



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 284 893**

51 Int. Cl.:
C12Q 1/70 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **02750730 .0**

86 Fecha de presentación : **26.07.2002**

87 Número de publicación de la solicitud: **1415006**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **06.05.2004**

54 Título: **Ensayo para identificar inhibidores de la dimerización de la RT del VIH.**

30 Prioridad: **27.07.2001 US 307883 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.11.2007

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

73 Titular/es:
BOEHRINGER INGELHEIM (CANADA) Ltd.
2100 Cunard Street
Laval, Québec, H7S 2G5, CA

72 Inventor/es: **Sluis-Cremer, Nicolas;**
Parniak, Michael y
Pelletier, Alex

74 Agente: **Isern Jara, Jorge**

ES 2 284 893 T3

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

DESCRIPCIÓN

Ensayo para identificar inhibidores de la dimerización de la RT del VIH.

5 **Ámbito de la invención**

La presente invención se refiere a un nuevo ensayo para medir el proceso de dimerización de la transcriptasa inversa (RT) del VIH-1. Esta invención se refiere en particular a un nuevo método, idóneo para la adaptación a la exploración de alta productividad de inhibidores de este proceso.

10 **Antecedentes de la invención**

La transcriptasa inversa (RT) del virus de la inmunodeficiencia humana del tipo 1 (VIH-1) desempeña un papel clave en la replicación del VIH convirtiendo el RNA genómico de hebra simple en DNA provirico de doble hebra y constituye una de las principales dianas del desarrollo de la terapia del SIDA.

La mayor parte de inhibidores de la RT descritos en años pasados, ya sean inhibidores análogos de nucleósidos o no nucleósidos, están dirigidos contra la actividad de polimerasa de la RT, pero presentan algunas limitaciones, incluida la toxicidad y la aparición de cepas resistentes.

La forma activa y biológicamente relevante de la RT del VIH encontrada en viriones infecciosos es un heterodímero que contiene dos polipéptidos, el p66 y el p51; el último se deriva del primero por rotura proteolítica de su dominio del extremo C durante la maduración vírica. Las dos subunidades de forma de 66 y 51 kDa están presentes en una proporción de 1 a 1. Esta RT heterodímera se produce en una proceso de dimerización de dos pasos, la cinética implica una asociación rápida de las dos subunidades en un dímero inmaduro, seguida de un cambio conformacional lento, que da lugar a la forma totalmente activa ($p66 + p51 \rightarrow p66/p51$ inmaduro $\rightarrow p66/p51$ activo; Divita y col., J. Mol. Biol. 245, 508-52112, 13, 1995).

Las actividades de la DNA-polimerasa y de la RNasa-H de la RT del VIH-1 dependen de la estructura dímera de la enzima (Restle y col., J. Biol. Chem. 265, 8986-8988, 1990; Restle y col., FEBS Letters 300, 97-100, 1992). Debido a que se requiere la dimerización de estas subunidades para la actividad enzimática, la interferencia en la dimerización de la RT del VIH-1 podría constituir un objetivo apropiado para el desarrollo de compuestos anti-VIH. En el caso que nos ocupa: los péptidos sintéticos del dominio recortado de la subunidad p51 inhiben el proceso de "maduración" (Morris y col., Biochemistry 38, 15097-15103, 1999). Los compuestos que interfieren en la formación y/o estabilidad del dímero de RT pueden, por tanto, representar un nuevo grupo de compuestos antivíricos.

En diversas publicaciones se describen ensayos de asociación-disociación para medir la cinética del proceso de dimerización del p51-p66 (Cabodevilla y col., Eur. J. Biochem. 268, 1163-1172, 2001; Morris y col., J. Biol. Chem. 274 (35), 24941-24946, 1999; Divita y col., Biochemistry 34, 16337-16346, 1995; Divita y col., J. Biol. Chem. 269 (18), 13080-13083, 1994; Divita y col., FEBS Letters 324 (2), 153-158, 1993; Becerra y col., Biochemistry 30, 11707-11719, 1991). En todos ellos se realiza la medición de la dimerización: por HPLC de exclusión de tamaño; por medición de la actividad de polimerasa del DNA dependiente del RNA de la muestra; por inmunoprecipitación; o por seguimiento de la emisión de fluorescencia intrínseca de la proteína. En ninguno de estas publicaciones se describe un ensayo de fijación idóneo para el formato HTS.

Tachedjian y col. (PNAS 97 (12), 6334-6339, 2000) describen un sistema híbrido de 2 levaduras para estudiar el proceso de asociación-disociación de la dimerización de la RT. Sin embargo, este ensayo no se puede adaptar fácilmente a un ensayo de gran productividad para evaluar los inhibidores potenciales en gran número.

Howard y col., J. Biol. Chem. 266 (34), 23003-23009, 1991, sugieren un sistema de ensayo para evaluar los agentes terapéuticos que actúan para prevenir la formación del dímero. Tampoco en esta publicación se describe un ensayo de fijación que pueda aplicarse a la exploración de gran productividad, idónea para la identificación de los potenciales inhibidores de la heterodimerización.

55 **Resumen de la invención**

La presente invención proporciona un ensayo de alta productividad, idóneo para evaluar la actividad de un gran número de compuestos contra la dimerización de la RT del VIH.

El principio general del ensayo de la presente invención incluye la disociación de un homodímero p66/p66 de la RT (marcado de modo apropiado con un resto detectable y/o un marcador de afinidad) en presencia de concentraciones limitantes de un agente de disociación (es decir, un desnaturizador, por ejemplo la urea), su puesta en contacto con la subunidad p51 de la RT y la incubación de la mezcla en presencia de un exceso de tampón libre de desnaturizador (o de concentración reducida de desnaturizador), para permitir la reasociación de las subunidades de la RT, con la consiguiente captura de afinidad de cualquier heterodímero p51/p66 reconstituido de la RT. Después del lavado para eliminar el material no fijado se evalúa la cantidad del material asociado por afinidad midiendo el nivel de un resto detectable (o como alternativa midiendo la actividad de polimerasa de la RT reconstituida, en cuyo

ES 2 284 893 T3

caso la subunidad p66 no necesariamente requiere un marcado), que es proporcional a la cantidad del heterodímero marcado p66/p51 de la RT que se haya fijado por afinidad. Este ensayo se efectúa en presencia o ausencia de un compuesto de la invención; la modulación (incremento/disminución) de la fijación de la subunidad de monómero p66 a la subunidad p51 en presencia del compuesto de ensayo se compara con el control y el resultado es un indicativo de que el compuesto de ensayo en cuestión es un modulador de la dimerización de la RT.

En un primer aspecto de la presente invención se proporciona un método para medir la heterodimerización de la RT del VIH, que consta de los pasos de:

a) proporcionar una primera solución que contiene homodímeros de la subunidad p66 en presencia de un agente de disociación;

b) poner en contacto dicha primera solución con las subunidades p51 de la RT e incubarlas en presencia de un tampón de reasociación para permitir la asociación de un complejo de las subunidades p66/p51 de la RT, una de dichas subunidades contiene un marcador de afinidad y la otra subunidad contiene un marcador detectable;

c) poner en contacto el material incubado del paso b) con un medio de afinidad en condiciones que permitan que el complejo p66/p51 se fije a dicho medio de afinidad; y

d) determinar la cantidad de complejo formado midiendo el nivel de marcador detectable fijado al medio de afinidad (o midiendo la actividad de polimerasa de la RT reconstituida).

En un segundo aspecto de la presente invención se proporciona un método para identificar compuestos de modular la heterodimerización de la RT del VIH, que consiste en:

llevar a cabo los pasos de a) a d) recién descritos en presencia o ausencia de un compuesto de ensayo; y

comparar la muestra con el compuesto de ensayo y una muestra de control, que no contiene dicho compuesto, la formación modulada del complejo p66/p51 en la muestra con el compuesto de ensayo es un indicativo de la capacidad de dicho compuesto para modular la heterodimerización.

En un tercer aspecto de la presente invención se proporciona un método para identificar compuestos capaces de interferir en la heterodimerización de la RT del VIH, que consiste en:

llevar a cabo los pasos de a) a d) descritos antes en presencia o ausencia de un compuesto de ensayo; y

e) comparar la muestra con el compuesto de ensayo y una muestra de control que carece de dicho compuesto, una menor formación del complejo p66/p51 en la muestra con el compuesto de ensayo es un indicativo de la capacidad de dicho compuesto para inhibir la heterodimerización.

En un cuarto aspecto de la presente invención se proporciona un método para identificar compuestos capaces de ampliar la heterodimerización de la RT del VIH, que consiste en:

efectuar los pasos de a) a d) descritos anteriormente en presencia o ausencia de un compuesto de ensayo; y

e) comparar la muestra con el compuesto de ensayo y una muestra de control que carece de dicho compuesto, una mayor formación del complejo p66/p51 en la muestra con el compuesto de ensayo es un indicativo de la capacidad de dicho compuesto para aumentar la heterodimerización.

Según un quinto aspecto de la presente invención se proporciona un método para medir la homodimerización de la RT del VIH, que consiste en los pasos de:

a) proporcionar una primera solución que contiene unos primeros homodímeros de la subunidad p66 en presencia de un agente de disociación;

b) poner en contacto dicha primera solución con unos segundos dímeros de la subunidad p66, en presencia de dicho agente de disociación e incubarlas en presencia de un tampón de reasociación para permitir la asociación de un complejo de las subunidades p66/p66 de la RT, una de dichas subunidades contiene un marcador de afinidad y la otra subunidad contiene un marcador detectable;

c) poner en contacto el material incubado del paso b) con un medio de afinidad en condiciones que permitan que el complejo p66/p66 se fije a dicho medio de afinidad; y

d) determinar la cantidad de complejo formado, midiendo el nivel de marcador detectable fijado al medio de afinidad (o midiendo la actividad de polimerasa de la RT reconstituida).

En un sexto aspecto de la presente invención se proporciona un método para identificar compuestos capaces de modular la homodimerización de la RT del VIH, que consiste en:

llevar a cabo los pasos de a) a d) descritos antes en presencia o ausencia de un compuesto de ensayo; y

5 e) comparar la muestra con el compuesto ensayo y una muestra de control que carece de dicho compuesto, la formación modulada del complejo p66/p66 en la muestra con el compuesto de ensayo es un indicativo de la capacidad del compuesto de ensayo para modular la homodimerización.

En un séptimo aspecto de la presente invención se proporciona un método para identificar compuestos capaces de interferir en la homodimerización de la RT del VIH, que consiste en:

10 realizar los pasos de a) a d) descritos anteriormente en presencia o ausencia de un compuesto de ensayo; y

e) comparar la muestra con el compuesto de ensayo y una muestra de control que carece de dicho compuesto, una menor formación del complejo p66/p66 en la muestra con el compuesto de ensayo es un indicativo de la capacidad de dicho compuesto para inhibir la homodimerización.

15 En un octavo aspecto de la presente invención se proporciona un método para identificar compuestos capaces de ampliar la homodimerización de la RT del VIH, que consiste en:

20 llevar a cabo los pasos de a) a d) descritos antes en presencia o ausencia de un compuesto de ensayo; y

e) comparar la muestra con el compuesto de ensayo y una muestra de control que carece de dicho compuesto, una mayor formación del complejo p66/p66 en la muestra con el compuesto de ensayo es un indicativo de la capacidad de dicho compuesto para aumentar la homodimerización.

25 Según un noveno aspecto de la presente invención se proporciona un kit para ensayar compuestos potencialmente moduladores de la heterodimerización de la RT del VIH, dicho kit contiene una pluralidad de homodímeros de la subunidad p51 marcados por afinidad, una pluralidad de subunidades p51 marcadas de la RT, un agente de disociación, un tampón de reasociación y un medio de afinidad.

30 Según un décimo aspecto de la presente invención se proporciona un kit para ensayar compuestos potencialmente moduladores de la heterodimerización de la RT del VIH, dicho kit contiene una pluralidad de homodímeros de la subunidad p66 marcados por afinidad, una pluralidad de subunidades p66 marcadas de la RT, un agente de disociación, un tampón de reasociación y un medio de afinidad.

35 Con la lectura de la siguiente descripción no restrictiva de las formas de ejecución preferidas resultarán evidentes otros objetos, ventajas y características de la presente invención con referencia a las figuras adjuntas, que son ilustrativas no deberían considerarse como limitadoras del alcance de la invención.

40 Breve descripción de las figuras

Después de haber descrito la invención de modo general ahora se hace referencia a las figuras que acompañan, presentando a título ilustrativo una forma preferida de ejecución de las mismas, en la que:

45 En la figura 1 se ilustra el efecto de la concentración de la urea en la estructura de la proteína p66/p66 de la RT de la VIH-1. En el recuadro A se ilustra el cambio de la longitud máxima de emisión de fluorescencia intrínseca de la proteína en función de la concentración de urea. El aumento de la proporción F350/335 indica una mayor exposición los restos triptófano "ocultos" normalmente al disolvente acuoso. En el recuadro B se ilustran los análisis de dicroísmo circular. El aumento de la elipticidad molar a 222 nm es un indicado de la pérdida de la estructura secundaria de la RT. En el recuadro C se presenta el cambio de la fijación del ácido 8-anilino-1-naftaleno-sulfónico (ANS) sobre la RT, que 50 guarda relación con la integridad de la subunidad del dímero de la RT.

En la figura 2 se ilustra el estado de dimerización de la subunidad p66 en función de la concentración de urea determinada por cromatografía de exclusión de tamaños.

55 En la figura 3 se ilustra la optimización de la concentración de urea para uso en el ensayo de fluorescencia resuelta en el tiempo (TRF, time resolved fluorescence) para la formación del heterodímero p66/p51 de la RT del VIH-1.

60 En la figura 4 se ilustra la señal específica de la TRF en función del tiempo después de la dilución de la subunidad His6xp51 de la RT desnaturalizada con urea y de la subunidad p66 de la RT marcada con un quelato de Eu-N1-yodoacetamido en el tampón de "asociación de subunidades" que contiene $MgCl_2$ 100 mM. Los detalles se describen en los ejemplos.

En la figura 5 se ilustra el principio del ensayo (recuadro A) y la inhibición de la dimerización de la RT del VIH-1 por acción del TSAO- m^3T y otras NNRTI (recuadro B), como resultado de la determinación por TRF.

65

Descripción detallada de las formas preferidas de ejecución*Definiciones*

5 A menos que se definan de otra manera, todos los términos técnicos y científicos tienen el significado que los expertos en la materia les atribuyen habitualmente dentro del ámbito científico al que pertenece la presente invención.

10 Tal como se emplean aquí, los términos “marcador” o “marcador detectable” indican cualquier grupo que pueda estar unido al p66 o al p51 para permitir el reconocimiento ya sea directo o indirecto de la subunidad, de modo que puede detectarse, medirse y cuantificarse. Los ejemplos de tales “marcadores” incluyen, pero no se limitan a: marca-
dores fluorescentes, marcadores quimioluminiscentes, marcadores colorimétricos, marcadores enzimáticos, isótopos
radiactivos y marcadores de afinidad, por ejemplo la biotina. Tales marcadores se unen al p66 o al p51 por métodos
bien conocidos. Un marcador o los marcadores múltiples de la presente invención pueden introducirse en cualquier
posición del p66 o del p51, por ejemplo, el marcador puede situarse en el extremo C o N o dentro de la cadena principal
15 de la proteína.

El término “marcador de afinidad” tal como se emplea aquí indica un marcador que está incrustado o atrapado en un ligando complementario de afinidad. Los ejemplos de pares de marcador de afinidad/ligando de afinidad incluyen, pero no se limitan a: proteína de fijación de maltosa (MBP)/maltosa; S-transferasa de glutatona (GST)/glutatona; marcador de estreptavidina/estreptavidina o neutravidina o histidina (His)/metal. El metal que se utiliza como ligando de afinidad puede seleccionarse entre el grupo formado por: cobalto, cinc, cobre, hierro y níquel (Wong y col., Separation and Purification Methods 20 (1), 49-106, 1991). El marcador de afinidad de la presente invención puede introducirse en cualquier posición del p66 o del p51, por ejemplo, el marcador puede estar en el extremo C o en extremo N o dentro de la cadena principal de la proteína, pero con preferencia en el extremo N de dicha proteína. Con preferencia, el metal elegido es el níquel. El ligando de afinidad puede estar presente en la fase sólida, en forma de esferillas, de hoyos de microplaca o en columnas para facilitar la separación por cromatografía de afinidad. Tales marcadores de afinidad pueden introducirse por métodos recombinantes bien conocidos en el p66 o en el p51.

Los términos p66 “monómero” o “monomérico” o “subunidad monomérica” indica una sola subunidad de un p66 dímero. La subunidad monomérica puede ser una copia exacta de la subunidad monomérica de origen natural o puede ser un análogo biológicamente activo o un análogo biológicamente inactivo (dominante negativo).

35 Tal como se emplea aquí, el término “subunidad”, referido tanto a p66 como a p51, indica uno o dos constituyentes de la RT homodímera (p66/p66) o de la RT heterodímera (p66/p51).

Tal como se emplea aquí, el término “homodímero” indica una molécula dímera, en la que las dos subunidades son idénticas, por ejemplo el p66/p66.

40 Tal como se emplea aquí, el término “homodimerización” indica el proceso en el que se dimerizan subunidades iguales, por ejemplo la p66.

Tal como se emplea aquí, el término “heterodímero” indica una molécula dímera, en la que las dos subunidades constituyentes son diferentes, por ejemplo p66 y p51.

45 Tal como se emplea aquí, el término “heterodimerización” indica el proceso por el que se dimerizan dos subunidades diferentes, a saber, la p66 y la p51.

Tal como se emplea aquí, el término “agente disociación” indica una sustancia que es capaz de disociar un complejo multicomponente en las subunidades individuales que lo componen.

50 Tal como se emplea aquí, el término “tampón de reasociación” indica un tampón que favorece la asociación de las subunidades individuales en un complejo multicomponente.

55 Tal como se emplea aquí, el término “exento de desnaturizador” indica condiciones, en las que el agente de disociación ya no está presente en cantidades suficientes para impedir la asociación de la mayor parte de las subunidades.

Tal como se emplea aquí, el término “medio de afinidad” significa un soporte sólido, por ejemplo los hoyos de una microplaca, las esferillas o una columna, que están recubiertos con un ligando de afinidad que es idóneo para capturar un marcador de afinidad.

Formas preferidas de ejecución

60 En un primer aspecto preferido de la primera forma de ejecución se proporciona un método para medir la heterodimerización de la RT del VIH, en la que con preferencia la primera solución del paso a) consta de un tampón seleccionado entre Tris-HCl, HEPES o bis-Tris. Con mayor preferencia, el tampón es el Tris-HCl en una concentración comprendida entre 0 mM y 50 mM. Con mayor preferencia, el tampón es el Tris-HCl de una concentración de 25 mM.

ES 2 284 893 T3

Con preferencia, la primera solución de la etapa a) contiene además una sal elegida entre Na_2SO_4 y MgCl_2 . Con mayor preferencia, la sal es el MgCl_2 en una concentración comprendida entre 0 mM y 100 mM.

5 En un aspecto preferido de la primera forma de ejecución, en el paso a), el agente de disociación se elige entre la urea, el HCl de guanidinio y el acetonitrilo. Con mayor preferencia, el agente de disociación es la urea en una concentración comprendida entre 1 y 3,5 M.

10 Con preferencia, el tampón de reasociación del paso b) es el mismo tampón que se emplea para disociar las subunidades p66/p66, pero está con preferencia exento de desnaturizador. Con mayor preferencia, el tampón de reasociación está presente en un exceso con respecto al tampón desnaturizador para diluir el agente de disociación de modo suficiente para permitir la reasociación de las subunidades p66 y p51. Con preferencia especial, el tampón de reasociación buffer se añade en un exceso de 10 veces con respecto al tampón de disociación.

15 Con preferencia, el tampón de reasociación del paso b) contiene además una sal elegida entre Na_2SO_4 y MgCl_2 . Con preferencia especial, la sal Na_2SO_4 está presente en una concentración de 0 mM a 100 mM. Con preferencia especial, la sal Na_2SO_4 está presente en una concentración de 50 mM.

20 Con preferencia el p51 del paso b) es un marcador de afinidad o un marcador detectable. Con preferencia especial el p51 del paso b) es un marcador de afinidad.

Con preferencia, el p66 del paso b) tiene un marcador detectable o un marcador de afinidad. Con mayor preferencia, el p66 del paso b) tiene un marcador detectable.

25 Con preferencia, el marcador de afinidad del paso b) se elige entre el grupo formado por: un marcador de hexahistidina, el FLAG, el T7, el HA, la GST y la biotina. Con mayor preferencia, el marcador de afinidad es la hexahistidina.

30 En otro aspecto preferido de la primera forma de ejecución del paso b), el marcador detectable se elige entre el grupo formado por: un marcador fluorescente (por ejemplo la fluoresceína, el verde Oregón, la rodamina, el rojo Texas, la ficoeritrina o el Eu^{3+}), un átomo radiactivo (por ejemplo el H^3 o el I^{125}), un marcador quimioluminiscente (por ejemplo la luciferasa), un anticuerpo detectable específico del p66 o específico de un marcador fijado sobre el p66 (con preferencia, el marcador del p66 se elige entre el grupo formado por: un marcador de hexahistidina, el FLAG, el T7, el HA, la GST y la biotina) y un marcador enzimático (por ejemplo la β -galactosidasa o la peroxidasa de rábano rústico). Con mayor preferencia, el marcador es un marcador fluorescente elegido entre el grupo formado por: la fluoresceína, el verde Oregón, la rodamina, el rojo Texas, la ficoeritrina y el Eu^{3+} . Con mayor preferencia, el marcador fluorescente es el Eu^{3+} .

Con preferencia, el marcador detectable del paso b) se añade a un resto cisteína que se introduce por métodos recombinantes en lugar de un resto prolina del extremo N del p66.

40 Se mide el marcador detectable con medios apropiados, por ejemplo un fluorímetro, un contador de radiactividad, un colorímetro o un quimioluminómetro, como los expertos en la materia podrán apreciar con facilidad.

45 En otro aspecto preferido de la primera forma de ejecución del paso c), el medio de afinidad es una fase sólida, por ejemplo las hoyos de una microplaca o las esferillas recubiertas con un ligando de afinidad que sea idóneo para capturar un marcador de afinidad. Con mayor preferencia, los hoyos de la microplaca están recubiertos con un receptor elegido entre el grupo formado por: Ni^{2+} , anticuerpos anti-marcador, glutatona o estreptavidina. Con preferencia especial, los hoyos de microplaca están recubiertos con Ni^{2+} y con preferencia el marcador de afinidad es un marcador de histidina. Los expertos en la materia sabrán reconocer la combinaciones idóneas de marcador de afinidad y de ligando de afinidad.

50 En un aspecto preferido de la primera forma de ejecución, el paso d) consta además de un paso de lavado para eliminar el material no fijado, la cantidad del marcador asociado al medio de afinidad se mide de un modo adecuado (o se mide la actividad de polimerasa de la RT reconstituida), dicho material fijado a dicho medio de afinidad es proporcionar a la cantidad del heterodímero p51/p66 de la RT marcada.

55 Los expertos en la materia advertirán con facilidad que la sucesión de acontecimientos en el ensayo que conducen a la incubación de los monómeros p66 y p51 pueden modificarse sin alterar el resultado. Por ejemplo: puede inmovilizarse la subunidad p51 de la RT sobre una fase sólida antes de su incubación con la subunidad p66. De modo similar, la dilución del tampón que favorece la asociación de las subunidades puede efectuarse al mismo tiempo que se mezclan las subunidades p66 y p51 o bien después de que la solución del p66 se haya puesto en contacto con el p51.

60 De manera similar, la puesta en contacto del compuesto de ensayo puede efectuarse en un orden diferente sin que afecte al principio del ensayo. Por ejemplo, puede añadirse el compuesto de ensayo a la solución del homodímero de p66 antes de añadir el agente de disociación; antes del mezclado con la subunidad p51; antes de la dilución con el tampón de reasociación; o al mismo tiempo que se realiza la dilución con el tampón de reasociación.

Ejemplos

Materiales y métodos

1. Plásmidos de expresión de la RT

Se clona el gen de la subunidad de 51 kDa de la RT del VIH-1 (cepa HXB2) en el sistema de expresión procariota pBAD HisB (Invitrogen) entre los sitios de restricción XhoI e HindIII, obteniéndose el pBAD-HisRT51. Este constructo permite la expresión inducible con arabinosa de la subunidad p51 de la RT en forma de proteína de fusión de polihistidina (6xHis) en el extremo N después de la transformación de una cepa bacteriana apropiada (p.ej., JM109 de *E. coli*).

Para conseguir el marcado específico de la subunidad de RT de 66 kDa con reactivos susceptibles de detección fluorimétrica, se efectúa una mutagénesis dirigida a un sitio empleando el kit llamado Quick Change Site-directed Mutagenesis Kit (Stratagene), obteniéndose la P2C/C38S/C280S-RT. En ella se han eliminado dos restos Cys de la RT WT (wild type) (C38, C280) y se ha insertado un solo resto Cys junto al extremo N de la subunidad.

Los genes del tipo salvaje (WT) y la subunidad P2C/C38S/C280S (SEQ ID NO. 1) de 66 kDa de la RT del VIH-1 se clonan en un vector procariota de expresión pKK223-3 (Amersham Pharmacia Biotech) entre los sitios de restricción EcoRI y HindIII, obteniéndose el pKK-RT66WT y el pKK-RT66-P2C, respectivamente. Estos vectores proporcionan una expresión dependiente de la IPTG de la subunidad de la RT de 66 kDa no marcada con HIS.

2. Reactivos para el ensayo TRF de la formación del dímero de la RT

Se adquieren a Perkin Elmer el quelato de Eu-N1-yodoacetamido Delfia y el patrón Eu³⁺, la solución llamada Delfia Enhancement solution y el concentrado de lavado Delfia.

Fluka suministra la urea ultrapura, el tris(hidroximetil)aminometano y el agua. Sigma suministra el cloruro magnésico (SigmaUltra) y el ácido dietilenotriamina-pentaacético (DTPA).

Las placas de 96 hoyos Ni-NTA HisSorb (blancas) se adquieren a Qiagen o a Pierce. Las mediciones de fluorescencia se realizan en un fluorímetro de microplaca del tipo SpectraMAX GeminiXS (Molecular Devices).

3. Expresión y purificación del monómero de la subunidad p51 de la RT y del homodímero p66/p66 de la RT

Se cultivan cepas JM109 de *E. coli* transformadas con pBAD-HisRT51 a 37°C en un caldo del tipo "Terrific broth" hasta una fase semilogarítmica (OD₆₀₀ de 0,5). La expresión del p51 de la RT se induce con la adición de arabinosa del 1%. Después de una incubación de 3 h se recogen las células por centrifugación y se lisan con un reactivo de extracción de proteínas llamado BugBuster™ (Novagen). Se purifica el p51 de RT del lisado por cromatografía de afinidad con Ni²⁺-NTA, empleando la resina His-Bind (Novagen). Tanto la lisis como la extracción se realizan con arreglo a las especificaciones del fabricante. Después de la elución a través de la resina Ni²⁺-NTA se cambia el p51 de RT al tampón Tris-HCl 50 mM (pH 7,5, 4°C) que contiene MgCl₂ 60 mM y glicerina del 50% mediante dos pasadas a través de la columna NAP™ 25 (Amersham Pharmacia Biotech). Se guarda la muestra de la proteína final dividida en partes alícuotas a -80°C. El p51 de la RT purificado existe de forma predominante como monómero.

La expresión del tipo salvaje (WT) y del mutante del p66 de la RT se induce por adición de 1 mM de IPTG a 1 l de fase semilogarítmica transformada apropiadamente de células de la cepa JP109 de *E. coli* (cultivadas en el caldo "Terrific broth" a 37°C). Después de la adición de IPTG se continúa el cultivo de las bacterias a 32°C durante 5 horas más. Se recogen las células por centrifugación. La purificación del p66 de la RT se efectúa del modo ya descrito (Fletcher y col., "Single paso purification of HIV-1 recombinant wild type and mutant reverse transcriptase" en: Protein Expression & Purification 7, 27-32, 1996). El p66 de la RT purificado existe de modo predominante como homodímero.

4. Alquilación del P2C/C38S/C280S-p66/p66 de la RT con el quelato de Eu³⁺-N1-yodoacetamido

Se concentra el P2C/C38S/C280S-p66/p66 de la RT purificado hasta aproximadamente 20 μM (aprox. 2,5 mg/ml) en un tampón 50 mM Tris-HCl (pH = 7,9 a 20°C) que contiene 100 mM NaCl y 1 mM TCEP-HCl (clorhidrato de la tris(2-carboxietil)fosfina (Pierce)) a temperatura ambiente. Se añade una parte alícuota del reactivo de modificación de proteína, el quelato de Eu-N1-yodoacetamido (preparado en forma de solución patrón 5 mM en DMSO), para obtener un exceso molar aproximadamente de 20 veces con respecto a la concentración de la subunidad p66. Se deja progresar la reacción de alquilación a temperatura ambiente durante 6 horas.

Como alternativa, la reacción puede llevarse a cabo a 4°C durante una noche. Una vez finalizada la reacción se añade un exceso de DTT para consumir el quelato de Eu-N1-yodoacetamido que no haya reaccionado. Se separa el p66/p66 de la RT alquilado del conjugado del reactivo DTT mediante dos pasadas a través de una columna NAP™ 25 equilibrada con un tampón 25 mM Tris-HCl (pH 7,5, 20°C) que contiene 60 mM MgCl₂ y glicerina del 50%. La estequiometría del marcador se sitúa por lo general entre 0,1 y 1 mol de Eu-N1-yodoacetamida por mol de la subunidad p66 de la RT (es decir, 1,5-2 moles por cada mol de homodímero p66/p66 de la RT).

La caracterización cinética del mutante y de las proteínas de RT modificadas químicamente indica que el P2C/C38S/C280S-p66/p66 de la RT posee una actividad específica de polimerasa de DNA dependiente del RNA (RDDP) similar a la de la enzima homodímero p66p66 de tipo salvaje (WT) (datos no presentados). El P2C/C38S/C280S-p66/p66 de la RT alquilado químicamente con el quelato de Eu-N1-yodoacetamido conserva aproximadamente un 80% de la actividad RDDP de la proteína sin modificar (tabla 1). Además, la RT modificada es igualmente sensible a la inhibición provocada por el TSAOe³T (tabla 2) que el mutante no modificado P2C/C38S/C280S-p66/p66, que a su vez tiene una sensibilidad igual a la del WT del p66/p66 de la RT (datos no presentados). Por tanto, las manipulaciones genéticas y químicas de la RT requeridas para preparar los reactivos del ensayo de dimerización parecen tener poco efecto en la respuesta de la enzima dentro de los parámetros de la norma de ensayo.

TABLA 1

Actividad de polimerasa de DNA dependiente de RNA (DDP) y actividad específica de polimerasa de DNA dependiente de RNA (DDDP) del P2C/C38S/C280S-p66/p66 de la RT

sustrato de polimerasa	% de actividad relativa del p66/p66 marcado con Eu ³⁺ con respecto al p66/p66 no marcado
Poly rC:dG	80
Poly rA:dT	77
Poly dC:dG	73

TABLA 2

Inhibición del P2C/C38S/C280S-p66/p66 de la RT por acción de los inhibidores de la RT del VIH

Inhibidor	IC ₅₀ (μM)	
	p66/p66 sin marcar	p66/p66 marcado con Eu ³⁺
Nevirapina	1	1
TSAOe3T	30	3

5. Ensayo de microplaca para el seguimiento de la dimerización del p66/p51 de la RT

El principio general del ensayo implica el mezclado del His6xp51 con el p66 de RT marcado con un fluoróforo en solución y la posterior captura en fase sólida del heterodímero His6xp51/p66 de RT marcado con fluoróforo en microplacas de Ni²⁺-NTA. Después del lavado para eliminar el material no fijado se mide la cantidad de fluorescencia asociada a la microplaca en un lector apropiado de fluorescencia en placas. Como alternativa, la actividad de polimerasa de la RT reconstituida puede determinar empleando un intercalador fluorescente de RNA/DNA, por ejemplo el PicoGreenTM.

Aunque el p51 recombinante purificado de la RT existe como monómero, el p66 de la RT purificado es predominantemente un dímero. Dado que la energía de asociación de subunidades del homodímero p66/p66 de la RT es inferior, aunque mínimamente, a la del heterodímero p51/p66 de la RT, la formación del heterodímero después de un simple mezclado del p51 y del p66/p66 de la RT será demasiado lenta para que pueda ser viable en un ensayo de gran productividad. Por consiguiente, se ha efectuado la búsqueda para determinar el tipo y la concentración óptimos de desnaturizador requerido para proporcionar la disociación del homodímero p66/p66 sin un efecto significativo en la estructura secundaria de la proteína. Se constata que, como desnaturizador, la urea es superior al cloruro de guanidinio. El efecto de la concentración de la urea en la disociación del p66/p66 y en la desnaturización de la proteína (cambio de la estructura secundaria de la proteína) se presenta en la figura 1. La optimización de la concentración de la urea para maximizar la señal de TRF en el sistema de ensayo de dimerización se representa en la figura 3.

Se ha encontrado que es óptima la urea de una concentración de 1 a 3,5 M, en base a una gran variedad de datos, incluidos los ilustrados en las figuras 1, 2 y 3. Existe un gran número de restos triptófano en la interfase de la subunidad de la RT del VIH-1; estos están esencialmente “ocultos” y por ello emiten fluorescencia en torno a 335 nm cuando la RT se excita con longitudes de onda comprendidas entre 280 y 295 nm. Tal como puede verse en la figura 1A, estos restos sufren una “exposición creciente al disolvente” a medida que aumentan las concentraciones de urea, tal como indica el desplazamiento del rojo en $\lambda_{\text{máx}}$ de emisión a 350 nm. Para una concentración 3,5 M de la urea, este desplazamiento del rojo se aproximadamente semimáximo. Sin embargo, al mismo tiempo esta concentración de urea apenas tiene efecto en la elipticidad molar de la RT (figura 1B), lo cual indica que la estructura secundaria de la proteína no puede alterarse de modo significativo (es decir, no tiene lugar una “desnaturalización” significativa de la proteína). Esto sugiere que una mayor exposición de los restos triptófano de la proteína al disolvente se deben primariamente a la disociación de las subunidades de la RT. los cambios en la fijación del ANS sobre la RT en función de la concentración de urea (figura 1C) son consistentes con esta interpretación.

En la figura 2 se representa el cambio en el estado de dimerización del p66/p66 de la RT en función de la urea, que se determina por cromatografía de exclusión de tamaño. En este caso la disociación del homodímero parece haberse completado para una concentración 2 M de urea y parece que tiene lugar la progresiva desnaturalización/agregación del monómero p66 cuando el pico se desplaza lentamente hacia pesos moleculares mayores a medida que aumentan las concentraciones de urea.

En la figura 3 se presenta la señal obtenida en el ensayo de reasociación de subunidades de RT resuelta en el tiempo, cuando se incuban el homodímero p66/p66 de la RT marcado y el monómero p51 marcado con His en concentraciones de urea entre 0 y 6 M, antes de la introducción de la mezcla en las microplacas recubiertas con níquel. Se elige por tanto la urea 1-3,5 M como intervalo de concentraciones capaces de proporciona el nivel más elevado de reasociación, con un efecto dañino mínimo sobre la estructura secundaria de la RT.

Los ensayos adiciones demuestran que el uso del Na_2SO_4 50 mM en lugar del MgCl_2 100 mM en el tampón de la desnaturalización aumenta significativamente la señal específica de la fluorescencia TRF con respecto a la base del ensayo (tabla 3).

TABLA 3

Proporción entre señal y ruido en el ensayo de dimerización de la RT en función de la composición de la sal tampón de la renaturalización

marcador del p66 de la RT	sal	señal/ruido
tetrametil-rodamina	100 mM MgCl_2	2,0
verde Oregón	100 mM MgCl_2	3,2
Eu-N1-yodoacetamida (TRF)	100 mM MgCl_2	6,5
Eu-N1-yodoacetamida (TRF)	50 mM Na_2SO_4	10,8

6. Actividad antivírica de los disruptores de subunidades de la RT y de los inhibidores de la asociación de subunidades de la RT

Norma de ensayo

El principio del ensayo se representa en la figura 5A. En un volumen total de 20 μl se mezclan 100 pmoles de la subunidad His6x-p51 purificada de la RT y 200 pmoles de la subunidad p66 de la RT marcada con el quelato Eu-N1-yodoacetamido (es decir, 100 pmoles del homodímero p66/p66 de la RT) con urea (preparada en 25 mM Tris-HCl, de pH 7,5, 20°C, que contiene 100 mM MgCl_2) para llegar a una concentración final de 3,5 M de urea. Se incuba esta mezcla a temperatura ambiente durante 1 h.

Se diluye esta solución en 200 μl de una solución 10 μM del compuesto de interés en Tris-HCl 25 mM, pH = 7,5, 20°C, que contiene 50 mM de Na_2SO_4) que se ha introducido en una placa Ni-NTA HiSorb de 96 hoyos.

El paso de dilución proporciona una dilución de 10 veces para reducir la concentración de urea de 3,5 M a 0,35 M, permitiendo de este modo la formación del heterodímero p66/p51 de la RT. Se deja progresar la formación del dímero durante 6 h, después se lavan las placas 3x con tampón de lavado Delfia que contiene 200 μM de DTPA. Después del lavado se añaden a cada hoyo 200 μl de la solución de ampliación Delfia y seguidamente se incuba a temperatura ambiente durante 30 minutos. Las mediciones de fluorescencia se realizan empleando un instrumento del

tipo SpectraMAX GeminiXS de la empresa Molecular Devices, utilizando como longitudes de onda de excitación, emisión corte de 335 nm, 615 nm y 530 nm, respectivamente. Utilizando este formato, el TSAOm³T disminuye la señal en el ensayo de la invención (figura 5B). El TSAOm³T es un miembro del grupo TSAO y se cree que inhibe la dimerización de la RT en un grado similar al TSAOe³T. Además, la nevirapina y el efavirenz son dos inhibidores no nucleósidos de la transcriptasa inversa, que no inhiben la enzima en su mecanismo de dimerización de la RT. De hecho, que estos dos inhibidores de la NNRT son mejoradores químicos de la dimerización de la RT del VIH-1 que provocan la inhibición de la actividad de polimerasa a través de cambios conformacionales nocivos (Tachedjian y col., PNAS, 7188-7193, 2001). En este formato concreto de ensayo, el % de señal con respecto al control que se representa en la figura 5B confirma la hipótesis y apoya la utilidad del presente ensayo para identificar inhibidores/mejoradores del proceso de dimerización de la RT del VIH.

Como alternativa puede medirse la actividad de polimerasa de p66/p51-transcriptasa inversa reconstituida. En este formato se introducen directamente los sustratos necesarios (molde, cebador, nucleótido, cloruro de magnesio) en un tampón apropiado (Tris, pH = 7,8, que contiene DTT, GSH y Chaps), después se realiza el paso de dimerización y se incuba durante 1 hora, después de lo cual se determina la cantidad de material polimerizado por adición de un intercalador RNA/DNA fluorescente. Un ejemplo es el siguiente: se incuba el homodímero p66/p66 (10-20 pmoles) en presencia de HIS-p51 (25-50 pmoles) en urea 1 M (preparada en 20 mM Tris-HCl, pH = 8,0, que contiene 250 mM NaCl) en un volumen final de 10 μ l durante 1 hora para permitir la disociación del homodímero. Entonces se realiza una dilución 5 veces de la inicial (volumen final = 50 μ l) en tampón de reasociación (50 mM Tris-acetato, pH = 8,0, 500 mM NaCl, 0,05% Tween-20, 0,01% BSA) con un compuesto de ensayo en el tampón de asociación, durante 1-2 horas para permitir la formación del heterodímero por reducción de la concentración de urea a 200 mM. El paso final consiste en la captura de los heterodímeros marcados con His y reconstituidos por transferencia de la muestra a los hoyos recubiertos con níquel de una placa, que contiene 100 μ l de tampón de reasociación y en la incubación durante 1 hora. Después de 3 ciclos de lavado se añade un cóctel de ensayo de polimerasa y se deja progresar la reacción a 37°C durante 1-2 horas, seguidamente se detectan los productos RNA/DNA prolongados con el intercalador fluorescente PicoGreenTM.

7. Formato alternativo de ensayo

La forma biológicamente relevante y activa de la RT del VIH hallada en viriones infecciosos es un heterodímero que contiene dos polipéptidos, el p66 y el p51; el último se deriva del primero por rotura proteolítica de su dominio del extremo C por acción de la proteasa del VIH durante la maduración vírica. Las dos subunidades de 66 y 51 kDa están presentes en una proporción de 1 a 1. Se cree que esta RT heterodímera se produce en un proceso de dimerización de dos pasos, cuya cinética implica la asociación rápida de las subunidades p66 y p51 en un dímero inmaduro, después tiene lugar un cambio conformacional lento que da lugar a la forma plenamente activa (p66 + p51 $\rightarrow$ p66/p51 inmaduro $\rightarrow$ p66/p51 activo; Divita y col., J. Mol. Biol. 245, 508-52112, 13, 1995).

Sin embargo, los estudios más recientes han sugerido también un mecanismo alternativo para la formación de la RT, que implica en primer lugar la homodimerización de las subunidades p66 para formar el homodímero p66/p66, después de lo cual la rotura realizada por la proteasa del VIH se traduciría en la aparición del heterodímero p66/p51 (presentación oral, Retrovirus 2001, Cold Spring Harbor, NY, 26 de mayo de 2001). Actualmente todavía no está claro cuál de los mecanismos prevalece durante la replicación vírica y los ensayos de exploración diseñados para probar cada uno de los mecanismos individuales puede dar pie a nuevas estrategias terapéuticas. Es, pues, otro aspecto de esta invención el probar que los compuestos pueden interferir potencialmente en la homodimerización de las subunidades p66.

REIVINDICACIONES

1. Un método para medir la heterodimerización de la RT del VIH, que consiste en los pasos de:

a) proporcionar una primera solución que contiene homodímeros de la subunidad p66 en presencia de un agente de disociación;

b) poner en contacto dicha primera solución con las subunidades p51 de la RT e incubarlas en presencia de un tampón de reasociación para permitir la asociación de un complejo de las subunidades p66/p51 de la RT, una de dichas subunidades contiene un marcador de afinidad y la otra subunidad contiene un marcador detectable;

c) poner en contacto el material incubado del paso b) con un medio de afinidad en condiciones que permitan que el complejo p66/p51 se fije a dicho medio de afinidad; y

d) determinar la cantidad de complejo formado midiendo el nivel de marcador detectable fijado al medio de afinidad.

2. El método según la reivindicación 1, en el que en el paso d) dicha cantidad de complejo se determina midiendo la actividad de polimerasa de dicho complejo de RT reconstituida.

3. El método según la reivindicación 1, en el que la primera solución del paso a) contiene un tampón elegido entre Tris-HCl, HEPES y bis-Tris.

4. El método según la reivindicación 2, en el que el tampón es el Tris-HCl de una concentración comprendida entre 0 mM y 50 mM.

5. El método según la reivindicación 1, en el que la primera solución del paso a) contiene además una sal elegida entre el Na₂SO₄ y el MgCl₂.

6. El método según la reivindicación 5, en el que la sal es el MgCl₂ de una concentración entre 0 mM y 100 mM.

7. El método según la reivindicación 1, en el que en el paso a) se elige el agente de disociación entre la urea, el HCl de guanidinio y el acetonitrilo.

8. El método según la reivindicación 7, en el que el agente de disociación es la urea de una concentración comprendida entre 1 y 3,5 M.

9. El método según la reivindicación 1, en el que el tampón de reasociación del paso b) es el mismo tampón que se emplea para disociar las subunidades p66/p66 subunidades, dicho tampón de reasociación está libre de desnaturizador.

10. El método según la reivindicación 1, en el que el tampón de reasociación está presente en exceso con respecto al tampón desnaturizador para diluir el agente de disociación de modo suficiente para permitir la reasociación de la subunidades p66 y p51.

11. El método según la reivindicación 10, en el que el tampón de reasociación se añade en un exceso de 10 veces con respecto al tampón de disociación.

12. El método según la reivindicación 1, en el que el tampón de reasociación del paso b) contiene además una sal elegida entre el Na₂SO₄ y el MgCl₂.

13. El método según la reivindicación 12, en el que la sal es el Na₂SO₄ de una concentración entre 0 mM y 100 mM.

14. El método según la reivindicación 13, en el que la sal es el Na₂SO₄ de una concentración de 50 mM.

15. El método según la reivindicación 1, en el que el p51 del paso b) se marca con un marcador de afinidad o con un marcador detectable.

16. El método según la reivindicación 15, en el que el p51 del paso b) se marca con un marcador de afinidad.

17. El método según la reivindicación 1, en el que el p66 del paso b) tiene un marcador detectable o un marcador de afinidad.

18. El método según la reivindicación 17, en el que el p66 del paso b) tiene un marcador detectable.

ES 2 284 893 T3

19. El método según la reivindicación 15 ó 17, en el que el marcador de afinidad del paso b) se elige entre el grupo formado por: un marcador de hexa-histidina, el FLAG, el T7, el HA, la GST y la biotina.
20. El método según la reivindicación 19, en el que el marcado de afinidad es la hexa-histidina.
21. El método según la reivindicación 15 ó 17, en el que el marcador detectable se elige entre el grupo formado por: un marcador fluorescente, un átomo radiactivo, un marcador quimioluminiscente, un anticuerpo detectable específico del p66 o específico del marcador fijado sobre el p66 y un marcador enzimático.
22. El método según la reivindicación 21, en el que el marcador detectable es un marcador fluorescente que se elige entre el grupo formado por: la fluoresceína, el verde Oregon, la rodamina, el rojo Texas, la ficoeritrina y el Eu^{3+} .
23. El método según la reivindicación 22, en el que el marcador fluorescente es el Eu^{3+} .
24. El método según la reivindicación 1, en el que el marcador detectable del paso b) se añade a un resto cisteína que se introduce por métodos recombinantes en lugar de un resto prolina del extremo N del p66.
25. El método según la reivindicación 1, en el que el medio de afinidad del paso c) captura cualquier heterodímero p66/p51 marcado de la RT reconstituida.
26. El método según la reivindicación 1, en el que en el paso c) el medio de afinidad es una fase sólida recubierta con un receptor, que es idóneo para capturar el marcador de afinidad.
27. El método según la reivindicación 26, en el que la fase sólida se recubre con un receptor elegido entre el grupo formado por: Ni^{2+} , anticuerpos anti-marcador, glutatona y estreptavidina.
28. El método según la reivindicación 27, en el que la fase sólida está recubierta con Ni^{2+} .
29. El método según la reivindicación 26, en el que el marcador de afinidad es la histidina.
30. El método según la reivindicación 26, en el que la fase sólida es una microplaca.
31. El método según la reivindicación 1, en el que el paso d) consta además de un paso de lavado para eliminar el material no fijado, la cantidad del marcador asociado con el medio de afinidad se mide de una manera apropiada (o se mide la actividad de polimerasa de la RT reconstituida), el material fijado sobre dicho medio de afinidad es proporcional a la cantidad del heterodímero p51/p66 marcado de la RT.
32. Un método para identificar compuestos capaces de modular la heterodimerización de la RT del VIH, que consiste en efectuar los pasos de a) a d) según la reivindicación 1, en presencia o ausencia de un compuesto de ensayo; y e) comparar la muestra del compuesto de ensayo con la muestra de control que carece de dicho compuesto de ensayo, la formación modulada del complejo p66/p51 en la muestra que contiene el compuesto de ensayo es un indicativo de la capacidad de dicho compuesto para modular la heterodimerización.
33. Un método para identificar compuestos capaces de interferir en la heterodimerización de la RT del VIH, que consiste en efectuar los pasos de a) a d) según la reivindicación 1, en presencia o ausencia de un compuesto de ensayo; y e) comparar la muestra del compuesto de ensayo con la muestra de control que carece de dicho compuesto de ensayo, la disminución de la formación del complejo p66/p51 en la muestra que contiene el compuesto de ensayo es un indicativo de la capacidad de dicho compuesto para inhibir la heterodimerización.
34. Un método para identificar compuestos capaces de ampliar la heterodimerización de la RT del VIH, que consiste en efectuar los pasos de a) a d) según la reivindicación 1, en presencia o ausencia de un compuesto de ensayo; y e) comparar la muestra del compuesto de ensayo con la muestra de control que carece de dicho compuesto de ensayo, una mayor formación del complejo p66/p51 en la muestra que contiene el compuesto de ensayo es un indicativo de la capacidad de dicho compuesto para ampliar la heterodimerización.
35. Un método para medir la homodimerización de la RT del VIH, que consiste en los pasos de:
- a) proporcionar una primera solución que contiene unos primeros homodímeros de la subunidad p66 en presencia de un agente de disociación;
- b) poner en contacto dicha primera solución con unos segundos dímeros de la subunidad p66, en presencia de dicho agente de disociación e incubarla en presencia de un tampón de reasociación para permitir la asociación de un complejo de las subunidades p66/p66 de la RT, una de dichas subunidades contiene un marcador de afinidad y la otra subunidad contiene un marcador detectable;
- c) poner en contacto el material incubado del paso b) con un medio de afinidad en condiciones que permitan que el complejo p66/p66 se fije a dicho medio de afinidad; y

ES 2 284 893 T3

d) determinar la cantidad de complejo formado, midiendo el nivel de marcador detectable fijado al medio de afinidad (o midiendo la actividad de polimerasa de la RT reconstituida).

36. Un método para identificar compuestos capaces de modular la homodimerización de la RT del VIH, que consiste en: efectuar los pasos de a) a d) según la reivindicación 35, en presencia o ausencia de un compuesto de ensayo; y e) comparar la muestra del compuesto de ensayo con la muestra de control que carece de dicho compuesto de ensayo, la formación modulada del complejo p66/p66 en la muestra que contiene el compuesto de ensayo es un indicativo de la capacidad de dicho compuesto para modular la homodimerización.

37. Un método para identificar compuestos capaces de interferir en la homodimerización de la RT del VIH, que consiste en: efectuar los pasos de a) a d) según la reivindicación 35, en presencia o ausencia de un compuesto de ensayo; y e) comparar la muestra del compuesto de ensayo con la muestra de control que carece de dicho compuesto de ensayo, una menor formación del complejo p66/p66 en la muestra que contiene el compuesto de ensayo es un indicativo de la capacidad de dicho compuesto para inhibir la homodimerización.

38. Un método para identificar compuestos capaces de ampliar la homodimerización de la RT del VIH, que consiste en: efectuar los pasos de a) a d) según la reivindicación 35, en presencia o ausencia de un compuesto de ensayo; y e) comparar la muestra del compuesto de ensayo con la muestra de control que carece de dicho compuesto de ensayo, una mayor formación del complejo p66/p66 en la muestra que contiene el compuesto de ensayo es un indicativo de la capacidad de dicho compuesto de ampliar la homodimerización.

39. Un kit para ensayar compuestos potencialmente moduladores de la heterodimerización de la RT del VIH, dicho kit contiene una pluralidad de homodímeros de la subunidad p66 marcados con marcadores de afinidad, una pluralidad de subunidades p51 de la RT marcadas, un agente de disociación, un tampón de reasociación y un medio de afinidad.

40. Un kit para ensayar compuestos potencialmente moduladores de la homodimerización de la RT del VIH, dicho kit contiene una pluralidad de homodímeros de la subunidad p66 marcados con marcadores de afinidad, una pluralidad de subunidades p66 de la RT marcadas, un agente de disociación, un tampón de reasociación y un medio de afinidad.

FIGURA 1

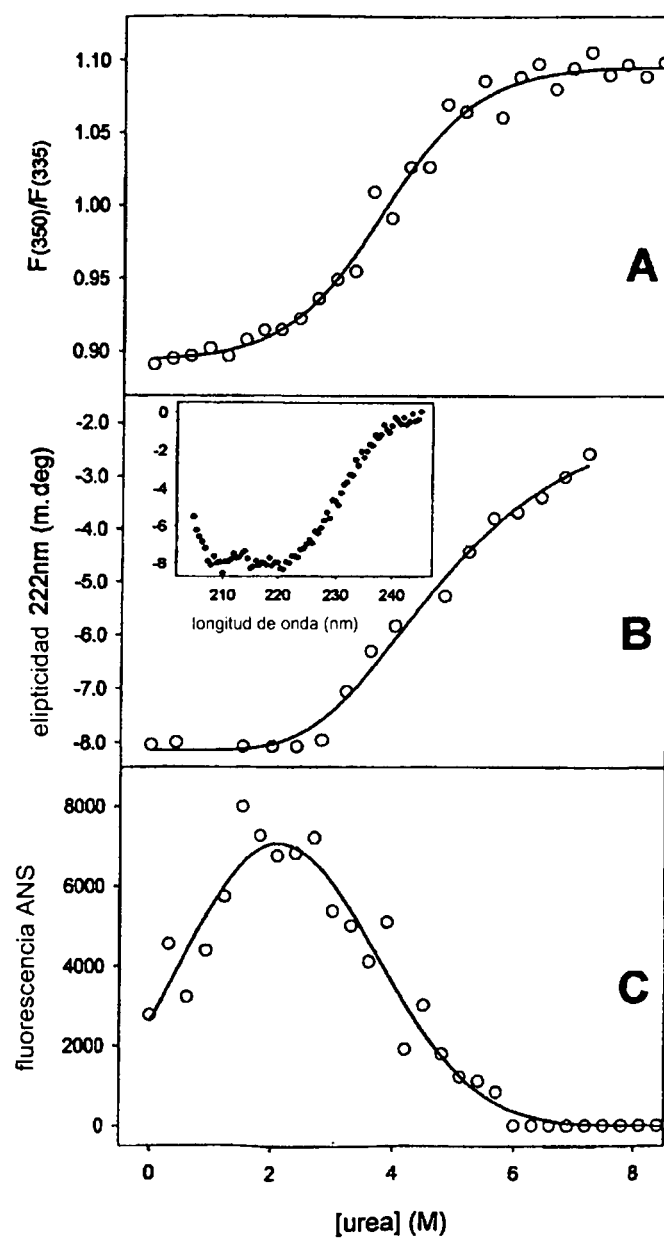


FIGURA 2

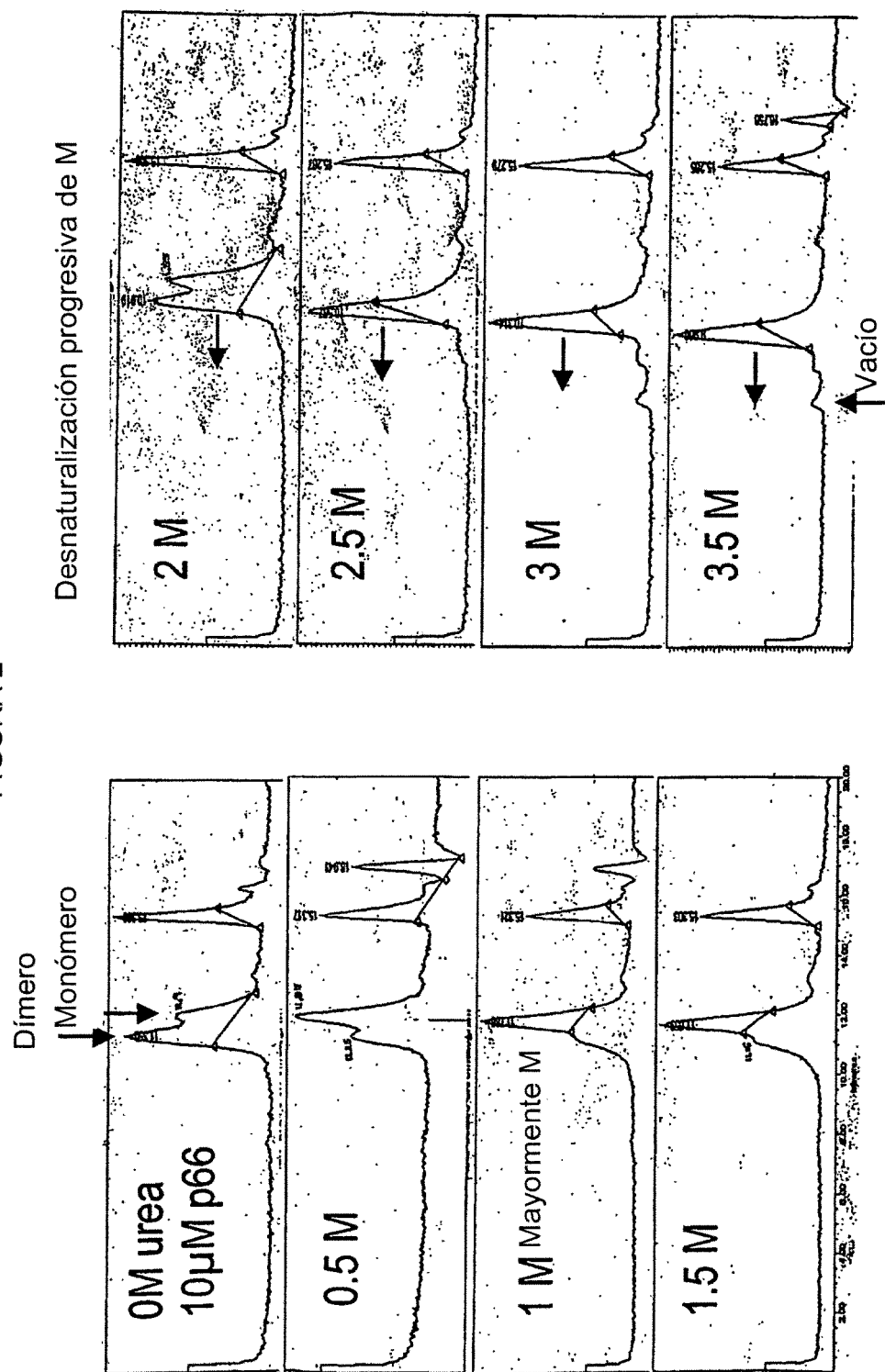


FIGURA 3

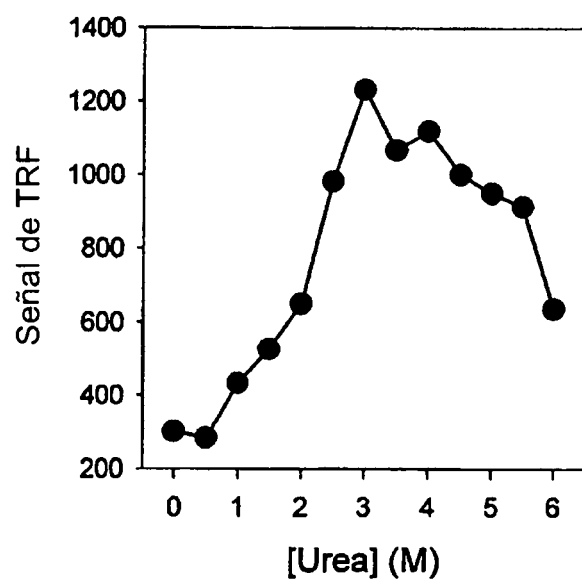


FIGURA 4

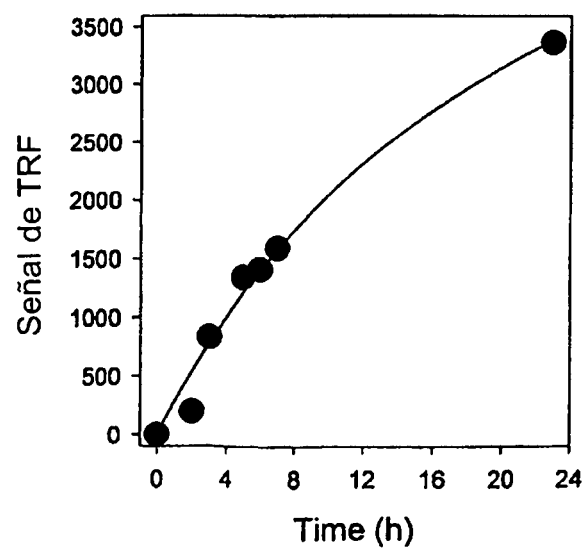
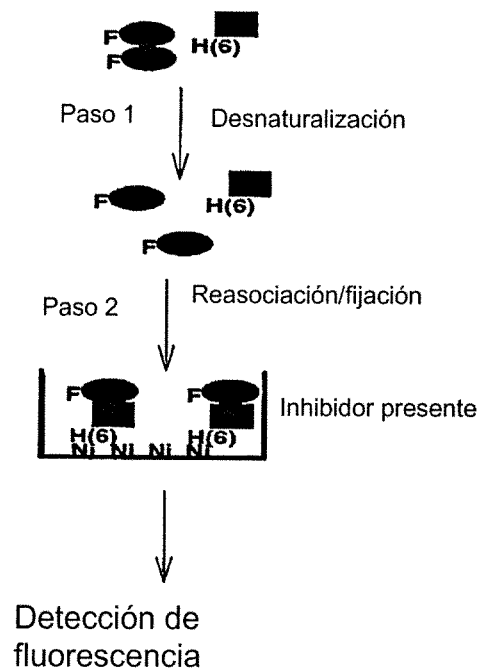
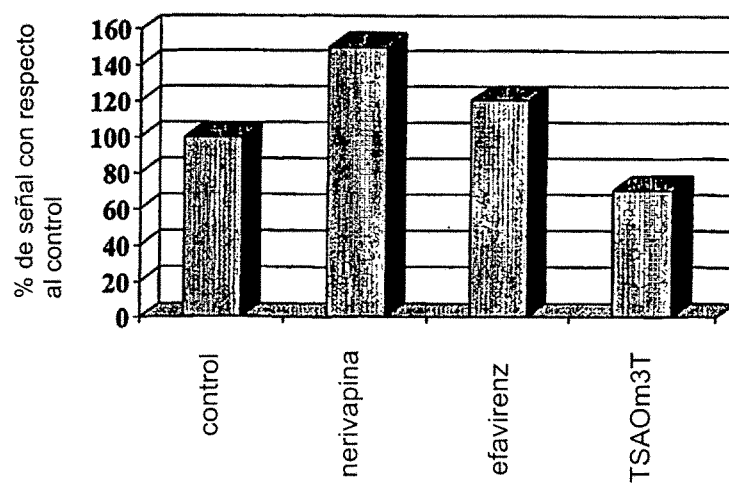


FIGURA 5

A.



B.



ES 2 284 893 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Boehringer Ingelheim (Canada) Ltd.
 <120> Ensayo para la identificación de inhibidores de la dimerización de la RT del VIH
 5 <130> 13/085
 <150> 60/307,883
 <151> 2001-07-27
 10 <160> 1
 <170> FastSEQ for Windows versión 4.0
 <210> 1
 <211> 560
 15 <212> PRT
 <213> HXB HIV-1 p66C2P
 20 <400> 1

 Cys Ile Ser Pro Ile Glu Thr Val Pro Val Lys Leu Lys Pro Gly Met
 1 5 10 15
 25 Asp Gly Pro Lys Val Lys Gln Trp Pro Leu Thr Glu Glu Lys Ile Lys
 20 25 30
 Ala Leu Val Glu Ile Ser Thr Glu Met Glu Lys Glu Gly Lys Ile Ser
 35 35 40 45
 Lys Ile Gly Pro Glu Asn Pro Tyr Asn Thr Pro Val Phe Ala Ile Lys
 30 50 55 60
 Lys Lys Asp Ser Thr Lys Trp Arg Lys Leu Val Asp Phe Arg Glu Leu
 65 70 75 80
 Asn Lys Arg Thr Gln Asp Phe Trp Glu Val Gln Leu Gly Ile Pro His
 85 90 95
 35 Pro Ala Gly Leu Lys Lys Lys Lys Ser Val Thr Val Leu Asp Val Gly
 100 105 110
 Asp Ala Tyr Phe Ser Val Pro Leu Asp Glu Asp Phe Arg Lys Tyr Thr
 115 120 125
 40 Ala Phe Thr Ile Pro Ser Ile Asn Asn Glu Thr Pro Gly Ile Arg Tyr
 130 135 140
 Gln Tyr Asn Val Leu Pro Gln Gly Trp Lys Gly Ser Pro Ala Ile Phe
 145 150 155 160
 Gln Ser Ser Met Thr Lys Ile Leu Glu Pro Phe Arg Lys Gln Asn Pro
 165 170 175
 45 Asp Ile Val Ile Tyr Gln Tyr Met Asp Asp Leu Tyr Val Gly Ser Asp
 180 185 190
 Leu Glu Ile Gly Gln His Arg Thr Lys Ile Glu Glu Leu Arg Gln His
 195 200 205
 50 Leu Leu Arg Trp Gly Leu Thr Pro Asp Lys Lys His Gln Lys Glu
 210 215 220

ES 2 284 893 T3

	Pro	Pro	Phe	Leu	Trp	Met	Gly	Tyr	Glu	Leu	His	Pro	Asp	Lys	Trp	Thr
	225					230					235					240
5	Val	Gln	Pro	Ile	Val	Leu	Pro	Glu	Lys	Asp	Ser	Trp	Thr	Val	Asn	Asp
					245					250					255	
	Ile	Gln	Lys	Leu	Val	Gly	Lys	Leu	Asn	Trp	Ala	Ser	Gln	Ile	Tyr	Pro
				260					265					270		
10	Gly	Ile	Lys	Val	Arg	Gln	Leu	Ser	Lys	Leu	Leu	Arg	Gly	Thr	Lys	Ala
			275					280					285			
	Leu	Thr	Glu	Val	Ile	Pro	Leu	Thr	Glu	Glu	Ala	Glu	Leu	Glu	Leu	Ala
	290						295					300				
15	Glu	Asn	Arg	Glu	Ile	Leu	Lys	Glu	Pro	Val	His	Gly	Val	Tyr	Tyr	Asp
	305					310					315					320
	Pro	Ser	Lys	Asp	Leu	Ile	Ala	Glu	Ile	Gln	Lys	Gln	Gly	Gln	Gly	Gln
				325						330					335	
20	Trp	Thr	Tyr	Gln	Ile	Tyr	Gln	Glu	Pro	Phe	Lys	Asn	Leu	Lys	Thr	Gly
			340					345					350			
	Lys	Tyr	Ala	Arg	Met	Arg	Gly	Ala	His	Thr	Asn	Asp	Val	Lys	Gln	Leu
			355				360						365			
25	Thr	Glu	Ala	Val	Gln	Lys	Ile	Thr	Thr	Glu	Ser	Ile	Val	Ile	Trp	Gly
	370					375					380					
	Lys	Thr	Pro	Lys	Phe	Lys	Leu	Pro	Ile	Gln	Lys	Glu	Thr	Trp	Glu	Thr
	385				390					395					400	
	Trp	Trp	Thr	Glu	Tyr	Trp	Gln	Ala	Thr	Trp	Ile	Pro	Glu	Trp	Glu	Phe
				405						410					415	
30	Val	Asn	Thr	Pro	Pro	Leu	Val	Lys	Leu	Trp	Tyr	Gln	Leu	Glu	Lys	Glu
			420					425					430			
	Pro	Ile	Val	Gly	Ala	Glu	Thr	Phe	Tyr	Val	Asp	Gly	Ala	Ala	Asn	Arg
			435				440					445				
35	Glu	Thr	Lys	Leu	Gly	Lys	Ala	Gly	Tyr	Val	Thr	Asn	Arg	Gly	Arg	Gln
	450					455					460					
	Lys	Val	Val	Thr	Leu	Thr	Asp	Thr	Thr	Asn	Gln	Lys	Thr	Glu	Leu	Gln
	465				470					475					480	
40	Ala	Ile	Tyr	Leu	Ala	Leu	Gln	Asp	Ser	Gly	Leu	Glu	Val	Asn	Ile	Val
				485						490				495		
	Thr	Asp	Ser	Gln	Tyr	Ala	Leu	Gly	Ile	Ile	Gln	Ala	Gln	Pro	Asp	Gln
			500				505						510			
45	Ser	Glu	Ser	Glu	Leu	Val	Asn	Gln	Ile	Ile	Glu	Gln	Leu	Ile	Lys	Lys
			515				520						525			
	Glu	Lys	Val	Tyr	Leu	Ala	Trp	Val	Pro	Ala	His	Lys	Gly	Ile	Gly	Gly
	530					535					540					
50	Asn	Glu	Gln	Val	Asp	Lys	Leu	Val	Ser	Ala	Gly	Ile	Arg	Lys	Val	Leu
	545					550					555					560