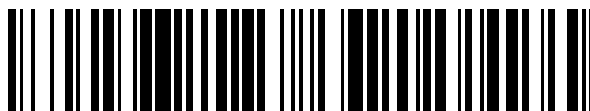


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 375 652**

51 Int. Cl.:
C12N 15/867 (2006.01)
C12Q 1/70 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **05748636 .7**
96 Fecha de presentación: **10.05.2005**
97 Número de publicación de la solicitud: **1752541**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **14.02.2007**

54 Título: **NUEVOS CLONES VIRALES RECOMBINANTES BASADOS EN EL VIH Y USO DE LOS MISMOS EN MÉTODOS ANALÍTICOS.**

30 Prioridad:
10.05.2004 ES 200401116

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
05.03.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
05.03.2012

73 Titular/es:
**FUNDACIÓN PARA LA INVESTIGACIÓN Y LA PREVENCIÓN DEL SIDA EN ESPAÑA
SINESIO DELGADO, 4
28029 MADRID, ES y
INSTITUTO DE SALUD CARLOS III**

72 Inventor/es:
**ALCAMÍ PERTEJO, José;
GARCÍA PEREZ, Javier;
SÁNCHEZ PALOMINO, Sonsoles y
GONZÁLEZ FERNÁNDEZ, Nuria**

74 Agente: **Ungría López, Javier**

ES 2 375 652 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

Nuevos clones virales recombinantes basados en el VIH y uso de los mismos en métodos analíticos.

5 **Campo técnico de la invención**

Dentro del amplio campo de la investigación que se está realizando en relación con el SIDA y más específicamente en el desarrollo de nuevas familias de fármacos, la presente invención se centra en la generación de algunos de los nuevos clones virales recombinantes basados en el genoma del Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) destinados para usarse ventajosamente en ensayos de sensibilidad a fármacos, ensayos de detección de anticuerpos neutralizantes, estudio de tropismo y capacidad replicativa viral y métodos de selección y caracterización de compuestos con actividad antiviral, etc.

15 **Estado de la técnica anterior a la invención**

En los últimos cinco años la evolución clínica de los pacientes infectados por el VIH ha mejorado espectacularmente gracias a la introducción de nuevas familias de fármacos antirretrovirales (Havir y Lange, 1998), y en consecuencia se ha producido una disminución en el número de casos de SIDA, de incidencia de infecciones oportunistas y de mortalidad como resultado de esta enfermedad.

Sin embargo, los éxitos conseguidos con dichos fármacos lamentablemente no han posibilitado la erradicación de la enfermedad dado que, a pesar de la disminución de la carga viral plasmática a niveles indetectables, la replicación viral persiste a bajo nivel en órganos linfoides (Chun y cols., 1997; Finzi y cols., 1997; Wong y cols., 1997). Además, la carga proviral, que refleja el conjunto de linfocitos infectados por el VIH, no disminuye con tratamiento antirretroviral o lo hace muy lentamente. (Sharkey y cols., 2000; Ramratnam y cols., 2000). Por último, la suspensión de la medicación antirretroviral conduce a una rápida subida de la carga viral a niveles basales, incluso en pacientes que se encontraban en supresión virológica aparentemente completa (<5 copias de ARN/ml) durante dos años (García y cols., 1999). Todos estos datos sugieren que la perspectiva de erradicación del SIDA con los fármacos actualmente disponibles parece improbable (Ho, 1998; Wein y cols., 1998; Zhang y cols., 1999; Furtado y cols., 1999; Pomerantz, 1999). Esta posibilidad de erradicación conlleva el desarrollo a medio plazo de virus resistentes a los fármacos antirretrovirales utilizados en cada paciente.

En esta situación, continúan en marcha una serie de estrategias contra esta enfermedad que pueden resumirse en los siguientes puntos:

- Desarrollo de nuevos fármacos y, especialmente de nuevas familias de compuestos con dianas diferentes de las contempladas actualmente por los fármacos antirretrovirales.
- Desarrollo de vacunas terapéuticas y preventivas.
- Desarrollo de estrategias de inmunoterapia dirigidas a reforzar el sistema inmunológico del paciente.

Concomitantemente al desarrollo de estas estrategias para combatir la enfermedad, es imprescindible el desarrollo de métodos y técnicas analíticas para evaluar estos nuevos enfoques: modelos de determinación de resistencias a antirretrovirales, caracterización biológica de aspectos cualitativos de la biología del virus y desarrollo de modelos para la generación de plataformas para exploración y caracterización de la actividad antiviral de nuevos compuestos.

En los párrafos siguientes se hará referencia a algunos de los métodos analíticos que se están empleando en la actualidad, y en los que la presente invención tiene una especial incidencia por sus ventajosas aportaciones.

- Sistemas de determinación de resistencias fenotípicas a fármacos antirretrovirales.

Las determinaciones de resistencias fenotípicas no se realizan de forma rutinaria en los pacientes con infección por VIH que presentan fracaso virológico, debido a su extrema laboriosidad y elevado coste. Estos ensayos de resistencias fenotípicas se realizan habitualmente por un método seleccionado entre uno de los dos grupos de sistemas siguientes:

55 a. Sistemas clásicos: en una primera etapa, consisten en el aislamiento del VIH a partir de cultivos de linfocitos del paciente y, en una segunda etapa, la infección de células diana en presencia de diferentes antirretrovirales para determinar la concentración inhibitoria de los fármacos (CI50) sobre un aislado concreto. Estos sistemas son terriblemente costosos, largos, tediosos y requieren sistemas de bioseguridad accesibles a muy pocos laboratorios de virología (Richman y cols., 1993; Nagy y cols., 1994).

60 b. Sistemas basados en técnicas de recombinación genética. En esta tecnología, las secuencias del gen *pol* se amplifican en base al plasma del paciente y se transfectan junto con el provirus seleccionado en estas secuencias, en líneas celulares. Por medio de reacciones de ligamiento "in vivo", en el interior de estas células, se recombina un virus que lleva las secuencias Transcriptasa Inversa y Proteasa del virus del paciente. La progenie viral recombinante generada se utiliza para evaluar la CI50 en la infección de células diana. Existen distintas variantes de esta tecnología en cuanto a las secuencias y etapas de amplificación, células diana y utilización de marcadores (Boucher y cols., 1996; Hertogs y cols., 1998; Ruiz y cols., 1998; Little y cols., 1999;

Borden y cols., 1999). A pesar de estos desarrollos que simplifican los sistemas clásicos, las técnicas de ensayos de recombinación viral tienen limitaciones como las bajas tasas de recombinación *in vivo* y su coste y laboriosidad todavía elevados.

5 Debido a su complejidad y dificultades de normalización, los ensayos de resistencia fenotípica a fármacos antirretrovirales están disponibles en la práctica en un pequeño número de laboratorios y se utilizan esencialmente con fines diagnósticos.

10 Existe, por tanto, la necesidad de nuevas técnicas más sencillas y asequibles que permitan realizar estas determinaciones en cualquier laboratorio, de forma rápida, simple y económica.

- Sistemas para la determinación de la capacidad replicativa del VIH.

15 Entre las características cualitativas existentes entre los distintos aislados del VIH se encuentra la "capacidad replicativa" o "eficacia biológica" viral (Ruiz Jarabo y cols., 2002; Domingo y cols., 2001). La eficacia biológica viral es el resultado final de un conjunto múltiple de características del virus en el proceso de adaptación a su hospedador. Sin embargo en algunas situaciones se ha observado que una eficacia biológica viral disminuida se asocia con la evolución clínica de la enfermedad (Tersmette y cols 1995; Learmont y cols 1995). En particular, en un porcentaje elevado de pacientes supervivientes a largo plazo es extremadamente difícil aislar sus virus en cultivo
20 debido a su baja capacidad replicativa (Cao y cols.,1995; Pantaleo y cols.,1995, Michael y cols.,1995). Quizás de mayor relevancia clínica es el hecho de que virus de pacientes multirresistentes parecen replicar con una menor capacidad (Mammano y cols.,2000; Martinez-Picado y cols.,2000; Nijhuis y cols.,2001; Spira y cols.,2003).

25 Los sistemas de determinación de eficacia biológica viral se basan en estudios de competencia en cultivo entre un virus silvestre y un virus que presenta diferentes mutaciones (Yuste y cols.,1999; Iglesias y cols.,2002). Estos métodos requieren cultivos prolongados por lo que son extremadamente laboriosos, costosos y difíciles de normalizar. Sólo recientemente se ha propuesto la utilización de virus recombinantes para determinar la eficacia biológica viral (Deeks y cols.,2001; Barbour y cols.,2002) aunque esta técnica no se encuentra adecuadamente normalizada en el momento actual. Con el fin de poder evaluar de manera precisa la capacidad replicativa del virus,
30 es imprescindible poder disponer de técnicas sencillas, fiables, asequibles y rápidas.

- Sistemas para la detección de la presencia de anticuerpos neutralizantes como parámetro de respuesta de eficacia de vacunas experimentales y de tratamientos inmunomoduladores.

35 La infección por un virus induce en el hospedador una doble respuesta inmune específica: activación de linfocitos citotóxicos y producción de anticuerpos (McMichael A.,2001; Burton DR.,2002). De estos últimos, sólo los anticuerpos que bloquean la entrada del virus en la célula diana por distintos mecanismos poseen eficacia en el control de la infección. Este tipo de anticuerpos se denominan "neutralizantes" y la importancia de su papel en la
40 infección por el VIH la han demostrado distintos trabajos en los últimos años (Burton DR., 2002; Moore J y Burton DR.,1999).

45 La medición de anticuerpos neutralizantes tiene importancia en una serie de situaciones clínicas, ya que se ha demostrado que su presencia se asocia con un buen pronóstico para la infección (Cao y cols.,1995; Lathey y cols.,1997; Pilgrim y cols.,1997; Lomis-Price y cols.,1998). Sin embargo, la mayor aplicación de anticuerpos neutralizantes se producirá en los próximos años en la evaluación de nuevas vacunas contra el VIH. Existen en la actualidad más de 50 preparaciones producidas según las normas GMP y 35 en fase I y II (McMichael AJ y Hanke T.,2003). En la evaluación de la eficacia de estas preparaciones, la detección de anticuerpos neutralizantes, constituirá junto con la actividad citotóxica contra el VIH, los dos parámetros que decidirán los pases de preparación a fases de estudio clínico más avanzadas (Poignard y cols.,1999; Moore JP y Burton DR.,1999; Mc Michael AJ y
50 Rowland Jones SL.,2001).

Los ensayos de neutralización o de detección de anticuerpos neutralizantes se realizan midiendo la inhibición de la lisis celular por el VIH en sistemas de infección *in vitro* (Sattentau Q.,1996, Langlois y cols.,1998).

55 Este modelo tiene dos inconvenientes importantes:

- a. Se mide un efecto indirecto de la replicación viral que es la destrucción celular, pero no se mide directamente la replicación del VIH.
- b. Se analiza la inhibición de una cepa de laboratorio, con lo que no se detectan anticuerpos contra el virus específico del paciente, un aspecto que puede afectar a la caracterización de una respuesta específica del
60 hospedador.

65 Se han propuesto otras técnicas basadas en microscopía o citometría de células infectadas pero revisten una complejidad que no las hace viables como ensayos rutinarios (Hausmann y cols.,1987; Mascola y cols.,2002). Recientemente se ha introducido la técnica de inhibición de infección mediante virus recombinantes para analizar la capacidad neutralizante de sueros en distintas estrategias experimentales (Kolchinski y cols.,2001) y en muestras

clínicas (Wei y cols.,2003; Richman y cols.,2003). Se hace, por tanto, imprescindible el desarrollo de nuevas técnicas que solventen estos dos grandes inconvenientes, permitiendo el análisis directo de la replicación viral y su inhibición por los anticuerpos del paciente, de alta sensibilidad y fiabilidad y que puedan llevarse a cabo de forma sencilla, rápida y económica.

5

- Sistemas para la caracterización del tropismo viral en la infección por el VIH.

Además de los aspectos cuantitativos de la replicación viral que viene expresado por la carga viral plasmática, las diferentes variantes del VIH tienen una serie de características biológicas que caracterizan su patogenicidad. Entre éstas, el tropismo viral, o la capacidad del VIH de entrar en la célula a través de distintos receptores, es una de las características virales más importantes (Weiss RA.,1996, Oberlin y cols.,1997; Dorantz y cols.,1996; Glushakova y cols.,1998).

10

La existencia de dos receptores mayores del VIH, denominados CCR5 y CXCR4 (Loetscher y cols.,2000) hace que las distintas variantes virales se clasifiquen en tres categorías: R5, X4 y R5X4 en función de su capacidad para entrar en la célula por uno de los dos receptores exclusivamente o ambos receptores (Berger y cols.,1998).

15

La medición del tropismo viral no se realiza habitualmente como ensayo de diagnóstico pero representa un parámetro de gran utilidad en determinadas áreas de investigación. Sin embargo, la introducción de fármacos específicos de la entrada que tienen como diana uno de los dos receptores, CCR5 o CXCR4, hace muy previsible que en el futuro se requiera una caracterización del tropismo viral del paciente antes de iniciar tratamiento frente a una de estas dianas (Lazzarin y cols.,2003;Este JA.,2003; Zaitseva y cols.,2003).

20

Por lo tanto, existe la necesidad de disponer de sistemas que permitan la caracterización del tropismo viral en la infección por el VIH en un paciente, mediante técnicas sencillas y asequibles a cualquier laboratorio de análisis, sistemas de los cuales hoy en día se carece.

25

- Modelos experimentales que permitan la rápida selección de compuestos con posible actividad antiviral.

Los tratamientos actuales no permiten una cura de la infección por el VIH por lo que el desarrollo de nuevos fármacos es una prioridad en el contexto de la investigación sobre el SIDA (De Clercq y cols.,2002). Existen esencialmente dos fuentes de nuevos fármacos: derivados de productos naturales, esencialmente procedentes del reino vegetal o generados por química combinatoria a partir de modelos informáticos o de estructuras cristalinas de las moléculas diana (Chu y Cutler., 1992; Jung y cols.,2000; Knowles y cols.,2003; Rudin y cols.,2003;Agrafiotis y cols.,2002).

30

35

En ambos casos, la molécula y sus derivados debe caracterizarse en cuanto a su toxicidad y actividad antiviral en una serie de modelos que deben ser robotizables para permitir una selección de alta eficacia, ya que deben ensayarse del orden de miles de compuestos. Existen distintos sistemas utilizados actualmente que van desde los clásicos en que se mide la protección frente al efecto citopático de un virus de referencia (Pauwels y cols.,1987), o los específicos que analizan una diana determinada mediante ensayos bioquímicos (Hazuda y cols.,2000; Cherepanov y cols.,1997; Walters y cols.,2003).

40

No obstante, sigue existiendo una demanda de sistemas de selección que permitan el desarrollo de modelos robotizables con los cuales puedan llevarse a cabo ensayos de selección de los miles de compuestos a probar de forma más rápida, fiable, segura y a menor coste (Federsel y cols.,2003; Bleicher y cols.,2003).

45

En el presente documento se hace especial mención a las enseñanzas de la solicitud de patente US2003013078, en la que en dos clones virales basados en el virus NL4.3, el gen nef se ha sustituido por el gen luciferasa de Renilla. Estas construcciones se usan para seleccionar nuevos compuestos antivirales. En relación a sus enseñanzas, la presente invención se describe adicionalmente de la siguiente manera:

50

- La introducción del gen LacZ, en concreto segmentos del genoma viral, permite la clonación de aquellos fragmentos genómicos deseados de los pacientes evitando secuencias salvajes del vector receptor. Esta estrategia permite el establecimiento de una gran diversidad de clones virales que conllevan diferentes secuencias de pacientes.
- Esto también permite la clonación de fragmentos de distintos subtipos virales y de aislados en circulación incluyendo aquellos resistentes a diferentes compuestos antivirales. Esta capacidad potencia la sensibilidad de los ensayos y representa una gran ventaja en la selección de nuevos compuestos.

55

60

Además, Petropoulos y cols., 2000, describen un ensayo de susceptibilidad basado en el uso de un clon viral en el que el gen *env* se ha sustituido por el gen luciferasa y que permite la clonación tanto de genes de proteasa como de transcriptasa inversa. En relación a estas enseñanzas, la presente invención se describe adicionalmente de la siguiente manera:

65

- De acuerdo con la referencia anterior, la introducción del gen *LacZ* en diferentes segmentos del genoma viral

permite la clonación de aquellos fragmentos genómicos deseados directos de los pacientes, evitando así secuencias salvajes del vector receptor.

- La clonación del gen luciferasa en el locus del gen *nef* permite la generación de progenie viral usando solamente un vector. El sistema de Petropoulos necesita realizar una co-transfección con un segundo vector que conlleva el gen *env*, dado que el gen de la envuelta viral es necesario para virus viables.
- La presente invención genera virus capaces de replicarse en ciclos de replicación múltiples, potenciando así la sensibilidad del ensayo, mientras que aquellos enseñados por Petropoulos permiten una replicación debido a su construcción pseudo-tipo

Por tanto, a la vista de la situación descrita anteriormente, el solicitante ha dirigido sus esfuerzos investigadores hacia la búsqueda de nuevos clones virales recombinantes, cuya creación, identificación y aplicaciones le han permitido la culminación de la presente invención, que representa un gran avance en la resolución de los problemas e inconvenientes antes mencionados, como se irá deduciendo fácilmente a partir de una lectura detallada del resto de la presente memoria descriptiva

Seguidamente se proporciona el listado de las referencias bibliográficas completas que se han ido citando abreviadamente en los párrafos precedentes.

- Agrafiotis DK y cols., Combinatorial informatics in the post-genomics ERA. *Nat Rev Drug Discov.* 2002;1:337.
- Barbour JD, Wrin T, Grant RM, Martin JN, Segal MR, Petropoulos CJ, Deeks SG. Evolution of phenotypic drug susceptibility and viral replication capacity during long-term virologic failure of protease inhibitor therapy in human immunodeficiency virus-infected adults. *J Virol.* 2002; 76: 11104-12.
- Berger EA, Doms RW, Fenyo EM, Korber BT, Littman DR, Moore JP, Sattentau QJ, Schuitemaker H, Sodroski J, Weiss RA. A new classification for HIV-1. *Nature.* 1998; 391: 240.
- Bleicher KH. Hit and lead generation: beyond high-throughput screening. *Nat Rev Drug Discov.* 2003; 2:369.
- Borden D, Hurley A, Zhang L. Y cols. HIV-1 drug resistance in newly infected individuals. *JAMA* 1999; 282: 1135-41.
- Boucher CA, Keulen W van Bommel T, Nijhuis M, de Jong D, de Jong MD, Schipper P, Back NK. Human immunodeficiency virus type 1 drug susceptibility determination by using recombinant viruses generated from patient sera tested in a cell-killing assay. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; 40:2404-9.
- Burton DR. Opinion: Antibodies, viruses and vaccines. *Nat Rev Immunol.* 2002;2:706-13
- Cao Y, Qin L, Zhang L, Safrin J, Ho DD. Virologic and immunologic characterization of long-term survivors of human immunodeficiency virus type 1 infection. *N Engl J Med.* 1995;332:201-8.
- Cherepanov. Mode of interaction of G-quartets with the integrase of HIV. *Mol Pharmacol.* 1997. 52:771
- Chu CK y Cutler HG (Eds). *Natural Products as Antiviral Agents.* Ed.C.K., (1992), Plenum, Press,N.Y.
- Chun TW, Carruth L, Finzi D, y cols. Quantification of latent tissue reservoirs and total body viral load in HIV-1 infection. *Nature* 1997; 387:183-8.
- Chun TW, Stuyver L, Mizell SB, Ehler LA, Mican JA, Baseler M, Lloyd AL, Nowank MA, Fauci AS. Presence of an inducible HIV-1 latent reservoir during highly active antiretroviral therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997 Nov 25; 94(24):13193-7.
- De Clercq E. Strategies in the design of antiviral drugs. *Nat Rev Drug Discov.* 2002;1:13-25.
- Deeks SG, Wrin T, Liegler T, Hoh R, Hayden M, Barbour JD, Hellmann NS, Petropoulos CJ, McCune JM, Hellerstein MK, Grant RM. Virologic and immunologic consequences of discontinuing combination antiretroviral-drug therapy in HIV-infected patients with detectable viremia. *N Engl J Med.* 2001; 344: 472-80.
- Domingo E, Mas A, Yuste E, Pariente N, Sierra S, Gutierrez-Riva M, Menendez-Arias L. Virus population dynamics, efficacy biological variations and the control of viral disease: an update. *Prog Drug Res.* 2001; 57: 77-115.
- Dorantz BJ, Rucker J, Yi Y, et al. A dual-tropic primary HIV-1 isolate that uses fusin and the beta-chemokine receptors CKR5, CKR3 and CKR2 as fusion coreceptors. *Cell* 1996; 35:1149-1158.
- Este JA. Virus entry as a target for anti-HIV intervention. *Curr Med Chem.* 2003; 10: 1617-32
- Federsel HJ. Logistics of process R&D: transforming laboratory methods to manufacturing scale. *Nat Rev Drug Discov.* 2003;2:654
- Finzi D, Hermankova M, Pierson T, y cols. Identification of a reservoir for HIV-1 in patients on highly active antiretroviral therapy. *Science* 1997; 278:1295-300.
- Furtado M, Callaways DS, Phair JP. y cols. Persistence of HIV transcription in patients receiving combination antiretroviral therapy. *N.Engl.J.Med.* 1999; 340:1614-22.
- García F, Plana M, Vidal C. y cols Dynamics of viral load rebound and immunological changes after stopping effective antiretroviral therapy. *AIDS* 1999;13:179-86.
- Glushakova S, Grivel JC, FitzgeraldW, Sylwester A, Zimmerberg J, Margolis LB. Evidence for HIV-1 phenotype switch as a causal factor in acquired immunodeficiency. *Nature Med* 1998; 4:346-348.
- Hausmann EH, Gelderblom HR, Clapham PR, Pauli G, Weiss RA. Detection of HIV envelope specific antibodies by immunoelectron microscopy and correlation with antibody titer and virus neutralizing activity. *J Virol Methods.* 1987;16: 125-37
- Havlir DV, Lange JM. New *antiretrovirals* and new combinations. *AIDS* 1998;12 Suppl A:S165-74.
- Havlir DV, Marschner IC, Hirsch MS y cols, Maintenance antiretroviral therapies in HIV infected patients with undetectable plasma HIV RNA after triple-drug therapy. AIDS Clinical Trials Group Study 343 Team. *N Engl J*

- Med* 1998;339:1261-8.
- Hazuda DJ, et al. Inhibitors of strand transfer that prevent integration and inhibit HIV-1 replication in cells. *Science*. 2000;287:646
 - 5 - Hertogs K, de Bethune MP, Miller V y cols. A rapid method for simultaneous detection of phenotypic resistance to inhibitors of protease and reverse transcriptase in recombinant human immunodeficiency virus type 1 isolates from patients treated with antiretroviral drugs. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42:269-76.
 - Ho DD. Toward HIV eradication or remission: the tasks ahead. *Science* 1998; 280:1866-7.
 - Iglesias-Ussel MD, Casado C, Yuste E, Olivares I, Lopez-Galindez C. In vitro analysis of human immunodeficiency virus type 1 resistance to nevirapine and efficacy biológica determination of resistant variants. *J Gen Virol*. 2002; 83): 93-101
 - 10 - Jung M. Recent studies on natural products as anti-HIV agents. *Curr. Med. Chem.*2000;649:125
 - Knowles J. A guide to drug discovery: Target selection in drug discovery. *Nat Rev Drug Discov.*2003;2:63
 - Kolchinsky P, Kiprilov E, Sodroski J. Increased neutralization sensitivity of CD4-independent human immunodeficiency virus variants. *J Virol*. 2001; 75: 2041-50.
 - 15 - Lathey JL, Pratt RD, Spector SA. Appearance of autologous neutralizing antibody correlates with reduction in virus load and phenotype switch during primary infection with human immunodeficiency virus type 1 [Letter]. *J Infect Dis*. 1997;175:231-2.
 - Langlois AJ, Matthews TJ, Weinhold KJ, Chaffee S, Hershfield M, Bolognesi DP. Detection of HIV-1 neutralizing antibodies by a simple, rapid, colorimetric assay. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 1988 Feb; 4(1): 63-9.
 - 20 - Lazzarin A, Clotet B, Cooper D, Reynes J, Arasteh K, Nelson M, Katlama C, Stellbrink HJ, Delfraissy JF, Lange J, Huson L, DeMasi R, Wat C, Delehanty J, Drobnos C, Salgo M; TORO 2 Study Group. Efficacy of enfuvirtide in patients infected with drug-resistant HIV-1 in Europe and Australia. *N Engl J Med*. 2003; 348: 2186-95
 - Learmont JC, Geczy AF, Mills J, Ashton LJ, Raynes-Greenow CH, Garsia RJ, et al. Immunologic and virologic status after 14 to 18 years of infection with an attenuated strain of HIV-1. A report from the Sydney Blood Bank Cohort. *N Engl J Med*. 1999;340:1715-22.
 - 25 - Little SJ, Daar ES, D'Aquila RT. Y cols reduced antiretroviral drug susceptibility among patient with primary HIV infection. *JAMA* 1999; 282:1142-49.
 - Loetscher P, Moser B, Baggiolini M. Chemokines and their receptors in lymphocyte traffic and HIV infection. *Adv Immunol*. 2000;74:127-80
 - 30 - Loomis-Price LD, Cox JH, Mascola JR, VanCott TC, Michael NL, Fouts TR, et al. Correlation between humoral responses to human immunodeficiency virus type 1 envelope and disease progression in early-stage infection. *J Infect Dis*. 1998;178:1306-16.
 - Mammano F, Trouplin V, Zennou V, Clavel F. Retracing the evolutionary pathways of human immunodeficiency virus type 1 resistance to protease inhibitors: virus efficacy biológica in the absence and in the presence of drug. *J Virol*. 2000; 7: 8524-31.
 - 35 - Martinez-Picado J, Savara AV, Shi L, Sutton L, D'Aquila RT. Efficacia biológica of human immunodeficiency virus type 1 protease inhibitor-selected single mutants. *Virology*. 2000 Sep 30; 275: 318-22.
 - Mascola JR, Louder MK, Winter C, Prabhakara R, De Rosa SC, Douek DC, Hill BJ, Gabuzda D, Roederer M. Human immunodeficiency virus type 1 neutralization measured by flow cytometric quantitation of single-round infection of primary human T cells. *J Virol*. 2002; 76: 4810-21.
 - 40 - McMichael AJ and Rowland-Jones SL. Cellular immune responses to HIV. *Nature* 2001;410:980-7.
 - McMichael AJ and Hanke T. HIV vaccines 1998-2003; *Nat.Med.*2003;9:874-880.
 - Michael NL, Chang G, d'Arcy LA, Ehrenberg PK, Mariani R, Busch MP, et al. Defective accessory genes in a human immunodeficiency virus type 1- infected long-term survivor lacking recoverable virus. *J Virol*. 1995;69:4228-36.
 - 45 - Moore JP and Burton DR. HIV-1 neutralizing antibodies: how full is the bottle?. *Nat Med* 1999; 5:142-144
 - Nagy K, Young M, Baboonian C, Merson J, Whittle P, Oroszlan S. Antiviral activity of human immunodeficiency virus type 1 protease inhibitors in a single cycle of infection: evidence for a role protease in the early phase. *J Virol* 1994; 68:757-65.
 - 50 - Nijhuis M, Deeks S and Boucher C. Implications of antiretroviral resistance on viral efficacy biológica. *Curr. Opin Inf. Dis*. 2001;14:23-28.
 - Oberlin E, Amara A, Bachelier F, et al. The CXc chemokine SDF-1 is the lignd for LESTR/Fusin and prevents infection by a T-cell line adapted HIV-1. *Nature* 1997; 382:833-835.
 - Pantaleo G, Menzo S, Vaccarezza M, Graziosi C, Cohen OJ, Demarest JF, et al. Studies in subjects with long-term nonprogressive human immunodeficiency virus infection. *N Engl J Med*. 1995;332:209-16.
 - 55 - Pauwels, R. et al. Sensitive and rapid assay on MT-4 cells for detection of antiviral compounds against the AIDS virus. *J Virol Methods*. 1987. 16:171-185.
 - Pilgrim AK, Pantaleo G, Cohen OJ, Fink LM, Zhou JY, Zhou JT, et al. Neutralizing antibody responses to human immunodeficiency virus type 1 in primary infection and long-term-nonprogressive infection. *J Infect Dis*. 1997; 176:924-32.
 - 60 - Pognard P. Neutralizing antibodies have limited effects on the control of established HIV-1 infections in vivo. *Immunity* 1999; 10:431-438.
 - Pomerantz RJ Residual HIV-1 disease in the era of HAART. *N.Eng.J.Med.*1999; 340: 1625-27.
 - Ramratnam B, Mitler JE, Zhang L. Y cols. The decay of the latent reservoir of replication-competent HIV-1 is inversely correlated with the extent of residual viral replication during prolonged antiretroviral therapy. *Nat.Med.*2000;6:82-85.
 - 65

- Richman DD, Johnson VA, Shirasaka T, O'Brien MC, Mitsuya H. Measurement of susceptibility of HIV-1 to antiviral drug. In: Strober W, Shevach E, eds. Current Protocols in Immunology. New York: Green Publishing associates, 1993:12.9.1.
- 5 - Richman DD, Wrin T, Little SJ, Petropoulos CJ. Rapid evolution of the neutralizing antibody response to HIV type 1 infection. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003; 100: 4144-9.
- Rudin M et al. Molecular imaging in drug discovery and development. Nat Rev Drug Discov. 2003;2:123.
- Ruiz L, Nijhuis M, Boucher C, Puig T, y cols. Efficacy of adding indinavir to previous reverse transcriptase nucleoside analogues in relation to genotypic and phenotypic resistance development in advanced HIV-1-infected patients. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 1998; 19:19-28.
- 10 - Ruiz-Jarabo CM, Arias A, Molina-Paris C, Briones C, Baranowski E, Escarmis C, Domingo E. Duration and eficacia biológica dependence of quasispecies memory. *J Mol Biol*. 2002; 315: 285-96
- Sattentau Q. Neutralization of HIV-1 by antibody. *Curr Opin Immunol*. 1996;8:540-5.
- Sharkey ME, Teo I, Greenough T y cols. Persistence of episomal HIV-1 infection intermediates in patients on highly active antiretroviral therapy. *Nat Med*. 2000;6:76-81.
- 15 - Spira S, Wainberg MA, Loomba H, Turner D, Brenner BG. Impact of clade diversity on HIV-1 virulence, antiretroviral drug sensitivity and drug resistance. *J Antimicrob Chemother*. 2003; 51: 229-40.
- Tersmette M, Lange JM, de Goede RE, de Wolf F, Eeftink-Schattenkerk JK, Schellekens PT, et al. Association between biological properties of human immunodeficiency virus variants and risk for AIDS and AIDS mortality. *Lancet*. 1989;1:983-5.
- 20 - Walters WP. Designing screens: how to make your hits a hit. *Nat Rev Drug Discov*. 2003;2:259.
- Wei X, Decker JM, Wang S, Hui H, Kappes JC, Wu X, Salazar-Gonzalez JF, Salazar MG, Kilby JM, Saag MS, Komarova NL, Nowak MA, Hahn BH, Kwong PD, Shaw GM. Antibody neutralization and escape by HIV-1. *Nature*. 2003; 422: 307-12.
- Wein L, D'Amato R, Perelson A. Mathematical analysis of antiretroviral therapy aimed at HIV-1 eradication or maintenance of low viral loads. *J Theor Biol* 1998; 192:81-98.
- 25 - Weiss RA. HIV receptors and the pathogenesis of AIDS. *Science* 1996; 272:1885-1886.
- Wong JK, Hezareh M, Günthard HF, Havlir DV, Ignacio CA, Spina CA and Richman D. Recovery of replicative competent HIV despite prolonged suppression of plasma viremia. *Science* 1997; 278:1291-5.
- Yuste E, Sanchez-Palomino S, Casado C, Domingo E, Lopez-Galindez C. Related Articles, Links Drastic eficacia biológica loss in human immunodeficiency virus type 1 upon serial bottleneck events. *J Virol*. 1999; 73: 2745-51
- 30 - Zaitseva M, Peden K, Golding H. HIV coreceptors: role of structure, posttranslational modifications, and internalization in viral-cell fusion and as targets for entry inhibitors. *Biochim Biophys Acta*. 2003; 1614: 51-61.
- Zhang I, Ramratnam B, Tenner-Racz K. Y cols. Quantifying residual HIV-1 replication in patients receiving combination antiretroviral therapy. *N Engl J Med*. 1999;340:1605-13.

35 **Descripción detallada de la invención**

La presente invención, tal y como se indica en su enunciado, se refiere a la generación de nuevos clones virales recombinantes basados en VIH y a su uso en métodos analíticos.

40 Dentro del contexto de la presente invención se denomina clon viral de VIH a un fragmento de ADN que contiene la totalidad o la práctica totalidad del genoma del VIH incluyendo los dos LTR de la forma proviral del virus. Para el caso más específico del VIH-1, la definición es la misma, pero sustituyendo VIH por VIH-1.

45 Los clones virales recombinantes de la presente invención son los clones resultantes de una serie de manipulaciones genéticas realizadas sobre dicho fragmento de ADN incluyendo delección de genes virales, inserción de genes marcadores, introducción de mutaciones y sustitución de genes o fragmentos génicos del clon original por los de otros clones o poblaciones virales.

50 En concreto, en el desarrollo de la presente invención se ha procedido de acuerdo con las siguientes estrategias:

- delección de fragmentos del VIH, como el gen Nef, de modo que se mantenga la capacidad infectiva de los clones virales recombinantes generados,
- 55 - inserción, en el ADN proviral del gen marcador de renilla, un gen no expresado en células humanas. Esto permite que el gen funcione como un marcador de la infección, esto es, una célula que expresa renilla indica que se ha infectado;
- inserción del gen LacZ que codifica la enzima Beta-galactosidasa, sustituyendo distintas secuencias del genoma para, por una parte, reconocer la frecuencia de generación de virus recombinantes y, por otra parte, evitar el arrastre de virus salvajes;
- 60 - introducción por mutagénesis de sitios de restricción dirigida que permitan "extraer" fácilmente determinados fragmentos de ADN del provirus matriz (tales como, por ejemplo, la Transcriptasa Inversa, la Proteasa, el gen Pol completo, gag, nef, o la envuelta del virus), para sustituirlos por genes de aislados procedentes de pacientes a valorar. Este sistema de "clonación" y generación de "virus quiméricos" permite estudiar las características de las distintas proteínas virales de los pacientes en un sistema que presenta todas las ventajas de los genes marcadores.
- 65 -

El sistema de marcado con renilla, presenta múltiples ventajas frente a los sistemas de marcado utilizados actualmente de forma más habitual, siendo de destacar especialmente que:

- la detección de renilla es una técnica que tiene una alta sensibilidad
- se puede realizar de forma automática y es incluso robotizable
- es un ensayo asequible
- la detección tras la infección con un virus portador de renilla como marcador es muy rápida (24 horas) en comparación con los sistemas convencionales de detección de replicación viral que requieren entre 5 días y una semana de cultivo.

Los clones virales recombinantes basados en VIH de la presente invención se caracterizan porque poseen la estructura general representada en la figura 8, que comprende en dirección 5' a 3' los siguientes elementos:- secuencias LTR o terminales redundantes (R), que contienen numerosas secuencias consenso para factores de transcripción que regulan la expresión viral;

- *gag* es el gen que codifica la proteína capsidial p55 formada por 3 subunidades proteicas (MA, CA y NC);
- *pol* es el gen que codifica las enzimas virales necesarias para el proceso de replicación viral: proteasa (PRO), la transcriptasa inversa (RT) e integrasa, y solapa en su extremo 5' con el elemento *gag*;
- *vif* es el gen que codifica la proteína Vif, solapa en su extremo 5' con el elemento *pol* y en su extremo 3' con el elemento *vpr*;
- *vpr* es el gen que codifica la proteína Vpr y solapa en su extremo 5' con el elemento *vif*;
- *tat* es el gen que codifica la proteína Tat, su segundo exón se encuentra contenido en la secuencia *env*;
- *vpu* es el gen que codifica a Vpu;
- *env* es el gen que codifica la proteína gp160 de la envuelta viral;
- *rev* es el gen que codifica la proteína Rev, su segundo exón se encuentra contenido en la secuencia *env*;
- *nef* es el gen que codifica la proteína Nef y se encuentra truncado en las bases en posición 8.796 y 8.887 en el genoma viral;
- *NotI* es un sitio de restricción para la enzima NotI que se ha introducido por mutagénesis dirigida en la posición 9.796 del genoma viral;
- *XhoI* es un sitio de restricción para la enzima XhoI, en la posición 8.887 del genoma viral;
- *Renilla* es el gen que codifica la proteína indicadora luciferasa de Renilla y que se ha clonado en los sitios de restricción NotI-XhoI en posiciones 5' y 3', respectivamente; y
- LTR, cuyo extremo 5' solapa con el extremo 3' del elemento *nef*.

Para la obtención de los clones virales de la invención representados por la estructura general (Figura 8), se parte del vector proviral NL4.3 [Adachi A. Gendelman HE, Koenig S, Folks, T, Willey R, Rabson A, Martin MA. Production of acquired immunodeficiency syndrome-associated retrovirus in human and nonhuman cells transfected with an infectious molecular clone. J. Virol. agosto 1986; 59(2):284-91.] el cual se modifica genéticamente en el laboratorio mediante distintas operaciones. A continuación se resumen las fases seguidas en la generación de los distintos clones virales. Entre paréntesis y negrita se da la denominación de las construcciones genéticas intermedias y finales generadas:

- a) Introducción por mutagénesis dirigida del sitio de restricción Not I al inicio del gen *nef* (**IP NL Not**).
- b) Deleción del gen *nef* (corte con enzimas de restricción Not I y XhoI).
- c) Clonación del gen de renilla en las posiciones Not I/Xho I. (**IP HIV NL Ren**). Estructura general (Figura 8).
- d) Eliminación del sitio NcoI único mediante digestión y relleno con Klenow e introducción por mutagénesis dirigida de otro sitio de restricción NcoI en la posición correspondiente al aminoácido 15 de la transcriptasa inversa, la posición 2593 de la secuencia de ADN, (cambio de glicina por alanina). (**IP HIV NL Nco Ren**).
- e) Clonación en el vector **IP HIV NL Nco Ren** del gen de beta-galactosidasa en la posición de la RT (**IP HIV NL LacZ/rt Ren**), Proteasa (**IP HIV NL LacZ/pr Ren**), o el gen *pol* completo (**IP HIV NL LacZ/pol Ren**) con el fin de aumentar la eficacia de clonación y evitar el arrastre de poblaciones minoritarias del virus de referencia. Los clones religados sin el inserto del paciente proporcionan colonias azules, mientras que el plásmido que ha incorporado la RT, Pr o el gen *pol* completo del paciente proporciona colonias blancas.
- f) A partir del plásmido **IP HIV NL LacZ/pr Ren**, destrucción del sitio de restricción NarI externo al provirus mediante mutagénesis dirigida e introducción del sitio de restricción KspI en la posición 4498 por mutagénesis dirigida (**IP HIV NL LacZ/gag-pr Ren**).
- g) Introducción por mutagénesis dirigida del sitio de restricción XbaI en la posición 6112 en el clon **IP HIV NL Ren** (**IP HIV NL Xba Ren**)
- h) Deleción de la envuelta en el plásmido **IP HIV NL XbaI Ren** mediante el corte con las enzimas de restricción XbaI y NotI y clonación en su lugar del gen lacZ (**IP HIV NL LacZ/env Ren**).
- i) Generación del clon viral **IP HIV JR Ren** clonando la envuelta del clon JR-CSF en el plásmido **IP HIV NL LacZ/Env Ren**.

Los vectores finales así generados corresponden a los nuevos clones virales recombinantes objeto de la presente invención, comprendidos todos ellos dentro de la estructura general (Figura 8). Dichos clones virales se han depositado en la Colección Española de Cultivos Tipo (Universidad de Valencia, Burjassot, Valencia, España),

conforme a la normativa del Tratado de Budapest sobre el reconocimiento internacional del depósito de microorganismos para los fines del procedimiento en materia de patentes.

5 Seguidamente se proporcionan las estructuras particulares de dichos clones virales, indicando entre paréntesis junto a su denominación en el contexto de la presente memoria, la que les ha sido asignada por la CECT:

IP HIV NL Ren (CECT 5842)

10 Clon viral recombinante basado en la estructura general descrita anteriormente, caracterizado porque posee sitios únicos de restricción para las enzimas Apal y Agel introducidos en las posiciones 2006 y 3485, respectivamente, tal y como se representa en la figura 9.

IP HIV NL LacZ/pol Ren (CECT 5847)

15 Clon viral recombinante basado en la estructura general descrita anteriormente, caracterizado porque posee el gen LacZ clonado en los sitios de restricción Apal-Agel en las posiciones 5' y 3' respectivamente, sustituyendo el fragmento del gen *pol* que codifica la proteasa y la transcriptasa inversa, tal y como se representa en la figura 10.

IP HIV NL LacZ/pr Ren (CECT 5846)

20 Clon viral recombinante basado en la estructura general descrita anteriormente, caracterizado porque posee un sitio único de restricción para la enzima NcoI introducido por mutagénesis dirigida en la posición 2593 de la secuencia de ADN, y el gen LacZ clonado en los sitios de restricción Apal-NcoI en las posiciones 5' y 3', respectivamente, sustituyendo el fragmento del gen *pol* que codifica la proteasa, tal y como se representa en la figura 11.

25 **IP HIV NL LacZ/rt Ren (CECT 5845)**

30 Clon viral recombinante basado en la estructura general descrita anteriormente, caracterizado porque posee un sitio único de restricción para la enzima NcoI introducido por mutagénesis dirigida en la posición 2593 de la secuencia de ADN, y el gen LacZ clonado en los sitios de restricción NcoI-Agel en las posiciones 5' y 3' respectivamente, sustituyendo el fragmento del gen *pol* que codifica la transcriptasa inversa (Figura 12).

IP HIV NL LacZ/gag-pr Ren (CECT 5848)

35 Clon viral recombinante basado en la estructura general descrita anteriormente, caracterizado porque posee sitios únicos de restricción, introducidos por mutagénesis dirigida, para las enzimas NarI y KspI, en las posiciones 637 y 4.498, respectivamente, de la secuencia de ADN, y el gen LacZ clonado en los sitios de restricción Apal-NcoI en posiciones 5' y 3' respectivamente, sustituyendo el fragmento del gen *pol* que codifica la proteasa. (Figura 13).

40 **IP HIV NL LacZ/env Ren (CECT 5844)**

45 Clon viral recombinante basado en la estructura general descrita anteriormente, caracterizado porque posee un sitio único de restricción para la enzima XbaI introducido por mutagénesis dirigida en la posición 6.112 de la secuencia de ADN, de modo que permite la clonación del gen de la envuelta del virus del paciente, y también posee el gen LacZ clonado en los sitios de restricción XbaI-NotI en las posiciones 5' y 3' respectivamente sustituyendo al gen *env*. (Figura 14).

IP HIV JRRen (CECT 5843)

50 Clon viral recombinante basado en la estructura general descrita anteriormente, caracterizado porque posee un sitio único de restricción para el enzima XbaI introducido por mutagénesis dirigida en la posición 6.112 de la secuencia de ADN, el gen LacZ clonado sustituyendo al gen *env* y el gen "*env JR-CSF*", que corresponde al gen *env* del clon JR-CSF, sustituyendo al gen *env* original. Este clon se representa en la figura 15.

55 Los clones virales recombinantes de la presente invención han mostrado ser muy útiles en el desarrollo o mejora de métodos y técnicas analíticas relacionados con las investigaciones en relación con el SIDA. De hecho, en las técnicas específicas que se describieron en el apartado del Estado de la Técnica, dichos clones han supuesto importantes ventajas, algunas de las cuales se detallan seguidamente:

60 - *Sistemas para la determinación de resistencias fenotípicas a fármacos antirretrovirales:*

La invención propuesta se basa en el sistema de clonación de los fragmentos génicos de la transcriptasa inversa, de la envuelta y de la Proteasa del VIH en vectores virales que contienen genes marcadores. Esta invención presenta una serie de ventajas con respecto a las ya existentes, concretamente:

65 a) La posibilidad de analizar por separado la resistencia a inhibidores de la Proteasa, de la Transcriptasa

Inversa y de la envuelta. Esto posibilita realizar una evaluación independiente de resistencias a distintos grupos farmacológicos.

b) La utilización de sistemas virales de ciclo múltiple.

c) Una mayor eficacia en la evaluación de aislados virales con baja capacidad replicativa.

5

- *Sistemas para la determinación de la capacidad replicativa del VIH:*

La invención propuesta permite determinar este parámetro y realizar un análisis directo de la capacidad replicativa viral células diana muy próximas a las dianas fisiológicas tales como linfocitos de sangre periférica. La clonación de los genes de la envuelta y distintos fragmentos del ADN de *gag-pol* del paciente en virus portadores de genes marcadores de ciclo múltiple (Renilla) otorga al virus quimérico las propiedades replicativas del virus mutado. A diferencia de los sistemas de evaluación de la eficacia biológica viral, extremadamente laboriosos, el desarrollo permite el análisis de la capacidad replicativa del virus recombinante de una manera prácticamente continua.

10

15 - *Sistemas para la detección de la presencia de anticuerpos neutralizantes:*

La invención propuesta permite superar los dos inconvenientes principales de las técnicas clásicas de determinación de la capacidad neutralizante en el suero de pacientes seropositivos ya que permite realizar un análisis directo de la replicación viral y su inhibición por los anticuerpos del paciente. Esto es posible realizarlo tanto sobre aislados o clones virales de referencia, como sobre un virus recombinante en el que la envuelta del clon viral ha sido sustituida por la envuelta completa de la población viral del paciente.

20

Este tipo de ensayo, denominado por el solicitante "ensayo autólogo de detección de anticuerpos neutralizantes" tiene una elevada sensibilidad y permite una evaluación exacta de la capacidad neutralizante del suero del paciente frente a los virus que, en el momento del ensayo, se estén replicando en su organismo.

25

- *Sistemas para la caracterización del tropismo viral en la infección por el VIH:*

La invención propuesta permite determinar este parámetro mediante dos herramientas: la generación de virus recombinantes que portan la envuelta completa de la población viral del paciente y la utilización de una célula diana que expresa establemente ambos receptores (SSPA-B7).

30

- *Modelos experimentales para la selección de compuestos con posible actividad antiviral:*

La invención propuesta permite realizar en un formato de microplaca fácilmente robotizable la detección de la actividad antiviral en un modelo que abarca todo el ciclo replicativo viral mediante el uso de vectores de ciclo múltiple. Con relación a los sistemas de determinación de actividad antiviral actualmente existentes que valoran la protección del efecto citopático, el sistema propuesto permite analizar la inhibición directa de la replicación del VIH y acorta considerablemente los tiempos de selección.

35

40

Por tanto, la presente invención también se refiere al uso de los clones virales descritos anteriormente en métodos analíticos para la determinación de resistencias fenotípicas a compuestos antirretrovirales para el tratamiento de infección por el VIH.

45

Una realización específica de la invención se refiere al uso de dichos clones virales en métodos analíticos para la determinación de la capacidad replicativa de virus recombinantes que portan secuencias *gag*, *pol* y/o *env* de pacientes con infección por VIH.

50

Por otro lado, la presente invención se refiere al uso de dichos clones virales recombinantes en métodos analíticos para la caracterización del tropismo viral en la infección por VIH.

En otra realización particular, la presente invención se refiere al uso de dichos clones virales recombinantes en métodos analíticos para la detección de anticuerpos neutralizantes frente al VIH en el suero de pacientes seropositivos para VIH y sujetos no infectados, sometidos o no a vacunación.

55

Por último, la presente invención se refiere al uso de dichos clones virales recombinantes en métodos analíticos para la selección y caracterización de la actividad antiviral de compuestos contra el VIH.

60 Breve descripción de las figuras

Figuras 1a y 1b: diagramas ilustrativos correspondientes a la producción de clones virales de la presente invención, de acuerdo con el proceso descrito en la realización preferida 1.

Figuras 2a y 2b: representaciones gráficas correspondientes a los resultados de los estudios expuestos en el apartado 2.1 de Modos de Realización de la Invención.

65

Figura 3: representación gráfica correspondiente a los estudios de determinación de capacidad replicativa

expuestos en el apartado 2.2. de Modos de Realización de la Invención.

Figura 4: expresión de CCR5 y CXR4 por el clon SSPA-B7, de acuerdo con el apartado 2.3 y 2.4 de Modos de Realización de la Invención.

Figura 5: efecto citopático inducido en el clon SSPA-B7 por los aislados NL4.3(X4) y Bal (R5), de acuerdo con el apartado 2.3 y 2.4 de Modos de Realización de la Invención.

Figura 6: análisis de la capacidad neutralizante del virus NL-Luc del plasma de un paciente en las condiciones del apartado 2.4(D) de Modos de Realización de la Invención.

Figura 7: resultados de los análisis de la actividad antiviral de dos compuestos estudiados de acuerdo con el apartado 2.5(C) de Modos de Realización de la Invención.

Figura 8: estructura general de los clones virales recombinantes de la presente invención, en la que: las LTR (repeticiones terminales largas) son las regiones con secuencia redundante (R) que juega un papel primordial durante el proceso de retrotranscripción; *gag* es el gen que codifica la proteína p55 de la cápside formada por 3 subunidades proteicas (MA, CA y NC); *pol* es el gen que codifica las enzimas virales necesarias para el proceso de replicación viral: proteasa (PRO), transcriptasa inversa (RT) e integrasa; *vif* codifica la proteína Vif asociada con la infecciosidad de los viriones extracelulares; *vpr* codifica la proteína Vpr que actúa como acelerador del ciclo de replicación a diferentes niveles; *tat* codifica la proteína Tat que es un transactivador; *vpu* codifica Vpu implicada en la liberación de los viriones; *env* es el gen que codifica la proteína gp160 de la envuelta viral; *rev* produce la proteína Rev, encargada del procesamiento y transporte al citoplasma del ARN mensajero; *nef* codifica la proteína Nef que regula negativamente moléculas CD4 y HLA de la célula infectada y desempeña un papel en la patogenicidad del virus; NotI y XhoI indican sitios únicos de restricción en la secuencia de ADN; Renilla indica la posición de clonación del gen indicador.

Figura 9: Clon viral recombinante IP HIV NL Ren, depositado en la Colección Española de Cultivos Tipo como CECT 5842, en la que Apal y Agel representan sitios únicos de restricción en la secuencia de ADN, y los restantes símbolos tienen el significado proporcionado anteriormente para la Figura 8.

Figura 10: Clon viral recombinante IP HIV NL LacZ/pol Ren, depositado en la Colección Española de Cultivos Tipo como CECT 5847, en la que LacZ indica la posición de clonación del gen *LacZ* sustituyendo un fragmento del gen *pol*, y los restantes símbolos tienen el significado proporcionado anteriormente.

Figura 11: Clon viral recombinante IP HIV NL LacZ/pr Ren, depositado en la Colección Española de Cultivos Tipo como CECT 5846, en la que NcoI indica un sitio único de restricción de la secuencia de ADN, y los restantes símbolos tienen el significado proporcionado anteriormente.

Figura 12: Clon viral recombinante IP HIV NL LacZ/rt Ren, depositado en la Colección Española de Cultivos Tipo como CECT 5845, donde los diferentes símbolos tienen el mismo significado indicado anteriormente.

Figura 13: Clon viral recombinante IP HIV NL LacZ/gag-pr Ren, depositado en la Colección Española de Cultivos Tipo como CECT 5848, en la que NarI y KspI indican sitios únicos de restricción en la secuencia de ADN y los restantes símbolos tienen el significado proporcionado anteriormente.

Figura 14: Clon viral recombinante IP HIV NL LacZ/env Ren, depositado en la Colección Española de Cultivos Tipo como CECT 5844, en la que XbaI indica un sitio único de restricción en la secuencia de ADN, "env. paciente" indica la posición de clonación del gen del paciente, y los demás símbolos tienen el significado proporcionado anteriormente.

Figura 15: Clon viral recombinante IP HIV JRRen, depositado en la Colección Española de Cultivos Tipo como CECT 5843, en la que XbaI indica un sitio único de restricción en la secuencia de ADN, "env JR-CSF" indica la posición de clonación del gen *env* del clon JR-CSF en lugar de la envuelta de NL4.3, y los restantes símbolos tienen el significado proporcionado anteriormente.

45 Modos de realización de la invención

Seguidamente se ilustra la presente invención con una descripción detallada de realizaciones preferidas, en la que se muestran los clones virales recombinantes de la invención así como sus principales aplicaciones junto con alguna de las técnicas generales de ingeniería genética empleadas en los diferentes casos, y todo ello haciendo uso de las figuras adjuntas para mayor claridad.

1.- Obtención de clones virales recombinantes.-

Se basa en el sistema de clonación de los fragmentos génicos de la transcriptasa inversa y de la proteasa del VIH en vectores virales portadores de genes marcadores.

(A) Descripción general de la técnica:

En la Figura 1a y 1b puede observarse esquemáticamente cómo se producen las partículas virales durante las 48 horas posteriores a la transfección del plasma viral en células 293T. La línea celular 293T se obtuvo del Depósito de la ATCC. El solicitante obtuvo el clon SSPA-B7 a partir de la línea celular MT-2 mediante transfección de un vector de expresión del gen CCR5 provisto de un marcador de resistencia para Geneticina. Después de la transfección se agrupan los sobrenadantes y se infectan las células diana SSPA-B7. La capacidad de los virus para completar un ciclo de replicación se cuantifica midiendo la actividad luciferasa en las células diana. La actividad de los inhibidores de la proteasa se mide añadiendo los primeros a las células transfectadas mientras que la actividad frente a inhibidores de la transcriptasa inversa y de entrada se mide añadiendo los fármacos a las células infectadas.

El proceso comprende las siguientes operaciones:

- A partir de 0,5 ml de plasma del paciente se realiza la extracción del ARN del VIH.
- 5 - El ARN viral se retrotranscribe y después se amplifica usando cebadores específicos de cada gen viral por reacción en cadena de la polimerasa. Los cebadores incluyen sitios de restricción específicos para la siguiente clonación en el virus de referencia del gen *pol* o sus fragmentos o del gen *env* en los diferentes clones virales según el tipo de virus recombinante que se desea generar.
- Tras la digestión enzimática del amplificado y del virus de referencia se realiza un proceso de ligamiento *in vitro* usando la ligasa de T4.
- 10 - La población del provirus recombinante generado se transfecta en la línea celular 293T y actúa como célula productora de virus recombinantes.
- La progenie infecciosa de virus recombinantes se reúne 48 horas después de la transfección y se usa para infectar la línea celular SSPA-B7.
- 15 - Cuando la aplicación es la determinación de resistencias a antirretrovirales, los dos últimos procesos se realizan en presencia de inhibidores de proteasa (en el caso de células productoras 293T), inhibidores de la transcriptasa inversa (en el caso de células diana SSPA-B7) o inhibidores de entrada viral (en el caso de células diana SSPA-B7).
- El nivel de sensibilidad de los distintos fármacos se define por medio de la concentración que proporciona una inhibición del 50% de la replicación viral (CI50) en comparación con un virus de referencia sin mutaciones de resistencia asociadas.
- 20 - La lectura de la sensibilidad a los distintos fármacos se realiza cuantificando la actividad renilla mediante un luminómetro Berthold Orion Microplate.

25 (B) Virus:

Se parte del vector proviral NL4.3 (Adachi et al. 1986). Este clon se ha modificado por ingeniería genética en el laboratorio produciendo clones virales de ciclo múltiple que expresan el gen indicador Renilla en lugar de *nef* y en los que se han introducido diferentes dianas de restricción para poder clonar el gen *pol* completo, los fragmentos Transcriptasa inversa o Proteasa por separado, las regiones gag - proteasa y gag - *pol* o el gen *env* completo.

Los clones virales recombinantes obtenidos permiten clonar el *gen pol* completo del paciente, la Transcriptasa inversa y la proteasa por separado y la región *gag* junto con la proteasa o el *gen pol* completo. Asimismo permiten la clonación del *gen env* completo del paciente. Todos son virus de ciclo múltiple y son muy útiles cuando existen múltiples mutaciones de resistencia en la RT y la Proteasa del paciente ya que se mejora la capacidad replicativa final.

(C) Cebadores:

40 En las operaciones más importantes anteriormente mencionadas, se usan los siguientes cebadores y las siguientes células:

- **Mutagénesis**

Mutagénesis Not I:

45 5' GCTATAAGATGGGTGGCGCGGCCGCAAAAAGTAGTGTGATTGG 3'
5' CCAATCACACTACTTTTTGCGGCCGCGCCACCCATCTTATAGC 3'

Mutagénesis Nco I:

50 5' CCAGTAAAATTAAGCCAGCCATGGATGGCCAAAAG 3'
5' CTTTTGGGCCATCCATGGCTGGCTTTAATTTACTGG 3'

Mutagénesis Ksp I:

55 5' GAAGCAGAAGTAATTCGCGGAGACAGGGCAAGAAAC 3'
5' GTTCTTGCCCTGTCTCCGCGGAATTACTTCTGCTTC 3'

Mutagénesis Nar I:

60 5' GAAAATACCGCATCAGGACCCATTCGCCATTCAGGC 3'
5' GCCTGAATGGCGAATGGGTCCTGATGCGGTATTTTC 3'

Mutagénesis XbaI:

65 5'GCATTAGTAGTAGCAATAATAATAGCTCTAGAGCTGTGGTCCATAGTAATCATAG

5'CTATGACTACTATGGACCACAGCTCTAGAGCTATTATTATTGCTACTACTAATGC

- Amplificación de gen pol de pacientes

5 POL: 5'GCCAAAAATTGCAGGGCCCCTAGGA3'
 5'TCTTTTGGTGCATAATACACTCCATGTACCGG3'
 RO: 5'GCCAAAAATTGCAGGGCCCCTAGGA3'
 5'CATGCCATGGCTGGCTTTAATTTTACTGGTACAGTC3'
 RT: 5'CATGCCATGGATGGCCCCAAAAGTTAAACAATGGCC3'
 10 5'TCTTTTGGTGCATAATACACTCCATGTACCGG3'
 GAG-PR: 5'GGAAAATCTCTAGCAGTGGCGCCCGAACAG3'
 5'CATGCCATGGCTGGCTTTAATTTTACTGGTACAGTC3'
 GAG-POL: 5'GGAAAATCTCTAGCAGTGGCGCCCGAACAG3'
 5'CTTGCCCTGTCTCTGCTGGAATTACTTCTGC3'

- Amplificación gen Env de pacientes

. Primera amplificación:

20 5' TATGAACTTACGGGGATACTTGGG 3' (posición 5697 –5721 del pNL4.3)
 5' CTGCCAATCAGGGAAGTAGCCTTGTGT 3' (posición 9135 –9161 del pNL4.3)

. PCR anidada:

25 (diana Xbal)

5'GTAGCAATAATAATAGCTCTAGAGCTGTGGTCCATAGTAATC3' (posición 6097 – 6138 del pNL4.3)
 (diana Not I)

30 5'TACTTTTTGCGGCCGCGCCACCCATCTTATAGC (posición 8779 - 8811 del pNL4.3)

(D) Clones virales recombinantes basados en VIH.

El procedimiento expuesto en los apartados anteriores usando los cebadores, sondas, secuencias diana, líneas celulares y condiciones indicadas ha permitido la obtención de los siguientes clones virales de la presente invención:

35

IP HIV NL Ren: Número de Depósito CECT 5842
 IP HIV NL LacZ/pr Ren: Número de Depósito CECT 5846
 IP HIV NL LacZ/rt Ren: Número de Depósito CECT 5845
 IP HIV NL LacZ/pol Ren: Número de Depósito CECT 5847
 40 IP HIV NL LacZ/gag-pr Ren: Número de Depósito CECT 5848
 IP HIV NL LacZ/env Ren: Número de Depósito CECT 5844
 IP HIV JRRen: Número de Depósito CECT 5843

45 **2.- EVALUACIÓN DE LOS CLONES VIRALES DE LA INVENCION EN DIFERENTES SISTEMAS DE DETERMINACIÓN ANALÍTICA**

2.1.- SISTEMA DE DETERMINACIÓN DE RESISTENCIAS FENOTÍPICAS A FÁRMACOS ANTIRRETROVIRALES

Los clones ensayados han sido los siguientes:

50

IP HIV NL Ren,
 IP HIV NL LacZ/pol Ren,
 IP HIV NL LacZ/pr Ren,
 IP HIV NL LacZ/rt Ren,
 55 IP HIV NL LacZ/ gag-pr Ren e
 IP HIV NL LacZ/env Ren.

Los resultados de los ensayos realizados con estos clones virales de acuerdo con el sistema de la invención para la determinación de resistencias fenotípicas frente a fármacos antirretrovirales se ilustran en las figuras 2a y 2b.

60

La figura 2a representa el perfil fenotípico de sensibilidad del clon viral **IP HIV NL Ren** frente a los siguientes fármacos: inhibidores de la transcriptasa inversa análogos a nucleósidos 3TC (A), AZT/ZDV (B), d4T (C), ddl (D); inhibidores de la transcriptasa inversa no análogos a nucleósidos; Efavirenz (E); inhibidores de proteasa: Saquinavir (F).

65

La figura 2b es una representación gráfica ilustrativa de un estudio de la determinación de la resistencia de AZT en

un virus de tipo silvestre (línea continua) y en un virus con las mutaciones M41L,K70R,T215F,K219Q(línea discontinua): Fold=36

5 Entre las ventajas de este sistema frente a otros sistemas existentes en la actualidad, pueden mencionarse los siguientes:

- a. Posibilidad de analizar por separado la resistencia a inhibidores de proteasa y de transcriptasa inversa. Esto posibilita realizar una evaluación independiente de resistencias frente a distintos grupos farmacológicos.
- b. Mayor eficacia en la evaluación de aislados virales con baja capacidad replicativa.
- 10 c. Permite el seguimiento de determinados pacientes en fracaso terapéutico.
- d. Con respecto al sistema patentado por Virologic (Patente de Estados Unidos 5.837.464), el sistema de clones virales recombinantes de la presente invención tiene diferencias notables, que conducen a las importantes ventajas citadas anteriormente, concretamente:

- 15 • Virologic clona el gen luciferasa en la envuelta y el solicitante en Nef.
- Virologic usa enzimas similares pero no idénticas a las usadas en el presente documento.
- El sistema de la presente invención ha modificado por mutagénesis el esqueleto de NL4.3.
- En la presente invención pueden usarse vectores de ciclo múltiple y clonación separada de la RT y Proteasa y la evaluación de los fragmentos gag-Proteasa y gag-pol, aspectos que el sistema de Virologic no permite.

20 **2.2.- SISTEMA DE DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD REPLICATIVA.**

En la figura 3 se representa un histograma en el que se demuestra la mejora en la recuperación de un virus con mutaciones de resistencia múltiples en la Proteasa y la RT cuando se realiza la clonación por separado de ambos fragmentos que con el gen *pol* completo. Este efecto es debido a la acumulación de pérdida de eficacia biológica viral que puede dar como resultado virus con baja capacidad replicativa difícil de detectar en ensayos de ciclo único cuando se suman las pérdidas de eficacia biológica debido a mutaciones en la Transcriptasa Inversa y la Proteasa.

Los clones virales sometidos a evaluación han sido los siguientes:

30 **IP HIV NL LacZ/pol Ren,
IP HIV NL LacZ/pr Ren,
IP HIV NL LacZ/rt Ren, y
IP HIV NL LacZ/gag-pr Ren,**

35 Las ventajas más destacables del sistema de la invención respecto a otros existentes en la actualidad, son las siguientes:

- 40 a. El sistema es muy sensible al utilizar la actividad renilla.
- b. El sistema mide directamente la actividad antiviral, a diferencia del ensayo con MTT que mide la protección frente al efecto citopático, una medida indirecta de la replicación viral.
- c. Tiene la posibilidad de clonar por separado la transcriptasa inversa o la proteasa lo que permite definir en qué proteína radica la pérdida de capacidad replicativa.
- 45 d. Tiene la posibilidad de clonar conjuntamente el gen *gag-pro* lo que permite definir el papel de sitios de escisión en la poliproteína del núcleo viral por la proteasa del VIH en la mejora de la capacidad replicativa viral.
- e. El uso de sistemas virales en los que puede detectarse replicación con un número limitado de ciclos permite que, cuando existe escape viral, no se igualen las curvas de neutralización en múltiples ciclos del virus.

50 **2.3.- SISTEMA DE DETERMINACIÓN DEL TROPISMO VIRAL, RESISTENCIAS FENOTÍPICAS A INHIBIDORES DE LA FUSIÓN.**

La invención propuesta se basa en el sistema de clonación de los fragmentos génicos de la envuelta en vectores virales portadores de genes marcadores. Se requiere a la vez una célula que exprese los dos correceptores mayores del virus CCR5 y CXCR4.

55 (A) Descripción general de la técnica.

A partir de 0,5 ml de plasma del paciente se realiza la extracción del ARN del VIH.

- 60 - El ARN viral se retrotranscribe y posteriormente se amplifica usando cebadores para cada gen viral mediante la reacción en cadena de la polimerasa. Los cebadores incluyen sitios de restricción específicos para la clonación posterior en el virus de referencia e incluyen toda la envuelta del virus.
- Tras la digestión enzimática del amplificado y del virus de referencia se realiza un proceso de ligamiento in vitro usando la ligasa de T4.
- 65 - La población de los provirus recombinantes generados se transfecta en la línea celular 293-T y actúa como una célula productora de virus recombinantes.

- La progenie infecciosa de virus recombinantes se reúne 48 horas después de la transfección y se usa para infectar la línea celular SSPA-B7 que expresa CCR5 y CXCR4 (Figura 4).

(B) Virus.

5 Se parte del vector proviral NL4.3 (Adachi et al. 1986). Estos clones se han sido modifica por ingeniería genética en el laboratorio produciendo clones virales de ciclo múltiple y en los que se clona el gen *env* completo. Con el virus recombinante generado se puede analizar el tropismo viral o la resistencia a inhibidores de entrada. Los correspondientes clones virales son los siguientes:

10

**IP HIV NL Ren,
IP HIV JRRen e
IP HIV NL LacZ/env Ren.**

15 (C) Células.

Se ha generado mediante técnicas de ingeniería genética un clon celular de SSPA-B7 que expresa el receptor CCR5 (Figura 4) y que es susceptible a la infección por virus R5, X4 ó R5X4. La infección por estas tres variantes es productiva e induce efecto citopático (Figura 5).

20

Las ventajas más destacables de este sistema frente a otros sistemas existentes en la actualidad, son las siguientes:

- a. La posibilidad de clonar la envuelta completa del VIH. Otros sistemas usan la recombinación que presenta una eficacia muy baja o clonan fragmentos más pequeños de la envuelta.
- 25 b. La disponibilidad de una célula que expresa los receptores CCR5 y CXCR4.
- c. Su uso en ensayos fenotípicos a inhibidores de entrada.

2.4.- SISTEMA PARA LA DETECCIÓN Y TITULACIÓN DE ANTICUERPOS NEUTRALIZANTES.

30 (A) Descripción general de la técnica.

La invención propuesta se basa en la medición de la actividad neutralizante en el suero de pacientes frente a la infección de una línea permisiva de virus portadores de genes marcadores y con diferentes envueltas. El sistema incluye dos clones virales con envueltas R5 y X4 y una célula que expresa los dos correceptores más grandes de los virus CCR5 y CXCR4.

35

(B) Virus:

40 Se parte del vector proviral NL4.3 (Adachi et al. 1986). Estos clones se han modifica por ingeniería genética en el laboratorio produciendo clones virales de ciclo múltiple y en los que se clona el gen *env* completo. Con el virus recombinante generado se puede analizar la capacidad neutralizante frente a distintas envueltas del virus incluyendo la del virus del propio paciente. Los correspondientes clones virales así obtenidos y evaluados han sido los siguientes:

45 **IP HIV NL Ren,
IP HIV JRRen e
IP HIV NL LacZ/env Ren**

(C) Células.

50

Se ha generado mediante técnicas de ingeniería genética un clon celular de SSPA-B7 que expresa el receptor CCR5 (figura 4) y que es susceptible a la infección por el virus R5, X4 o R5X4. La infección por estas tres variantes es productiva e induce efecto citopático (figura 5).

55 (D) Resultados.

Los resultados de los ensayos efectuados con estos clones virales de acuerdo con el sistema de la invención para la detección y titulación de anticuerpos neutralizantes que se ilustran en la figura 6.

60 Dicha figura 6 es una representación gráfica en la que se ilustran los resultados del análisis de la capacidad neutralizante del virus HIV NL Ren del plasma de un paciente antes (4.35) y después (4.2) de realizar una serie de interrupciones controladas de tratamiento. En el ensayo clásico con MTT no pudieron observarse diferencias entre ambas muestras.

65 Entre las ventajas del sistema respecto a otros existentes en la actualidad cabe destacar las siguientes:

- a. El sistema es muy sensible al usar actividad renilla.

b. El sistema mide directamente la actividad antiviral, a diferencia del ensayo con MTT que mide la protección frente al efecto citopático, una medida indirecta de la replicación viral.

c. Tiene la posibilidad de clonar la envuelta completa de diferentes VIH o incluso la del propio paciente ("ensayo de neutralización autóloga").

5 d. El uso de sistemas virales en los que puede detectarse replicación con un número limitado de ciclos significa que, cuando existe escape viral, no se igualen las curvas de neutralización en múltiples ciclos del virus.

e. La disponibilidad de una célula que expresa los receptores CCR5 y CXCR4.

f. El interés renovado en el estudio de anticuerpos neutralizantes en el contexto de nuevos modelos de vacunas y

g. su uso como marcador de reemplazo que aumentará la demanda de estos ensayos en un futuro inmediato.

10

El sistema es robotizable.

2.5.-SISTEMA PARA LA SELECCIÓN DE COMPUESTOS Y PRODUCTOS CON POSIBLE ACTIVIDAD CONTRA EL VIH

15

(A) Descripción general de la técnica.

La invención propuesta se basa en la medición de la actividad antiviral contra el VIH de compuestos químicos y derivados de productos naturales utilizando virus portadores de genes marcadores.

20

(B) Virus.

Se parte del vector proviral NL4.3 (Adachi et al. 1986). Estos clones se han sido modifica por ingeniería genética en el laboratorio produciendo clones virales de ciclo múltiple con la envuelta del VIH.

25

Limitando la infección a un solo ciclo de replicación (18h) se puede detectar una actividad antiviral desde el proceso de entrada hasta la transcripción/traducción de proteínas virales. En este periodo de tiempo no se detectaría acción antiviral en etapas posteriores, como en el caso de inhibidores de proteasa o inhibidores de encapsidamiento o gemación viral.

30

Para estos casos se evalúa la actividad renilla más allá del primer ciclo (18 horas). Una disminución en la actividad luciferasa en el ciclo único y múltiple indica que el compuesto actúa en etapas previas al procesamiento de proteínas virales. Sin embargo, si sólo actúa sobre el ciclo múltiple indicaría que actúa en etapas post-integración/replicación viral. El correspondiente clon viral recombinante es el siguiente:

35

IP HIV NL Ren.

(C) Resultados:

40

Los resultados de los ensayos efectuados con estos clones virales de acuerdo con el sistema de la invención para la selección de compuestos, se ilustran en la Figura 7, en la cual se muestran las representaciones gráficas correspondientes al análisis de la actividad antiviral de dos compuestos derivados de productos vegetales. En el ensayo clásico con MTT se mide la toxicidad del compuesto (línea con rombos) y la protección frente al efecto citopático (línea con cuadrados). En los paneles de la derecha se analiza la inhibición de la replicación de un virus luciferasa. En este momento se está caracterizando el mecanismo de acción de ambos compuestos y se sabe que el compuesto 039 es un inhibidor de entrada viral.

45

Cabe destacar las siguientes ventajas del sistema respecto a otros existentes en la actualidad

50

a. No se han descrito sistemas de evaluación de actividad antiviral usando virus recombinantes.

b. El sistema es muy sensible al usar actividad renilla.

c. El sistema mide directamente actividad antiviral, a diferencia del ensayo con MTT que mide la protección frente al efecto citopático, una medida indirecta de la replicación viral.

d. El sistema es robotizable y aplicable a una selección masiva.

55

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> FUNDACIÓN PARA LA INVESTIGACIÓN Y LA PREVENCIÓN DEL SIDA EN ESPAÑA; INSTITUTO DE SALUD CARLOS III

5 <130> NUEVOS CLONES VIRALES RECOMBINANTES BASADOS EN EL VIH Y USO DE LOS MISMOS EN MÉTODOS ANALÍTICOS

<130> 120050086MAD

10 <160> 24

<170> PatentIn versión 3.1

15 <210> 1
<211> 43
<212> ADN
<213> Artificial

20 <220>
<221> misc_feature
<222> (1) .. (43)
<223> oligo mutagénesis NotI 1

25 <400> 1
gctataagat gggtagcgcg gccgcaaaaa gtagtgtgat tgg 43

<210> 2
<211> 43
30 <212> ADN
<213> Artificial

<220>
<221> misc feature
35 <222> (1) .. (43)
<223> oligo mutagénesis NotI 2

<400> 2
ccaatcacac tacttttgc ggccgcgcca cccatcttat agc 43

40 <210> 3
<211> 37
<212> ADN
<213> Artificial

45 <220>
<221> misc feature
<222> (1) .. (37)
<223> oligo mutagénesis NcoI 1

50 <400> 3
ccagtaaaat taaagccagc catggatgac ccaaaag 37

<210> 4
55 <211> 37
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
60 <221> misc_feature
<222> (1) .. (37)
<223> oligo mutagénesis NcoI 2

<400> 4
65 ctttgggcc atccatggct ggcttaatt ttactgg 37

ES 2 375 652 T3

<210> 5
<211> 38
<212> ADN
<213> Artificial

5
<220>
<221> misc_feature
<222> (1) .. (38)
<223> oligo mutagénesis Kspl 1

10
<400> 5
gaagcagaag taattccgc ggagacagg caagaaac 38

<210> 6
<211> 38
<212> ADN
<213> Artificial

15
<220>
<221> mis_feature
<222> (1) .. (38)
<223> oligo mutagénesis Kspl 2

20
<400> 6
gtttctgcc ctgtctccg gggaattact tctgctc 38

25
<210> 7
<211> 36
<212> ADN
<213> Artificial

30
<220>
<221> misc_feature
<222> (1) .. (36)
<223> oligo mutagénesis Narl 1

35
<400> 7
gaaaataccg catcaggacc cattcgccat tcaggc 36

40
<210> 8
<211> 36
<212> ADN
<213> Artificial

45
<220>
<221> misc_feature
<222> (1) .. (36)
<223> oligo mutagénesis Narl 2

50
<400> 8
gcctgaatgg cyaatgggtc ctgatcggt atttc 36

<210> 9
<211> 55
<212> ADN
<213> Artificial

55
<220>
<221> misc_feature
<222> (1) .. (55)
<223> oligo mutagénesis Xbal 1

60
<400> 9
gcattagtag tagcaataat aatagctcta gagctgtgt ccatagtaat catag 55

65
<210> 10

<211> 55
 <212> ADN
 <213> Artificial

5 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1) .. (55)
 <223> oligo mutagénesis Xbal 2

10 <400> 10

**ctatgattac tatggaccac agctclagag ctattattat tgctactact
 aatgc 55**

<210> 11
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Artificial

15

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1) .. (25)
 <223> oligo POL 1

20

<400> 11
 gccaaaaatt gcaggcccc tagga 25

25

<210> 12
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Artificial

30

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1) .. (35)
 <223> oligo POL 2

35

<400> 12
 tctttgatg ggtcataata cactccatgt accgg 35

40

<210> 13
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Artificial

45

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1) .. (25)
 <223> oligo PRO 1

50

<400> 13
 gccaaaaatt gcaggcccc tagga 25

55

<210> 14
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Artificial

60

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1) .. (36)
 <223> oligo PRO 2

<400> 14
 catgcatgg ctggcttaa tttactggt acagtc 36

ES 2 375 652 T3

<210> 15
<211> 35
<212> ADN
5 <313> Artificial

<220>
<221> misc_feature
<222> (1) .. (35)
10 <223> oligo RT 1
<400> 15
catgccatgg atggcccaaa agttaaaciaa tggcc 35

<210> 16
<211> 35
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
20 <221> misc_feature
<222> (1) .. (35)
<223> oligo RT 2

<400> 16
25 Lctttgatg ggtcataata cactccatgt accgg 35

<210> 17
<211> 30
<212> ADN
30 <213> Artificial

<220>
<221> misc_feature
<222> (1) .. (30)
35 <223> oligo GAG-PR 1

<400> 17
ggaaaatctc tagcagtggc gcccgaaacag 30

40 <210> 18
<211> 36
<212> ADN
<213> Artificial

45 <220>
<221> misc_feature
<222> (1) .. (36)
<223> oligo CAC-PR 2

50 <400> 18
catgccatgg ctggcttaa tttactggt acagtc 36

<210> 19
<211> 30
55 <212> ADN
<213> Artificial

<220>
<221> misc_feature
60 <222> (1) .. (30)
<223> oligo GAG POL 1

<400> 19
ggaaaatctc tagcagtggc gcccgaaacag 30

65 <210> 20

ES 2 375 652 T3

<211> 31
<212> ADN
<213> Artificial

5 <220>
<221> misc feature
<222> (1) .. (31)
<223> oligo CAC-POL 2

10 <400> 20
ctggccctgt cctgctgga attactctg c 31

<210> 21
<211> 25

15 <212> ADN
<213> Artificial

<220>
<221> misc_feature
20 <222> (1) .. (25)
<223> oligo Env 1

<400> 21
tatgaaactt acggggatag ttggg 25

25 <210> 22
<211> 27
<212> ADN
<213> Artificial

30 <220>
<221> misc_feature
<222> (1) .. (27)
<223> oligo Env 2

35 <400> 22
ctgccaatca gggaagtag cttgtg 27

<210> 23
40 <211> 42
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
45 <221> misc feature
<222> (1) .. (42)
<223> oligo anidado Env 1

<400> 23
50 gttagcaataa taatagctct agagctgtgg tccatagtaa tc 42

<210> 24
<211> 33
<212> ADN

55 <213> Artificial

<220>
<221> misc_feature
<222> (1) .. (33)

60 <223> oligo anidado Env 2

<400> 24
tactttttgc ggccgcca cccatcttat agc 33

65

REIVINDICACIONES

1. Clones virales recombinantes basados en VIH, **caracterizados porque** comprenden el gen LacZ clonado sustituyendo una secuencia del genoma, **y porque** comprenden una estructura general que contiene, en dirección 5' a 3', los siguientes elementos:
- secuencias LTR o terminales redundantes (R) que contienen numerosas secuencias consenso para factores de transcripción que regulan la expresión viral;
 - el gen *gag*
 - el gen *pol* cuyo extremo 5' solapa con el elemento *gag*;
 - el gen *vif* cuyo extremo 5' solapa con el elemento *pol* y su extremo 3' con el elemento *vpr*;
 - el gen *vpr* cuyo extremo 5' solapa con el elemento *vif*;
 - *tat* cuyo segundo exón está contenido dentro de la secuencia *env*;
 - el gen *vpu*;
 - el gen *env*;
 - el gen *rev* cuyo segundo exón está contenido dentro de la secuencia *env*;
 - el gen *nef* que codifica la proteína Nef, y que está truncado en las bases en las posiciones 8.796 y 8.887 del genoma viral;
 - *NotI* es un sitio de restricción para la enzima NotI, que se ha introducido por mutagénesis dirigida en la posición 8.796 del genoma viral;
 - *XhoI* es un sitio de restricción para la enzima XhoI, en la posición 8.887 del genoma viral;
 - *Renilla* es el gen que codifica la proteína indicadora luciferasa de Renilla y que se ha clonado en los sitios de restricción NotI-XhoI en las posiciones 5' y 3', respectivamente; y
 - LTR cuyo extremo 5' solapa con el extremo 3' del elemento *nef*.
2. Clon viral recombinante de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado porque** dicho clon es el clon IP HIV NL LacZ/rt Ren, depositado en la Colección Española de Cultivos Tipo como CECT 5845, que posee un sitio único de restricción para la enzima NcoI, que se ha introducido por mutagénesis dirigida en la posición 2.593 de la secuencia de ADN, y el gen *LacZ* está clonado entre los sitios de restricción NcoI-AgeI en las posiciones 5' y 3' respectivamente, sustituyendo el fragmento del gen *pol* que codifica la transcriptasa inversa.
3. Clon viral recombinante de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado porque** dicho clon es el clon IP HIV NL LacZ/pr Ren, depositado en la Colección Española de Cultivos Tipo como CECT 5846, que posee un sitio único de restricción para la enzima NcoI, que se ha introducido por mutagénesis dirigida en la posición 2.593 en la secuencia de ADN, y el gen *LacZ* está clonado entre los sitios de restricción ApaI-NcoI en las posiciones 5' y 3', respectivamente, sustituyendo el fragmento del gen *pol* que codifica la proteasa.
4. Clon viral recombinante de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado porque** dicho clon es el clon IP HIV NL LacZ/pol Ren, depositado en la Colección Española de Cultivos Tipo como CECT 5847, que posee el gen *LacZ* clonado entre los sitios de restricción ApaI-AgeI en las posiciones 5' y 3' respectivamente, sustituyendo el fragmento del gen *pol* que codifica la transcriptasa inversa.
5. Clon viral recombinante de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado porque** dicho clon es el clon IP HIV NL LacZ/gag-pr Ren, depositado en la Colección Española de Cultivos Tipo como CECT 5848, que posee sitios únicos de restricción para las enzimas NarI y KspI, introducida esta última por mutagénesis dirigida, en las posiciones 637 y 4.498, respectivamente, en la secuencia de ADN, y el gen *LacZ* está clonado entre los sitios de restricción ApaI-NcoI en las posiciones 5' y 3', respectivamente, sustituyendo el fragmento del gen *pol* que codifica la proteasa.
6. Clon viral recombinante de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado porque** dicho clon es el clon IP HIV NL LacZ/env Ren, depositado en la Colección Española de Cultivos Tipo como CECT 5844, que posee un sitio único de restricción, introducido por mutagénesis dirigida en la posición 6.112 de la secuencia de ADN y el gen *LacZ* está clonado en los sitios de restricción XbaI-NotI en las posiciones 5' y 3' respectivamente, sustituyendo al gen *env*.
7. El uso de clones virales recombinantes definidos en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en métodos analíticos *in vitro* para la determinación de resistencias fenotípicas a fármacos antirretrovirales para el tratamiento de infección por VIH.
8. El uso de clones virales recombinantes definidos en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en métodos analíticos *in vitro* para la determinación de la capacidad replicativa de virus recombinantes que portan secuencias *gag*, *pol* y/o *env* de pacientes con infección por VIH.
9. El uso de clones virales recombinantes definidos en la reivindicación 6, en métodos analíticos *in vitro* para la caracterización del tropismo viral en la infección por VIH.
10. El uso de clones virales recombinantes definidos en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en métodos analíticos *in vitro* para la detección de anticuerpos neutralizantes contra el VIH en suero de pacientes seropositivos

para el VIH y de sujetos no infectados, sometidos a vacunación.

11. El uso de clones virales recombinantes definidos en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en métodos analíticos *in vitro* para la selección y caracterización de compuestos con actividad antiviral contra el VIH.

5

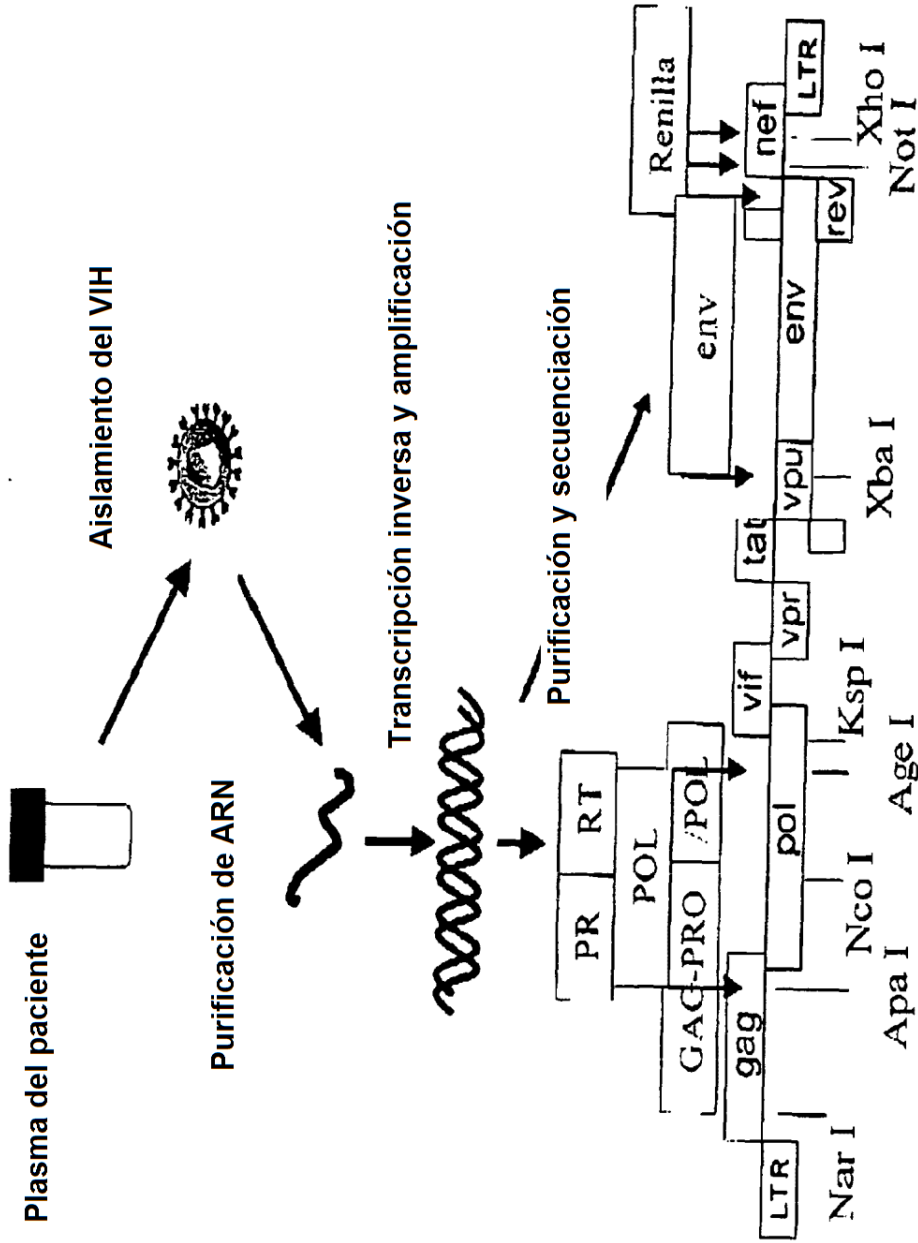


FIG. 1a

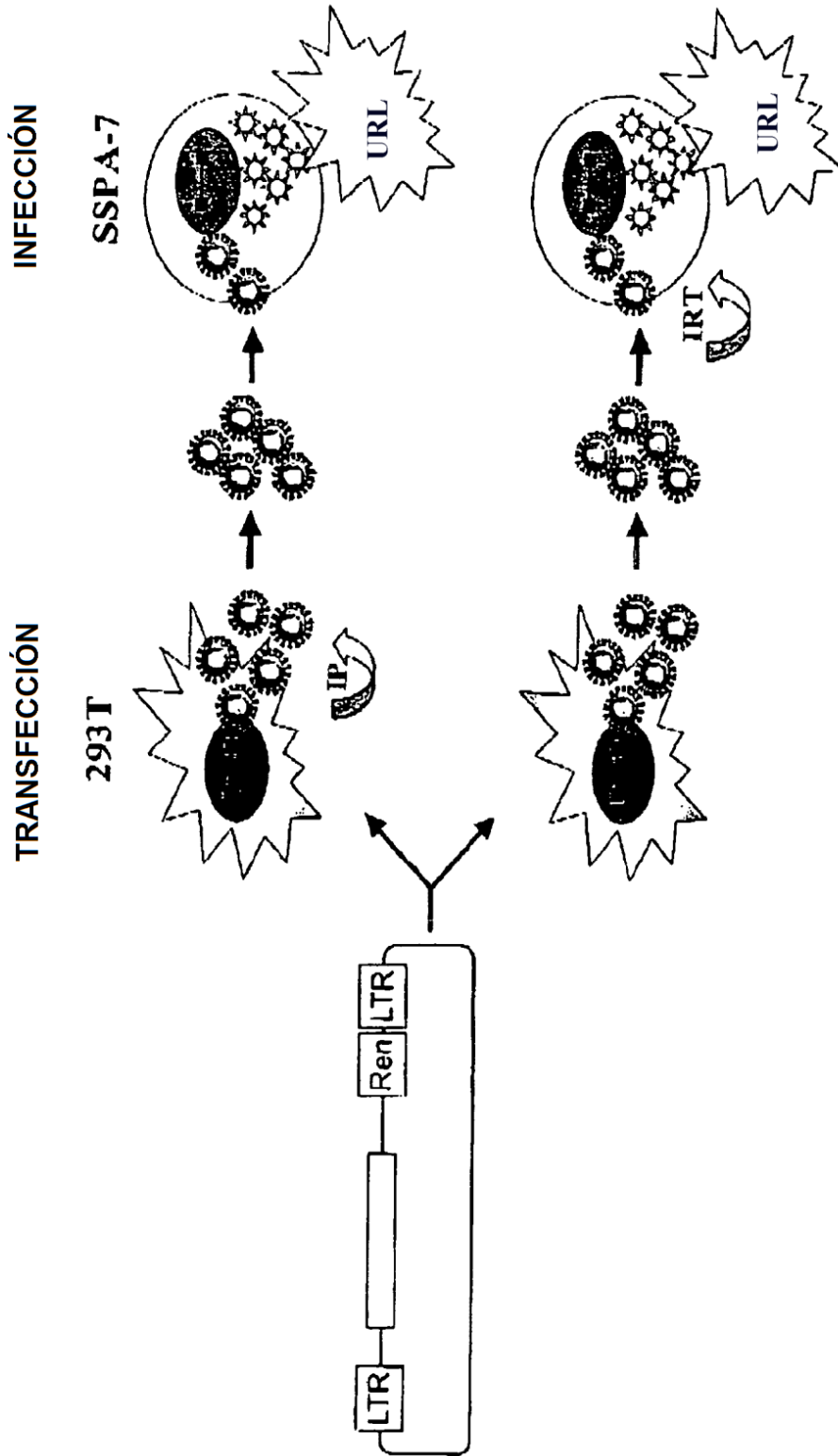


FIG. 1b

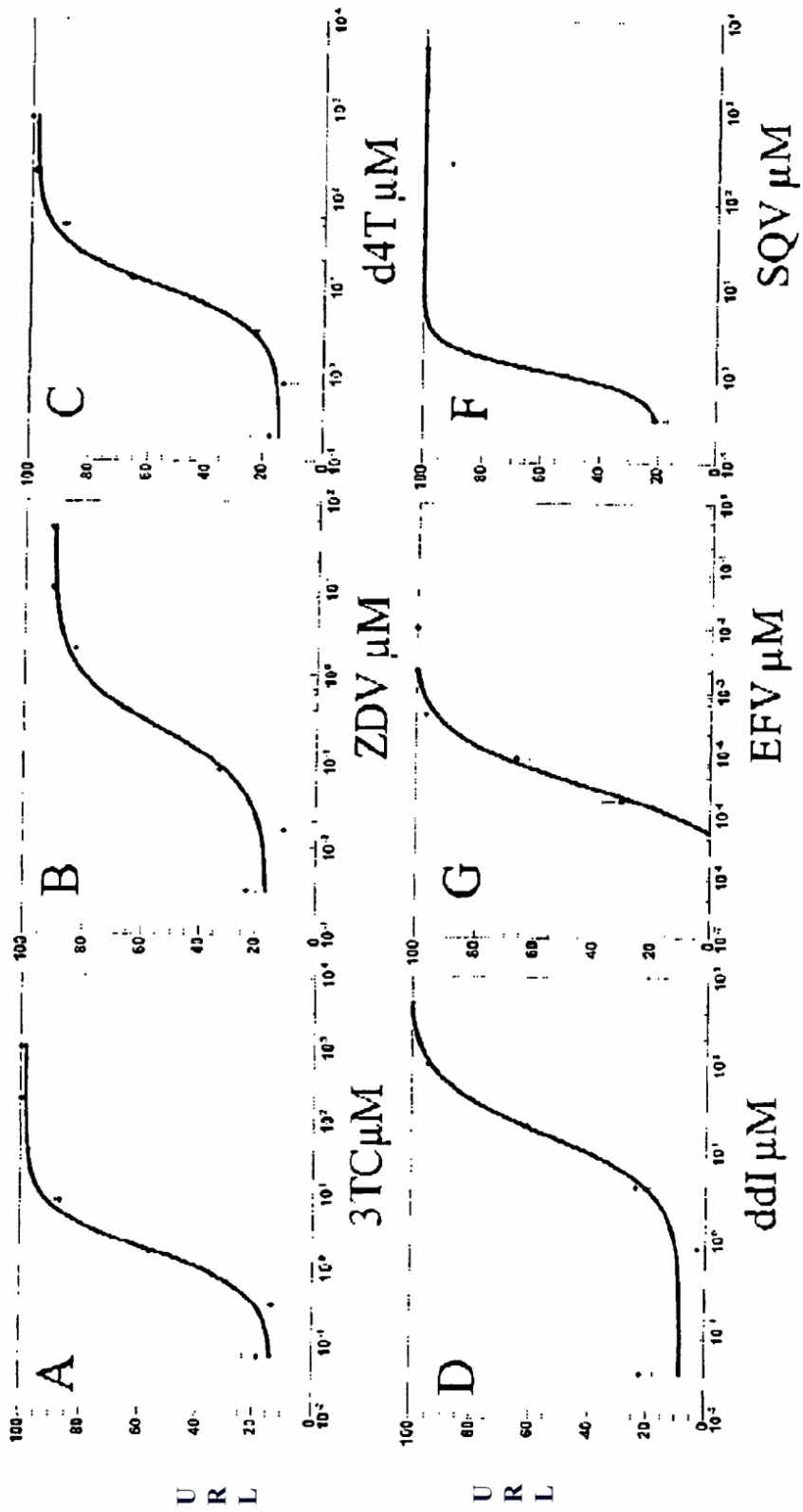


FIG. 2a

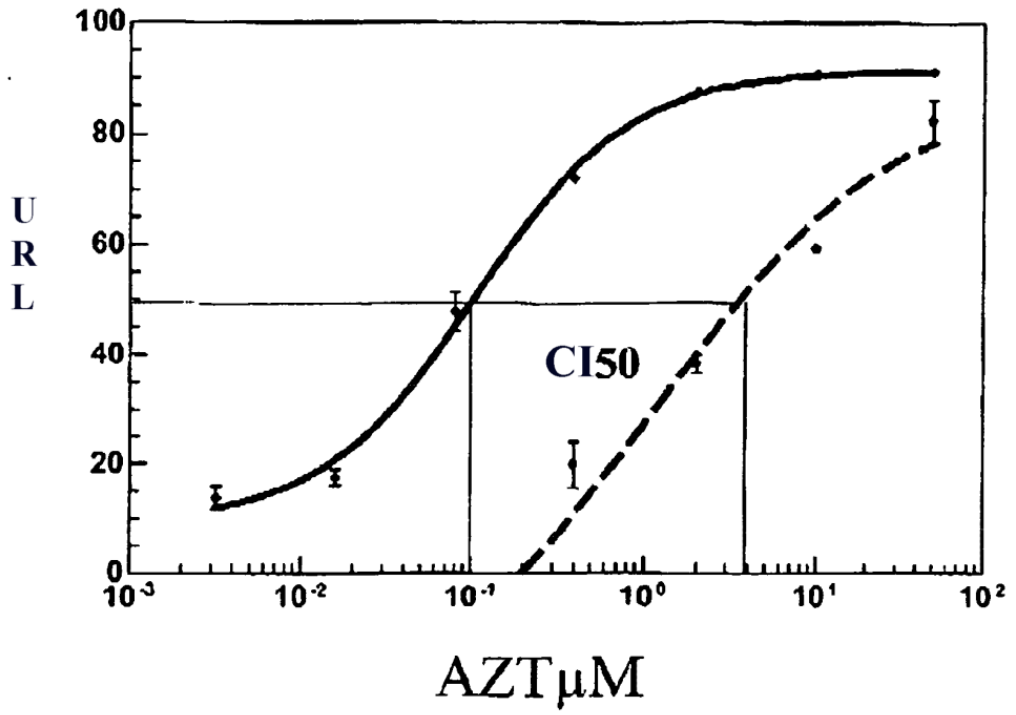


FIG. 2b

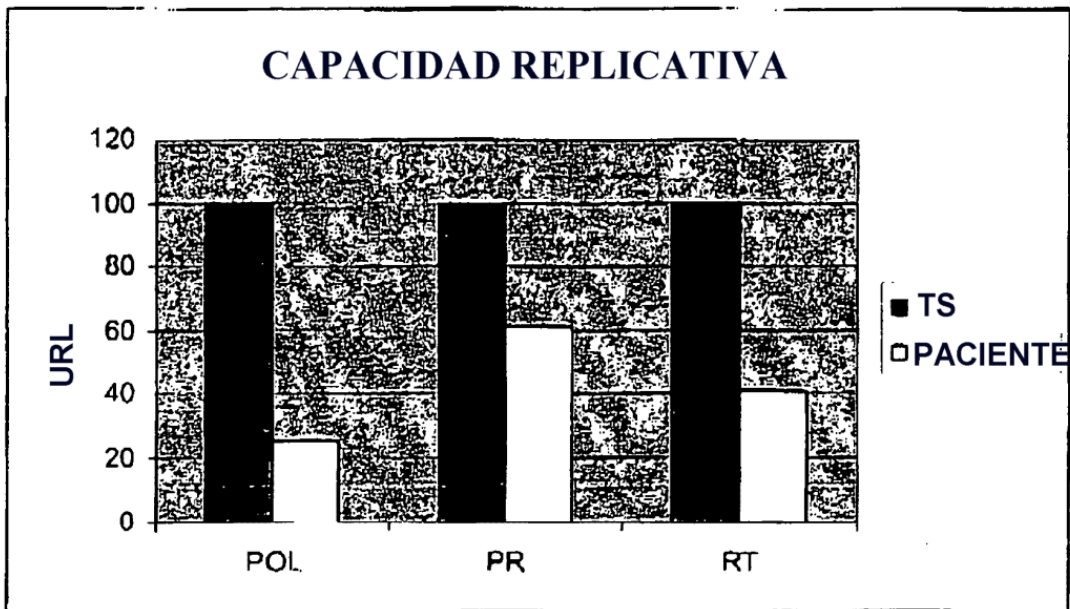


FIG. 3

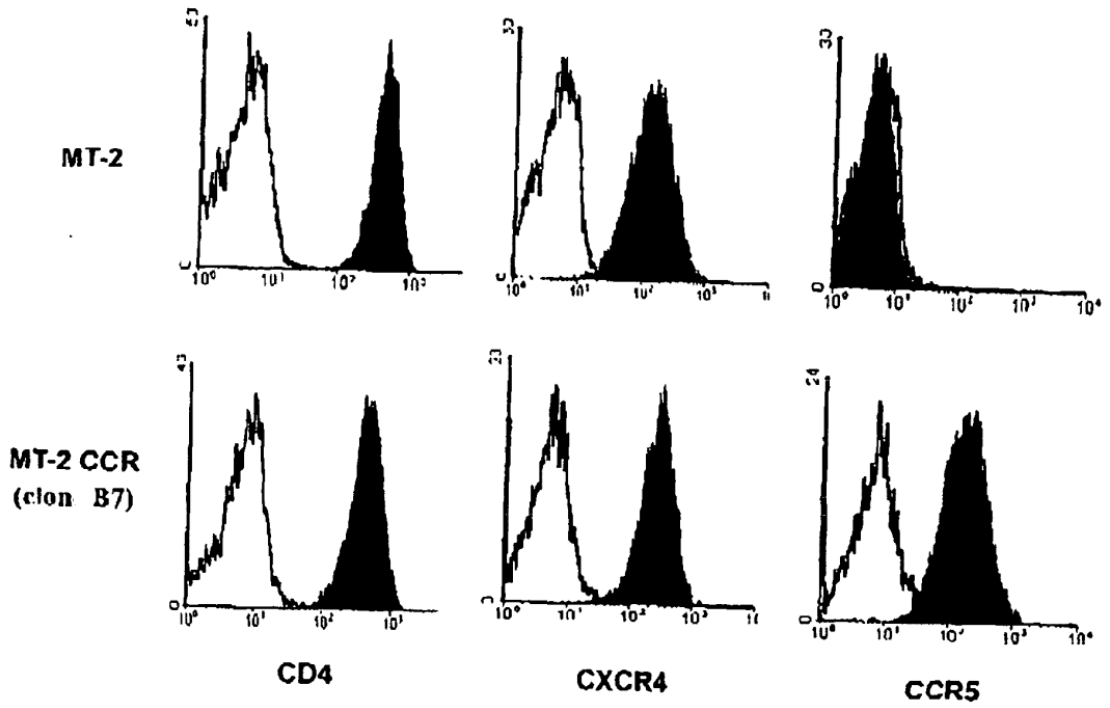


FIG. 4

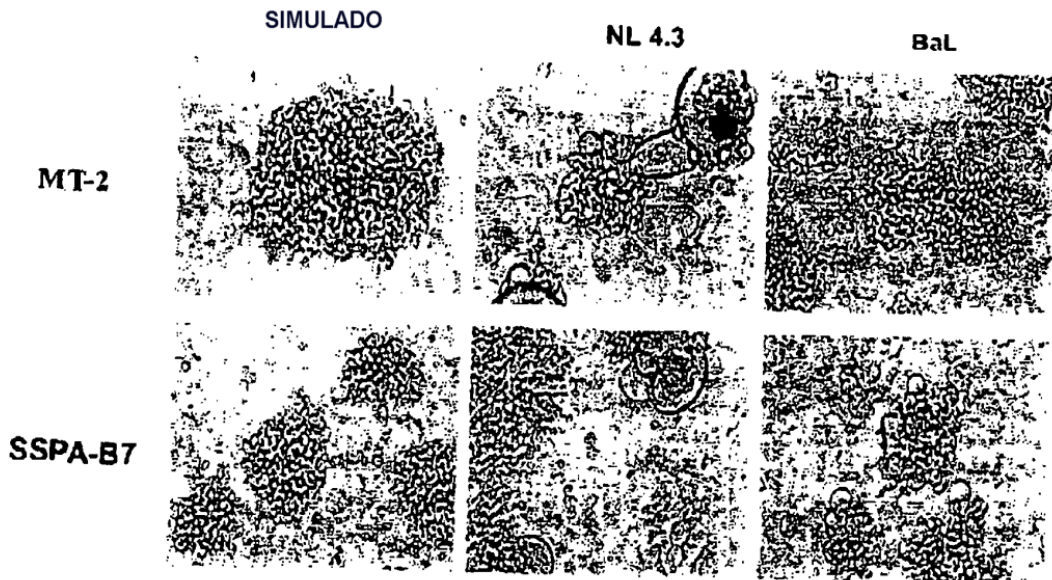


FIG. 5

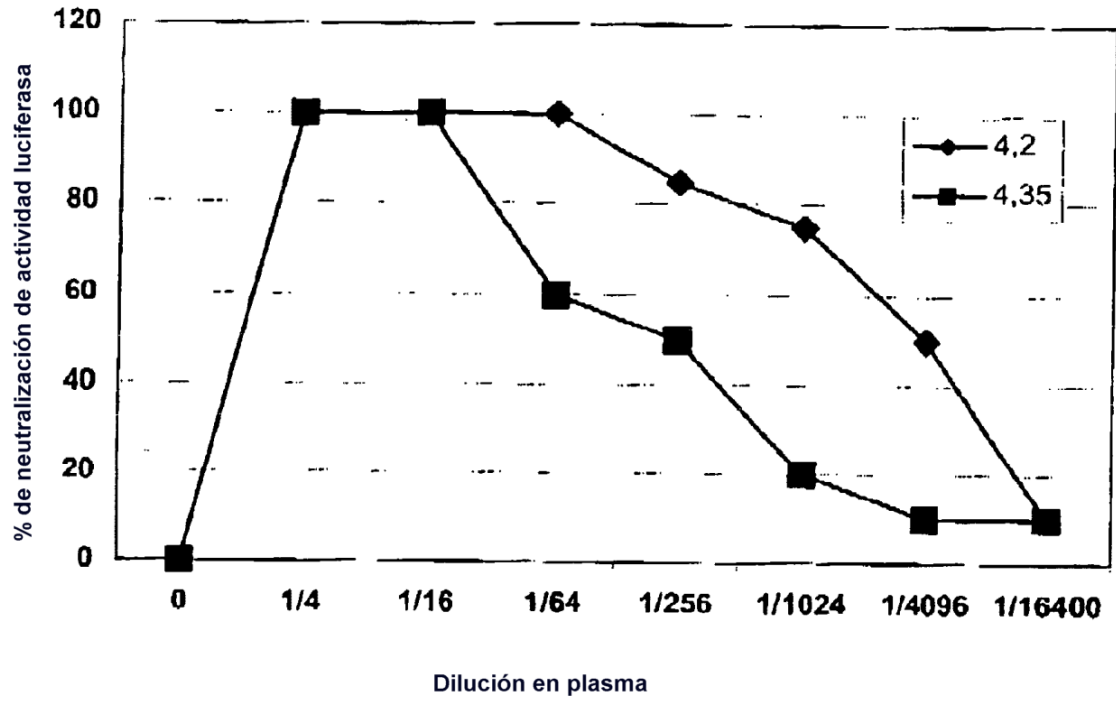


FIG. 6

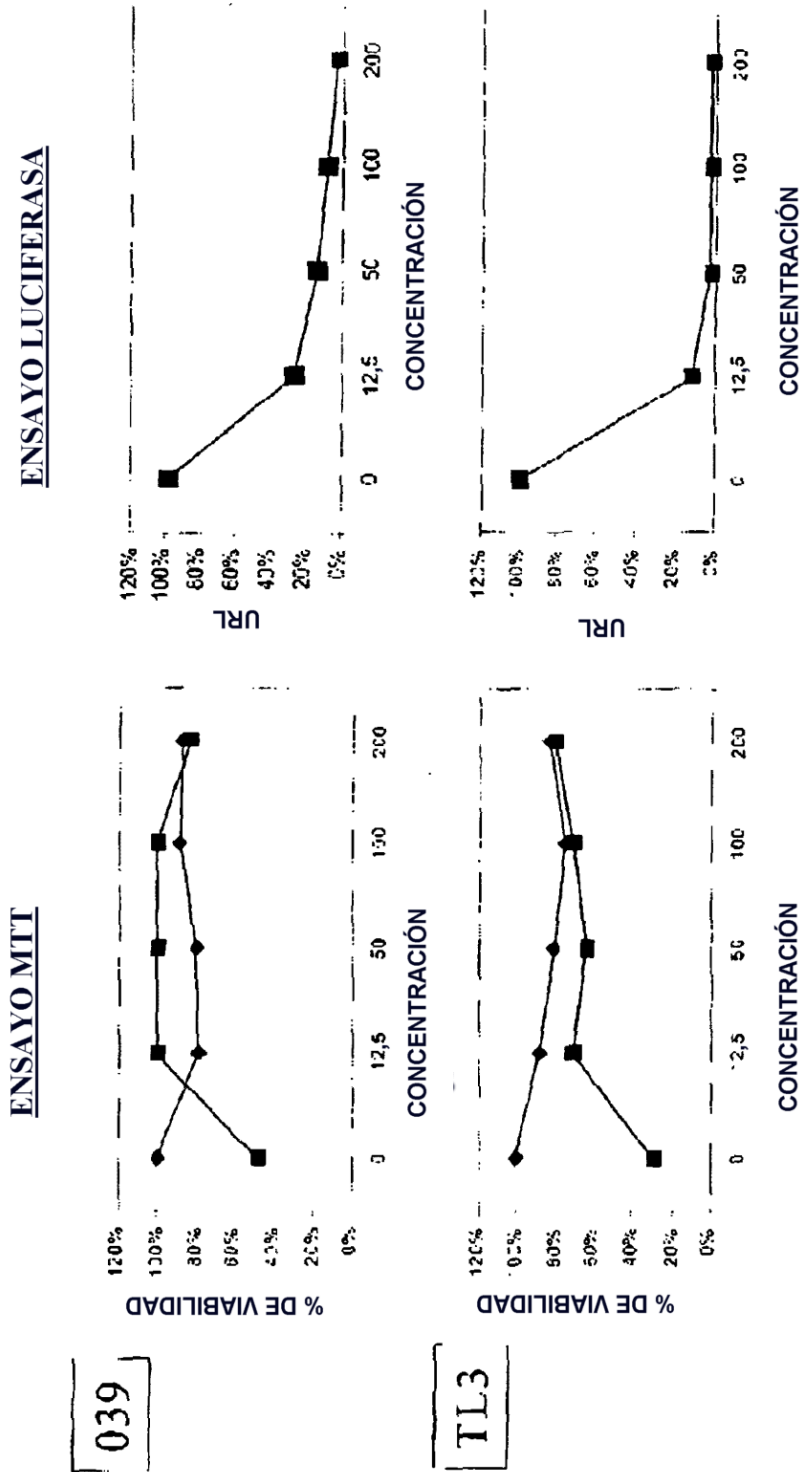


FIG. 7

Estructura General I:

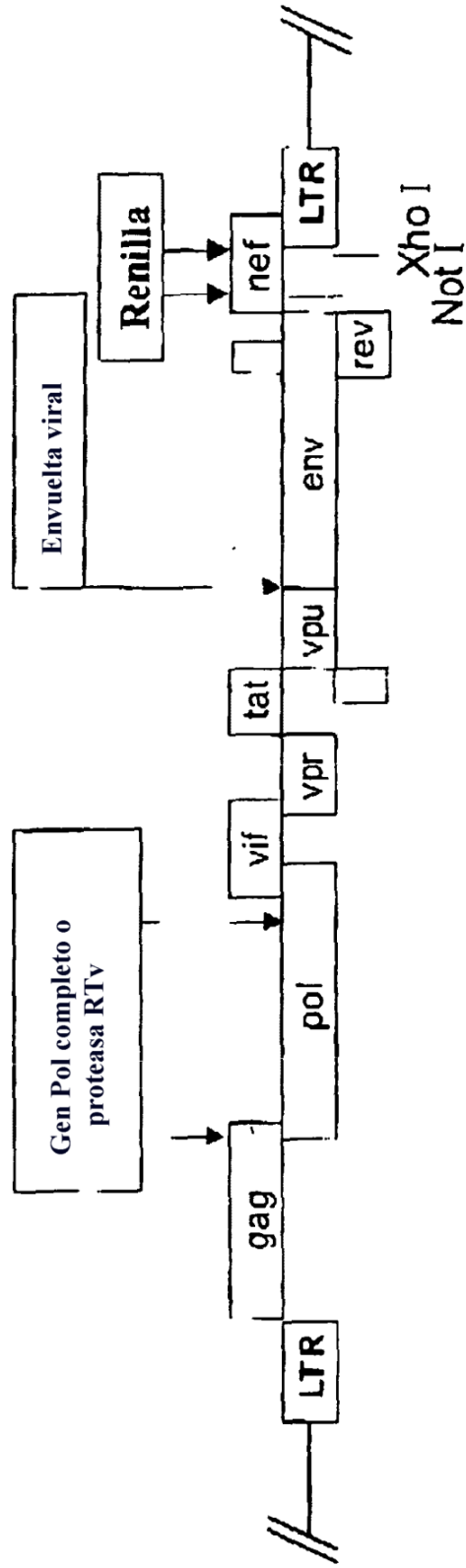


FIG. 8

IP HIV NL Ren (CECT 5842) :

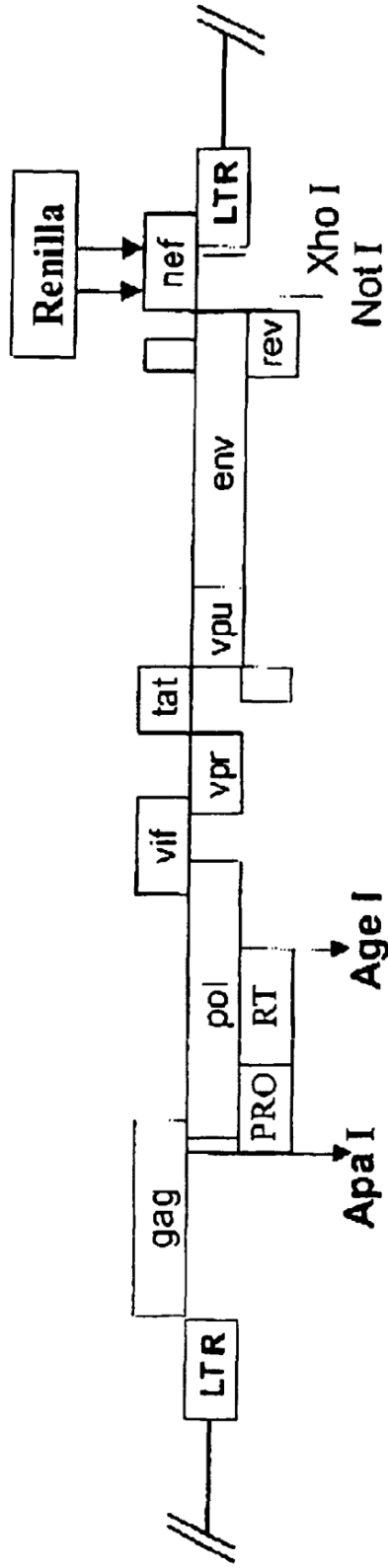


FIG. 9

IP HIV NL LacZ/pol Ren (CECT 5847) :

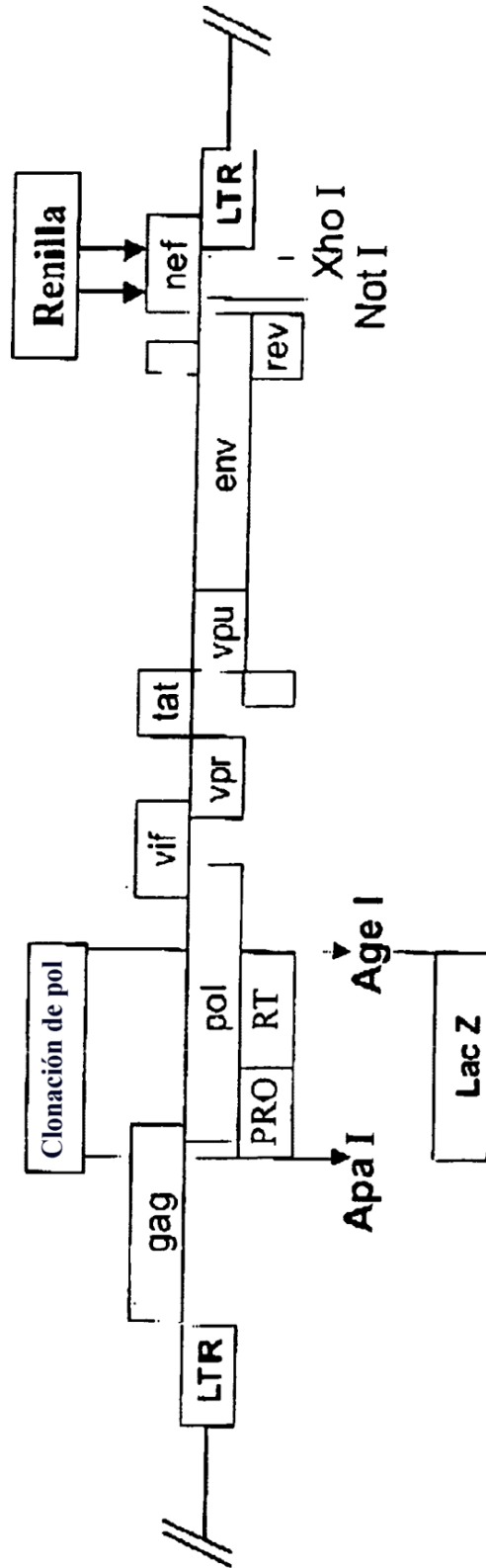


FIG. 10

IP HIV NL LacZ/pr Ren (CECT 5846) :

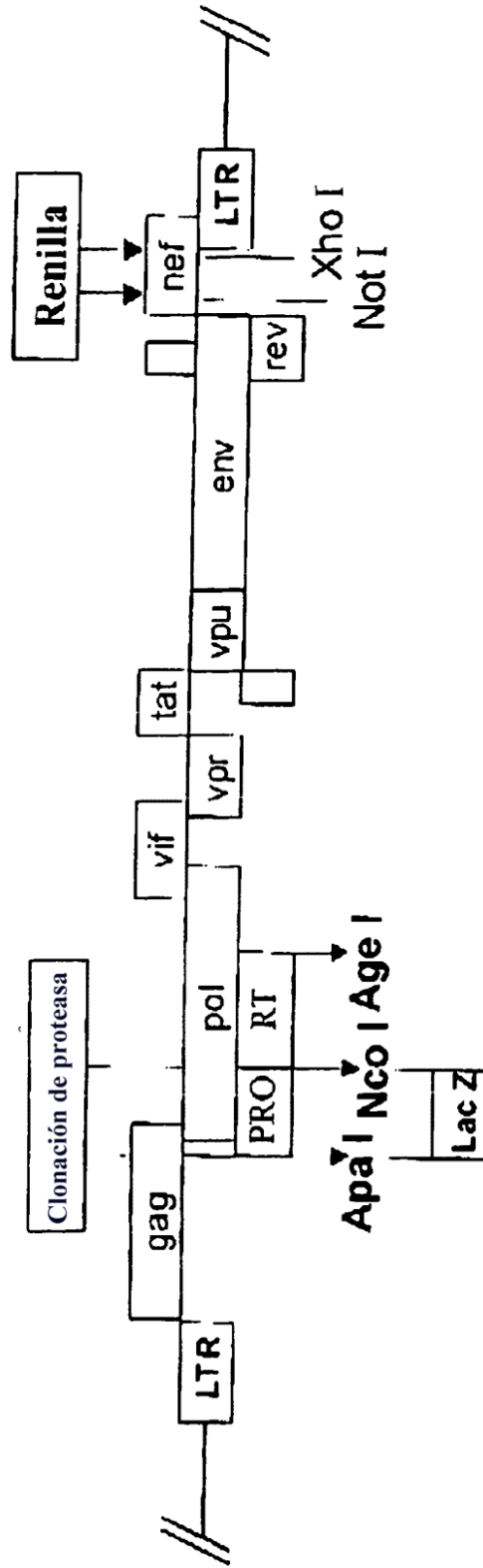


FIG. 11

IP HIV NL LacZ/rt Ren (CECT 5845) :

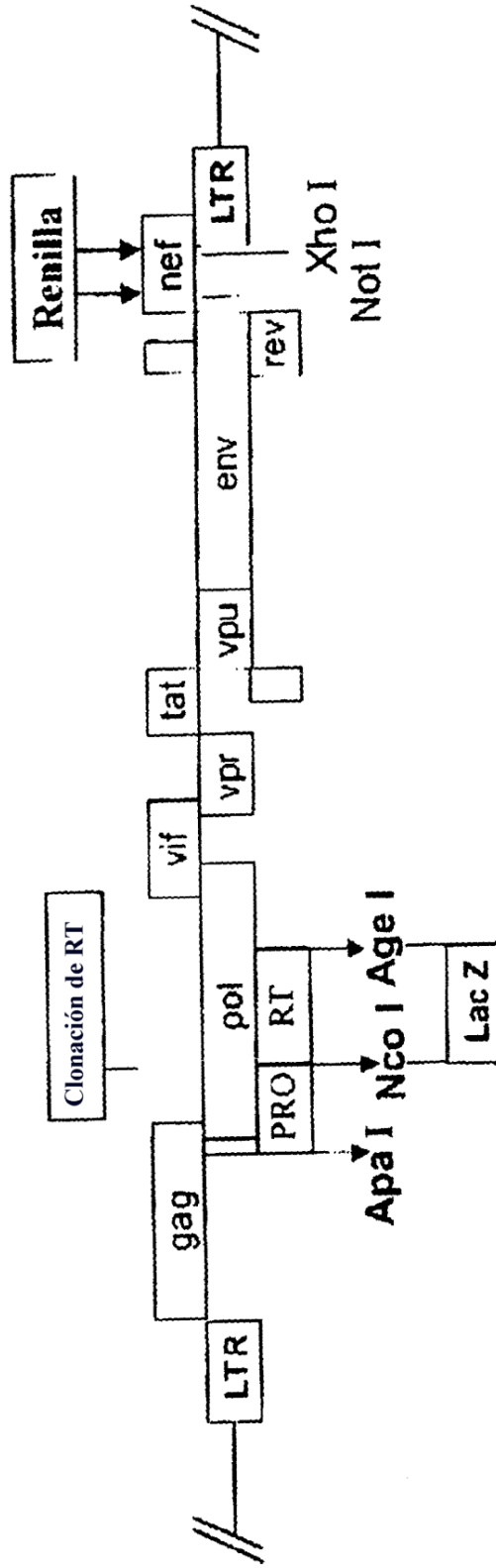


FIG. 12

IP HIV NL LacZ/gag-pr Ren (CECT 5848) :

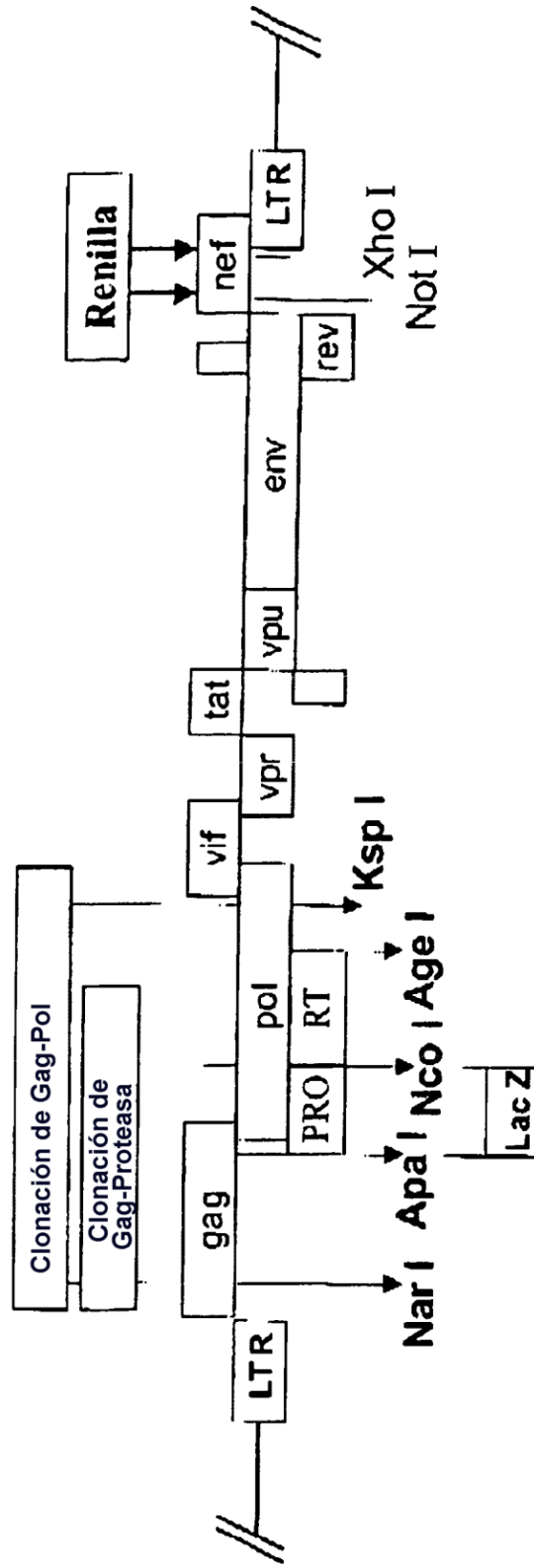


FIG. 13

IP HIV NL LacZ/ENV Ren (cect 5844):

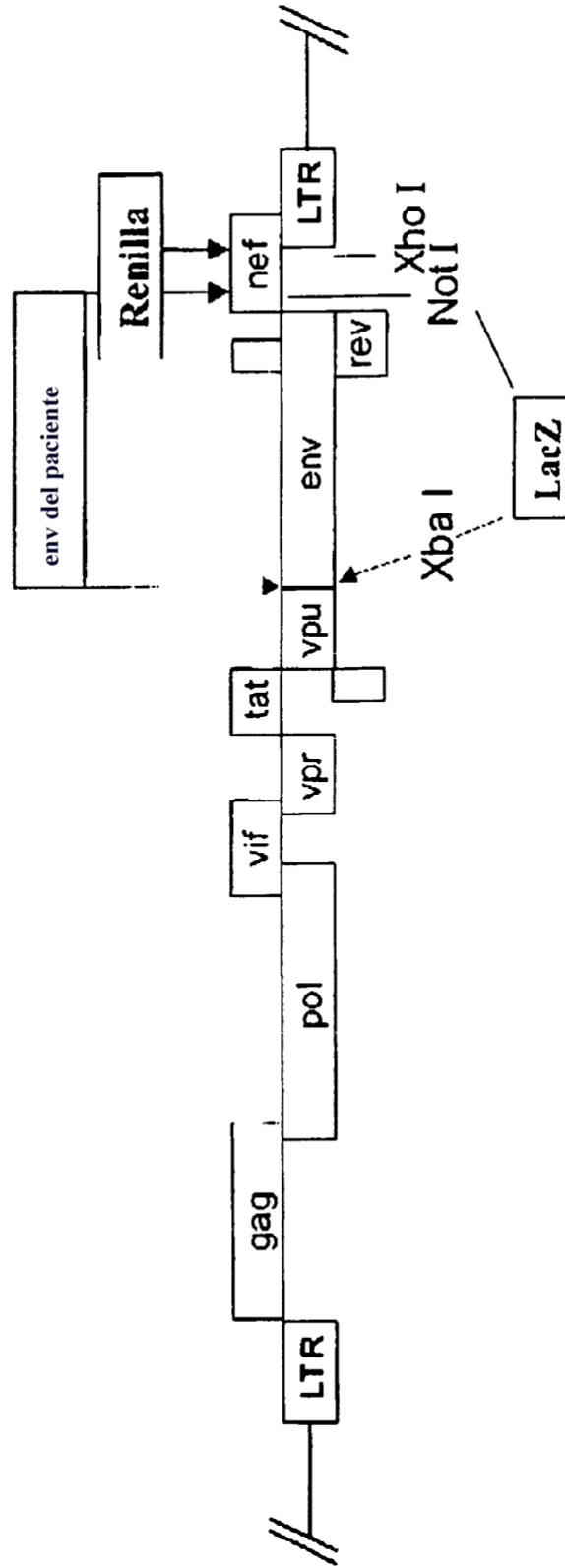


FIG. 14

IP HIV JRRen (CECT 5843) :

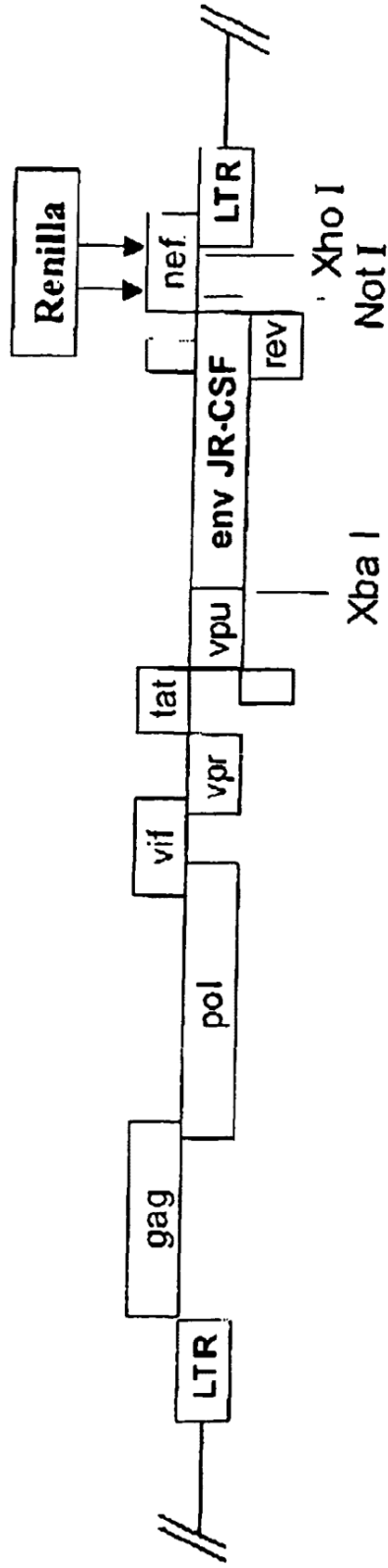


FIG. 15