

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 657 466**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/70 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.03.2013** **PCT/IB2013/051707**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.09.2013** **WO13132412**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.03.2013** **E 13720051 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.11.2017** **EP 2823067**

54 Título: **Utilización de RBM39 como biomarcador**

30 Prioridad:

05.03.2012 FR 1251980

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

05.03.2018

73 Titular/es:

ABIVAX (100.0%)
5 rue de la Baume
75008 Paris, FR

72 Inventor/es:

TAZI, JAMAL;
VENABLES, JULIAN;
GARCEL, AUDE;
CAMPOS, NOËLIE;
MAHUTEAU-BETZER, FLORENCE;
NAJMAN, ROMAIN y
SCHERRER, DIDIER

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 657 466 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

Utilización de RBM39 como biomarcador

La presente invención se refiere a un marcador celular para el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). Más específicamente, la presente invención se refiere a la identificación de un marcador celular útil para evaluar la eficacia de compuestos presuntamente activos con respecto al VIH. Más particularmente, la presente invención se refiere a procedimientos de cribado de nuevos compuestos activos con respecto al VIH o para evaluar la eficacia de un tratamiento con respecto al VIH en un paciente.

El SIDA (Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida) es una causa importante de mortalidad en el mundo, y se considera como una pandemia. El agente infeccioso que provoca el SIDA es el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), retrovirus que pertenece a la familia de los lentivirus. Este virus afecta los linfocitos T, conduciendo a una severa inmunodeficiencia y al desarrollo de diferentes cánceres e infecciones oportunistas y, generalmente, al fallecimiento del individuo infectado.

El corte y empalme intracelular es un proceso que consiste en eliminar los intrones del ARN mensajero (ARNm) para producir un ARNm maduro, utilizable por los mecanismos de traducción de la célula (Sharp, Cell, 1994, 77: 805). En el caso del corte y empalme alternativo, el mismo ARNm precursor puede ser, por escisión de algunos exones, fuente de diferentes ARNm que codifican diferentes formas de una proteína, o isoformas, que tienen unas funciones distintas (Black, Ann Rev Biochem, 2003, 72: 991). Estos eventos se denominan eventos de corte y empalme alternativos o "alternative splicing event" (ASE). La selección precisa de los sitios de corte y empalme en 5' y 3' es un mecanismo que es fuente de diversidad y que puede conducir a la regulación de la expresión de genes según el tipo tisular o durante el desarrollo del organismo.

La secuenciación del genoma humano y el análisis de los bancos EST (Expressed Sequence Tag) ha mostrado que el 65% de los genes se expresan en forma de variantes alternativamente cortadas y empalmadas (Ewin & Green, Nat Genet, 2000, 25: 232; Johnson *et al.*, Science, 2003, 302: 2141). Por otro lado, se estima que el 50% de las mutaciones puntuales implicadas en las enfermedades genéticas inducen a un corte y empalme alternativo aberrante.

Este mecanismo puede, por lo tanto, constituir una diana terapéutica interesante, y no solamente en el ámbito de las enfermedades genéticas.

Así, recientemente, se han propuesto nuevos compuestos que actúan sobre el proceso de corte y empalme alternativo para el tratamiento y/o la prevención de una infección por VIH (WO 2010/143169).

Al ser el mecanismo celular de corte y empalme una diana terapéutica particularmente interesante para el tratamiento de la infección por VIH, existe la necesidad de disponer de un biomarcador celular que permita evaluar la eficacia de activos potenciales frente a este mecanismo.

Existe también la necesidad de disponer de un biomarcador celular útil para cribar nuevos activos aptos para prevenir y/o tratar una infección por VIH, y que actúan sobre el corte y empalme alternativo.

Existe también una necesidad de disponer de un biomarcador que permite evaluar la respuesta de un individuo que padece una infección por VIH al tratamiento de esta infección.

La presente invención tiene por objeto satisfacer estas necesidades.

Así, según uno de estos primeros objetos, la presente invención se refiere a la utilización (i) de un porcentaje de expresión de una isoforma larga de una proteína RBM39, denominada RBM39L, y (ii) de un porcentaje de expresión de una isoforma corta de una proteína RBM39, denominada RBM39C, como marcador de la eficacia de un activo apto para prevenir y/o tratar una infección por VIH;

- siendo la relación entre dichos porcentajes de expresión de la isoforma larga y de dicho porcentaje de expresión de la isoforma corta indicativa de la eficacia del activo a prevenir y/o a tratar de dicha infección;

- correspondiendo dicha isoforma larga a una isoforma de la proteína RBM39 de referencia UniProtKB/Swiss Prot Q14498-1;

- correspondiendo dicha isoforma corta a una isoforma de la proteína RBM39 de secuencia SEC ID nº 3.

En el sentido de la invención, se entiende por "isoforma" una forma particular de una proteína obtenida por corte y empalme alternativo. Unas proteínas isoformas procedentes del corte y empalme alternativo de un ARNm que resulta de la transcripción de un mismo gen tiene unas secuencias peptídicas próximas, pero se diferencian las unas de las otras por la adición o la pérdida de una parte de su secuencia peptídica, que resulta de la

inclusión o de la exclusión de un exón.

En el sentido de la invención, se entiende por "transcrito" un ácido ribonucleico (ARN) que resulta de la transcripción de un gen. Un gen puede dar varios transcritos o ARNm por corte y empalme alternativo, codificando cada uno una isoforma, obtenida después de la traducción del ARNm.

En el sentido de la invención, se entiende por "expresión" de una isoforma de una proteína, (i) o bien la síntesis de un ARNm que codifica dicha isoforma proteica, por transcripción del gen correspondiente, (ii) o bien la síntesis de dicha isoforma proteica por traducción y, llegado el caso, modificación post-traducciona del ARNm que codifica dicha isoforma proteica.

En el sentido de la invención, se entiende por "marcador" celular o "biomarcador" un constituyente de una célula o de un tejido que se puede determinar directa o indirectamente, por ejemplo por visualización directa o después de la extracción y del marcado, por ejemplo con un marcador fluorescente o isotópico, o también mediante un método de determinación, y que es indicativo de un estado fisiológico, bioquímico o morfológico de dicha célula o de dicho tejido. Así, un marcador celular o un biomarcador se puede utilizar para calificar un estado fisiológico, bioquímico o morfológico de un individuo que lo necesita o de un tejido biológico de dicho individuo.

En el sentido de la invención, se entiende por "prevenir" referirse a la acción de reducir el riesgo de aparición de un evento.

De manera inesperada, los inventores han observado un deslazamiento del evento de corte y empalme alternativo (ASE) del ARNm procedente de la transcripción del gen RBM39 hacia el ARNm que codifica la isoforma larga, ARNmL, con respecto a un ARNm que codifica la isoforma corta, ARNmC, de la proteína RBM39, durante el tratamiento de células mononucleares de la sangre periférica por unos compuestos activos con respecto a una infección por VIH. Resulta que la relación del porcentaje de transcripción del ARNmL con la suma de los porcentajes de transcripción de los ARNmL y ARNmC procedentes del gen RBM39 se puede realizar como marcador sensible y específico de la eficacia de agentes activos con respecto a una infección por VIH.

Los agentes activos considerados en la invención son unos agentes que se supone que son activos con respecto al VIH y que se supone que son aptos para afectar al corte y empalme alternativo de los genes, y en particular al ratio de los diferentes ARNm transcritos, y por lo tanto al ratio de las diferentes isoformas proteicas producidas.

Según otro aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento de cribado *in vitro* o *in vivo* de un activo que se supone que previene y/o trata una infección por VIH que comprende al menos las etapas que consisten en:

a- poner en contacto:

i- al menos una célula que conviene a la transcripción, por corte y empalme alternativo, de un ARNm que codifica una isoforma larga ARNmL, y de un ARNm que codifica una isoforma corta, ARNmC, de una proteína RBM39, estando dicha célula dispuesta en condiciones propicias a dicha transcripción, y

ii- un activo a cribar,

en condiciones propicias para la observación de un eventual efecto de dicho activo sobre la transcripción de un gen RBM39,

b- determinar un porcentaje de transcripción de dicha isoforma corta y un porcentaje de transcripción de dicha isoforma larga de dicho gen RBM39,

c- determinar una relación entre los porcentajes de transcripción determinados en la etapa b),

d- comparar dicha relación obtenida en la etapa c) con una relación de referencia;

correspondiendo dicha isoforma larga a una isoforma de la proteína RBM39 de referencia UniProtKB/Swiss-Prot Q14498-1;

- correspondiendo dicha isoforma corta a una isoforma de la proteína RBM39 de secuencia SEC ID nº 3.

Las utilizaciones y procedimientos descritos convienen a una utilización *in vitro*, *ex vitro* o *in vivo*, y en particular *in vitro* o *ex vivo*.

Según también otro de estos objetos, la presente invención se refiere a un procedimiento de evaluación de la eficacia de un activo destinado a prevenir y/o tratar una infección por VIH en un individuo que lo necesita que comprende al menos las etapas que consisten en:

a- determinar, en una muestra biológica aislada de dicho individuo, antes del tratamiento con dicho activo, un porcentaje de expresión de una isoforma larga de una proteína RBM39, RBM39L, y un porcentaje de expresión de una isoforma corta de una proteína RBM39, RBM39C,

5 b- determinar una relación entre los porcentajes de expresión determinados en la etapa a),

c- determinar, en una muestra biológica aislada de dicho individuo, después del tratamiento con dicho activo, un porcentaje de expresión de una isoforma larga de una proteína RBM39, RBM39L, y un porcentaje de expresión de una isoforma corta de una proteína RBM39, RBM39C,

10

d- determinar una relación entre los porcentajes de expresión determinados en la etapa c), y

e- comparar dicha relación obtenida en la etapa d) con dicha relación obtenida en la etapa b);

15 - correspondiendo dicha isoforma larga a una isoforma de la proteína RBM39 de referencia UniProtKB/Swiss-Prot Q14498-1;

- correspondiendo dicha isoforma corta a una isoforma de la proteína RBM39 de secuencia SEC ID nº 3.

20 Según algunos modos de realización del procedimiento anterior, dichos porcentajes de expresión consisten respectivamente en (i) un porcentaje de transcripción de un ARNm que codifica una isoforma larga, ARNmL, y (ii) un porcentaje de transcripción de un ARNm que codifica una isoforma corta, ARNmC, de una proteína RBM39.

25 Según algunos otros modos de realización del procedimiento anterior, dichos porcentajes de expresión consisten respectivamente en (i) un porcentaje de producción de una isoforma larga, ProtL, y en (ii) un porcentaje de producción de una isoforma corta, ProtC, de una proteína RBM39.

30 En el sentido de la invención, se entiende por "muestra biológica aislada" referirse a cualquier muestra biológica obtenida y aislada de un individuo, y que se presume que es conveniente para la determinación de un porcentaje de transcripción de las isoformas larga y corta de la proteína RBM39.

Por ejemplo, una muestra biológica aislada que conviene a la invención puede ser una extracción sanguínea y puede comprender unas células mononucleares.

35 También según otro de estos objetos, la presente invención se refiere a una utilización de un kit tal como se define en la reivindicación 14, comprendiendo dicho kit al menos un par de cebadores de ácidos nucleicos que convienen a la determinación de un porcentaje de transcripción de un ARNm que codifica una isoforma larga, ARNmL, y un porcentaje de transcripción de un ARNm que codifica una isoforma corta, ARNmC, de una proteína.

40 La presente invención tiene por ventaja proponer un nuevo marcador celular sensible, específico, y reproducible para calificar la eficacia de agentes activos con respecto al VIH y que actúa sobre el corte y empalme alternativo.

La presente invención tiene también por ventaja proponer unos métodos sensibles, rápidos y simples de determinación de la eficacia de agentes activos con respecto a una infección por VIH.

45

Proteína RBM39

50 La proteína RBM39 (o RNA-binding protein 39) está presente en el núcleo en el que está colocalizado con unas proteínas del núcleo espirosomal. Es una proteína que liga el ARN que funciona al mismo tiempo como un factor de corte y empalme y como factor de regulación de la transcripción de los genes (Dowhan *et al.*, Mol Cell, 2005, 17:429). Unos estudios de la proteína paróloga en el ratón sugieren que esta proteína puede actuar como un co-activador de la transcripción para JUN/AP-1 y los receptores de los estrógenos (Jung *et al.*, J Biol Chem, 2002, 277:1229). RBM39 está también implicado como co-factor oncogénico (Dutta *et al.*, J Virol, 2008, 82:10792) y está implicado en el corte y empalme alternativo del factor de angiogénesis VEGF (Dowhan *et al.*, 2005). Finalmente, RBM39 ha sido recientemente identificado como factor que interactúa con la proteína tat del VIH mediante una estrategia de proteómica basada en una cromatografía de afinidad acoplada a un espectrómetro de masa (Gautier *et al.*, Retrovirology, 2009, 6: 47).

60 Se precisa que el gen RBM39 está constituido del ácido nucleico que va del nucleótido en posición 34330259 hasta el nucleótido en posición 34291128 de la hebra "menos" del cromosoma 20 humano tal como se referencia en la base de datos Genbank.

65 Se conoce una pluralidad de isoformas de la proteína RBM39. La pluralidad de isoformas de la proteína RBM39 resulta de la existencia de una gran variedad de productos de transcripción del gen *RBM39*, debido a eventos de corte y empalme alternativos. Se censan hoy en día aproximadamente 57 ARNm distintos y aproximadamente 34 isoformas de la proteína RBM 39. Se documentan a continuación exclusivamente (i) la isoforma larga y (ii) la

isoforma corta, cuyos porcentajes de expresión se utilizan como marcador para la presente invención.

Una primera isoforma, denominada "isoforma larga" con fines de la presente descripción, o isoforma 1 o HCC1.4 (referencia UniProtKB/Swiss-Prot Q14498-1) comprende 530 aminoácidos y posee un peso molecular de aproximadamente 59 380Da.

Dicha isoforma larga está codificada por un ARNm, denominado ARNmL, cuya secuencia en nucleótido es conocida (referencias Genbank "transcript_id: NM_184234.2", "db_xref: GI:336176061"; "db_xref: GeneID:9584"; "db_xref: HGNC:15923"; "db_xref: HPRD:09201"; "db_xref: MIM:604739").

Una segunda isoforma, denominada "isoforma corta" con fines de la presente descripción, comprende 40 aminoácidos y posee un peso molecular de aproximadamente 4500 Da. Dicha isoforma corta está representada por la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 3.

La isoforma corta resulta de un corte y empalme alternativo que provoca la introducción de un exón adicional, entre el exón nº 2 y el exón nº 3, presentes en el ARNm que codifica la isoforma larga. El exón adicional (exón "nº 3" presente en el ARNm que codifica la isoforma corta) provoca (i) un cambio del cuadro de lectura y (ii) la introducción de un codón de terminación.

Dicha isoforma corta está codificada por un ARNm, denominado ARNmC. Más precisamente, la isoforma corta de secuencia SEC ID nº 3 está codificada por una pluralidad de ARN mensajeros que resultan todos de un evento de inserción de dicho exón adicional que provoca un cambio del cuadro de lectura y la introducción de dicho codón de terminación. Los diferentes ARN mensajeros que codifican la isoforma corta de RBM39 de secuencia SEC ID nº 3 son colectivamente designados "ARNmC" en la presente descripción.

La secuencia de aminoácidos que va del resto en posición 1 hasta el resto en posición 17 de la secuencia de la isoforma corta de SEC ID nº 3 es idéntica a la secuencia de aminoácidos que va del resto en posición 1 hasta el resto en posición 17 de la secuencia de 530 aminoácidos de la isoforma larga (referencia UniProtKB/Swiss-Prot Q14498-1). Por el contrario, debido al cambio del cuadro de lectura generado por la presencia del exón adicional en ARNmC, la secuencia que va del resto 18 hasta el resto 40 de la isoforma corta de secuencia SEC ID nº 3 difiere de la secuencia correspondiente de dicha isoforma larga.

Se muestra según la invención que, cuando el gen RBM 39 está transcrito de manera fisiológica en las células del sistema inmunitario, los ARNm /colectivamente ARNmC) que codifican para la isoforma corta son transcritos de manera predominante con respecto al ARNm que codifica la isoforma larga.

Se precisa que no hay específicamente ninguna relación entre (i) la longitud de una isoforma de la proteína RBM39 y (ii) la longitud del ARNm que codifica dicha isoforma. A título ilustrativo, el ARNmL que codifica la isoforma larga de RBM39 es más corto que los ARNmC que codifican la isoforma corta de RBM39. La longitud incrementada de ARNmC, con respecto a ARNmL, resulta de la presencia del exón adicional que genera un codón de terminación precoz en ARNmC.

Se precisa que ARNmL se puede discriminar fácilmente de los ARN mensajeros que codifican la isoforma corta (colectivamente ARNmC) debido a la longitud más corta del ARNmL, con respecto a la longitud de cada uno de los ARN mensajeros que codifican la isoforma corta.

Así, un desplazamiento del equilibrio de transcripción del gen que codifica RBM39 hacia una reducción del porcentaje de transcripción del ARNmL comparado al porcentaje de transcripción del ARNmC puede indicar una modificación de los mecanismos de corte y empalme alternativo que afecta la transcripción de este gen, y más globalmente de la fisiología de la célula y de las infecciones susceptibles de afectarla.

Se precisa que un desplazamiento del equilibrio de transcripción del gen que codifica RBM39 hacia una reducción del porcentaje de transcripción del ARNmL comparado con el porcentaje de transcripción del ARNmC induce paralelamente a un desplazamiento del equilibrio de la síntesis o producción de la proteína RBM39 hacia una reducción del porcentaje de producción de la isoforma larga ProtL, comparado con el porcentaje de producción de la isoforma corta ProtC.

Utilizaciones y procedimientos

Las utilizaciones y los procedimientos de la invención pueden, en particular, convenir para calificar o cribar un agente supuestamente activo con respecto a una infección por VIH, o pueden convenir a la determinación de la eficacia de un tratamiento de un individuo que tiene una infección por VIH mediante estos activos.

Un aspecto de la invención comprende la determinación de los porcentajes de expresión de las isoformas cortas (RBM39C) y larga (RBM39L) de una proteína RBM39.

Este aspecto comprende la determinación de los porcentajes de transcripción de los ARNm que codifican las isoformas corta (ARNmC) y larga (ARNmL) de una proteína RBM39.

Este aspecto de la invención comprende también la determinación del porcentaje de producción de las isoformas larga, denominada ProtL, y corta, denominada ProtC, de una proteína RBM39.

El porcentaje de transcripción de los ARNmC y ARNmL se puede determinar midiendo la cantidad de ARNm correspondiente directamente producido por la célula, o se puede determinar sobre el ADN obtenido por transcripción inversa del ARNm mediante un método que permite conservar la proporción de los diferentes ARNm.

El porcentaje de producción de los ProtC y ProtL se puede determinar midiendo la cantidad de proteína correspondiente producida por la célula, por ejemplo con la ayuda de método que utilizan (i) o bien unos medios detectables que reconocen específicamente al mismo tiempo las dos isoformas ProtC y ProtL de una proteína RBM39, (ii) o bien unos medios detectables que reconocen específicamente una sola de las dos isoformas ProtC y ProtL de una proteína RBM39, las cuales se pueden utilizar en combinación.

Según un aspecto de la invención, la determinación de los porcentajes de transcripción de los ARNm puede llevarse a cabo sobre el ARNm entero o sobre una porción característica del ARNm. Una porción característica es una porción que incluye todo o parte del o de los exones que son el objeto del corte y empalme alternativo.

Ventajosamente, la determinación de los porcentajes de transcripción se puede efectuar sobre una porción característica de los ARNmC y ARNmL procedente de la transcripción del gen RBM39 mediante un procedimiento que comprende una etapa de amplificación específica de esta porción.

Los métodos de detección y de medición de cantidad del ARN o del ADN son conocidos por el experto en la técnica. Estos métodos abarcan los métodos de RT-PCT (por "Reverse transcriptase PCR") y de qRT-PCR (por "quantitative Reverse Transcriptase PCR") y de Real-Time PCR. Para la realización de estos métodos, el experto en la materia podrá referirse en particular a los trabajos de Wang *et al.* (1989, Proc Natl Acad Sci USA, Vol. 86: 917-921), de Wong *et al.* (2005, Bio Techniques, Vol. 39 (1): 75-85), de Nolan *et al.* (2006, Nat Protoc, Vol. 1(3): 1559-1582) y de Klinck *et al.* (2008, Cancer Research, Vol. 68: 657-663), o también a una revista general de estas técnicas publicadas por Bustin (2000, Journal of Molecular Endocrinology, Vol. 25: 169-193).

El conjunto de estos métodos comprenden (i) una etapa de extracción de los ARNm celulares, (iii) una etapa de transcripción inversa del ARNm en ADN con la ayuda de una enzima transcriptasa inversa y (iii) una etapa de amplificación del ADN obtenido en la etapa anterior, utilizando unos cebadores nucleotídicos apropiados, antes de la cuantificación del ADN amplificado. En general, están simultáneamente amplificados a partir de la misma muestra (a) el ADN obtenido por transcripción inversa del ARNm de interés y (b) un ADN o una pluralidad de ADN obtenidos por transcripción inversa de ARNm expresados de manera constitutiva y constante por las células ("housekeeping genes"), tales como los ARN codificados por los genes *MRPL19*, *PUM1* y *GADPH*.

El ADN amplificado se puede cuantificar, después de la separación por electroforesis y, por medición de las bandas de ADN, y los resultados para el o los ARNm de interés expresados en valores relativos por comparación con los ARNm codificados por los genes "housekeeping". En algunos modos de realización, la etapa de separación de los ADN amplificados se realiza por electroforesis sobre gel de agarosa, después coloración de las bandas de ADN con bromuro de etidio, antes de la cuantificación de los ADN contenida en las bandas de migración por densitometría. En otros modos de realización, se utiliza un dispositivo de micro-canales en el que se realiza una separación de los ADN amplificados por electroforesis capilar, después una cuantificación de los diferentes ADN separados por medición de la señal emitida por estos ADN después de la iluminación por un haz láser. Tal dispositivo puede ser el aparato LabChip®, por ejemplo de la serie "GX" comercializado por la compañía Caliper LifeSciences (Hopkinton, MA, Estados Unidos).

En algunos modos de realización, la determinación de los porcentajes de transcripción de los ARNm puede comprender una etapa de amplificación conjunta de los ADNc que resulta de la transcripción inversa de los ARNmL y ARNmC con la ayuda de un par único de cebadores nucleotídicos, siendo los dos tipos de ADNc amplificados después separados, preferiblemente por electroforesis.

En otros modos de realización, la determinación de los porcentajes de transcripción de los ARNm puede comprender una etapa de amplificación de una porción característica de los ARNmL y ARNmC procedente de la transcripción del gen RBM39, con la ayuda de dos pares de cebadores distintos, respectivamente para los ADNc obtenidos a partir de cada uno de los ARNmL y ARNmC.

Se pueden utilizar diferentes cebadores sentido y antisentido en una reacción de RT-PCR que conviene a la invención, con la condición de que enmarcan también el exón que es objeto de la inclusión o de la exclusión. La elección de los cebadores sentido y antisentido se puede guiar también por la diferencia de longitudes entre los transcritos procedentes de los ARNmL y ARNmC a amplificar. La diferencia de longitud se puede ajustar según el método de separación de los transcritos amplificados y del grado de resolución que permite obtener.

Ventajosamente, unos cebadores que son convenientes para la invención se pueden seleccionar para amplificar una porción de ARNm de RBM39 susceptible de incluir el exón adicional, y que comprende a cada lado de este exón 18 nucleótidos.

Ventajosamente, la diferencia de tamaño entre los transcritos procedentes de los ARNmL y ARNmC procedente de la transcripción del gen RBM39 es de 73 nucleótidos.

En unos modos de realización ventajosos, un par de cebadores se selecciona de tal manera que:

- un primer cebador hibrida específicamente con la región de un ARNm procedente de la transcripción del gen RBM39 que corresponde al exón nº 1 (exón referenciado nº 1 en el ARNmL que codifica la isoforma larga). El exón nº 1 consiste en el ácido nucleico que va del nucleótido en posición 5001 hasta el nucleótido en posición 5396 de la secuencia del gen RBM39 (referencia Genbank nº NG_029955), y

- un segundo cebador hibrida específicamente con la región de un ARNm procedente de la transcripción del gen RBM39 que corresponde al exón nº 3 (exón referenciado nº 3 en el ARNmL que codifica la isoforma larga). El exón nº 3 consiste en el ácido nucleico que va del nucleótido en posición 6740 hasta el nucleótido en posición 6812 de la secuencia del gen RBM39 (referencia Genbank nº NG_029955).

Unos cebadores sentido y antisentido que convienen a la invención se pueden obtener mediante cualquier procedimiento conocido por el experto en la técnica en el campo, en particular como se describe por Sambrook *et al.* (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3ª Ed., 2001, Cold Spring Harbour, N. Y.).

En algunos modos de realización, se utiliza un par de cebadores nucleotídicos que comprenden respectivamente las secuencias SEC ID nº 1 y SEC ID nº 2. El cebador nucleotídico de secuencia SEC ID nº 1 hibrida con una región de un ARNm procedente de la transcripción del gen RBM39, que comprende el exón 3 de dicho gen (hibrida con la secuencia complementaria del ácido nucleico que comprende los nucleótidos 34329893 a 34329912 de la hebra "menos" del cromosoma 20 según GenBank). El cebador nucleotídico de secuencia SEC ID nº 2 hibrida con una región de un ARNm procedente de la transcripción del gen RBM39, que comprende el exón 1 de dicho gen (hibrida con la secuencia complementaria del ácido nucleico que comprende los nucleótidos 34326905 a 34326922 de la hebra "menos" del cromosoma 20 según GenBank).

Según un aspecto de la invención, las determinaciones de los porcentajes de transcripción de los ARNmL y ARNmC procedentes de la transcripción del gen RBM39 se pueden realizar en forma de una relación.

Ventajosamente, esta relación se puede determinar estableciendo una relación entre un porcentaje de transcripción del ARNm que codifica una isoforma larga de una proteína RBM39 y un porcentaje de transcripción del ARNm que codifica una isoforma corta de una proteína RBM39.

De manera más ventajosa aún, se puede establecer una relación entre un porcentaje de transcripción del ARNm que codifica una isoforma larga de una proteína RBM39 y la suma de los porcentajes de transcripción de los ARNm que codifican las isoformas larga y corta de una proteína RBM39. Esta relación permite determinar un valor en porcentaje de corte y empalme (Ψ).

Según otro aspecto de la invención, una relación así determinada se puede comparar con una relación de referencia.

En el sentido de la invención, se entiende por "relación de referencia" referirse a una relación determinada mediante el porcentaje de transcripción de ARNm medidos en condiciones de base o calificado de fisiológicamente normal.

Por ejemplo, tales porcentajes de transcripción se pueden determinar en células dispuestas en unas condiciones fisiológicas o unas condiciones que imitan unas condiciones fisiológicas, y en ausencia de factores externos susceptibles de afectar estas condiciones. Un factor externo considerado en la invención puede ser un agente activo supuestamente eficaz para prevenir y/o tratar una infección por VIH.

Una relación de referencia se puede obtener paralelamente a la relación determinada en presencia de factor externo susceptible de afectar la transcripción de los ARNm de interés, o se puede determinar anteriormente, incluso posteriormente.

Una relación de referencia se puede almacenar sobre un soporte, por ejemplo electrónico, para constituir una base de datos denominada de referencia.

Según un aspecto de la invención, durante la realización de la invención para evaluar la eficacia de un activo apto para prevenir y/o tratar una infección por VIH, se puede obtener una relación de referencia mediante determinación del porcentaje de transcripción de los ARNm de interés en ausencia del activo cuya eficacia está por evaluar.

En particular, durante la realización de la invención para cribar un activo que se supone que previene y/o trata una infección por VIH, se puede determinar una relación de referencia reproduciendo el protocolo de cribado en ausencia del activo a cribar.

En particular, durante la realización de la invención para evaluar la eficacia de un activo destinado a prevenir y/o tratar una infección por VIH en un individuo que lo necesita, se puede determinar una relación de referencia en una muestra biológica aislada obtenida de dicho individuo antes de la administración del activo.

Alternativamente, una relación de referencia se puede determinar en un conjunto de individuos no sometidos al tratamiento cuya eficacia está por evaluar.

Durante la realización de la invención para evaluar la eficacia de un activo destinado a prevenir y/o tratar una infección por VIH en un individuo que lo necesita, la relación de referencia puede, llegado el caso, correlacionarse con otros parámetros del paciente, tal como su edad, su peso u otros parámetros fisio-patológicos.

Una desviación entre una relación determinada en presencia de un factor susceptible de afectar el porcentaje de transcripción de los ARNm de interés, tal como un agente activo, y una relación de referencia puede ser indicativa de un eventual efecto de dicho factor, tal como dicho agente activo.

Tal desviación puede ser indicativa de un desplazamiento del evento de corte y empalme alternativo del porcentaje de transcripción del ARNmL hacia el porcentaje de ARNmC, de los ARNm procedentes de la transcripción del gen RBM39. Tal desplazamiento puede ser indicativo de un eventual efecto del factor estudiado, tal como la eficacia de un agente supuestamente activo con respecto a una infección por VIH y que actúa sobre los mecanismos de corte y empalme alternativos.

Tal desviación puede resultar de una disminución del valor de la relación entre un porcentaje de transcripción del ARNm que codifica una isoforma larga de una proteína RBM39 y la suma de los porcentajes de transcripción de los ARNm que codifica las isoformas larga y corta de una proteína RBM39.

Según un aspecto de la invención, una desviación entre una relación de los porcentajes de transcripción de los ARNmL y ARNmC que codifican una proteína RBM39 determinada en presencia de un agente supuestamente activo con respecto al VIH y una relación de referencia puede ser indicativa de un eventual efecto de dicho agente activo con respecto al VIH.

Según otro aspecto de la invención, una desviación entre una relación de los porcentajes de transcripción de los ARNmL y ARNmC que codifican una proteína RBM39 determinada en un individuo tratado con un agente supuestamente activo con respecto al VIH y una relación de referencia puede ser indicativa de un eventual efecto de dicho agente activo con respecto al VIH o de una sensibilidad del individuo al tratamiento.

Según el grado de desviación observado, un individuo tratado se puede calificar de resistente, de débilmente resistente, de débilmente sensible, o de sensible al tratamiento.

Así, una realización de la invención puede también permitir determinar la resistencia, incluso el grado de resistencia, o la sensibilidad o el grado de sensibilidad del VIH que infecta un individuo al tratamiento destinado a administrarse a dicho individuo.

Según otro aspecto, la invención se puede realizar para seguir la progresión de la resistencia del VIH al tratamiento anti-VIH en un individuo que presenta una infección por VIH.

Tal modo de realización puede comprender la obtención de una primera muestra biológica aislada de un individuo que presenta una infección por VIH y sometido a un tratamiento anti-VIH a un tiempo t_0 , la determinación de una relación de los porcentajes de transcripción de los ARNmL y ARNmC que codifican una proteína RBM39, y la comparación de la relación obtenida con respecto a los porcentajes de transcripción de los ARNmL y ARNmC que codifican una proteína RBM39 determinada en una segunda muestra biológica aislada de dicho individuo a un tiempo ulterior t_1 .

La observación de una desviación o de una ausencia de desviación entre las dos relaciones determinadas puede ser indicativa con la progresión o la ausencia de progresión de la infección por VIH al tratamiento anti-VIH. La obtención de muestras biológicas aisladas adicionales de dicho individuo y la determinación de las relaciones de los porcentajes de transcripción de los ARNmL y ARNmC que codifican una proteína RBM39 se puede efectuar tantas veces como se desea. La posibilidad de seguir un individuo afectando una serie de determinaciones de relaciones de porcentajes de transcripción de los ARNmL y ARNmC que codifican una proteína RBM39 a lo largo del tiempo se puede utilizar para seguir la progresión de la resistencia de una infección por VIH al tratamiento administrado.

Según otra variante preferida de realización, un procedimiento de la invención puede utilizar una célula selecciona

entre las células mononucleadas de la sangre periférica, unas células HeLa, Jurkat, CEM o cualquier otra célula susceptible de infectarse por el virus del SIDA.

Según otra variante preferida de realización, en un procedimiento de la invención, los porcentajes de transcripción de las isoformas corta y larga del gen RBM39 se pueden obtener mediante un método seleccionado entre RT-PCR, RTqPCR.

Según otros modos de realización de un procedimiento de la invención, los porcentajes de expresión de la isoforma larga RBM39L y de la isoforma corta RBM39C de la proteína RBM 39 consisten respectivamente en (i) un porcentaje de producción de una isoforma larga, denominada ProtL, y en (ii) un porcentaje de producción de una isoforma corta, denominada ProtC, de una proteína RBM39.

En estos modos de realización, dichos porcentajes de expresión son determinados por unos métodos que comprenden una etapa de cuantificación de ProtL y ProtC producidas por las células.

Típicamente, las isoformas ProtL y ProtC se pueden detectar y cuantificar con la ayuda de compuestos ligandos que reconocen específicamente (i) o bien indiferentemente las dos isoformas ProtL y ProtC, (ii) o bien específicamente una sola de las dos isoformas ProtC y ProtL, en tal caso se necesitan dos compuestos ligandos específicos respectivamente de la isoforma ProtL y de la isoforma ProtC.

Los compuestos ligandos de las isoformas ProtC y ProtL se pueden seleccionar entre los anticuerpos, los aptámeros nucleicos y los aptámeros proteicos, cuyos métodos de obtención son bien conocidos por el experto en la materia.

En particular, unos aptámeros nucleicos que se unen específicamente a la isoforma ProtL, llegado el caso a la isoforma ProtC, o también a las dos isoformas ProtL y ProtC, se pueden obtener según la técnica SELEX descrita por ejemplo en las patentes americanas n° US 5,475,096 y n° 5,270,163.

Según una gran variedad de técnicas conocidas por el experto en la materia se pueden también preparar unos anticuerpos dirigidos específicamente contra cada una de las isoformas ProtL y ProtC, y unos anticuerpos que reconocen específicamente al mismo tiempo las dos isoformas ProtC y PRotL. Tales anticuerpos abarcan los anticuerpos policlonales y los anticuerpos monoclonales, incluso los anticuerpos obtenidos por recombinación genética. Los anticuerpos se pueden obtener según la enseñanza de Kohler y Milstein (1975, Nature, Vol. 256: 495-497). Se pueden obtener según unas técnicas de clonación genética a partir de una célula linfocitaria única de un animal inmunizado de manera apropiada, como se describe por Babcook *et al.* (1996, Proc Natl Acad Sci USA, Vol. 93(15): 7843-78841) o también en las solicitudes PCT n° WO 92/02551, WO 2004/051268 y WO 2004/106377. Pueden ser unos anticuerpos recombinantes, en particular unos anticuerpos humanizados, y se pueden obtener mediante las técnicas descritas en la patente americana n° US 5,585,089 o en la solicitud PCT n° WO 91/09967, o también en los documentos de patente EP0546073, US 5,545,806, US 5,569,825, US 5,625,126, US 5,633,425, US 5,661,016, US 5,770,429, EP 0438474 y E P0463151.

Numerosos anticuerpos que reconocen específicamente la proteína RBM39, y en particular unas regiones específicas de la proteína RBM39 están disponibles en el comercio. Se puede utilizar por ejemplo uno cualquiera de los anticuerpos anti-RBM39 humano comercializado por la compañía Sigma Aldrich, y en particular los anticuerpos referenciados respectivamente #SAB2101959, #SAB2103105 y #HPA001591. Se pueden utilizar también "Caper (P14)" comercializado por la compañía Santa Cruz Biotechnology Inc.

Están asimismo disponibles en el comercio unos dispositivos de ensayo ELISA para la detección o la cuantificación de la proteína RBM39.

En algunos modos de realización de un procedimiento según la invención, se utiliza un anticuerpo que reconoce específicamente la región C-terminal de la proteína RBM39 (isoforma PRotL). Como anticuerpo que reconoce la parte C-terminal de RBM39, se puede utilizar por ejemplo el anticuerpo #A300-353A que reconoce el epítipo comprendido en la región 480-530, comercializado por la compañía Bethyl Laboratories (Montgomeryn TXn USA). Alternativamente, se puede utilizar el anticuerpo #IHC-00022 también comercializado por la compañía Bethyl Laboratories, que reconoce la región 325-375 de la proteína RBM39.

Las isoformas ProtL y ProtC se pueden detectar y cuantificar según unas técnicas bien conocidas por el experto en la materia, como por ejemplo según una técnica de inmunotransferencia (también designada "Western Blotting"). Típicamente, las proteínas celulares son sometidas, después de la extracción, a una etapa de migración sobre gel de electroforesis, después las bandas proteicas son incubadas con el anticuerpo anti-RBM39, o bien con una combinación de anticuerpos que reconocen respectivamente ProtL y ProtC. Las isoformas ProtL y ProtC se pueden distinguir según su posición de migración sobre el gel de electroforesis. Después, las isoformas ProtL y ProtC son cuantificadas, por ejemplo por medición de una señal detectable emitida por los anticuerpos utilizados, por ejemplo por medición de fluorescencia si los anticuerpos anti-RBM39, o bien unos segundos anticuerpos anti-anticuerpos si se utilizan unos segundos anticuerpos, se marcan con la ayuda de un cromóforo o un fluoróforo, o bien por medición de absorbancia si dichos anticuerpos se acoplan a una enzima capaz de catalizar la formación de un producto que

absorbe la luz a una longitud de onda dada.

La presente invención se refiere a un procedimiento de cribado *in vitro* o *ex vivo* de un activo que se supone que previene y/o trata una infección por VIH que comprende al menos las etapas que consisten en:

a- poner en contacto:

i- al menos una célula que conviene a la producción, por corte y empalme alternativo del ARNm, de una isoforma larga de la proteína RBM39, ProtL, y de una isoforma corta de la proteína RBM39, ProtC, estando dicha célula dispuesta en condiciones propicias para dicha producción, y

ii- un activo a cribar,

en condiciones propicias para la observación de un eventual efecto de dicho activo sobre la transcripción de un gen RBM39,

b- determinar un porcentaje de producción de dicha isoforma corta y un porcentaje de producción de dicha isoforma larga de dicha proteína RBM39,

c- determinar una relación entre los porcentajes de producción determinados en la etapa b),

d- comparar dicha relación obtenida en la etapa c) con una relación de referencia.

En el sentido de la invención, se entiende por "relación de referencia", en el contexto del procedimiento anterior, referirse a una relación determinada mediante porcentajes de producción de proteínas medidos en condiciones de base o calificado de fisiológicamente normal.

Ventajosamente, esta relación se puede determinar estableciendo una relación entre un porcentaje de producción de la isoforma larga de una proteína RBM39 y un porcentaje de producción de la isoforma corta de una proteína RBM39.

De manera aún más ventajosa, se puede establecer una relación entre un porcentaje de producción de la isoforma larga de una proteína RBM39 y la suma de los porcentajes de producción de las isoformas larga y corta de una proteína RBM39. Esta relación permite determinar un valor en porcentaje de corte y empalme (Ψ).

Los detalles de realización de los procedimientos anteriores con los valores de porcentajes de producción de las isoformas ProtL y ProtC son fácilmente determinados por el experto en la materia, a la vista de la enseñanza para la realización de los procedimientos para los cuales los porcentajes de expresión de las isoformas de la proteína RBM39 consisten en unos porcentajes de transcripción de un ARNm que codifica dichas isoformas, que se divulga en la presente descripción.

La presente invención se refiere también a un procedimiento de evaluación de la eficacia de un activo destinado a prevenir y/o tratar una infección por VIH en un individuo que lo necesita, que comprende al menos las etapas que consisten en:

a- determinar, en una muestra biológica aislada de dicho individuo, antes del tratamiento con dicho activo, un porcentaje de producción de una isoforma larga de una proteína RBM39, ProtL, y un porcentaje de expresión de una isoforma corta de una proteína RBM39, ProtC,

b- determinar una relación entre los porcentajes de producción determinados en la etapa a),

c- determinar, en una muestra biológica aislada de dicho individuo, después del tratamiento con dicho activo, un porcentaje de producción de una isoforma larga de una proteína RBM39, ProtL, y un porcentaje de producción de una isoforma corta de una proteína RBM39, ProtC,

d- determinar una relación entre los porcentajes de producción determinados en la etapa c), y

e- comparar dicha relación obtenida en la etapa d) con dicha relación obtenida en la etapa b).

Kits

Un kit que es conveniente para una utilización de la invención puede comprender al menos un par de cebadores que convienen a la determinación de un porcentaje de transcripción de un ARNm que codifica una isoforma larga, ARNmL, y de un porcentaje de transcripción de un ARNm que codifica una isoforma corta, ARNmC, de una proteína RBM39.

Los cebadores sentido y antisentido se pueden envasar en dos recipientes distintos o pueden ser envasados en un mismo recipiente. Además de estos cebadores, un kit puede comprender el conjunto de las enzimas y reactivos necesarios para la realización de los métodos de detección de los transcritos de un gen, en particular tal como se detalla anteriormente.

Un kit que conviene a una utilización de la invención puede además comprender una noticia explicativa que precisa las modalidades de determinación de una relación de los porcentajes de transcripción de un ARNm que codifica una isoforma larga, ARNmL, y de un ARNm que codifica una isoforma corta, ARNmC, de una proteína RBM39 y de comparación de la relación obtenida con una relación de referencia.

En otros modos de realización, un kit que es conveniente para una utilización de la invención puede comprender al menos un anticuerpo que reconoce al mismo tiempo la isoforma larga ProtL y la isoforma corta ProtC de la proteína RBM39, o alternativamente al menos dos anticuerpos, respectivamente un anticuerpo que reconoce específicamente la isoforma larga ProtL de la proteína RBM39 y un anticuerpo que reconoce la isoforma corta ProtC de la proteína RBM39.

Llegado el caso, el o los anticuerpos anti-RBM39 se marcan por una molécula detectable.

Llegado el caso, dicho kit comprende también unos anticuerpos, denominados segundos anticuerpos, que reconocen los anticuerpos anti-RBM39, por ejemplo unos anticuerpos que reconocen la parte Fc de los anticuerpos anti-RBM39, siendo dichos segundos anticuerpos marcados por una molécula detectable, por ejemplo una molécula cromófora, una molécula fluorófora, o también una enzima apta para catalizar la transformación de un sustrato cromógeno.

Leyenda de las figuras

Figura 1: La figura 1A ilustra los resultados obtenidos por RT-PCR y electroforesis sobre gel de agarosa con las 20 teclas, cada una no específicamente asociada a un compuesto e identificadas en el ejemplo 1, en cinco condiciones: (1) PBMC, (2) PBMC + DMSO, (3) Darunavair, (4) drug402, y (5) drug464. Las isoformas largas y cortas son visibles para la mayoría de ASE pero un desplazamiento significativo del corte y empalme hacia una u otra de las isoformas sólo se ha podido observar para los genes CKLF y RBM39.

La figura 1B ilustra una nueva determinación de ASE para los genes CKLF y RBM39 en las mismas condiciones que las utilizadas en el ejemplo 1, y sólo el corte y empalme alternativo del gen RBM39 se ha modificado de manera constante por los compuestos ensayados. La transcripción de la isoforma corta está inducida por los compuestos ensayados en detrimento de la expresión de la isoforma larga.

Los diferentes aspectos de la presente invención se ilustran por los ejemplos detallados a continuación, que no se deben interpretar, de ninguna manera que sea, como limitando el alcance de la invención.

Ejemplos

Ejemplo 1: Identificación de los porcentajes de corte y empalme alternativos de RBM39 como marcador de la eficacia de un activo útil en el tratamiento de una infección por VIH.

A. Materiales y métodos

1. Metodología general

Las reacciones de cortes y empalmes alternativos estudiados se seleccionaron tras unos cribados sucesivos de la base de datos RefSeq y considerando los cortes y empalmes alternativos conocidos por manifestarse de manera sensible y constatare en diferentes líneas celulares.

Para la búsqueda de un marcador candidato, se preseleccionaron 382 eventos de corte y empalme alternativos (Alternative Splice Event, ASE) y representan un cliché aleatorio de alto caudal de las alteraciones globales de corte y empalme alternativo. En los 382 ASE preseleccionados, sólo se han podido detectar 309 ASE de manera satisfactoria en los PBMC.

Los 309 eventos de corte y empalme alternativos (Alternative Splice Events o ASE) (eje de las y) se ensayaron por PCR efectuada sobre regiones conocidas de cortes y empalmes alternativos en doce muestras (eje de las x): PBMC (células), PBMC + DMSO (DMSO), PBMC + control (Darunavair), PBMC + compuestos ensayados (drug387, drug464, drug273, drug388, drug449, drug36, drug35, drug402, drug415). La exclusión o la inclusión de un exón conduce a dos productos de PCR diferentes: una isoforma corta y una isoforma larga.

Los compuestos drug35 y drug36 corresponden respectivamente a los compuestos C24 y C25 del documento WO 2009/087238 (WO 2009/087238, página 45). Se preparan como se describe en este documento.

Los compuestos drug387, drug464, drug273, drug388, drug449 y drug402 se describen en el documento WO 2010/143169:

- 5 - drug387 es el compuesto 77, de fórmula Ib (página 51)
- drug464 es el compuesto 90, de fórmula Ib (página 53)
- drug273 es el compuesto 6, de fórmula Ia (página 44)
- 10 - drug388 es el compuesto 112, de fórmula le (página 56)
- drug449 es el compuesto 43, de fórmula Ia (página 47)
- 15 - drug402 es el compuesto 80, de fórmula Ib (página 52)
- drug415 es el compuesto 106, de fórmula Ic (página 56).

2. Técnica utilizada

- 20 Se utilizan células mononucleadas de la sangre periférica (o PBMC: Peripheral Blood Mononuclear Cells) purificadas por centrifugación sobre cojín de Ficoll® a partir de bolsas de sangre (donantes sanos) proporcionadas por el Centro de transfusión sanguínea de París (Francia).
- 25 El ARN se extrae de las células mediante el método de Tri reagent® (Sigma) y los ADN complementarios de los ARNm (ADNc) que codifican para las isoformas largas y cortas de RBM39 se amplifican por RT (*Reverse Transcriptasa*)-PCR a fin de obtener las dos isoformas del corte y empalme ARNmL y ARNmC. Se ha utilizado el kit comercial "*First strand cDNA synthesis kit*" comercializado por la compañía GE HealthCare (Estados Unidos).
- 30 Típicamente, las reacciones de RT-PCR se han realizado con 60 ng de ARNm como sustrato en un volumen final de reacción de 50 µl final que contiene 50 pmoles de cada cebador, respectivamente (i) el cebador sentido: GCAATCTCTTCCCGAACACG (SEC ID nº 1), y (ii) el cebador antisentido TCATGGCCGTTGGCACTG (SEC ID nº 2)) y la polimerasa Taq platinum® (Compañía Invitrogen).
- 35 Las condiciones de las reacciones de amplificación del ADNc por PCR son las siguientes: (a) 2 min a 94°C después (b) 35 ciclos de 30 s con las secuencias siguientes (b1) 94°C, (b2) 55°C y (b3) 72°C, seguido de (c) 2 min de elongación a 72°C.
- 40 Los productos de PCR se analizan sobre gel de agarosa al 1,5% y los fragmentos amplificados se visualizan por coloración con bromuro de etidio.
- 45 Para cada evento de corte y empalme alternativo, se ensayaron doce condiciones: PBMC (células), PBMC + DMSO (DMSO), PBMC + control (Darunavir), PBMC + compuestos ensayados (respectivamente los compuestos siguientes: drug387, drug464, drug273, drug388, drug449, drug36, drug35, drug402, drug415).
- 50 Cada compuesto se ensaya después de la activación de las células por 100 U/ml de IL2 e infección por VIH1 como se describe en la solicitud internacional WO2010/143169 depositada el 14 de junio de 2010 bajo el nº PCT/IB2010/052651 a nombres de Splicos, del Centro Nacional de la búsqueda Científica, el Instituto Curie y de la Universidad de Montpellier 2 y en la solicitud internacional WO2010/143170 depositada el 14 de junio de 2010 bajo el nº PCT/IB2010/052652 a nombres de Splicos, del Centro Nacional de la búsqueda Científica, el Instituto Curie y de la Universidad de Montpellier 2.
- Los primeros resultados se refieren a los datos generados por 3708 reacciones de PCR.
- 55 Se calcula un porcentaje de corte y empalme en valor (ψ o Ψ) para cada reacción determinando una relación de la concentración en isoforma larga sobre la suma de las concentraciones de las isoformas cortas y largas o L/(L+S). Los valores Ψ obtenidos son alternativamente codificados en color en mapas de temperatura. El color rojo indica un desplazamiento del corte y empalme hacia la exclusión de un exón y el color verde indica un desplazamiento del corte y empalme hacia la inclusión de un exón.
- 60 Se han calculado los valores Ψ al mismo tiempo para los genes cuyo corte y empalme se ha alterado únicamente por uno o dos de los compuestos ensayados y para los otros genes cuyo corte y empalme se ha alterado por varios o la totalidad de los compuestos ensayados.
- 65 La exclusión o la inclusión de un exón conduce a dos productos de PCR diferentes: una isoforma corta y una isoforma larga.

Se ha efectuado un análisis PCR de alto caudal de estos sucesos de cortes y empalmes alternativos según la técnica descrita por Klinck *et al.* (2008, Cancer Res, 2008, 68:657).

5 B. Resultados

Los ASE se seleccionaron como significativos si más del 75% del producto de PCR ha migrado a la movilidad esperada (que califica la pureza de la reacción) y si la concentración del producto total esperado en PCR era superior a 20 nM (grado de intensidad de la reacción). Se identificaron 309 ASE satisfactorios a estas condiciones de selección en las 12 condiciones ensayadas, y se representan en mapa de temperatura en la figura 1A.

Un "punto" ASE se define para cualquier desplazamiento de ASE de más del 20% con respecto a una media determinada sobre 3 valores control. Se han definido así 40 "puntos" ASE: 20 "puntos" ASE que corresponden a un desplazamiento esporádico inducido únicamente por uno o dos compuestos solamente, denominados "puntos" ASE específicos, y "20 puntos" ASE desplazados en la misma dirección e inducidos por varios o la totalidad de los compuestos ensayados, denominados "puntos" ASE no específicos.

Los 20 "puntos" ASE no específicos se ensayaron de nuevo por RT-PCR con respecto a 5 condiciones: PBMC, PBMC + DMSO, Darunavir, drug402 y drug464.

El análisis por electroforesis sobre gel de agarosa no ha confirmado ningún desplazamiento significativo con respecto a la mayoría de los "puntos" ASE entre la muestra control y la muestra tratada, con la excepción de los "puntos" relativos a los genes RBM39 y CKLF (figura 1A).

Se han ensayado de nuevo dos "puntos" ASE que se refieren a los genes RBM39 y CKLF para las 12 condiciones iniciales (figura 1B).

Sólo el desplazamiento de ASE del gen RBM39 se ha confirmado para todos los compuestos ensayados.

Estos resultados muestran que la determinación de la transcripción de las isoformas larga y corta del gen RBM39, y en particular un desplazamiento de ASE del gen RBM39, se puede utilizar como biomarcador de la eficacia de agentes activos con respecto a una infección por VIH por acción sobre el mecanismo de corte y empalme alternativo.

35 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> SPLICOS

<120> Utilización de RBM39 como biomarcador

<130> BR97820

40 <150> FR1251980

<151> 2012-03-05

<160> 3

<170> BiSSAP 1.0

45 <210> 1

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

50 <221> fuente

<222> 1..20

<223> /mol_tipo="ADN" /nota="cebador" /organismo="Secuencia artificial "

<400> 1

gcaatctctt cccgaacacg 20

55 <210> 2

<211> 18

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

60 <220>

<221> fuente

<222> 1..18

<223> /mol_tipo="ADN" /nota="cebador" /organismo=" Secuencia artificial "

<400> 2

65 tcatggccgt tggcactg 18

```

5  <210> 3
    <211> 40
    <212> PRT
    <213> Homo sapiens
    <220>
    <221> Fuente
    <222> 1..40
    <223> /mol_tipo="proteína" /organismo="Homo sapiens"
    <400> 3
    Met Ala Asp Asp Ile Asp Ile Glu Ala Met Leu Glu Ala Pro Tyr Lys
    1          5          10          15
10  Lys Thr Cys Leu Thr Ile Ser His Leu Tyr Ser His Glu Phe Thr Phe
    20          25          30
    Asp Ser Ser Val Asn Cys Gln Ser
    35          40

```

REIVINDICACIONES

1. Utilización (i) de un porcentaje de expresión de una isoforma larga de una proteína RBM39, denominada RBM39L, y (ii) de un porcentaje de expresión de una isoforma corta de una proteína RBM39, denominada RBM39C, como
5 marcador de la eficacia de un activo apto para prevenir y/o tratar una infección por VIH;

- siendo la relación entre dicho porcentaje de expresión de la isoforma larga y dicho porcentaje de expresión de la isoforma corta indicativo de la eficacia del activo para prevenir y/o tratar dicha infección;

10 - correspondiendo dicha isoforma larga a una isoforma de la proteína RBM39 de referencia UniProtKB/Swiss-Prot Q14498-1;

- correspondiendo dicha isoforma corta a una isoforma de la proteína RBM39 de secuencia SEC ID nº 3.

15 2. Utilización según la reivindicación 1, caracterizada por que dichos porcentajes de expresión consisten respectivamente en (i) un porcentaje de transcripción de un ARNm que codifica una isoforma larga, denominada ARNmL, y (ii) un porcentaje de transcripción de un ARNm que codifica una isoforma corta, denominada ARNmC, de una proteína RBM39.

20 3. Utilización según la reivindicación 1, caracterizada por que dichos porcentajes de expresión consisten respectivamente en (i) un porcentaje de producción de una isoforma larga, denominada ProtL, y en (ii) un porcentaje de producción de una isoforma corta, denominada ProtC, de una proteína RBM39.

25 4. Utilización según una de las reivindicaciones anteriores, en la que se determina una relación del porcentaje de expresión de RBM39L a la suma de los porcentajes de expresión de RBM39L y de RBM39C.

5. Utilización según una de las reivindicaciones 1, 2 y 4, en la que los porcentajes de expresión consisten en unos porcentajes de transcripción y se determinan mediante una técnica de cuantificación con amplificación de ácidos nucleicos.

30 6. Utilización según una de las reivindicaciones 1 y 3, en la que los porcentajes de expresión consisten en unos porcentajes de producción y se determinan mediante un método de inmunodetección.

7. Procedimiento de cribado *in vitro* o *ex vivo* de un activo que supuestamente previene y/o trata una infección por
35 VIH que comprende al menos las etapas que consisten en:

a- poner en contacto:

i- al menos una célula que conviene a la transcripción, por corte y empalme alternativo, de un ARNm que codifica
40 una isoforma larga ARNmL, y de un ARNm que codifica una isoforma corta, ARNmC, de una proteína RBM39, estando dicha célula dispuesta en condiciones propicias a dicha transcripción, y

ii- un activo a cribar,

45 en condiciones propicias para la observación de un eventual efecto de dicho activo sobre la transcripción de un gen RBM39,

b- determinar un porcentaje de transcripción de un ARNmL y un porcentaje de transcripción de dicha isoforma larga de dicho gen RBM39,
50 c- determinar una relación entre los porcentajes de transcripción determinados en la etapa b),

d- comparar dicha relación obtenida en la etapa c) con una relación de referencia;

55 - correspondiendo dicha isoforma larga a una isoforma de la proteína RBM39 de referencia UniProtKB/Swiss-Prot Q14498-1;

- correspondiendo dicha isoforma corta a una isoforma de la proteína RBM39 de secuencia SEC ID nº 3.

60 8. Procedimiento según la reivindicación anterior, en el que la relación determinada en la etapa c) consiste en la relación del porcentaje de transcripción del ARNmL a la suma de los porcentajes de transcripción del ARNmL y del ARNmC.

9. Procedimiento según una de las reivindicaciones 7 u 8, en el que una desviación entre la relación obtenida en la
65 etapa c) y la relación de referencia es indicativa de un eventual efecto de dicho activo a ensayar.

10. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, en el que los porcentajes de transcripción de los ARNmL y ARNmC que codifican para una proteína RBM39 se obtienen mediante una técnica de cuantificación con amplificación de ácidos nucleicos, preferentemente un método seleccionado entre RT-PCR y RTqPCR.

5 11. Procedimiento de evaluación de la eficacia de un activo destinado a prevenir y/o tratar una infección por VIH en un individuo que lo necesita que comprende al menos las etapas que consisten en:

10 a- determinar, en una muestra biológica aislada de dicho individuo, antes del tratamiento con dicho activo, un porcentaje de expresión de una isoforma larga de una proteína RBM39, RBM39L, y un porcentaje de expresión de una isoforma corta de una proteína RBM39, RBM39C,

b- determinar una relación entre los porcentajes de expresión determinados en la etapa a),

15 c- determinar, en una muestra biológica aislada de dicho individuo, después del tratamiento con dicho activo, un porcentaje de expresión de una isoforma larga de una proteína RBM39, RBM39L, y un porcentaje de expresión de una isoforma corta de una proteína RBM39, RBM39C,

d- determinar una relación entre los porcentajes de expresión determinados en la etapa c), y

20 e- comparar dicha relación obtenida en la etapa d) con dicha relación obtenida en la etapa b);

- correspondiendo dicha isoforma larga a una isoforma de la proteína RBM39 de referencia UniProtKB/Swiss-Prot Q14498-1;

25 - correspondiendo dicha isoforma corta a una isoforma de la proteína RBM39 de secuencia SEC ID nº 3.

30 12. Procedimiento según la reivindicación 11, caracterizado por que dichos porcentajes de expresión consisten respectivamente en (i) un porcentaje de transcripción de un ARNm que codifica una isoforma larga, ARNmL, y (ii) un porcentaje de transcripción de un ARNm que codifica una isoforma corta, ARNmC, de una proteína RBM39.

35 13. Procedimiento según la reivindicación 11, caracterizado por que dichos porcentajes de expresión consisten respectivamente en (i) un porcentaje de producción de una isoforma larga, ProtL, y en (ii) un porcentaje de producción de una isoforma corta, ProtC, de una proteína RBM39.

40 14. Utilización de un kit que comprende al menos un par de cebadores de ácidos nucleicos que convienen a la determinación de un porcentaje de transcripción de un ARNm que codifica una isoforma larga, ARNmL, y un porcentaje de transcripción de un ARNm que codifica una isoforma corta, ARNmC, de una proteína RBM39, para determinar la eficacia de un activo apto para prevenir y/o tratar una infección por VIH;

- siendo la relación entre dichos porcentajes de expresión de la isoforma larga y de dicho porcentaje de expresión de la isoforma corta indicativa de la eficacia del activo a prevenir y/o a tratar de dicha infección;

45 - correspondiendo dicha isoforma larga a una isoforma de la proteína RBM39 de referencia UniProtKB/Swiss Prot Q14498-1;

- correspondiendo dicha isoforma corta a una isoforma de la proteína RBM39 de secuencia SEC ID nº 3.

50 15. Utilización de un kit que comprende al menos un anticuerpo que conviene a la determinación (i) de un porcentaje de producción de una isoforma larga, ProtL, y en (ii) de un porcentaje de producción de una isoforma corta, ProtC, de una proteína RBM39, para determinar la eficacia de un activo apto para prevenir y/o tratar una infección por VIH;

- siendo la relación entre dichos porcentajes de expresión de la isoforma larga y de dicho porcentaje de expresión de la isoforma corta indicativa de la eficacia del activo para prevenir y/o a tratar de dicha infección;

55 - correspondiendo dicha isoforma larga a una isoforma de la proteína RBM39 de referencia UniProtKB/Swiss Prot Q14498-1;

- correspondiendo dicha isoforma corta a una isoforma de la proteína RBM39 de secuencia SEC ID nº 3.

60

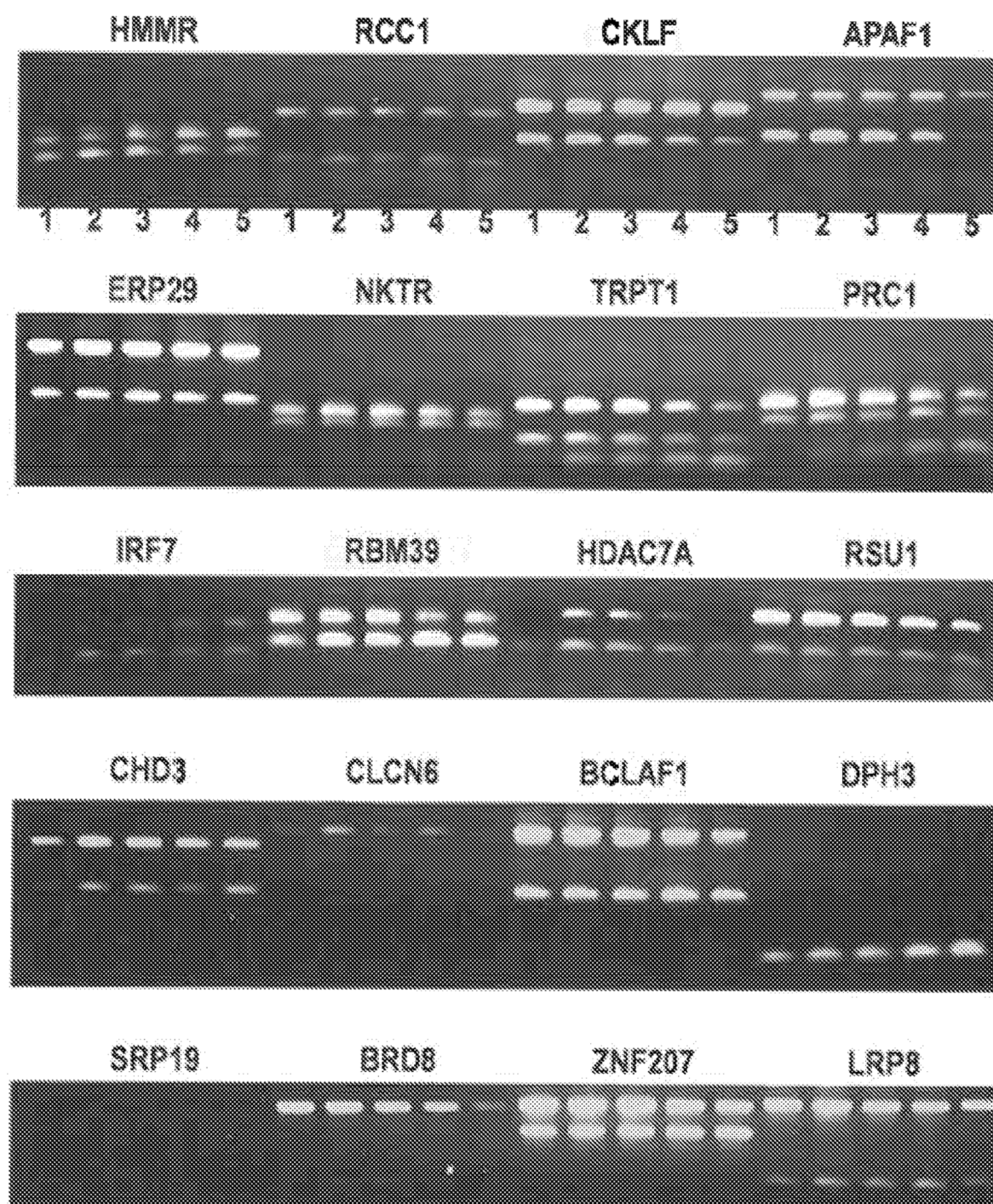


Figura 1a

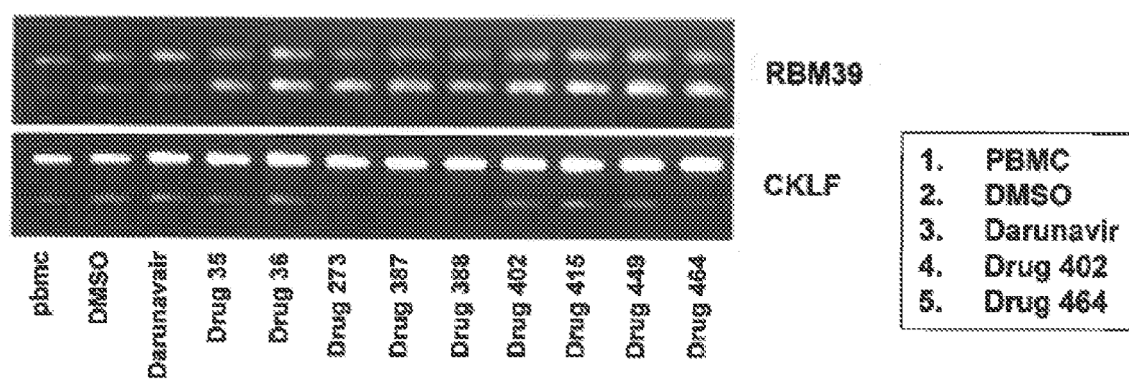


Figura 1b