



(12)

CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2019 00356**

(22) Data de depozit: **12/06/2019**

(41) Data publicării cererii:
30/12/2020 BOPI nr. **12/2020**

(71) Solicitant:
• SPITALUL CLINIC COLENTINA
BUCUREȘTI, ȘOS.ȘTEFAN CEL MARE,
NR.19-21, SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO

(72) Inventatori:
• CIUBOTARU MIHAI, STR.ION BERINDEI,
NR.6, BL.OD 18, ET.2, AP.11, SECTOR 2,
BUCUREȘTI, B, RO;

• MUȘAT MIHAELA,
BULEVARDUL TIMIȘOARA, NR.39, BL.36,
AP.67, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;
• PETRESCU JOSE ANDREI,
STR.POSTĂVARUL, NR.5, BL.C5, SC.7,
ET.4, AP.85, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B,
RO

(54) **PROCEDEU FOLOSIND FLUORESCENȚA
PENTRU SELECȚIA DE COMPUȘI CHIMICI SOLUBILI
INHIBITORI AI REACȚIEI DE 3' PROCESARE CATALIZATĂ
DE INTEGRAZA HIV**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de selecție a unor compuși chimici solubili, inhibitori ai reacției de procesare 3' catalizată de integraza HIV, cu potențial terapeutic în tratarea infecțiilor HIV. Procedeu, conform invenției, folosește drept substrat o oligonucleotidă (27 bp) ADN dublu catenar de sinteză cu secvență virală U5' LTR dublu marcat terminal 5' și 3' la capătul supus catalizei, enzima IN exprimată recombinant și o pereche de fluorofori pentru transferul rezonant de energie prin fluorescență (FRET), astfel că, incubarea enzimei cu

substratul dublu catenar în urma procesării 3' ADN prin îndepărtarea dinucleotidei 3' terminale și a unuia dintre fluorofori reduce sau chiar suprimă procesul de FRET. Puterea inhibitorie a unui compus chimic solubil asupra procesării 3' a IN este cuantificabilă prin gradul persistenței fenomenului de FRET asociat substratului ADN intact.

Revendicări: 2
Figuri: 6



PROCEDEU FOLOSIND FLUORESCENȚA PENTRU SELECȚIA DE COMPUȘI CHIMICI SOLUBILI INHIBITORI AI REACȚIEI DE 3' PROCESARE CATALIZATĂ DE INTEGRAZA HIV

DESCRIEREA INVENȚIEI

Invenția se referă la un procedeu pentru selecția de compuși chimici solubili ininhibitori ai reacției de 3' procesare catalizată de integraza HIV folosind fluorescența, destinat selecției rapide a unui număr mare de compuși chimici diverși, high-throughput screening HTS, solubili cu potential terapeutic în tratarea infecțiilor HIV.

Este deja cunoscut un procedeu ce ar fi putut fi folosit selecției de compuși chimici solubili ininhibitori ai reacției de 3' procesare catalizată de IN folosind fluorescența. Acest procedeu este prezentat de in doua lucrari de [1] Lee S. P. ,Censullo,M. L. , Kim H. G., Knutson J. R., Han M. K. Characterization of endonucleolytic activity of HIV-1 integrase using a fluorogenic substrate, 1995, Analytical Biochemistry, 227, 295-301 și [2] Lee S. P., Kim, H. G. , Censullo,M. L.and Han M. K., Characterization of Mg²⁺-Dependent 3'-Processing Activity for Human Immunodeficiency Virus Type 1 Integrase in Vitro: Real-Time Kinetic Studies Using Fluorescence Resonance Energy Transfer, 1995, Biochemistry, 34, 10205-10214 si folosește drept substrat un ADN oligonucleotidic și fenomenul de transfer rezonant de de energie prin fluorescența FRET pentru detecție. El nu a fost folosit în selecția de medicamente din cauza unor dezavantaje de design. Dezavantajul major al acestui procedeu este ca ADN-ul folosit este diferit de cel natural folosit de virus, fiind modificat la capătul 5' cu un analog sintetic de bază azotată 5-amino-(12)-2' deoxiuridina, unde este atașat fluoroforul iar la capatul 3' pe langa acest analog mai prezintă o prelungire de 16 deoxinucleotide extensie monocatenară în formă de Y nenaturală. Din aceste motive în acest procedeu HIV-IN catalizează in mod artificial si endonucleolitic reacția cu substratul ADN hibrid dublu si monocatenar, în locul celei naturale de 3' procesare propriu-zisă care necesită substrat ADN viral dublu catenar cu catene complet complementare, cum este cazul procedeuului nostru. Mentionăm ca acest procedeu mai vechi nu este selectiv pentru HIV-IN, ci se aplica mai multor endonuclease, are eficiență de detecție pe substrat ADN complet dublu catenar natural si preferă cation divalent Mn²⁺ in locul Mg²⁺ cel fiziologic folosit de HIV-IN.

Spre deosebire, procedeul pentru selecția de compuși chimici solubili inhibitori ai reacției de 3' procesare catalizată de integraza HIV folosind fluorescența propus de noi prezintă următoarele avantaje: folosește eficient ca substrat ADN dublu catenar ca cel natural viral, reacția pe care o monitorizează este cea naturală de 3' procesare, folosește Mg^{2+} drept cofactor HIV-IN, este selectiv pe HIV-IN, și se pretează urmării inhibiției medicamentoase a IN, INi.

Se dă în continuare un exemplu de realizare a invenției, în legătură cu procedeul propus și cu figurile Fig.1 -Fig.6, incluse la paginile 12-14 care reprezintă:

- Fig.1, mecanismul enzimatic al reacției IN
- Fig.2, principiu molecular procedeul pentru selecția de compuși chimici solubili inhibitori ai reacției de 3' procesare catalizată de integraza HIV folosind fluorescența;
- Fig. 3 Aplicarea procedeului pe selecția de compuși medicamentoși,
- Fig.4, Detecția spectrală a variației FRET asociate HIV-IN 3' procesării ADNului
- Fig.5, Procedeul propus este cel mai sensibil la prezența Mg^{2+} față de alți cationi
- Fig.6, Procedeul propus este aplicabil detecției INi indusă de medicamente de raltegravir.

Unul dintre cele mai eficiente și mai noi tratamente ale infecțiilor HIV este cel cu inhibitori ai integrazei HIV, INi. Acești compuși țintesc enzima HIV integrază IN, care înserează genomul viral în cromozomii celulelor gazdă. Odată însă acesta integrat în genomul gazdă se crează un rezervor de producție virală. Terapiile ulterioare nu pot decât să reducă ritmul amplificării, ceea ce subliniază avantajul terapiei cu INi. Necesitatea dezvoltării unui număr cât mai mare de compuși medicamentoși INi derivă și din faptul că multiplicarea virală este susceptibilă unui grad sporit de mutagenză generând și selectând în urma tratamentului virioni cu IN modificată ce conferă rezistență la tratamentul urmat. Rezistența la raltegravir, cel mai folosit INi în tratamentul antiretroviral ART clinic, a fost raportată la unele cazuri survenind chiar și la 3 luni de la începutul tratamentului cum este descris în [3]. Di Santo, R., Inhibiting the HIV Integration Process: Past, Present, and the Future. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2014, 57, (3), 539-566.

În vederea descoperirii de noi compuși chimici cu proprietăți INi, apare necesitatea dezvoltării unor procedee de selecție/screening biochimică a acestor agenți acționând direct pe activitatea enzimei IN virală. Selecția lor se face dintr-o colecție extinsă de compuși, noi de sinteză, sute sau chiar mii denumite generic librărie, caracterizați doar chimic structural dar

neinvestigați anterior asupra potențialului lor de acțiune INi. Procedeu biochimic enzimatic descris în prezenta cerere este destinat selecției rapide a unui număr mare de compuși chimici diverși HTS solubili, cu grad sporit de confidență pentru activitatea INi. Cerințele unui astfel de procedeu de selecție biochimic sunt:

- selectivitatea procedurii pe activitatea enzimatică HIV IN,
- detecția sensibilă discriminativă chiar și a unei modificări reduse a activității HIV-IN induse doar de prezența compușilor activi,
- versatilitatea de execuție a procedurii iterativ la scară largă HTS pentru mulți compuși supuși simultan selecției.

Mecanismul enzimatic al reacției IN decurge în trei etape având drept substrat ADNul viral liniar copiat cDNA_v dublu catenar descris în [4] Hare, S.; Maertens, G.N.; Cherepanov, P., 3'-processing and strand transfer catalysed by retroviral integrase in crystallo. *The EMBO journal*, 2012, 31, (13), 3020-3028. Întâi, IN se leagă la cele două capete ale cDNA_v recunoscând specific secvențele lungi terminale repetitive LTR. În a doua etapă și cea mai importantă pentru propunerea noastră la ambele capete 3' ale cDNA_v IN generează un atac nucleofil ce taie legătura fosfodiestică cu îndepărtarea dinucleotidei GT terminale. Aceasta etapă de cataliză monocatenară poartă denumirea de procesarea 3' și lasă câte o grupare 3'OH liberă și câte un capăt dinucleotidic AC 5' monocatenar la nivelul fiecărui element LTR ce flanchează genomul viral linear Fig.1 imaginea din stânga și cea centrală. În cadrul celei de-a treia etape, cea a transferului catenar, IN ține cele două LTR 3' procesate în proximitatea ADN-ului țintă de integrare, fiecare LTR 3'OH inițiind un atac nucleofil ce inserează cele două capete scurtate ale ADN-ului viral în fiecare din catenele cromozomului gazdă țintă. Această etapă a transferului catenar Fig.1 dreapta, nu face obiectul procedurii noastre.

Procesul descris de noi în prezenta cerere reconstituie *in vitro*, în soluție, cu reactivi de sinteză ADN și exprimați recombinant IN reacția de procesare 3', schematic reprezentată în Fig.2 și are drept scop testarea sub aspect inhibitor IN a oricărei librării diverse de compuși solubili de investigat. Detecția procesării 3' se va face prin fluorescență de emisie. O primă incubare de 12 ore cu HIV-IN la temperatura 4⁰C pe placa ce adsoarbe polipeptide este urmată de o spălare a enzimei nelegate. Substratul dublu catenar sub formă de oligonucleotide ADN de sinteză cu 27 perechi de baze bp conform cu secvența 5'UTR LTR a virusului HIV-1 prezintă la

extremitatea terminală netranslatată 5'UTR-5' untranslated, ambele catene marcate cu fluorofori atât la capătul 5' Alexa488 donor D cât și 3' Alexa 594 acceptor A. Proximitatea celor doi fluorofori A și D în ADN-ul LTR intact, localizați diametral opus pe ADN-ul dublu elicoidal $\approx 20\text{\AA}$, permite fenomenul de FRET evidențiat printr-un semnal de emisie de fluorescență puternic al A, $\lambda_{em} = 622\text{nm}$ când A este Alexa 594 porțiunea de spectru gri pe Fig.2 atunci când excitarea luminoasă se face la λ_{ex} caracteristica D, $\lambda_{ex} = 490\text{nm}$ când D este Alexa 488. Aceasta se datorează FRET între D și A, Fig.2 imaginea centrala. O primă incubare scurtă de 1 ora ADN cu HIV-IN la temperatura camerei este urmată de o spălare, și o primă citire de fluorescență la citire Fig.2 centrala care ne indică formarea complexului IN-LTR. Incubarea de 24ore a acestui substrat LTR-ADN cu IN la $+37^{\circ}\text{C}$ în prezența unei soluții tampon conținând Mg^{2+} , cofactor IN pentru cataliză duce la îndepărtarea A clivat odată cu dinucleotida 3'GT numai atunci când IN desfășoară optim cataliza procesării 3'. După incubare se produce o spălare scurtă pentru îndepărtarea A liber în timp ce substratul ADNv LTR 3'procesat ce conține doar D rămâne atașat enzimei, cu semnal D porțiune închisă spectru Fig.2. Acest proces catalitic este însoțit de o dispariție sau scădere semnificativă a semnalului fluorescent FRET A la 622nm și reamplificarea celui datorat donorului D la 520nm, ultimul spectru din dreapta jos Fig.2. Efectul oricărui compus IN inhibitor lasă fie nemodificat ori foarte puțin schimbat semnalul A față de cel al referinței LTR intact.

În absența recrutării ADN-ului de către IN din cauza faptului că fluoroforii sunt atașati de el, ei sunt îndepărtați la prima spălare, ducând la absența totală a fluorescenței în primul set de citiri. Dacă legarea ADN-IN se produce, ADN-ul va fi sechestrat în godeu, iar fluorescența va prezenta maximele caracteristice fluoroforilor D și A în primul set de înregistrări. ADN-ul intact legat la IN generează maxime de fluorescență moderată D și A. Deci, în absența compușilor inhibitori, cu sursa țintită spre excitația donorului D λ_{ex} Alexa488=490nm D în momentul legării ADN-ului detectăm fluorescența de emisie a donorului D λ_{max} Alexa488=520nm înspre albastru, și fluorescența de emisie A spre roșu λ_{max} Alexa594=622nm rezultată prin FRET. Odată ce IN produce tăierea ADN-ului viral legat, capătul 3' funcțional cu A va fi îndepărtat împreună cu dinucleotida GT prin spălarea urmând etapei de incubare proteină-ADN. Astfel, în godeurile unde IN clivează substratul, FRET dispare în cel de-al doilea set de citiri, D1 recăpătându-și întreaga sa fluorescență, crescând astfel maximul D, în același timp emisia A ar trebui să fie

absentă. Fig. 3 prezintă cele trei scenarii posibile pentru compușii testați prin această metodă, în primul și al doilea set de citiri, unde +/- reflectă un rezultat pozitiv, respectiv negativ de selecție. Dacă compușii nu competiționează cu situsurile de legare IN-ADN, ADN-ul marcat va fi sechestrat de către IN după prima spălare. În godeurile cu compuși negativi care nu blochează legarea ADN-ului viral de IN, vor fi emisii moderate atât a donorului cât și a acceptorului compușii schematizați cerc ori triunghi gri, în godeurile A12 și H11 în Fig. 3 stanga. Orice compus blocând legarea ADN-ului viral de IN abolește recrutarea acestuia în godeu, ceea ce rezultă în absența semnalului în godeurile corespunzătoare, în Fig. 3 dreapta compusul unghi gri din godeul H1. Compușii care permit legarea ADN-ului, deși negativi pentru legare pot fi pozitivi dacă blochează activitatea catalitică de tăiere a ADN-ului, ceea ce ar corespunde unei emisii nemodificate de fluorescență la cel de-al doilea set de înregistrări, după 24 ore de incubare, în Fig. 3 dreapta cercul gri din godeul A12. Compușii care permit IN să taie capătul 3' al ADN-ului viral sunt negativi atât pentru legare cât și pentru clivaj, arătând la cel de-al doilea set de înregistrări maxima unică intensă D fără emisia A, în Fig. 3, triunghiul gri din H11.

În următoarea secțiune descriem evidențierea experimentală a catalizei monocatenare a IN pe ADNv 5' LTR prin FRET. Pentru testarea procedurii de tăiere 3' monocatenară ADN folosim o metodă HTS de scanare a emisiei de fluorescență pe un cititor de fluorescență pentru plăci de 96 de godeuri în care au loc reacțiile. Noi am folosit spectrofluorometrul FluoroMax 4 Plus Horiba cu monocromator Czerny-Turner cu rețele gravate plane cu 1200 sanțuri gravate/mm centrat la max 330 nm atât la excitare cât și la emisie pentru controlul lungimii de undă, dotat cu doi detectori pentru emisie cu fotomultiplicatoare pe domeniul PPD 650 la 230-700 nm, cuplat prin fibră optică la cititorul de plăci MicroMax 384. Procedura poate fi adaptată oricărei mărci de spectrofluorometru cu monocromator și control cu rețea gravată și capabilitate de detecție emisie fluorescență pe domeniu apropiat cu cel folosit de noi. Oligonucleotidele ADN de 27 nucleotide cu secvența catenei sens LTR 5' TTGGTAGTGTGGAAAATCTCTAGCAGT 3' marcate 5' cu Alexa488 D și antisens marcate 3' cu Alexa492 A din procedura de sinteză sunt achiziționate comercial de la Integrated DNA Technologies IDT-DNA. Pentru mobilitate fluoroforii sunt atașați la bazele corespunzătoare printr-o punte alifatică de 6 atomi de carbon (-CH₂)₆. Pentru puritate oligonucleotidele sunt desalinizate și purificate de producător prin HPLC (high pressure liquid chromatography). Oligonucleotidele monocatenare sunt hibridizate prin încălzirea unui

amestec echimolar conținând 100 μ M sens și antisens LTR5' în soluția tampon de reacție MB fără Ditiotreitoli; conține 20mM(Acid 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineetanesulfonic) HEPES pH= 7,5, 150mM clorura Sodiu (NaCl), 7,5mM Clorura de Magneziu (MgCl₂), 10% Dimetil sulfoxid (DMSO), 5% polietilenglicol (PEG)4000), într-un tub Eppendorf tip 1,5ml la 95^oC timp de 5 minute într-un bloc de încălzire termosat după care blocul conținând probele de ADN sunt scoase împreună cu blocul cu godeuri din încălzitor și lasat să se răcească treptat la temperatura camerei lent în decurs de o ora. La final concentrația ADN dublu catenar este citită spectrofotometric cu absorbanta la $\lambda_{abs}=260$ nm.

HIV1-IN folosită în procedeul nostru conform invenției cuprinde în întregime polipeptidul viral de 288 aminoacizi fuzionat la capătul său C terminal cu un polipeptid de 184aa E2C proteină tip zinc finger iar la cel N terminal de 6 histidine. HIV-IN folosită este exprimată recombinant în *E. coli* și purificată urmând în totalitate procedeul descris de [5]. Tan, W., Tan, W. Zhu, K. Segal, D. J. Barbas, C. F., 3rd Chow, S. A. (2004). "Fusion proteins consisting of HIV type 1 integrase and the designed polydactyl zinc finger protein E2C direct integration of viral DNA into specific sites." *Journal of Virology*, 78(3): 1301-1313.

Fracțiile rezultate din ultima purificare de cromatografie cumulate și conținând > 95% puritate HIV-IN sunt stocate în soluția tampon finală PB, 20 mM tris(hydroximetil)aminometan (Tris) pH 7,5, 20% glycerol, 10 mM ditiotreitoli(DTT), 500 mM NaCl, 50 μ M Clorura de Zinc ZnCl₂ la congelator -80^oC în probe mici de 100 μ ls ce sunt dezghețate lent pe gheață cu 5 minute înaintea începerii procedurii.

Procedeul conform invenției a fost testat în plăci negre pentru fluorescența formată în 96 godeuri de tip "high binding" disponibile comercial absorbante pentru proteină, cu incubare de 100 μ l volum final pe godeu. Concentrația optimă de ADN dublu catenar 200nM LTR marcat cu 5'Alexa488, 3'Alexa594 sau cu ambii fluorofori este incubată în soluția tampon completă MBC 20mM HEPES pH 7,5, 150mM NaCl, 7,5mM MgCl₂, 5mM DTT, 10% DMSO, 5% PEG 4000, în prezența sau absența a 400 nM HIV-IN pură. Placa este incubată 24 ore la 37^o C într-o baie termostată cu agitare orizontală după care spectre de emisie de fluorescență se înregistrează cu excitare constantă $\lambda_{excitarea} = 490$ nm pe domeniul 510 - 680 nm cu intervale de 1nm și timp de integrare 1sec. la fiecare pas. Se înregistrează și spectre de fond corespunzând unor godeuri ce conțin doar soluția tampon MBC, sau aceasta doar cu IN la concentrația indicată. După

scaderea fondului caracteristic fiecărei reacții, integrarea spectrelor, eficiența de FRET este calculată sub aspect de creștere a intensității de emisie a acceptorului, sensibilizării acceptorului, metoda de calcul fiind documentată la procedura de calcul FRET pg.8. Activitatea IN este expresia diferenței dintre valorile de eficiență de FRET (ΔE) determinate între reacțiile similare în absența enzimei și cele în prezența ei. Testarea am efectuat-o prin reacțiile a căror spectre de emisie sunt prezentate în Fig. 4. Fenomenul de FRET este evidențiat pe spectrele de emisie fluorescență $\lambda_{ex} = 490\text{nm}$ specifica donorului, atât prin scăderea emisiei donorului D pe Fig.4, comparăm spectrul D negru punctat subțire față de D_A cel negru solid la 520nm, cât și prin creșterea fluorescenței acceptorului, aceleași spectre în jurul regiunii 620nm. Adăugarea enzimei HIV-IN la ADN-ul marcat unic cu donor duce la scăderea prin ecranare nespecifică a fluorescenței donorului D de pe AND. În Fig.4, comparăm intensitatea spectrului D negru punctat față de cel D+IN gri închis punctat către 520nm. Remarcabil însă este efectul produs de prezența enzimei HIV-IN la amestecul de reacție ce conține LTR ADN dublu marcat cu ambii fluorofori pe Fig.4, comparăm spectrul continuu negru D_A cu cel trasat continuu în gri D_A+IN, efect compatibil cu diminuarea substanțială a fenomenului de FRET ca urmare a îndepărtării acceptorului A de la capătul 3' terminal al catenei inferioare, consecința desfășurării catalizei. Acest clivaj este observabil și cuantificabil prin ambele efecte atât cel de recuperare parțială a fluorescenței donorului zona 520 nm cât și cea de scădere a emisiei induse FRET a acceptorului, zona 620 nm. Folosind teoria dezvoltată de Förster am cuantificat prin procedeul de senzitivizarea acceptorului, pg.8 procentul diferență de FRET înainte și după cataliza enzimatică a HIV-IN, $\Delta E=14-18\%$. Am investigat dacă variația detectabilă de FRET se datorează specific reacției catalitice IN. Precum toate enzimele din clasa sa și HIV-IN necesită pentru cataliza la nivelul sit-ului activ DDE prezența unui cofactor cation divalent, dar doar Mg^{2+} este considerat fiziologic activ în nucleeele limfocitelor, spre deosebire de Ca^{2+} sau Mn^{2+} . În Fig.5 histogramele arată fără echivoc faptul că $\Delta E > 0$ cu cataliza IN detectabilă în reacție este strict dependentă de prezența unui cation divalent iar absența lui crește FRET probabil prin modificarea quantum yield al fluoroforilor polar încărcati-, histograma cea mai din stânga cu $\Delta E < 0$, cât și faptul că ionul de Mg^{2+} este preferențial folosit de IN histograma neagră MgCl_2 corespunzătoare incubării cu Mg^{2+} conduce la variația maximală ΔE testată. Această ultimă observație este o confirmare a semnificației biologice a testărilor in vitro cu IN recombinată folosită de noi.

Procedeu nostru de FRET pe 3'procesare monocatenară IN, conform invenției, a fost testat pe raltegravir, Isentress Merck, actual cel mai folosit compus medicamentos INi în ART clinic. Pe Fig.6 sunt ilustrate prin histograme efectele a 2 concentrații de raltegravir 0.5 și respectiv 1μM, sau Ef 2% vs 10%DMSO, Ef. ± PEG pentru solubilizarea compusului. Efectul de inhibiție al reacției de 3'Procesare LTR, scăderea ΔE FRET de la valori 18-22% în absența raltegravir ΔE-RAL la ΔE 12-16% în prezența sa ΔE+RAL este evidentă la ambele concentrații de agent chimic și pare indiferent de concentrația de DMSO, dar un pic afectată de prezența PEG, necesitatea prezenței sale la compusii PEG-ilati cu absorbție prelungită de lungă activitate.

Descriem procedura de calcul a diferenței de eficiența a FRET între starea pre și post clivaj monocatenar catalitic HIV-IN pentru deducerea eficienței inhibitorii de interferența a compusilor supuși testării. Eficiența transferului de energie E_{FRET} între D și A fluoroforii atașați substratului ADN LTR se obține din spectrele de emisie înregistrate în cazul fiecărei reacții. Din spectrele înregistrate se scad spectrele de fond ale soluțiilor tampon corespunzătoare incubării ± HIV-IN pentru obținerea spectrelor corectate. Acestea se integrează numeric și calculul eficienței se face prin metoda de sensibilizare acceptor Alexa 594 pentru E_{FRET} conform [6],

$$E = \frac{[f_{DA}(\lambda_{490}, \lambda) - f_A(\lambda_{490}, \lambda) - f_D(\lambda_{490}, \lambda)]}{\frac{[A_D^D(\lambda_{490})]}{[A_A^A(\lambda_{490})]} \cdot f_A(\lambda_{490}, \lambda) - f_D(\lambda_{490}, \lambda)}$$

Unde E este expresia eficienței E_{FRET} , $f(\lambda_{490}, \lambda)$ reprezintă integrala numerică a spectrului de emisie excitat la 490nm (D Alexa 488 $\lambda_{maxEx} = 490$ nm) monitorizând emisia ca funcție de λ între 565 and 660nm semnatura A Alexa594,. Subscriptele denotă, A- LTR cu Alexa 594 +HIV-IN, D- LTR cu Alexa 488 +HIV-IN, DA- LTR cu 5'Alexa 488 și 3'Alexa594 +HIV-IN. Majuscula A (λ) este absorbanta speciei fluorescente precizate din proba desemnată de subscript la $\lambda_{maxEx} = 490$ nm descrisă de [6] Fairclough, R.H., Cantor, C.R. (1978) The use of singlet-singlet energy transfer to study macromolecular assemblies. *Methods Enzymology*, **48**, 347-379.

Valoarea ΔE se calculează din diferența E_{FRET} înainte de clivaj față de cea calculată după cataliza $\Delta E = E_{FRET}(\text{pre-clivaj}) - E_{FRET}(\text{postclivaj})$ iar Valoarea inhibitorie a HIV-IN în reacția 3' procesare exprimată procentual $Inh\% = (\Delta E_{noninhibitor} - \Delta E_{inhibitor}) \times 100 / \Delta E_{noninhibitor}$. $\Delta E_{noninhibitor} - \Delta E_{FRET}$ în absența inhibitorului, $\Delta E_{inhibitor} - \Delta E_{FRET}$ în prezența inhibitorului,

REVENDICĂRI

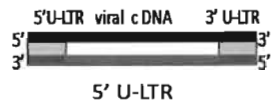
1. Procedeu pentru selecția de compuși chimici solubili inhibitori ai reacției de 3' procesare catalizată de integrarea HIV folosind fluorescența, caracterizat prin aceea că, se prepara soluțiile MB fără DTT și MBC conform rețetelor documentate la descrierea procedurii, se filtrează sub presiune pe un filtru de 2 μm pentru îndepărtarea particulelor și sterilizare, soluțiile fiind ținute la rece pe tot parcursul procedurii, apoi se hibridizează oligonucleotidele monocatenare marcate fluorescent prin încălzirea unui amestec echimolar conținând 100 μM sens și antisens, LTR5', în soluția tampon de reacție MB fără DTT, într-un tub Eppendorf tip 1,5 ml la +95°C timp de 5 minute într-un bloc de încălzire termosat, după care blocul conținând probele de ADN sunt scoase împreună cu blocul cu godeuri din încălzitor și lăsat să se răcească treptat la temperatura camerei lent în decursul de o oră. La final concentrația ADN dublu catenar este citită spectrofotometric cu absorbanta la $\lambda_{\text{abs}}=260\text{nm}$. Apoi se face planificarea cu exactitate a poziției fiecărei reacții pe placa de 96 godeuri de culoare neagră pentru fluorescența de tip tip "high binding" absorbante pentru proteină, după care se adaugă un prim volum de 100 μl ± 400 nM HIV-IN în soluția tampon, MBC, în toate godeurile plăcii, se incubează 12 ore la temperatura +4°C, după care se spală placa de două ori cu 400 μl cu MBC cu scuturarea plăcii pentru îndepărtarea enzimei nelegate și în final se adaugă 100 μl ADN dublu catenar 200 nM, U5' LTR marcat cu 5' Alexa488, 3' Alexa594 în MBC sau cu ambii fluorofori în MBC, respectiv MBC simplu pentru godeurile cu desemnate detectiei fluorescenței de fond. Se incubează, timp de o oră la temperatura camerei, în final spalându-se ca anterior și apoi se înregistrează la fiecare godeu un prim spectru de emisie de fluorescență cu excitare constantă ($\lambda_{\text{excitare}} = 490\text{nm}$) pe domeniul 510 and 680 nm cu intervale de 1 nm și timp de integrare 1 sec., apoi se face incubarea 24 ore a plăcii cu amestecuri de reacție la +37°C pe platforma orizontală cu agitare rotativă 60 rpm după care se spală ca anterior pentru îndepărtarea dinucleotidei libere. Imediat după spălare se adaugă 100 μl MBC în fiecare godeu și se înregistrează la fiecare al II-lea spectru de emisie fluorescență așa cum a fost descris anterior.

2. Retetele chimice procedurii, conform revendicării 1, caracterizat prin aceea că, utilizează rețetele de soluții alese pentru optimizarea procedurii, soluția tampon de reacție MBC folosită pentru incubări și (20 mM (Acid 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineetanesulfonic), HEPES pH= 7,5, 150 mM clorura de sodiu, NaCl, 7,5 mM clorura de Magneziu, MgCl₂, 10 mM

dithiothreitol, DTT, 10% dimetil sulfoxide, DMSO, 5% polietilenglicol 4000, PEG, raportul molar 1:2 intre cantitatea de substrat ADN LTR dublu marcat si cea de enzimă 400nM HIV-IN, introdusa la incubarea reactiei de cataliza.

DESENE EXPLICATIVE

Mecanismul integrării HIV-
INTEGRAZA



5'CTTTTAGTCAGTGTGGAAAATCTCTAGCAGT 3'

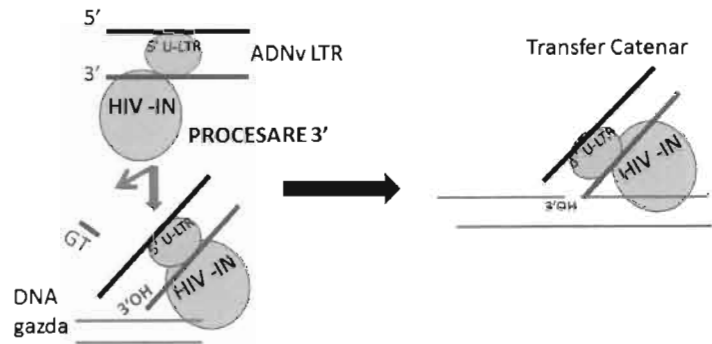


Fig. 1

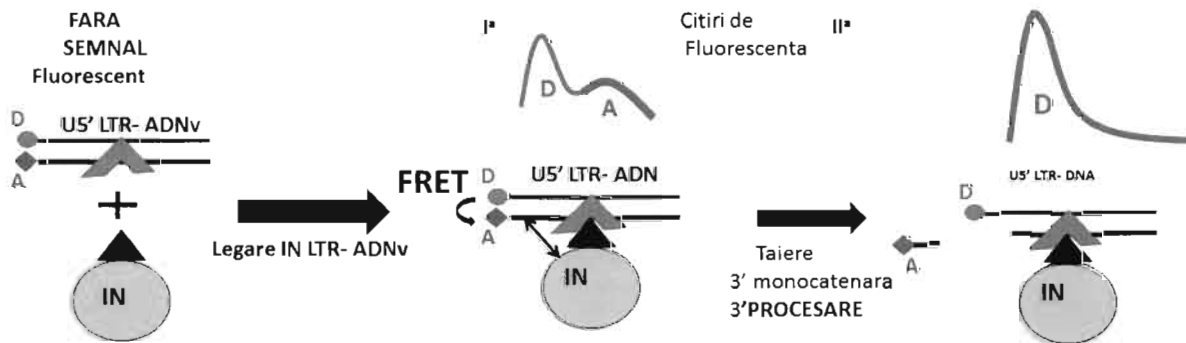


Fig. 2

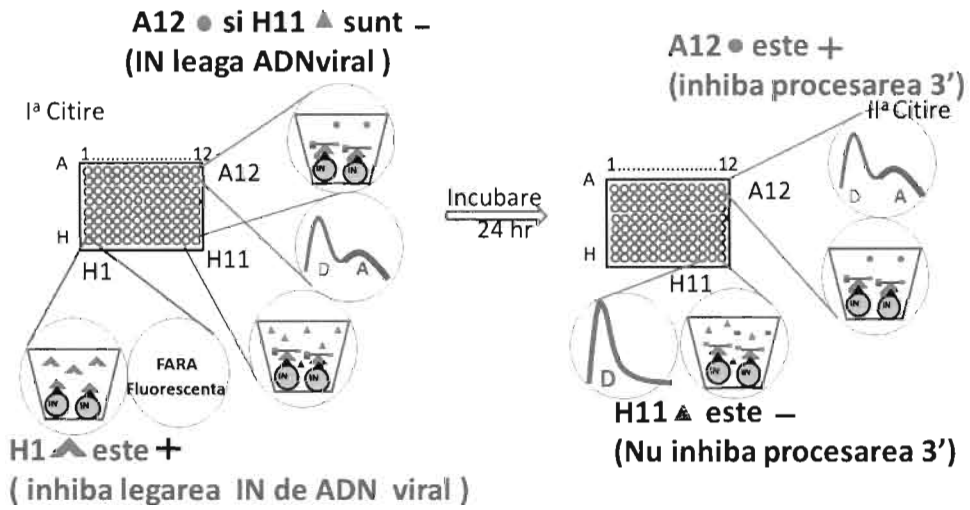


Fig. 3

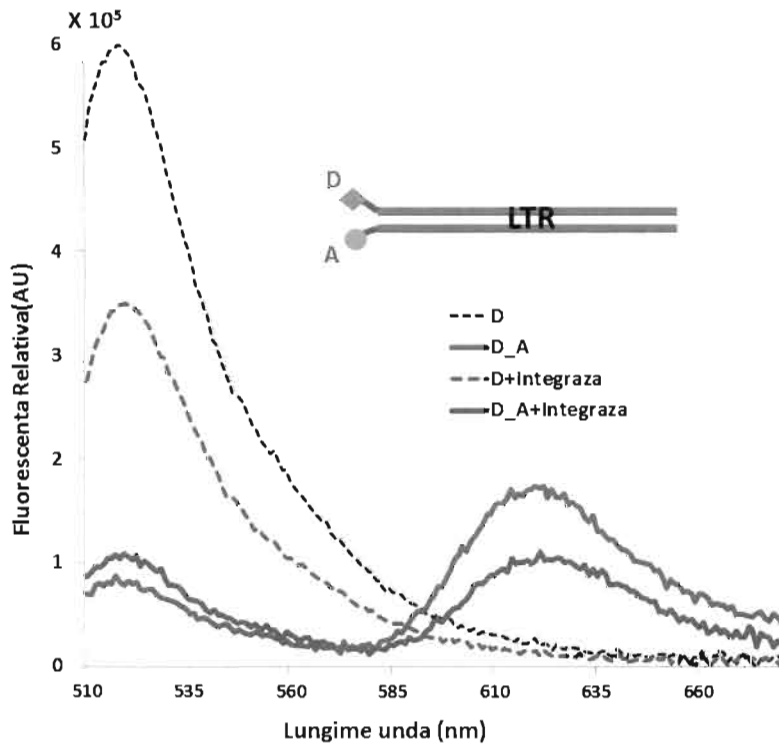


Fig. 4

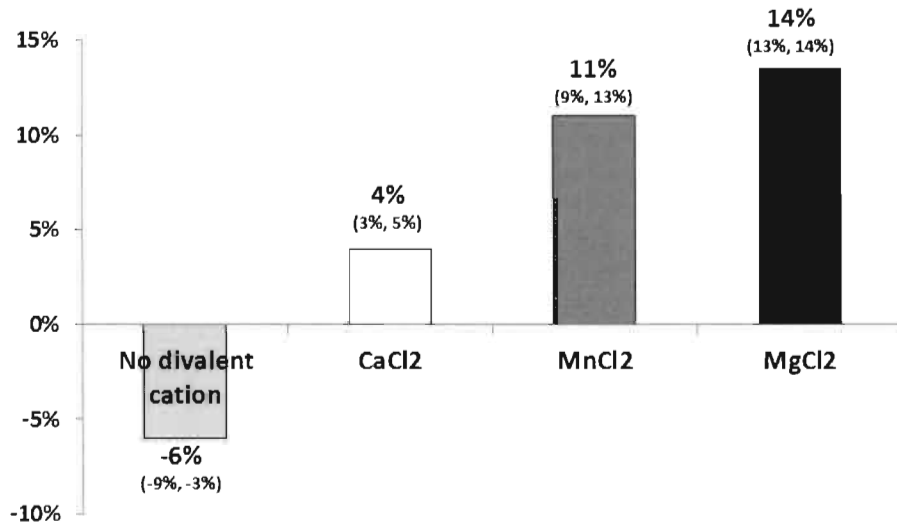


Fig. 5

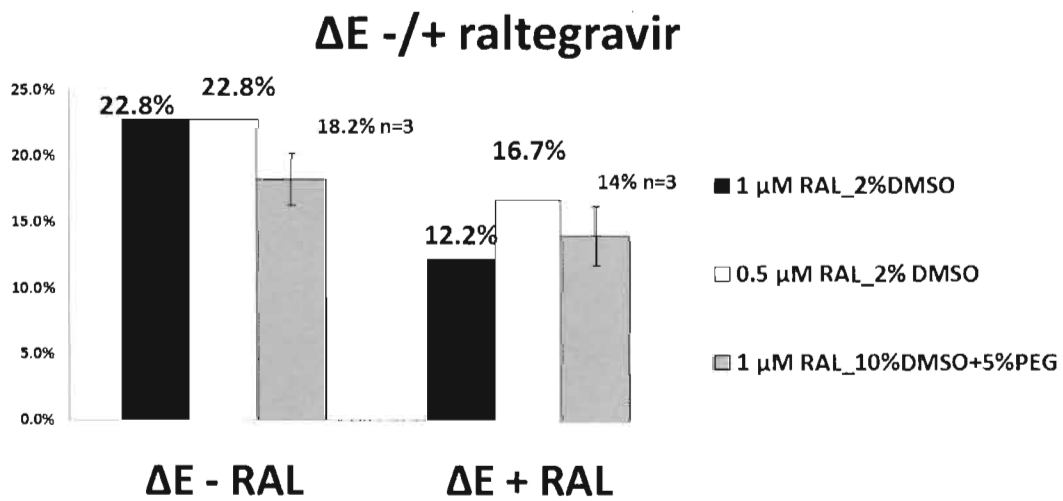


Fig.6