator hospedeiro de interação com HIV empregado na primeira etapa de ensaio for uma cinase). Proteínas de fusão contendo tais fragmentos ou análogos podem ser também usadas para avaliação de agentes de teste. Derivados funcionais de um fator hospedeiro de interação com HIV geralmente têm deleções e/ou inserções e/ou substituições de aminoácido enquanto mantendo uma ou mais das bioatividades e então podem ser também usados na prática dos métodos de avaliação da presente invenção. Um derivado funcional pode ser preparado a partir de um fator hospedeiro de interação com HIV através de clivagem proteolítica seguido por procedimentos de purificação convencionais conhecidos daqueles versados na técnica. Alternativamente, o derivado funcional pode ser produzido através de tecnologia de DNA recombinante através da expressão de apenas fragmentos de um fator hospedeiro de inte-

ração com HIV que retêm uma ou mais de suas bioatividades.

IV. Compostos de Teste

Os agentes ou compostos de teste que podem ser avaliados com métodos da presente invenção incluem polipeptídeos, miméticos de
5 folha beta "*beta-turn*", polissacarídeos, fosfolipídeos, hormônios, prostaglandinas, esteróides, compostos aromáticos, compostos heterocíclicos, benzodiazepinas, glicinas N-substituídas oligoméricas, oligocarbamatos, polipeptídeos, sacarídeos, ácidos graxos, esteróides, purinas, pirimidinas, derivados, análogos estruturais ou suas combinações. Alguns agentes de teste são mo-
10 léculas sintéticas e outras moléculas naturais.

Os agentes de teste são obtidos a partir de uma ampla variedade de fontes incluindo bibliotecas de compostos sintéticos ou naturais. Bibliotecas combinatoriais podem ser produzidas para muitos tipos de composto que podem ser sintetizados de uma maneira etapa-em-etapa. Bibliotecas
15 combinatoriais grandes de compostos podem ser construídas pelo método de bibliotecas sintéticas codificadas (ESL) descrito nos WO 95/12608, WO 93/016121, WO 94/08051, WO 95/35503 e WO 95/30642. Bibliotecas de peptídeo podem ser também geradas através de métodos de *display* de fago (vide, por exemplo, Devlin, WO 91/18980). Bibliotecas de compostos natu-
20 rais na forma de extratos bacterianos, fúngicos, de planta e animais podem ser obtidas a partir de fontes comerciais ou coletadas no campo. Agentes farmacológicos conhecidos podem ser submetidos a modificações químicas diretas ou aleatórias, tal como acilação, alquilação, esterificação, amidificação para produzir análogos estruturais.

25 Bibliotecas combinatoriais de peptídeos ou outros compostos podem ser completamente aleatorizadas, sem quaisquer preferências de sequência ou constantes em nenhuma posição. Alternativamente, a biblioteca pode ser induzida, isto é, algumas posições dentro da sequência ou são mantidas constantes ou são selecionadas de um número limitado de possibi-
30 lidades. Por exemplo, em alguns casos, os resíduos de nucleotídeo ou aminoácido são aleatorizados dentro de uma classe definida, por exemplo, de aminoácidos hidrofóbicos, resíduos hidrofílicos, resíduos estericamente in-

duzidos (ou pequenos ou grandes), em direção à criação de cisteínas, para ligação com cruzamento, prolinas para domínios SH-3, serinas, treoninas, tirosinas ou histidinas para sítios de fosforilação ou a purinas.

Os agentes de teste podem ser proteínas de ocorrência natural ou seus fragmentos. Tais agentes de teste podem ser obtidos de uma fonte natural, por exemplo, uma célula ou lisato de célula. Bibliotecas de agentes de polipeptídeo podem ser também preparadas, por exemplo, a partir de uma biblioteca de cDNA comercialmente disponível ou gerada com métodos de rotina. Os agentes de teste podem ser também peptídeos, por exemplo, peptídeos de a partir de cerca de 5 a cerca de 30 aminoácidos, com de a partir de cerca de 5 a cerca de 20 aminoácidos sendo preferido, e de a partir de cerca de 7 a cerca de 15 sendo particularmente preferido. Os peptídeos podem ser digestões de proteínas de ocorrência natural, peptídeos aleatórios ou peptídeos aleatórios "influenciados". Em alguns métodos, os agentes de teste são polipeptídeos ou proteínas. Os agentes de teste podem ser ácidos nucleicos. Os agentes de teste de ácido nucleico podem ser ácidos nucleicos de ocorrência natural, ácidos nucleicos aleatórios ou ácidos nucleicos aleatórios "influenciados". Por exemplo, digestões de genomas procarióticos ou eucarióticos podem ser similarmente usadas conforme acima descrito para proteínas.

Em alguns métodos preferidos, os agentes de teste são compostos orgânicos de molécula pequena, por exemplo, compostos químicos com um peso molecular de não mais do que cerca de 1.000 ou não mais do que cerca de 500. De preferência, ensaios de alto rendimento são adaptados e usados para avaliar tais moléculas pequenas. Em alguns métodos, bibliotecas combinatoriais de agentes de teste de molécula pequena conforme acima descrito podem ser prontamente empregadas para avaliar composto de molécula pequena que inibe infecção por HIV. Vários ensaios estão disponíveis para tal avaliação, por exemplo, conforme descrito em Schultz (1998) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 8:2409-2414; Weller (1997) *Mol. Divers.* 3:61-70; Fernandes (1998) *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2:597-603; e Sittampalam (1997) *Curr. Opin. Chem. Biol.* 1:384-91.

Bibliotecas de agentes de teste a serem avaliadas com os métodos reivindicados podem ser também geradas com base em estudos estruturais dos fatores hospedeiros de interação com HIV discutidos acima ou seus fragmentos. Tais estudos estruturais permitem a identificação de agentes de teste que são mais prováveis de se ligar a fatores hospedeiros de interação com HIV. As estruturas tridimensionais dos fatores hospedeiros de interação com HIV podem ser estudadas de várias maneiras, por exemplo, estrutura de cristal e modelagem molecular. Métodos de estudo de estruturas de proteína usando cristalografia de raio X são bem-conhecidos na literatura. Vide

5

10 *Physical Bio-Chemistry*, Van Holde, K.E. (Prentice-Hall, Nova Jersey, 1971), PP. 221-239 e *Physical Chemistry with Applications to the Life Sciences*, D. Eisenberg & D.C. Crothers (Benjamin Cummings, Menlo Park, 1970). Modelagem por computador de estruturas de fator de hospedeiro de interação com HIV provê outro meio para criação de agentes de teste para avaliar moduladores de infecções por HIV. Métodos de modelagem molecular foram descritos na literatura, por exemplo, Patente U.S. Nº 5.612.894 intitulada "System and method for molecular modeling utilizing a sensitivity factor" e Patente U.S. Nº 5.583.973 intitulada "Molecular modeling method and system". Ainda, estruturas de proteína podem ser também determinadas através

15

20 de difração de nêutron e ressonância magnética nuclear (RMN). Vide, por exemplo, *Physical Chemistry*, 4ª Ed., Moore, W.J. (Prentice-Hall, Nova Jersey, 1972) e *RMN of Proteins and Nucleic Acids*, K. Wuthrich (Wiley-Interscience, Nova York, 1986).

Moduladores da presente invenção também incluem anticorpos

25

que especificamente se ligam a um fator hospedeiro de interação com HIV nas Tabelas 2-4. Tais anticorpos podem ser monoclonais ou policlonais. Tais anticorpos podem ser gerados usando métodos bem-conhecidos na técnica. Por exemplo, a produção de anticorpos monoclonais não-humanos, por exemplo, murino ou rato, pode ser realizada através de, por exemplo, imunização do animal com um fator hospedeiro de interação com HIV nas Tabelas

30

2-4 ou seu fragmento (vide Harlow e Lane, *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, 3ª Ed., 2000). Tal imunógeno pode ser obtido a

partir de uma fonte natural, através de síntese de peptídeo ou através de expressão recombinante.

Formas humanizadas de anticorpos de camundongo podem ser geradas ligando as regiões de CDR de anticorpos não-humanos a regiões constantes humanas através de técnicas de DNA recombinante. Vide Queen e outros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 10029-10033 (1989) e WO 90/07861. Anticorpos humanos podem ser obtidos usando métodos de *display* de fago. Vide, por exemplo, Dower e outros, WO 91/17271; McCafferty e outros, WO 92/01047. Nesses métodos, bibliotecas de fago são produzidas onde membros mostram anticorpos diferentes em suas superfícies externas. Anticorpos são geralmente mostrados como fragmentos Fv ou Fab. Fagos mostrando anticorpos com uma especificidade desejada são selecionados através de enriquecimento de afinidade para um fator hospedeiro de interação com HIV nas Tabelas 2-4.

Anticorpos humanos contra fator hospedeiro de interação com HIV podem ser também produzidos a partir de mamíferos transgênicos não-humanos tendo transgenes codificando pelo menos um segmento do *locus* de imunoglobulina humana e um *locus* de imunoglobulina endógena inativada. Vide, por exemplo, Lonberg e outros, WO93/12227 (1993); Kucherlapati, WO91/10741 (1991). Anticorpos humanos podem ser selecionados através de experimentos de ligação competitivos, ou, então, ter a mesma especificidade de epítipo que um anticorpo de camundongo particular. Tais anticorpos são particularmente prováveis de compartilhar as propriedades funcionais úteis dos anticorpos de camundongo. Anticorpos policlonais humanos podem ser também providos na forma de soro de humanos imunizados com um agente imunogênico. Opcionalmente, tais anticorpos policlonais podem ser concentrados através de purificação com afinidade usando um fator hospedeiro de interação com HIV ou seu fragmento.

V. Avaliação quanto a Moduladores de Fatores Hospedeiros de Interação com HIV

Tipicamente, agentes de teste são primeiro avaliados quanto à sua habilidade em modular uma atividade biológica de um fator hospedeiro

de interação com HIV identificado pelos presentes inventores. Vários sistemas de ensaio podem ser empregados nesta etapa de avaliação. A avaliação pode utilizar um sistema de ensaio *in vitro* ou um sistema de ensaio baseado em célula. Nesta etapa de avaliação, agentes de teste podem ser

5 avaliados quanto à ligação a um fator hospedeiro de interação com HIV, alteração do nível de expressão do fator hospedeiro de interação com HIV ou modulação de outras atividades biológicas (por exemplo, atividades enzimáticas) do fator hospedeiro de interação com HIV.

1. modulação de atividades de ligação de fatores hospedeiros de
 10 interação com HIV

Em alguns métodos, ligação de um agente de teste a um fator hospedeiro de interação com HIV é determinada na primeira etapa de avaliação. Ligação dos agentes de teste a um fator hospedeiro de interação com HIV pode ser ensaiada através de vários métodos incluindo, por exemplo,

15 ensaios de ligação de proteína-proteína *in vitro* marcada, ensaios de mudança de mobilidade eletroforética, imunoenaios para ligação de proteína, ensaios funcionais (ensaio de fosforilação, etc.) e similar. Vide, por exemplo, Patentes U.S. 4.366.241; 4.376.110; 4.517.288; e 4.837.168; e também Bevan e outros, *Trends in Biotechnology* 13:115-122, 1995; Ecker e outros, *Bio/Technology* 13:351-360, 1995; e Hodgson, *Bio/Technology* 10:973-980,

20 1992. O agente de teste pode ser identificado através de detecção de uma ligação direta com o fator hospedeiro de interação com HIV, por exemplo, co-imunoprecipitação com fator hospedeiro de interação com HIV por um anticorpo direcionado ao fator hospedeiro de interação com HIV. O agente

25 de teste pode ser também identificado através da detecção de um sinal que indica que o agente se liga ao fator hospedeiro de interação com HIV, por exemplo, fluorescência diminuída ou FRET.

Ensaio de competição provê um formato adequado para identificação de agentes de teste que especificamente se ligam a um fator

30 hospedeiro de interação com HIV. Em tais formatos, os agentes de teste são avaliados em competição com um composto já conhecido se ligar ao fator hospedeiro de interação com HIV. O composto de ligação conhecido pode

ser um composto sintético. Ele pode ser também um anticorpo, que especificamente reconhece o fator hospedeiro de interação com HIV, por exemplo, um anticorpo monoclonal direcionado contra o fator hospedeiro de interação com HIV. Se o agente de teste inibir ligação dos compostos conhecidos se
5 ligar ao fator hospedeiro de interação com HIV, então o agente de teste também se liga ao fator hospedeiro de interação com HIV.

Vários tipos de ensaios de ligação competitivos são conhecidos, por exemplo: radioimunoensaio direto ou indireto de fase sólida (RIA), imunoensaio de enzima direto ou indireto de fase sólida (EIA), ensaio de competição sanduíche (vide Stahli e outros, *Methods in Enzymology* 9:242-253, 1983); EIA de biotina-avidina direcionado à fase direta (vide Kirkland e outros, *J. Immunol.*, 137:3614-3619; ensaio marcado direto de fase sólida, ensaio sanduíche marcado direto de fase sólida (vide Harlow e Lane, *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, 3ª Ed., 2000); RIA de
10 marcação direto de fase sólida usando marcador ^{125}I (vide Morel e outros, *Mol. Immunol.*, 25(1):7-15, 1988); EIA de biotina-avidina direto de fase sólida (Cheung e outros, *Virology*, 176:546-552, 1990); e RIA marcado direto (Moldenhauer e outros, *Scand. J. Immunol.*, 32:77-82, 1990). Tipicamente, tal ensaio envolve o uso de polipeptídeo purificado ligado a uma superfície sólida ou células carregando qualquer um desses, um agente de teste não-marcado e um composto de referência marcado. Inibição competitiva é medida através de determinação da quantidade de marcador ligado à superfície sólida ou células na presença do agente de teste. Geralmente o agente de teste está presente em excesso. Agentes de modulação identificados pelo
15 ensaio de competição incluem agentes que se ligam ao mesmo epitopo que o composto de referência e agentes que se ligam a um epitopo adjacente suficientemente próximo ao epitopo ligado pelo composto de referência para impedimento estérico acontecer. Geralmente, quando um agente de competição está presente em excesso, ele vai inibir ligação específica de um composto de referência a um polipeptídeo alvo comum em pelo menos 50 ou
20 75%.

Os ensaios de avaliação podem estar ou em formatos insolúveis

ou solúveis. Um exemplo de um ensaio insolúvel é imobilizar um fator hospedeiro de interação com HIV ou seu fragmento em uma matriz de fase sólida. A matriz de fase sólida é então posta em contato com agentes de teste, por um intervalo suficiente para permitir que os agentes de teste se liguem.

- 5 Após lavagem de qualquer material não-ligado da matriz de fase sólida, a presença do agente ligado à fase sólida permite identificação do agente. Os métodos podem ainda incluir a etapa de eluição do agente ligado a partir da matriz de fase sólida, deste modo isolando o agente. Alternativamente, exceto pela imobilização do fator hospedeiro celular, os agentes de teste são ligados à matriz sólida e o fator hospedeiro de interação com HIV é então adicionado.
- 10

Ensaio solúvel inclui alguns dos métodos de avaliação de bibliotecas combinatoriais descritos acima. Sob os formatos de ensaio solúvel, nem os agentes de teste nem o fator hospedeiro de interação com HIV é ligado a um apoio sólido. Ligação de um fator hospedeiro de interação com HIV ou fragmento dele a um agente de teste pode ser determinada através de, por exemplo, mudanças em fluorescência ou do fator hospedeiro de interação com HIV ou dos agentes de teste, ou ambos. Fluorescência pode ser intrínseca ou conferida marcando qualquer componente com um fluoróforo.

15

20 Em alguns ensaios de ligação, ou o fator hospedeiro de interação com HIV, o agente de teste ou uma terceira molécula (por exemplo, um anticorpo contra o fator hospedeiro de interação com HIV) pode ser provido como entidades marcadas, isto é, covalentemente anexadas ou ligadas a um marcador ou grupo detectável, ou grupo que pode ser ligado com cruzamento, para facilitar identificação, detecção e quantificação do polipeptídeo em uma dada situação. Esses grupos detectáveis podem compreender um grupo de polipeptídeo detectável, por exemplo, uma enzima ou epitopo de anticorpo que pode ser ensaiado. Alternativamente, o grupo detectável pode ser selecionado de uma variedade de outros grupos ou marcadores detectáveis,

25

30 tal como radiomarcadores (por exemplo, ^{125}I , ^{32}P , ^{35}S) ou um grupo quimio-luminescente ou fluorescente. Similarmente, o grupo detectável pode ser um substrato, co-fator, inibidor ou ligante por afinidade.

2. modulação de outras atividades de fatores hospedeiros de interação com HIV

Ligação de um agente de teste a um fator hospedeiro de interação com HIV provê uma indicação de que o agente pode ser um modulador do fator hospedeiro de interação com HIV. Ela também sugere que o agente pode inibir infecção por HIV através da ação sobre o fator hospedeiro de interação com HIV. Então, um agente de teste que se liga a um fator hospedeiro de interação com HIV pode ser testado quanto à habilidade em modular uma atividade relacionada com infecção por HIV (isto é, na segunda etapa de teste mostrada acima). Alternativamente, um agente de teste que se liga a um fator hospedeiro de interação com HIV pode ser examinado mais para determinar se ele modula uma atividade biológica (por exemplo, uma atividade enzimática) do fator hospedeiro de interação com HIV. A existência, natureza e extensão de tal modulação podem ser testadas com um ensaio de atividade. Mais freqüentemente, tais ensaios de atividade podem ser usados independentemente para identificar agentes de teste que modulam as atividades de um fator hospedeiro de interação com HIV (isto é, sem primeiro ensaiar sua habilidade em se ligar ao fator hospedeiro de interação com HIV).

Em geral, o método envolve adição de um agente de teste a uma amostra contendo um fator hospedeiro de interação com HIV na presença ou ausência de outras moléculas ou reagentes que são necessários para testar uma atividade biológica do fator hospedeiro de interação com HIV (por exemplo, atividade enzimática se o fator hospedeiro de interação com HIV for uma enzima) e determinação de uma alteração na atividade biológica do fator hospedeiro de interação com HIV. Se o fator hospedeiro de interação com HIV tiver uma função biológica ou enzimática conhecida (por exemplo, atividade de cinase ou atividade de protease), a atividade biológica monitorada na primeira etapa de avaliação pode ser também a atividade bioquímica ou enzimática específica do fator hospedeiro de interação com HIV. Essas incluem cinases (por exemplo, NTRK1, CCRK, PAK7, MAP3K14, MAPK14, TYK2 e MLK3), proteases (por exemplo, CTSO), fosfatases (por

exemplo, LOC91443) ou outras enzimas conhecidas nas Tabelas 2-4 (por exemplo, NMT1, ALDH3A1, PDE1B e CAT). Qualquer uma dessas moléculas pode ser empregada na primeira etapa de avaliação. Métodos para avaliação das atividades enzimáticas dessas moléculas são bem-conhecidos e rotineiramente praticados na técnica. Os substratos a serem usados na avaliação podem ser uma molécula conhecida ser enzimaticamente modificada pela enzima (por exemplo, uma cinase) ou uma molécula que pode ser facilmente identificada a partir de substratos candidatos para uma dada classe de enzimas.

Em uma modalidade exemplar, o fator hospedeiro de interação com HIV empregado na avaliação é a cinase MLK3, e os agentes de teste são primeiro avaliados quanto à habilidade em modular a atividade de cinase MLK3 em autofosforilação ou fosforilação de um substrato. Efeito dos compostos de teste sobre a atividade de cinase MLK3 pode ser examinado através da monitoração da autofosforilação de MLK3 na presença dos compostos usando métodos conforme descrito em, por exemplo, Gallo e outros, *J. Biol. Chem.*, 269:15092-100, 1994; Leung e outros, *J. Biol. Chem.*, 273:32408-15, 1998; Zhang e outros, *J. Biol. Chem.*, 276:45598-603, 2001 e Durkin e outros, *Biochemistry* 43:16348-55, 2004. Compostos inibindo a atividade de cinase MLK3 podem também ser identificados através do monitoramento da fosforilação de um substrato por MLK3 na presença de um composto de teste. Por exemplo, os compostos podem ser examinados quanto a efeito sobre fosforilação de MLK3 de golgin-160 em um ensaio *in vitro* conforme descrito em, por exemplo, Cha e outros, *J. Cell Sci.*, 117:751-60, 2004.

Muitos outros ensaios para monitoramento de atividades de proteína cinase são também descritos na técnica. Esses incluem ensaios relatados em, por exemplo, Chedid e outros, *J. Immunol.*, 147:867-73, 1991; Kontny e outros, *Eur. J. Pharmacol.*, 227:333-8, 1992; Wang e outros, *Oncogene* 13:2639-47, 1996; Murakami e outros, *Oncogene*, 14:2435-44, 1997; Pyrzynska e outros, *J. Neurochem.* 74:42-51, 2000; Berry e outros, *Biochem. Pharmacol.*, 62:581-91, 2001; Cai e outros, *Chin. Med. J. (Engl.)*, 114:248-

52, 2001. Qualquer um desses métodos pode ser empregado e modificado para ensaiar efeito modulador de um agente de teste em um fator hospedeiro de interação com HIV que é uma cinase, por exemplo, NTRK1, CCRK, PAK7, MAP3K14, MAPK14, TYK2 e MLK3. Ainda, muitos substratos de cinase estão disponíveis na técnica. Vide, por exemplo, www.endobiosciences.com; e www.proteinkinase.de. Ainda, um substrato adequado de uma cinase pode ser avaliado em formato de alto rendimento. Por exemplo, substratos de uma cinase podem ser identificados usando o ensaio de cinase luminescente Kinase-Glo® (Promega) ou outros estojos de avaliação de substrato de cinase (por exemplo, desenvolvidos pela Cell Signaling Technology, Beverly, Massachusetts).

Em adição a ensaios para avaliação de agentes que modulam atividades enzimáticas ou outras biológicas de um fator hospedeiro de interação com HIV, o ensaio de atividade também compreende avaliação *in vitro* e avaliação *in vivo* quanto a alterações no nível de expressão do fator hospedeiro de interação com HIV. Modulação de expressão de um fator hospedeiro de interação com HIV pode ser examinada em um sistema baseado em célula através de transfecção transiente ou estável de um vetor de expressão em linhagens de célula cultivadas. Por exemplo, os compostos de teste podem ser ensaiados quanto à habilidade em inibir expressão de um gene-repórter (por exemplo, gene de luciferase) sob o controle de um elemento regulador de transcrição (por exemplo, sequência promotora) de um fator hospedeiro de interação com HIV. Genes codificando os fatores hospedeiros de interação com HIV mostrados nas Tabelas 2-4 foram todos caracterizados na técnica. Elementos reguladores de transcrição tal como sequências promotoras de muitos desses genes foram todos delineados.

Vetor de ensaio carregando o elemento regulador de transcrição que é operavelmente ligado ao gene-repórter pode ser transferido para qualquer linhagem de célula de mamífero para ensaios de atividade de promotor. Genes-repórter tipicamente codificam polipeptídeos com uma atividade enzimática facilmente ensaiada que está naturalmente ausente da célula hospedeira. Polipeptídeos-repórter típicos para promotores eucarióticos incluem,

por exemplo, cloranfenicol acetiltransferase (CAT), luciferase de vaga-lume ou Renilla, beta-galactosidase, beta-glucuronidase, fosfatase alcalina e proteína fluorescente verde (GFP). Vetores expressando um gene-repórter sob o controle de um elemento regulador de transcrição de um fator hospedeiro de interação com HIV podem ser preparados usando apenas técnicas rotineiramente praticadas e métodos de biologia molecular (vide, por exemplo, Sambrook e outros, *supra*; Brent e outros, *supra*). Em adição a um gene-repórter, o vetor pode também compreender elementos necessários para propagação ou manutenção na célula hospedeira, e elementos tal como seqüências de poliadenilação e terminadores transcripcionais. Vetores de ensaio exemplares incluem séries de vetores pGL3 (Promega, Madison, WI; Patente U.S. Nº 5.670.356), que incluem uma seqüência poliligante 5' de um gene de luciferase. Métodos gerais de ensaio de cultura celular, transfecção e gene-repórter foram descritos na técnica, por exemplo, Sambrook e outros, *supra*; e *Transfection Guide*, Promega Corporation, Madison, WI (1998). Qualquer linhagem de célula de mamífero prontamente transfectável pode ser usada para avaliar a expressão do gene-repórter a partir do vetor, por exemplo, células HCT116, HEK 293, MCF-7 e HepG2.

VI. Teste de Compostos de Modulação quanto à Atividade Inibidora sobre Infecção por HIV

Para identificar novos inibidores de infecção por HIV, compostos que modulam um fator hospedeiro de interação com HIV conforme acima descrito são tipicamente testados mais para confirmar seu efeito inibidor sobre infecção por HIV. Tipicamente, os compostos são avaliados quanto à habilidade em modular uma atividade que é indicativa de infecção por HIV ou replicação de HIV. A avaliação é realizada na presença do fator hospedeiro de interação com HIV sobre o qual os compostos de modulação agem. O fator hospedeiro de interação com HIV contra o qual os agentes de modulação são identificados na primeira etapa de avaliação pode ser ou expresso endogenamente pela célula ou expresso a partir do segundo vetor de expressão. De preferência, esta etapa de avaliação é realizada *in vivo* usando células que expressam endogenamente o fator hospedeiro de interação com

HIV. Como um controle, efeito dos compostos de modulação sobre uma célula que não expressa o fator hospedeiro de interação com HIV pode ser também examinado. Por exemplo, se o fator hospedeiro de interação com HIV (por exemplo, codificado por um gene de camundongo) usado na primeira etapa de avaliação não for endogenamente expresso pela linhagem celular (por exemplo, uma linhagem de célula humana), um segundo vetor expressando o polipeptídeo pode ser introduzido na célula. Comparando uma atividade relacionada com infecção por HIV na presença ou ausência de um composto de modulação, atividades dos compostos sobre infecção por HIV podem ser identificadas.

Muitos ensaios e métodos estão disponíveis para examinar atividade de inibição de HIV dos compostos. Isto geralmente envolve teste dos compostos quanto à habilidade em inibir replicação viral de HIV *in vitro* ou uma atividade bioquímica que é indicativa de infecção por HIV. Em alguns métodos, atividade inibidora potencial dos compostos de modulação sobre infecção por HIV pode ser testada examinando seu efeito sobre infecção por HIV de uma célula cultivada *in vitro*, usando métodos rotineiramente praticados na técnica. Por exemplo, os compostos podem ser testados em infecção por HIV de uma cultura de macrófago primária conforme descrito em Seddiki e outros, *AIDS Res. Hum. Retroviruses.*, 15:381-90, 1999. Eles podem ser também examinados em infecção por HIV de outras linhagens de célula T e de célula de monócito conforme relatado em Fujii e outros, *J. Vet. Med. Sci.*, 66:115-21, 2004. Sistemas *in vitro* adicionais para monitoramento de infecção por HIV foram descritos na técnica. Vide, por exemplo, Li e outros, *Pediatr. Res.*, 54:282-8, 2003; Steinberg e outros, *Virology*, 193:524-7, 1993; Hansen e outros, *Antiviral Res.*, 16:233-42, 1991; e Piedimonte e outros, *AIDS Res. Hum. Retroviruses.*, 6:251-60, 1990.

Nesses ensaios, infecção por HIV das células pode ser monitorada morfolologicamente, por exemplo, através de um ensaio de efeito citopático microscópico (vide, por exemplo, Fujii e outros, *J. Vet. Med. Sci.*, 66:115-21, 2004). Ela pode ser também avaliada enzimaticamente, por exemplo, ensaiando atividade de transcriptase reversa (RT) de HIV no sobrenadante

de cultura celular. Tais ensaios são descritos na técnica, por exemplo, Reynolds e outros, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 100:1615-20, 2003; e Li e outros, *Pediatr. Res.*, 54:282-8, 2003. Outros ensaios monitoram infecção por HIV através da quantificação do acúmulo de ácidos nucleicos virais ou antígenos virais. Por exemplo, Winters e outros (*PCR Methods Appl.*, 1:257-62, 1992) descreveram um método que ensaia RNA e DNA de gag de HIV de culturas de células infectadas com HIV. Vanitharani e outros descrevem um ensaio de infecção por HIV que mede a produção de antígeno p24 viral (*Virology*, 289:334-42, 2001). Replicação viral pode ser também monitorada *in vitro* por um ensaio ELISA de antígeno p24, conforme descrito em, por exemplo, Chargelegue e outros, *J. Virol. Methods*. 38(3):323-32, 1992; e Klein e outros, *J. Virol Methods.*, 107(2):169-75, 2003. Todos esses ensaios podem ser empregados e modificados para avaliar a atividade anti-HIV dos compostos de modulação da presente invenção.

Em alguns métodos, efeito de inibição potencial de compostos de modulação sobre infecções por HIV pode ser examinado em células repórter engenheiradas que são permissivas para replicação de HIV. Nessas células, infecção e replicação de HIV são monitoradas através do exame da expressão de um gene-repórter sob o controle de um elemento regulador de transcrição de HIV, por exemplo, HIV-LTR. Um exemplo de tais células é a célula repórter de HIV HeLa-T4- β Gal. Conforme ilustrado nos Exemplos abaixo, a célula repórter HeLa-T4- β Gal pode ser infectada com HIV-IIIb após ser tratada com um composto de modulação. Infecctividade do vírus a partir das células tratadas com composto, conforme monitorado através da medição da atividade de β -galactosidase, pode ser comparada com aquela de células-controle que não foram tratadas com o composto. Um título de vírus reduzido ou redução em infectividade de células tratadas com o composto de modulação confirmaria que o composto pode na verdade inibir infecção por HIV ou replicação viral.

Em adição às células HeLa-T4- β Gal exemplificadas aqui, muitos ensaios de repórter similares foram também descritos na técnica. Por exemplo, Gervaix e outros (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94:4653-8, 1997) desen-

volveram uma linhagem de célula T estável expressando um plasmídeo codificando uma proteína verde-fluorescente humanizada (GFP) sob o controle de um promotor LTR de HIV-1. Quando da infecção por HIV-1, um aumento de 100- a 1.000 vezes de fluorescência de células infectadas pode ser observado conforme comparado com células não-infectadas. Qualquer um desses sistemas de ensaio pode ser empregado na presente invenção para monitorar efeitos dos compostos de modulação sobre a infecção por HIV em tempo real. Esses sistemas *in vitro* permitem também quantificação de células infectadas ao longo do tempo e determinação de susceptibilidade aos compostos.

Em alguns outros métodos, efeito dos compostos de modulação sobre replicação de HIV pode ser examinado examinando produção de pseudovírus HIV-1 em uma célula tratada com os compostos. A célula pode expressar o fator hospedeiro de interação com HIV endogenamente ou exogenamente. Por exemplo, um construto codificando o fator hospedeiro de interação com HIV pode ser transfectado para a célula hospedeira que não expressa endogenamente o fator hospedeiro de interação com HIV. Conforme descrito em mais detalhes no Pedido de Patente Provisório US Nº 60/673.623, produção do pseudovírus HIV-1 pode ser obtida através da transfecção de uma célula produtora (por exemplo, uma célula 293T HEK) com um plasmídeo-repórter expressando o RNA psi-positivo codificando um gene-repórter (por exemplo, gene de luciferase), um construto de empacotamento delta psi codificando todas as proteínas estruturais e a proteína reguladora ou acessório tal como Tat, Rer, Vpr e Vif e um plasmídeo de expressão envelope VSV-g. Após infecção de uma célula-alvo com pseudovírus no sobrenadante da célula produtora, o gene-repórter é expresso seguindo retrotranscrição e integração no genoma da célula-alvo.

Para avaliar inibidores de replicação de HIV, a célula hospedeira produtora pode ser tratada com um composto de modulação antes da, concomitantemente com ou subsequente à transfecção dos plasmídeos de pseudovírus. De preferência, o composto é administrado à célula hospedeira antes da transfecção dos plasmídeos de pseudovírus, e está presente em

todo o processo de ensaio. Título do pseudovírus produzido pode ser monitorado através de infecção das células-alvo com o pseudovírus no sobrenadante da célula produtora e ensaio de uma atividade do repórter (por exemplo, atividade de luciferase) nas células-alvo. Como um controle, atividade repórter em células-alvo infectadas com sobrenadante de células produtoras que não foram tratadas com o composto é também medida. Se o composto de modulação tiver um efeito inibidor sobre o desenvolvimento do vírus, células-alvo contatadas com o sobrenadante das células produtoras que foram tratadas com o composto terão uma atividade de repórter reduzida com relação às células controle.

VII. Aplicações Terapêuticas

Através da inibição da infecção por HIV, compostos de inibição de HIV descritos acima provêm aplicações terapêuticas úteis da presente invenção. Eles podem ser prontamente empregados para prevenir ou tratar infecções por HIV, bem como doenças ou condições associadas com infecções por HIV (por exemplo, AIDS) em vários indivíduos. Ainda, compostos conhecidos na técnica que inibem qualquer um dos fatores hospedeiro de interação com HIV identificados pelos presentes inventores podem ser também usados nas aplicações terapêuticas. Exemplos incluem K252a e CEP1347 que inibem a atividade de cinase de MLK3 (Roux e outros, *J. Biol. Chem.*, 277:49473-80, 2002).

Infecções por HIV que são condescendentes a tratamento com os compostos de inibição de HIV descritos aqui compreendem infecção de um indivíduo, particularmente um indivíduo humano, por qualquer um da família HIV de retrovírus (por exemplo, HIV-I, HIV-II ou HIV-III). Os compostos de inibição de HIV são úteis para tratamento de um indivíduo que é um veículo de qualquer membro da família HIV de retrovírus. Eles podem ser usados para tratar um indivíduo que é diagnosticado de AIDS ativa. Os compostos são também úteis no tratamento ou profilaxia das condições relacionadas com AIDS em tais indivíduos. Indivíduos que não foram diagnosticados como tendo infecção por HIV, mas são acreditados estar sob risco de infecção por HIV, são também condescendentes a tratamento com os compostos de

inibição de HIV da presente invenção.

Indivíduos sofrendo de qualquer uma das condições relacionadas com AIDS são adequados para tratamento com os compostos de inibição de HIV. Tais condições incluem complexo relacionado com AIDS (ARC),
5 linfadenopatia generalizada progressiva (PGL), condições positivas de anticorpo anti-HIV e condições HIV-positivas, condições neurológicas relacionadas com AIDS (tal como demência ou paraparesia tropical), sarcoma de Kaposi, trombocitopenia púrpura e infecções oportunistas associadas tal como pneumonia *Pneumocystis carinii*, Tuberculose micobacteriana, candidíase
10 se esofageal, toxoplasmose do cérebro, retinite CMV, encefalopatia relacionada com HIV, síndrome debilitadora relacionada com a HIV, etc.

Métodos-padrão para medição da infecção por HIV *in vivo* e progressão para AIDS podem ser usados para determinar se um indivíduo está positivamente respondendo a tratamento com os compostos de inibição de
15 HIV da invenção. Por exemplo, após tratamento com um composto de inibição de HIV da invenção, uma contagem de célula T CD4⁺ do indivíduo pode ser monitorada. Um aumento em células T CD4⁺ indica que o indivíduo está se beneficiando da administração do tratamento da terapia antiviral. Este, bem como outros métodos conhecidos na técnica, pode ser usado para de-
20 terminar o ponto ao qual os compostos da presente invenção são eficazes no tratamento de infecção por HIV e AIDS em um indivíduo.

Os compostos de inibição de HIV da presente invenção podem ser diretamente administrados sob condições estéreis ao indivíduo a ser tratado. Os moduladores podem ser administrados sozinhos ou como o ingrediente ativo de uma composição farmacêutica. A composição farmacêutica
25 da presente invenção pode ser também combinada com ou usada em associação com outros agentes terapêuticos. Em algumas aplicações, um primeiro composto de inibição de HIV é usado em combinação com um segundo composto de inibição de HIV a fim de inibir infecção por HIV a um grau mais
30 extensivo que não pode ser conseguido quando um composto de inibição de HIV é usado individualmente. Em algumas outras aplicações, um composto de inibição de HIV da presente invenção pode ser usado em conjunto com

fármacos anti-HIV conhecidos tal como AZT.

Composições farmacêuticas da presente invenção tipicamente compreendem pelo menos um ingrediente ativo junto com um ou mais seus veículos aceitáveis. Veículos farmaceuticamente aceitáveis aumentam ou estabilizam a composição ou facilitam a preparação da composição. Veículos farmaceuticamente aceitáveis são determinados em parte pela composição particular sendo administrada (por exemplo, ácido nucléico, proteína ou compostos moduladores), bem como pelo método particular usado para administrar a composição. Eles devem ser ambos farmaceuticamente e fisiologicamente aceitáveis no sentido de serem compatíveis com os outros ingredientes e não prejudiciais ao indivíduo. Este veículo pode tomar uma variedade de formas dependendo da forma de preparação desejada para administração, por exemplo, oral, sublingual, retal, nasal, intravenosa ou parenteral. Por exemplo, o composto de inibição por HIV pode ser complexado com proteínas-veículo tal como ovalbumina ou albumina do soro antes de sua administração a fim de aumentar a estabilidade ou propriedades farmacológicas.

As composições farmacêuticas podem ser preparadas em várias formas, tal como grânulos, comprimidos, pílulas, supositórios, cápsulas e similar. A concentração do composto terapeuticamente ativo na formulação pode variar de a partir de cerca de 0,1 a 100% em peso. Formulações terapêuticas são preparadas através de quaisquer métodos bem-conhecidos na técnica de farmácia. As formulações farmacêuticas podem ser aplicadas através de quaisquer meios eficazes que possam ser usados para tratamento. Vide, por exemplo, *Goodman & Gilman's The Pharmacological Bases of Therapeutics*, Hardman e outros, Eds., McGraw-Hill Professional (10^a Ed., 2001); Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*, Gennaro, Ed., Lippincott Williams & Wilkins (20a ed., 2003); e *Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems*, Ansel e outros (eds.), Lippincott Williams & Wilkins (7a ed., 1999).

As formulações terapêuticas podem ser convenientemente apresentadas em forma de dosagem unitária e administradas em uma dose tera-

pêutica adequada. Uma dose terapêutica adequada pode ser determinada através de qualquer um dos métodos bem-conhecidos tal como estudos clínicos em espécies de mamífero para determinar a dose tolerável máxima e em indivíduos humanos normais para determinar dosagem segura. Exceto
5 sob certas circunstâncias quando dosagens maiores podem ser requeridas, a dosagem preferida de um composto de inibição de HIV geralmente se encontra dentro da faixa de a partir de cerca de 0,001 a cerca de 1000 mg, mais geralmente de a partir de cerca de 0,01 a cerca de 500 mg por dia.

A dosagem e o modo de administração preferidos de um composto de inibição de HIV podem variar para indivíduos diferentes, dependendo de fatores que podem ser individualmente revistos pelo médico que está tratando, tal como a condição ou condições a serem tratadas, a escolha de composição a ser administrada, incluindo o composto de inibição de HIV particular, a idade, peso e resposta do indivíduo individual, a severidade dos
15 sintomas do indivíduo e a via de administração escolhida. Como uma regra geral, a quantidade de um composto de inibição de HIV administrado é a menor dosagem que eficazmente e confiavelmente previne ou minimiza as condições dos indivíduos. Deste modo, as faixas de dosagem acima pretendem prover orientação e apoio geral para os presentes ensinamento, mas
20 não pretendem limitar o escopo da invenção.

EXEMPLOS

Os exemplos que seguem são providos para ilustrar, mas não limitar, a presente invenção.

25 Exemplo 1. Materiais e métodos gerais

Linhagens de célula e manutenção: Células HeLaCD4 β gal do Dr. Michael Emerman foram obtidas através do *AIDS Research and Reference Reagent Program, Division of AID, NIAID, NIH* (Kimpton, J. *Virol.*, 66:2232-9, 1992). As células são mantidas em DMEM suplementado com
30 10% de FBS, 1X de Penicilina/Estreptomicina/L-glutamina, 0,2 mg/mL de G418 e 0,1 mg/mL de Higromicina B. Células Jurkat foram mantidas em RPMI-1640 suplementado com 10% de FBS e 1X de Penicilina/Estrepto-

micina/L-glutamina. Todos os reagentes de cultura celular foram obtidos da Invitrogen.

Avaliação de cDNA em células HeLaCD4 β gal: Retrotransfecção de cDNA de alto rendimento de células HeLaCD4 β gal foi realizada essencialmente conforme descrito em Chanda e outros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100:12153-8, 2003. Resumidamente, cDNA individual de uma biblioteca subgenômica compreendendo 15.000 genes (detalhes da coleta no <http://function.gnf.org>), cDNA de Sport6GFP controle negativo e plasmídeo de Sport-6-Tat controle positivo foram salpicados a 40 ng/cavidade em 55
10 placas de 384 cavidades opacas brancas (Greiner). Uma solução de 1% de Gene Juice (Novagen) contendo 1 μ g/mL de um plasmídeo-repórter de HIV-LTR-Luciferase (derivado através de amplificação por PCR da sequência de LTR da linhagem HxB2) em meio Opti-MEM livre de soro (Invitrogen) foi adicionada a cada cavidade (10 μ L) usando um aparelho Multidrop (Titertek) e
15 complexos foram deixados formar por 10 minutos. Células HeLaCD4 β gal (1000 células/30 μ L/cavidade em DMEM/FBS a 10%) foram então adicionadas e as placas foram incubadas da noite para o dia, seguido pela adição de 20 μ L de DMEM/10% de FBS com 200 ng/mL de p24 de HIV-IIIb (Advanced Biotechnologies Inc.). Após 72 horas, a infecção foi avaliada através da medição da produção de luciferase usando Brit Glo (Promega) e leitura no aparelho CLIPR (Molecular Devices). Toda a biblioteca foi ativada em duplicata. Dados para cada cDNA foram comparados com o sinal médio da placa toda e expressos como a razão afa/mfa, que é a ativação de vezes média (*average fold activation*) (afa) dividida pelo desvio-padrão ajustado da ativação de
20 vezes (mfa). O mfa penaliza o valor para ativação de vezes se o desvio-padrão entre as réplicas for alto. *Hits* foram confirmados após cultivo de cDNA adicional através de teste no ensaio original e foram seqüenciados para confirmar sua atividade (Eton Bioscience).

Teste de cDNA de MLK3 inativa em cinase: MLK3 e um mutante
30 inativo em cinase de MLK3 (K144R) em vetor pcDNA3.1 (Xu e outros, *Mol. Cell. Biol.*, 21:4713-24, 2001) foram testados ao lado do *hit* de coleção de MLK3 Origene em placas de 12 cavidades usando uma versão ampliada do

ensaio de avaliação. Resumidamente, 1,28 µg de cDNA/0,32 µg de LTR-Lux/32 µL foram salpicados por cavidade seguido por 320 µL de 1% de gene juice/Optimem e então 6×10^4 células HeLaCD4βgal em 1 mL de DMEM/10% de FBS. Após 24 horas, as culturas foram infectadas com 90 ng p24 de HIV-IIIb, incubadas por três dias adicionais e avaliadas quanto a níveis de infecção usando Brite Glo (Promega) e leitura no aparelho CLIPR (Molecular Devices).

siRNA: siRNA de luciferase GL2 (No. de catálogo D-001100-01-20) e siRNAs Smartpool de PITPNα (No. de acesso NM_006224), TRIM28 (No. de acesso NM_005762), IFIT1 (No. de acesso NM_001548), LYZ (No. de acesso NM_000239), CORO1A (No. de acesso NM_007074) e DnaJC14 (No. de acesso NM_032364) foram obtidos da Dharmacon. No caso de siRNA de GL2, quantidades adicionais da mesma seqüência foram também obtidas da Qiagen. Dois siRNA contra Tat foram sintetizados e agrupados para uso como um controle positivo para inibição de infecção por HIV. siRNA de MLK3-1 e MLK3-2 foram criados e sintetizados e siRNA de MLK3-3 foi obtido da Dharmacon (No. de catálogo D-003577-03).

Avaliação de siRNA em células HeLaCD4βgal: A biblioteca de siRNA foi direcionada contra 5000 genes diferentes que têm o maior potencial para serem alvos de fármaco, com cada gene representado por dois siRNAs diferentes. Retrotransfecção de siRNA de células HeLaCD4βgal foi realizada essencialmente conforme descrito em Aza-Blanc e outros, *Molecular Cell* 12:627-37, 2003. Resumidamente, siRNAs individuais foram salpicados a 14 ng/cavidade em placas de 384 cavidades de fundo opaco branco ou transparente branco (Greiner) contendo uma seqüência de siRNA por cavidade. Uma solução de 2% de oligofectamina (Invitrogen) em meio Opti-MEM livre de soro (Invitrogen) foi adicionada a cada cavidade (10 µL) e complexos foram deixados se formar por 15-20 minutos. Todas as administrações a 384 cavidades foram feitas usando um aparelho Multidrop (Titer-tek). Células HeLaCD4βgal (1000 células/30 µL/cavidade em Opti-MEM livre de soro) foram então adicionadas e as placas foram incubadas da noite para o dia, seguido pela adição de 20 µL de 30% de FBS/DMEM com 200 ng/mL

de HIV-IIIb (Advanced Biotechnologies Inc.). Após 72 horas, infecção foi avaliada através da medição da produção de beta-galactosidase usando um volume igual de Gal Screen (Applied Biosystem). Toda leitura da placa de 384 cavidades foi feita usando o aparelho CLIPR (Molecular Devices). Doze

5 réplicas foram administradas por placa de 384 cavidades e os dados foram expressos como inibição percentual comparado com o siRNA de GL2 controle negativo. Citotoxidez do siRNA foi medida em 96 horas pós-transfecção adicionando volume igual de uma diluição 1:4 de Cell Titer Glo (Promega) e leitura de luminescência em aparelho CLIPR, com os dados novamente expressos como uma inibição percentual comparado com GL2.

10

Validação de siRNA através de western blot: siRNA (800 ng) foi salpicado em 250 µL de Opti-MEM livre de soro (Invitrogen) em placas de 6 cavidades seguido pela adição de 250 µL de 1,5% de Lipofectamina 2000 (Invitrogen) em Opti-MEM livre de soro. As placas foram incubadas em temperatura ambiente por 20 minutos para permitir formação de complexo. Células HeLaCD4βgal (3×10^5 em 1,5 mL de Opti-MEM livre de soro) foram então

15 adicionadas e incubadas da noite para o dia seguido pela adição de 1 mL de 30% de FBS/DMEM. As células foram coletadas 72 horas pós-transfecção através de raspagem e lisadas em tampão de lise de célula (Hepes a 20 mM pH 7,2/KCl a 10 mM/EDTA a 10 mM/1% de Triton X-100/inibidores de protease 1X; Sigma Chemical Co.) por uma hora em gelo. Concentração de proteína total do lisato foi medida usando o estojo Micro-BCA (Promega) e quantidades de proteína iguais foram carregadas em 4-12% de NuPage Bis-Tris gel (Invitrogen) e submetidas à eletroforese conforme sugerido pelo fabricante.

20 Seguindo transferência para nitrocelulose, *blots* foram bloqueados com 5% de leite desnatado em PBST (solução salina tamponada com fosfato com 0,05% de Tween-20) e então submetidos a *immunoblotting* com os anticorpos que seguem; anticorpo anti-MLK3 policlonal de coelho e antitubulina de cabra da Santa Cruz Biotechnology, anticorpo secundário anti-coelho de

25 cabra conjugado com HRP da Sigma Chemical Co., anticorpo secundário de burro-anticabra conjugado com HRP da Promega. Todos os anticorpos foram usados em diluições sugeridas pelo fabricante e foram diluídos em 5%

30

de leite desnatado em PBST. As faixas foram visualizadas usando reagente de detecção ECL-plus (Amersham).

Transfecção de siRNA de células T Jurkat: Células T Jurkat foram lavadas uma vez em PBS, ressuspensas em Opti-MEM livre de soro (Invitrogen) em densidade alta ($2,4 \times 10^8/\text{mL}$) e 50 μL foram adicionados a 1 nmol de siRNA (50 μL de 20 μM) em um cadinho de distância de 0,2 cm. A mistura foi submetida à eletroporação usando o módulo BioRad Gene Pulser Xcell usando condições sugeridas pelo fabricante (140V, 1000uF, declínio exponencial) e então transferida para 12 mL de RPMI suplementado com 10% de FBS sem antibióticos por 24 horas. Células foram então peletizadas, células viáveis contadas através de exclusão de azul tripiano e ressuspensas em uma densidade de $1,7 \times 10^6/\text{mL}$ em RPMI suplementado com 10% de FBS e 1XPen/Strep/Glutamina. Para estudos de infecção, 300 μL de células tratadas com siRNA foram adicionados a cavidades de uma placa de 48 cavidades e ou 2 ng ou 0,5 ng de HIV-IIIb, correspondendo a MOIs de 0,0005 e 0,000125 respectivamente com base em título viral provido pelo fabricante, foi adicionado a cada cavidade. Após três dias adicionais, as células foram coletadas, lavadas 3X em PBS, lisadas e infecção foi medida através de ELISA de p24 dos lisatos de célula. Para citotoxicidade, 300 μL de células tratadas com siRNA foram adicionados às cavidades de uma placa de 48 cavidades e após 3 dias viabilidade celular foi medida usando Cell Titer Glo (Promega) e leitura no CLIPR (Molecular Devices) ou usando Alamar Blue (TREK systems) e leitura no Acquest (LJL Biosystems). Para determinar a eficácia de siRNA, lisatos de célula foram preparados e analisados como em estudos de validação de siRNA de HeLaCD4 β gal em 72 horas pós-eletroporação.

Exemplo 2. Identificação de novos fatores hospedeiros de interação com HIV a partir de avaliação de siRNA

Foi realizada uma avaliação de siRNA subgenômico para proteínas hospedeiro que estão envolvidas em infecção por HIV através de monitoramento da expressão de um gene-repórter sob o controle de promotor LTR de HIV em células HeLaCD4 β gal (Kimpton e outros, *J. Virology*

66:2232-2239, 1992). As células HeLaCD4 β gal foram obtidas do Dr. Michael Emerman através do *AIDS Research and Reference Reagent Program, Division of AIDS, NIAID, NIH*. As células foram transfectadas usando um protocolo de transfecção reversa com siRNA contra Tat usado como um controle positivo e foram provocadas com HIV-IIIb 24 horas após transfecção (Huang e outros, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 101:3456-61, 2004). A infecção foi deixada prosseguir por 3 dias para permitir que os efeitos em todos os estágios de infecção entrassem para liberar e espalhar por toda a cultura a ser vista. Através do monitoramento da expressão do gene-repórter nas células HeLaCD4 β gal, este sistema permite que uma pessoa detecte qualquer efeito de modulação dos siRNAs sobre infecção por HIV.

Infecção foi avaliada através da medição da quantidade de betagalactosidase produzida fora do promotor LTR viral usando um substrato quimioluminescente. Toda a avaliação foi conduzida em duplicata e os dados foram expressos como uma razão de ativação de vezes média (afa) para desvio-padrão ajustado da ativação de vezes (mfa), um valor que leva em consideração ambos o efeito de cada siRNA e o desvio entre as réplicas. Para aqueles genes cuja afa era menos do que 1 (inibidores de infecção), valores foram convertidos para ativação de vezes negativa.

20 Exemplo 3. Identificação e caracterização de fatores hospedeiros de interação com HIV a partir de avaliação de cDNA

Foi realizada uma avaliação de alto rendimento de uma biblioteca de cDNA de 15.000 genes únicos para encontrar novos fatores pró-virais cuja expressão levaria a aumento da infecção por HIV-IIIb. Por causa de sua facilidade de transfecção, foram empregadas células HeLaCD4 β gal para avaliação e provocação com HIV-IIIb competente em replicação. cDNAs de controle negativo (Sport6-gfp) e controle positivo (Tat-Sport6) foram salpicados em cavidades de placas de 384 cavidades contendo o cDNA de biblioteca (um gene por cavidade) seguido pela adição de solução de reagente de transfecção contendo um construto de LTR-repórter de luciferase responsivo a Tat de HIV. As células foram adicionadas após formação de complexo, e, após 24 horas, cada cavidade foi infectada com HIV-IIIb. Infecção foi deixa-

da prosseguir por 3 dias para permitir que os efeitos em todos os estágios de infecção entrassem para liberar e se espalhar por toda a cultura a ser observada. Infecção foi então avaliada através da medição da quantidade de luciferase produzida através do promotor LTR viral.

5 A maioria das cavidades de cDNA Tat controle mostrou aumento comparado com o controle negativo e cavidades vazias. A avaliação completa foi conduzida em duplicata e os dados foram expressos como uma razão de ativação de vezes média (afa) para desvio-padrão ajustado da ativação de vezes (mfa), um valor que leva em consideração ambos o efeito de cada
10 cDNA e o desvio entre as réplicas. De toda a biblioteca, 315 (2,1%) genes aumentaram a infecção com uma $afa.mfa \geq 2$, o limiar escolhido para acompanhamento. Vários genes já conhecidos estão envolvidos em infecção por HIV, tal como os aumentadores S100A12, subunidade B reguladora PP2A e exportina nuclear CRM1, foram identificados como aumentadores através da
15 avaliação, servindo como uma validação interna. Os 89 principais aumentadores de infecção, conforme determinado ambos através do desempenho de avaliação e revisão da literatura, foram escolhidos para acompanhamento. Os *hits* representaram uma variedade de famílias de genes com a maioria sendo alvos "*druggable*", incluindo cinases, outras enzimas e fatores de
20 transcrição, e de cursos conhecidos ser importantes em infecção por HIV, incluindo o curso de ubiquitina e fatores de processamento de RNA. Cada *hit* de cDNA foi novamente desenvolvido em escala mini-prep e testado no ensaio original onde 19 desses *hits* reconfirmaram. Esses foram então desenvolvidos em escala maxi-prep, testados no ensaio original e seqüenciados
25 para assegurar identidade de *hit* apropriada. Neste estágio, 13 *hits* de seqüência confirmada continuaram a mostrar aumento de atividade comparado com o controle negativo, variando de 1,7 vez a 8,8 vezes sobre controle negativo Sport6-GFP (Tabela 1).

Em seguida a requerente investigou se os aumentadores de
30 cDNA mais fortes eram essenciais para replicação de HIV através da depleção das proteínas endógenas usando siRNA. Para 6 dos genes tendo desempenho de ~3 vezes ou mais sobre o controle foi obtido o siRNA validado

Smartpools e avaliados seus efeitos sobre infecção por HIV-IIIb em células HeLaCD4 β gal. Daqueles testados, siRNA contra chaperona DnaJC14, proteína induzida por interferon com repetições tetratricopeptídeo 1 (IFIT1) e proteína alfa de transferência de fosfatidilinositol (PITPN α) diminuiu a replicação de HIV sem toxidez significativa reforçando mais seu papel em infecção, enquanto os outros não tiveram nenhum efeito sobre replicação viral ou viabilidade celular (dados não mostrados). Interessantemente, um dos genes que ambos aumentou infecção quando superexpresso e bloqueou infecção quando depletado era a proteína induzida por interferon IFIT1, que tinha sido mostrada ser supra-regulada em uma variedade de infecções virais incluindo Hepatite C (HCV) bem como infecção por HIV de astrócitos. Embora a função biológica de IFIT1 seja desconhecida, ela foi descrita ser capaz de interagir com fator de troca de nucleotídeo guanina Rho/Rac, e então pode ajudar na ativação de proteínas Rho. A idéia de que HIV pode usar uma proteína induzida por interferon para ajudar a facilitar sua replicação é intrigante e merece mais estudo. Os outros dois genes com atividade dupla, a proteína chaperona DnaJC14 e PITPN α que é uma proteína de transporte de lipídeo envolvida em tráfego em vesícula, também prometem dar mais compreensão da biologia de vírus.

Por causa de seu papel fisiológico claro e seu alto potencial como um alvo terapêutico, a requerente em seguida foca seus esforços no aumentador de cDNA forte cinase de linhagem mista 3 (MLK3). Esta serina/treonina cinase está envolvida na ativação de cinases Map a jusante, incluindo JNK, p38 e ERK, e foi mostrada desempenhar um papel crítico em apoptose neuronal incluindo aquela mediada por gp120 de HIV. Um composto inibidor de MLK3, CEP-1347, estava em teste clínico para o tratamento de doenças neurodegenerativas, destacando seu papel em morte de célula neuronal e sua aplicabilidade como um alvo de fármaco (Bodner e outros, *Experimental Neurology*, 188:246-53, 2004). Para discutir se a atividade de cinase de MLK3 era responsável pelo aumento de infecção visto usando o cDNA, foi obtido um mutante inativo de cinase (MLK3 KI) e testados seus efeitos sobre infecção por HIV. Diferente da proteína do tipo selvagem,

MLK3 KI era incapaz de aumentar infecção, sugerindo que o funcionamento de MLK3 é crítico para aumento (Figura 1). Por causa de seu papel em ativação do complexo AP-1 através da ativação de JNK, foi tomado como hipótese que MLK3 poderia estar agindo aumentando a transcrição de HIV através do sítio AP-1 localizado em LTR de HIV. Para este teste, MLK3 foi co-transfectada com o construto de LTR-luciferase ou com um vetor de expressão Tat ou um plasmídeo controle para avaliar ambos efeitos dependentes de Tat e independentes de Tat sobre a transcrição mediada por LTR. Expressão de MLK3 aumentou a transcrição dependente de Tat em aproximadamente 3 vezes sobre o controle, mas não teve nenhum efeito significativo sobre transcrição independente de Tat (Figura 2), sugerindo que MLK3 aumenta a infecção através de transcrição específica viral.

Considerando os dados de superexpressão, foi finalmente investigado pela requerente se siRNA contra MLK3 poderia inibir infecção por HIV. Foram obtidas três seqüências de siRNA únicas se direcionando a MLK3 e avaliada sua eficácia contra HIV em células HeLaCD4 β gal e células Jurkat. siRNAs de MLK3 individuais foram transfectados em células HeLaCD4 β gal ou eletroforados em células Jurkat. Após 24 horas, as células foram provocadas com HIV-IIIb. Para células HeLaCD4 β gal, infecção foi avaliada após 3 dias adicionais através da medição da beta-galactosidase produzida a partir LTR- β gal repórter estável dentro das células usando um substrato quimioluminescente (Gal Screen). Para células Jurkat, vírus de entrada foi removido 24 horas após infecção, e sobrenadantes foram coletados após uma adicional de 48 horas e testados quanto a níveis de p24 através de ELISA. Citotoxicidade de cada siRNA foi também determinada através do uso de Cell Titer Glo em culturas não-infectadas paralelas. Os resultados indicam que todos os três siRNAs foram eficazes na depleção de proteína MLK3 (Figura 3B) e diminuíram infecção por HIV em aproximadamente 40% (Figura 3A) em células HeLaCD4 β gal. De acordo com seu mecanismo proposto de afetar transcrição dependente de Tat, depleção de MLK3 não teve nenhum efeito sobre níveis de transcritos reversos ou pró-vírus integrados iniciais (dados não mostrados). Em adição, os siRNAs de MLK3 também di-

- minuíram infecção por HIV-IIIb de células Jurkat, embora a um grau menor do que visto em células HeLaCD4 β gal (Figura 3C). Análise *Western blot* mostrou que a quantidade de depleção de proteína nas células Jurkat era menor do que aquela vista nas células HeLaCD4 β gal, então explicando o nível menor de inibição visto (Figura 3D).

Tabela 1. Avaliação de HeLaCD4 β gal de HIV-IIIb: resultados gerais:

Faixa de hits	-8,9 x +4,9 vezes afa.mfa
Fatores pró-virais (inibição com siRNA inibe infecção):	
Faixa de afa.mfa	No. de hits (biblioteca total 10k)
-8,9 a -5	61 (0,6%)
-5 a -3	280 (2,8%)
-3 a -2	741 (7,41%)
Fatores antivirais (inibição com siRNA promove infecção):	
Faixa de afa.mfa	No. de hits (biblioteca total de 10k)
+2 a +3	365 (3,65%)
+3 a +4,9	53 (0,53%)

Tabela 2. Fatores hospedeiros de interação com HIV confirmados identificados através de avaliação de siRNA

No. de Ac.	Hit do gene	Gene	afa.mfa orig.	Resultados de reconfirmação	
				% de inibição de infecção	% de citotoxicidade
NM_00208	INSR	receptor de insulina	-3,22	81,45	7,88
NM_013278	IL17C	interleucina 17C	-4,05	71,07	14,86
NM_004736	XPR1	receptor de retrovírus xenotrópico e politrópico	-4,94	70,71	15,92
NM_006978	ZNF183	proteína dedo de zinco 183 (<i>RING finger</i> , tipo C3HC4)	-3,68	87,57	24,95
NM_000099	CST3	cistatina C (angiopatia amiloide e hemorragia cerebral)	-3,49	78,42	25,83
NM_002529	NTRK1	tirosina cinase neurotrófica, receptor, tipo 1	-3,49	61,21	26,95
NM_001752	CAT	catalase	-4,32	72,57	27,70
NM_178432	CCRK	cinase relacionada com ciclo celular	-3,02	83,89	30,46
NM_003352	UBL1	ubiquitina-tipo 1 (sentrina)	-2,59	83,33	31,01
NM_001334	CTSO	catepsina O	-2,57	71,93	32,49
NM_032875	MGC15482	proteína F-box FBL2	-5,94	95,24	33,33
NM_020341	PAK7	cinase 7 ativada por p21 (CDKN1A)	-2,52	68,61	36,04
NM_000924	PDE1B	fosfodiesterase 1B, dependente de calmodulina	-3,84	91,01	37,71
NM_014339	IL17R	receptor de interleucina 17	-3,32	87,07	38,15
NM_014215	INSRR	receptor relacionado ao receptor de insulina	-4,91	88,16	38,51
NM_003877	SOCS2	supressor de sinalização de citocina 2	-3,29	67,78	38,74
NM_052867	VGCLN1	canal de fechamento por tensão tipo 1	-3,08	85,22	39,93
NM_003954	MAP3K14	proteína cinase ativada por mitógeno cinase cinase 14	-3,01	76,62	40,15
NM_000211	ITGB2	integrina, beta 2 (antígeno CD18 (p95), antígeno 1 associado com funcionamento de linfócito; subunidade beta antígeno de macrófago 1 (mac-1))	-3,12	74,21	40,31
NM_005056	RBBP2	proteína de ligação de retinoblastoma 2	-3,18	76,76	41,11
NM_006748	SLA	adaptador tipo Src	-5,98	92,69	41,87

Tabela 2 continuação

No. de Ac.	Hit do gene	Gene		afa.mfa orig.	Resultados de reconfirmação	
					% de inibição de infecção	% de citotoxicidade
NM_001315	MAPK14	proteína cinase ativada por mitógeno 14		-4,07	82,06	42,00
NM_023006	KLK15	calicreína 15		-3,22	89,76	44,88
NM_006079	CITED2	transativador de interação Cpb/p300, com domínio carboxi-terminal rico em Glu/Asp, 2		-2,93	91,04	45,05
NM_003809	TNFSF12	superfamília de fator de necrose de tumor (ligante), membro 12		-3,22	78,67	46,58
NM_002788	PSMA3	subunidade de proteassoma (prosome, <i>macropain</i>), tipo alfa, 3		-3,47	88,03	46,87
NM_021079	NMT1	N-miristoliltransferase 1		-3,39	81,45	47,87
NM_002214	ITGB8	integrina, beta 8		-3,19	85,07	48,12
NM_000352	ABCC8	cassete de ligação de ATP, subfamília C (CFTR/MRP), membro 8		-3,08	86,80	50,11
NM_000958	PTGER4	receptor E de prostaglandina 4 (subtipo EP4)		-3,69	90,45	50,13
NM_002208	ITGAE	integrina, alfa E (antígeno CD103, antígeno de linfócito mucosal humano 1; polipeptídeo alfa)		-3,33	93,57	50,38
NM_007049	BTN2A1	butirofilina, subfamília 2, membro A1		4	91,89	50,74
NM_003331	TYK2	tirosina cinase 2		-5,12	87,38	51,06
NM_001244		TNFSF8		-3,28	89,69	51,92

Tabela 3. Fatores hospedeiros de interação com HIV confirmados identificados através de avaliação com cDNA

Hit do Gene	No. de acesso	Símbolo	Hit original alfa.mfa ^a	Reconfirmação de vezes sobre controle ^b
Proteína alfa de transferência de fosfatidilinositol	NM_006224	PITPN α	2,77	2,95
Domínio de ligação extracelular contendo 1	NM_006691	XLKD1	2,60	2,7
Motivo <i>tripartite</i> - contendo 28	NM_005762	TRIM28	2,67	5,8
Lisozima	NM_000239	LYZ	2,67	8,6
Proteína induzida por interferon com repetições de tetratricopeptídeo 1	NM_001548	IFIT1	4,90	3,5
Coronina, proteína de ligação de actina, 1 ^a	NM_007074	CORO1A	2,90	2,92
Clone PP902	AF218032		2,47	2,4
Proteína DnaJC14	NM_032364		5,70	5,5
Família aldeído desidrogenase 3, membro A1	NM_000691	ALDH3A1	2,07	1,70
Domínio SET – contendo proteína 8	AY102937	SET8	2,13	2,2
Proteína cinase ativada por mitógeno cinase cinase 11	NM_002419	MAP3K11, MLK3	4,60	8,80
Produto de gene KIAA0247	NM_014734		3,90	2,01
Fosfatase de especificidade dupla	NM_038481	DUSP18	2,99	2,10

^aAtivação de vezes média (afa) dividida pelo desvio-padrão ajustado da ativação de vezes (mfa), que é responsável por ambos o efeito de cada cDNA e o desvio entre as réplicas.

^bControle negativo Sport6gfp, mesmo usado em avaliação.

Exemplo 4. Fatores hospedeiros de interação com HIV identificados por avaliação de dois híbridos de levedura

Uma avaliação de dois híbridos foi realizada para identificar novos fatores de célula hospedeira de interação codificados em uma biblioteca de cDNA de leucócito humana. Ensaios de interação de proteína-proteína em levedura foram feitos com proteínas de fusão GAL4 e LexA. cDNA de Vpr foi amplificado através de PCR usando iniciadores específicos de Vpr. O cDNA foi inserido no vetor de expressão de LexA DBD pSLANS. pSLANS é uma versão modificada de pBTM116 (Bartel e outros, *Biotechniques*, 14:920-924, 1993). Ele foi modificado para aceitar insertos NotI e pôr gly4-ser-gly4-ser- entre LexA e a isca. O cDNA codificando a proteína de fusão LexA DBD - Vpr foi transformado em linhagem de levedura L40 MATa. Os cDNAs codifi-

cando as proteínas de fusão Gal4 AD – leucócito de DNA foram transformados na linhagem de levedura 540 MAT α . As duas linhagens de levedura foram emparelhadas e transformantes contendo ambos plasmídeos foram selecionados em meios sintéticos deficientes em THUKL, e interações de proteína foram analisadas através de um ensaio de filtro de β -galactosidase.

Aproximadamente dois milhões de transformantes diplóides foram avaliados e vários candidatos positivos foram isolados. Colônias positivas foram ensaiadas quanto à atividade de β -galactosidase usando um ensaio de "filter lift" para confirmação adicional da interação proteína-proteína.

Os *hits* de avaliação, conforme listado na Tabela 4, foram identificados através de sequenciamento dos clones de cDNA candidatos e comparação com o banco de dados Genbank.

Tabela 4. Fatores hospedeiros de interação com HIV identificados através de avaliação de dois híbridos

No. de Acesso	Nome do Gene	Descrição
AK026228.1	FLJ22575	cDNA de <i>Homo sapiens</i> : FLJ22575 fis, clone HSI02453, altamente similar a mRNA de antígeno NY-REN-34 de proteína dedo de zinco putativa de <i>Homo sapiens</i> AF155105
AC002299.1	HS Chrom 16 Clone Bac	Cromossomo de <i>Homo sapiens</i> 16 clone BAC CIT987-SIKA-113A6 ~sequência genômica completa
AB033001	KIAA1175	mRNA de <i>Homo sapiens</i> para proteína KIAA1175, cds parcial
NM_002211	ITGB1	Integrina de <i>Homo sapiens</i> , beta 1 (receptor de fibronectina, polipeptídeo beta, antígeno CD29 inclui MDF2, MSK12) (ITGB1), variante de transcrito 1A
AF223391.1	CACNA1E	Gene de subunidade 1E alfa de canal de cálcio de <i>Homo sapiens</i> (CACNA1E), exons 7-49, e cds parcial, alternativamente unidos
NM_001456	FLNA	Filamina A de <i>Homo sapiens</i> , alfa (proteína de ligação de actina 280)
NM_003775.1	EDG6	Receptor acoplado à proteína G 6, de diferenciação endotelial de <i>Homo sapiens</i> (EDG6)
AL390127.1	DKFZp761p06121	mRNA de <i>Homo sapiens</i> ; cDNA DKFZp761P06121 (do clone DKFZp761P06121)
NM_016142.1	HSD17B12	Hidroxiesteróide (17-beta) desidrogenase 12 de <i>Homo sapiens</i> (HSD17B12)
M27288.1	Oncostatina M,	Gene M de oncostatina humana, exon 3

NM_004247.1	EFTUD2	Domínio de ligação Tu GTP de fator de alongamento de <i>Homo sapiens</i> contendo 2 (EFTUD2)
NM31951.1	PRF1	Gene de perforina humano (PRF1), cds completo
NM_012227.1	GTPBP6	Proteína de ligação de GTP de <i>Homo sapiens</i> 6 (putativa) (GTPBP6)

É compreendido que os exemplos e modalidades descritos aqui são para propósitos ilustrativos apenas e que várias modificações ou mudanças à sua luz serão sugeridas às pessoas versadas na técnica e devem ser incluídas no espírito e escopo do presente pedido e escopo das reivindicações apenas. Embora quaisquer métodos e materiais similares ou equivalentes àqueles descritos aqui possam ser usados na prática ou teste da presente invenção, os métodos e materiais preferidos são descritos.

Todas as publicações, seqüências de GenBank, depósitos ATCC, patentes e pedidos de patente citados aqui são aqui expressando incorporados a título de referência em sua totalidade e para todos os propósitos como se cada um fosse individualmente denotado.

REIVINDICAÇÕES

1. Método para identificação de um agente que inibe infecção por HIV, caracterizado pelo fato de que compreende:

- 5 (a) avaliação de compostos de teste para identificar um ou mais compostos de modulação que sub-regulem uma atividade biológica ou nível de expressão de um fator hospedeiro de interação com HIV codificado por um polinucleotídeo selecionado dos membros listados nas Tabela 2-4; e
- 10 (b) teste dos compostos de modulação quanto à habilidade em inibir infecção por HIV.

2. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o fator hospedeiro de interação com HIV é selecionado do grupo consistindo em repetições de tetratricopeptídeo 1 (FIT1), proteína alfa de transferência de fosfatidilinositol (PITPN α) e cinase de linhagem mista 3 (MLK3).

15

3. Método de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que o fator hospedeiro de interação com HIV é MLK3 e os compostos de teste são avaliados quanto à habilidade em inibir a atividade de cinase de MLK3 ou sua expressão.

20 4. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a habilidade em inibir infecção por HIV pelos compostos de modulação é examinada através de monitoramento da expressão de um gene-repórter sob o controle de promotor LTR de HIV em uma célula infectada por HIV.

25 5. Método de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de que a célula é HeLa-CD4- β gal.

6. Método de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de que o gene-repórter é um gene de beta-galactosidase.

30 7. Método de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de que a célula é infectada por HIV-IIIb.

8. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a habilidade em inibir infecção por HIV-1 por um composto de

modulação é examinada comparando a replicação de HIV em uma célula permissiva a HIV engenheirada que foi contatada com o composto de modulação com replicação de HIV em uma célula controle que não foi contatada com o composto.

5 9. Método de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo fato de que a célula permissiva a HIV é célula de HIV HeLa-T4-βGal.

10 10. Método de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo fato de que a replicação de HIV é monitorada através de um ensaio ELISA de antígeno p24 ou um ensaio de atividade de transcriptase reversa.

11 11. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a habilidade em inibir infecção por HIV pelo composto é examinada através de comparação de produção de pseudovírus em uma célula hospedeira tratada com o composto com produção de pseudovírus em uma célula hospedeira controle que não foi tratada com o composto.

12 12. Método de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que a célula hospedeira é célula HEK 293T.

13 13. Método de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que a célula hospedeira é transfectada com plasmídeos de pseudovírus que produzem pseudovírus de HIV na célula.

14 14. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o fator hospedeiro de interação com HIV é uma enzima e a atividade biológica ensaiada é sua atividade enzimática.

15 15. Método de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo fato de que a enzima é uma cinase.

16 16. Método de acordo com a reivindicação 15, caracterizado pelo fato de que a cinase é MLK3.

17 17. Composição farmacêutica para inibição de infecção por HIV em um indivíduo, caracterizada pelo fato de que compreende pelo menos um composto que inibe uma atividade biológica ou expressão de um fator hospedeiro de interação com HIV codificado por um polinucleotídeo selecionado dos membros listados nas Tabelas 2 a 4, em combinação com um ou mais veículos farmacêuticamente aceitáveis.

18. Uso de uma quantidade eficaz de um composto que inibe uma atividade biológica ou expressão de um fator hospedeiro de interação com HIV codificado por um polinucleotídeo selecionado dos membros listados nas Tabelas 2 a 4, caracterizado pelo fato de que é para a fabricação de uma composição farmacêutica para inibição de infecção por HIV em um indivíduo.

19. Uso de acordo com a reivindicação 18, caracterizado pelo fato de que o fator hospedeiro de interação com HIV é selecionado do grupo consistindo em repetições de tetratricopeptídeo 1 (IFIT1), proteína alfa de transferência de fosfatidilinositol (PITPN α) e cinase de linhagem mista 3 (MLK3).

20. Uso de acordo com a reivindicação 18, caracterizado pelo fato de que o fator hospedeiro de interação com HIV é MLK3 e o composto inibe a atividade de cinase de MLK1.

21. Uso de acordo com a reivindicação 18, caracterizado pelo fato de que o composto é K252a ou CEP1347.

Recebido

RESUMO

Patente de Invenção: **"MÉTODO PARA IDENTIFICAÇÃO DE UM AGENTE QUE INIBE INFECÇÃO POR HIV, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA PARA INIBIÇÃO DE INFECÇÃO POR HIV EM UM INDIVÍDUO, BEM COMO USO**
5 **DO REFERIDO AGENTE"**.

A presente invenção refere-se a novos fatores hospedeiros de interação com HIV. A invenção também provê métodos de uso dos fatores hospedeiros de interação com HIV para avaliar compostos que inibem infecção por HIV. Os métodos compreendem primeiro avaliação de compostos de
10 teste para moduladores de um fator hospedeiro de interação com HIV descrito aqui e então avaliação adicional dos compostos de modulação identificados quanto à habilidade em inibir infecção por HIV. A invenção provê ainda métodos e composições farmacêuticas para tratamento de doenças e condições associadas com infecção por HIV.