

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 385 960**

51 Int. Cl.:  
**C07K 14/16** (2006.01)  
**C12N 7/04** (2006.01)  
**C12Q 1/66** (2006.01)  
**C12Q 1/70** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05791148 .9**  
96 Fecha de presentación: **07.06.2005**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1774049**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **18.04.2007**

54 Título: **Composición y métodos para determinar la resistencia a inhibidores de la entrada de virus usando ensayos de virus recombinantes**

30 Prioridad:  
**07.06.2004 US 577851 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**06.08.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**06.08.2012**

73 Titular/es:  
**MONOGRAM BIOSCIENCES, INC.  
345 OYSTER POINT BOULEVARD  
SOUTH SAN FRANCISCO, CA 94080, US**

72 Inventor/es:  
**PETROPOULOS, Christos**

74 Agente/Representante:  
**de Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 385 960 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

Composición y métodos para determinar la resistencia a inhibidores de la entrada de virus usando ensayos de virus recombinantes

### 2. Antecedentes

5 Los virus encapsulados animales se unen a la célula hospedante y entran en ella a través de la interacción de proteínas víricas de la membrana del virión (proteínas de cápsula) y proteínas de la superficie celular (receptores de virus). El reconocimiento y la unión al receptor están mediados por la proteína de cápsula superficial. La entrada del virus es una diana atractiva para un tratamiento antiviral; se han evaluado o se están evaluando actualmente numerosos fármacos diseñados para bloquear la unión del virus o la fusión de la membrana en estudios preclínicos o clínicos (Richman, 1998; PhRMA, 1999; Stephenson, 1999). Por ejemplo, el inhibidor de unión SCH-D, que bloquea la interacción entre proteínas de membrana víricas y CCR5 está siendo evaluado actualmente en estudios clínicos para determinar su eficacia como tratamiento antiviral (Shurman, 2004). Otros inhibidores de entrada que están en investigación actualmente incluyen UK-427857 (Pfizer), TNX-355 (Tanox Inc.), AMD-070 (AnorMED), Pro 140 (Progenics), FP-21399 (EMD Lexigen), BMS-488043 (Bristol-Myers Squibb) y GSK-873.140 (GlaxoSmithKline). Un inhibidor de entrada, el T-20 (Roche/Trimeris), ha sido aprobado para tratar la infección de VIH.

Según se vayan desarrollando estos fármacos y entren en las clínicas, serán necesarios ensayos que detecten rápida y fácilmente la emergencia de virus con una susceptibilidad reducida frente a inhibidores de entrada. En particular, se necesitan métodos para determinar si un VIH es resistente a un inhibidor de entrada, por ejemplo, SCH-C, SCH-D, UK-427857 y/o TNX-355. La presente invención cubre éstas y otras necesidades no satisfechas.

20 El documento WO03070985 describe un ensayo fenotípico para determinar la resistencia de virus de VIH frente a inhibidores de entrada de VIH. Se realiza una curva de inhibición log-sigmoidea, a partir de la cual se pueden obtener los valores de  $IC_{50}$ , que son una medida de la resistencia del VIH a los compuestos evaluados.

### 3. Sumario

En su más amplio sentido, la invención proporciona métodos definidos en las reivindicaciones anexas.

25 En determinados aspectos, la invención proporciona un método para determinar si un virus de inmunodeficiencia humana ("VIH") es resistente a un inhibidor de entrada de VIH. En un aspecto, la invención proporciona un método para determinar si un virus de inmunodeficiencia humana ("VIH") es resistente a un inhibidor de entrada de VIH que comprende generar una curva log-sigmoidea de inhibición que comprende puntos de datos que miden la entrada del VIH a una célula en presencia de concentraciones variables del inhibidor de entrada de VIH; y comparar la curva de inhibición de la etapa (a) con una curva de inhibición log-sigmoidea de inhibición para un VIH de referencia. En determinadas realizaciones, la curva correspondiente al virus de referencia en el mismo tiempo o cerca de la curva log-sigmoidea del VIH. En determinadas realizaciones, la curva del virus de referencia puede ser una curva estándar conocida para el virus de referencia. Una disminución del porcentaje de inhibición máximo observado para el VIH respecto al observado para el VIH de referencia indica que el VIH es resistente al inhibidor de entrada de VIH y que el inhibidor de entrada de VIH es un inhibidor de entrada de VIH no competitivo. En determinadas realizaciones, el inhibidor de entrada se selecciona del grupo que consiste en SCH-C, SCH-D, UK-427857 y TNX-355. En determinadas realizaciones, el VIH de referencia es HXB2, NL4-3 o SF2. En determinadas realizaciones, el VIH procede de un sujeto infectado con VIH.

40 En determinadas realizaciones, los puntos de datos que miden la entrada del VIH en la célula se determinan poniendo en contacto una particular vírica de VIH con la célula en presencia del inhibidor de entrada de VIH, en donde la célula expresa un receptor de superficie celular al cual se une la partícula vírica, y en donde la partícula vírica comprende: (i) un vector de expresión vírica que carece de un ácido nucleico que codifica una proteína de cápsula vírica funcional, pero que comprende un ácido nucleico indicador que produce una señal detectable cuando se introduce en la célula, y (ii) una proteína de cápsula vírica codificada por un ácido nucleico del VIH; y medir la cantidad de señal detectable producida por la célula. En determinadas realizaciones, la señal detectable es una señal fluorescente. En determinadas realizaciones, el ácido nucleico indicador codifica luciferasa. En determinadas realizaciones, la partícula vírica se produce co-transfectando en una célula (i) un ácido nucleico que codifica una proteína de cápsula vírica del VIH, y (ii) un vector de expresión vírico que carece de un ácido nucleico que codifica una proteína de cápsula, en donde el vector comprende un ácido nucleico indicador que produce una señal detectable. En determinadas realizaciones, el receptor de superficie celular es CD4. En determinadas realizaciones, la célula también expresa un receptor de quimioquina. En determinadas realizaciones, el receptor de quimioquina es CXCR4 o CCR5. En determinadas realizaciones, el ácido nucleico de VIH codifica gp160, gp120 y/o gp41.

55 En otros aspectos, la invención proporciona un método para determinar si una población de VIH es resistente a un inhibidor de entrada de VIH, en donde el método comprende generar una curva de inhibición log-sigmoidea que comprende puntos de datos que miden la entrada de la población de VIH en una célula en presencia de concentraciones variables del inhibidor de entrada de VIH; y comparar la curva de inhibición de la etapa (a) con una curva de inhibición log-sigmoidea para una población de VIH de referencia. Un descenso en el porcentaje de inhibición máximo observado para la población de VIH respecto al observado para la población de VIH de referencia

indica que el VIH es resistente al inhibidor de entrada de VIH y que el inhibidor de entrada de VIH es un inhibidor de entrada de VIH no competitivo.

5 La descripción proporciona un método para determinar si un VIH es resistente a un inhibidor de entrada de VIH que comprende determinar una curva de inhibición log-sigmoidea que comprende puntos de datos para la entrada del VIH en presencia de concentraciones variables del inhibidor de entrada de VIH, en donde si la entrada del VIH no puede ser inhibida completamente por el inhibidor de entrada de VIH, el VIH es resistente al inhibidor de entrada de VIH.

10 La descripción proporciona un método para determinar si una población de VIH es resistente a un inhibidor de entrada de VIH, que comprende determinar una curva de inhibición log-sigmoidea que comprende puntos de datos para la entrada de la población de VIH en presencia de concentraciones variables del inhibidor de entrada de VIH, en donde si la entrada de la población de VIH no puede ser inhibida completamente por el inhibidor de entrada de VIH, la población de VIH es resistente al inhibidor de entrada de VIH.

#### 4. Breve descripción de las figuras

**Figura 1A:** Estructura de expresión de cápsula y vectores de expresión vírica.

15 El vector de expresión de cápsula de VIH (pHIVenv) se modifica para aceptar secuencias de cápsula que han sido amplificadas a partir de muestras de plasma del sujeto. Las designaciones a/b y c/d se refieren a sitios de endonucleasa de restricción posicionados en los extremos 5' y 3' de la poliproteína de cápsula de VIH-1 (gp160). El vector de expresión de VIH (pHIVlucΔU3) codifica todas las proteínas de VIH excepto la poliproteína de cápsula. Se ha eliminado una porción del gen de cápsula para acomodar una casete de gen indicador, en este caso, luciferasa de luciérnaga que se usa para monitorizar la capacidad del virus para replicarse en presencia o ausencia de fármacos antivirales. La región 3' U3 ha sido eliminada parcialmente para evitar la transcripción desde el 5' LTR en células infectadas. El virus producido en este sistema se limita a una única ronda de replicación.

**Figura 1B:** Ensayo de entrada basado en célula

25 La susceptibilidad a fármaco, el tropismo de co-receptor y la prueba de neutralización de virus se llevan a cabo mediante la co-transfección de una célula hospedante con pHIVenv y pHIVlucΔU3. La célula hospedante produce partículas de VIH que son pseudo-tipadas con secuencias de cápsula de VIH derivadas del virus ensayado o de una muestra del sujeto. Se recolectan las partículas víricas (~48 h) después de la transfección y se usan para infectar células diana que expresan receptores de VIH (por ejemplo, CD4) y co-receptores (por ejemplo, CXCR4, CCR5). Tras la infección (~72 h) las células diana son lisadas y se mide la actividad de luciferasa. El VIH debe completar una ronda de replicación para infectar con éxito la célula hospedante y producir actividad de luciferasa. Si el virus es incapaz de entrar en la célula diana, disminuye la actividad de luciferasa. Este sistema se puede usar para evaluar la susceptibilidad a inhibidores de entrada, tropismo de receptor o de co-receptor y neutralización de virus.

**Figura 2:** Vectores de expresión de cápsula de VIH.

35 Las secuencias de cápsula de VIH son amplificadas a partir de muestras de sujeto e insertadas en vectores de expresión usando sitios de endonucleasa de restricción (5' a/b y 3' c/d). La transcripción de cápsula está dirigida por el promotor de gen temprano inmediato del citomegalovirus humano (CMV). El ARN de cápsula es poliadenilado usando una secuencia de señal (A+) de poliadenilación de virus 40 de simio (SV40). Se diseña un intrón localizado entre el promotor CMV y las secuencias de cápsula de VIH para aumentar los niveles de ARNm de cápsula en células transfectadas. FL expresa proteínas de cápsula de longitud completa (gp120, gp41); ΔCT expresa proteínas de cápsula (gp120, gp41) que carecen del dominio de cola citoplasmática C-terminal de gp41; +CT expresa proteínas de cápsula (gp120, gp41) que contienen un dominio de cola citoplasmática de gp41 pre-definido constante; gp120 expresa proteínas gp120 derivadas del sujeto junto con una gp41 predefinida constante; y gp41 expresa una gp120 predefinida constante junto con proteínas gp41 derivadas del sujeto.

**Figura 3A:** Ensayo de escrutinio de tropismo de co-receptor.

45 En esta figura, el ensayo se realiza usando dos líneas celulares. Una línea celular expresa CD4 y CCR5 (los seis paneles de la parte superior). La otra línea celular expresa CD4 y CXCR4 (los seis paneles de la parte inferior). El ensayo se lleva a cabo infectando células con un gran número de reservas de virus recombinantes derivadas de células transfectadas con los vectores pHIVenv y pHIVlucΔU3. El ejemplo mostrado representa el análisis de 96 virus formateados en una placa de 96 pocillos. Las infecciones se llevan a cabo en ausencia de fármaco (no fármaco), o en presencia de un fármaco que inhiba preferencialmente virus R5 trópico (inhibidor de CCR) o virus X4 trópico (inhibidor de CXCR4). El tropismo de co-receptor se determina comparando la cantidad de actividad de luciferasa producida en cada tipo de célula, tanto en presencia como en ausencia del fármaco (véase la Figura 3B para la interpretación de los resultados del ensayo).

**Figura 3B:** Determinación del tropismo de co-receptor.

55 En esta figura, los resultados del ensayo se interpretan comparando la capacidad de cada virus simple para infectar

(producir actividad de luciferasa) células que expresan CD4/CCR5 (células R5) o células que expresan CD4/CXCR4 (células X4). La capacidad de un inhibidor de CCR5 o de CXCR4 para bloquear específicamente la infección (inhibir la actividad de luciferasa) también es evaluada. Los virus trópicos X4 (paneles verdes) infectan células que expresan CXCR4 pero no células que expresan CCR5. La infección de células X4 es bloqueada por el inhibidor de CXCR4. Los virus trópicos R5 (paneles azules) infectan células R5 pero no células X4. La infección de células R5 es bloqueada por el inhibidor de CCR5. Las mezclas duales trópicas o X4/R5 (paneles amarillos) infectan células X4 y R5. La infección de células R5 es bloqueada por el inhibidor de CCR5 y la infección de células X4 es bloqueada por el inhibidor de CXCR4. Los virus no viables (paneles rojos) no se replican en células X4 o R5.

**Figura 4A:** Medida de la susceptibilidad de inhibidor de entrada: inhibidor de fusión.

En esta figura se demuestra la susceptibilidad al inhibidor de fusión T-20. Se infectaron células que expresan CD4, CCR5 y CXCR4 en ausencia de T-20 y en un amplio rango de concentraciones de T-20 (eje x en escala log10). Se determinó el porcentaje de inhibición de replicación vírica (eje y) comparando la cantidad de luciferasa producida en células infectadas en presencia de T-20 con la cantidad de luciferasa producida en ausencia de T-20. Se evaluaron virus R5 trópico, X4 trópico y dual trópico. La susceptibilidad a fármaco se cuantifica determinando la concentración de T-20 requerida para inhibir el 50% de replicación vírica ( $IC_{50}$ , presentada como líneas discontinuas verticales). Los virus con menor valor de  $IC_{50}$  son más susceptibles a T-20 que los virus con mayores valores de  $IC_{50}$ . NL4-3: cepa trópica X4 bien caracterizada; JRCSF: cepa trópica R5 bien caracterizada; 91US005.11: elemento aislado trópico R5 obtenido del "NIH AIDS Research and Reference Reagent Program" (ARRRP); 92HT593.1: elemento aislado trópico (X4R5) dual obtenido del NIH ARRRP; y 92HT599.24: elemento aislado trópico X4 obtenido del NIH ARRRP.

**Figura 4B:** Medición de la susceptibilidad a inhibidor de entrada: mutaciones de resistencia a fármaco.

En esta figura, se demuestra una susceptibilidad reducida al inhibidor de fusión T-20 conferida por mutaciones de resistencia a fármaco específicas en la proteína de cápsula gp41. Se infectaron células que expresan CD4, CCR5 y CXCR4 en ausencia de T-20 y en un amplio intervalo de concentraciones de T-20 (eje x en escala log10). Se determinó el porcentaje de inhibición vírica (eje y) comparando la cantidad de luciferasa producida en células infectadas en presencia de T-20 con la cantidad de luciferasa producida en ausencia de T-20. Se evaluaron virus isogénicos que contienen una o dos mutaciones específicas en la proteína de cápsula de transmembrana gp41 (resaltados en rojo en la leyenda de la figura). La susceptibilidad a fármaco se cuantifica determinando la concentración de T-20 requerida para inhibir el 50% de la replicación vírica ( $IC_{50}$ , mostrada como líneas discontinuas verticales). Los virus con menores valores de  $IC_{50}$  son más susceptibles a T-20 que los virus con mayores valores de  $IC_{50}$ . No mutación (secuencia natural): GIV; Mutaciones sencillas: DIV, DIM, SIV; Mutaciones dobles: DIM, SIM, DTV.

**Figura 5:** Resistencia a inhibidor de entrada competitiva.

La Figura 5 muestra curvas log-sigmoideas para virus resistentes a AMD-3100 y T20, que indican que la resistencia a estos inhibidores de entrada se manifiesta como un aumento de  $IC_{50}$  y que la entrada puede inhibirse completamente con concentraciones elevadas de inhibidor.

**Figura 6:** Resistencia a inhibidor de entrada no competitiva.

La Figura 6 muestra curvas log-sigmoideas para virus resistentes a SCH-C y TNX-355, que indican que la resistencia a estos inhibidores de entrada se manifiesta como una reducción del porcentaje máximo de inhibición.

**Figura 7:** Proteínas de cápsula vírica mixtas susceptibles y resistentes.

La Figura 7 presenta los resultados de experimentos de mezclamiento de ADN que muestran curvas log-sigmoideas para proteínas de cápsula mixtas resistentes y sensibles. En resumen, la proporción de proteínas de cápsula resistentes y sensibles fue variada como se indica en la leyenda de las figuras y el porcentaje de inhibición observada se representó frente al log10 de la concentración de inhibidor. Los resultados indican que la susceptibilidad o la resistencia de poblaciones mixtas de virus frente a inhibidores de entrada también pueden ser determinadas de acuerdo a la presente invención.

**Figura 8:** Resistencia de inhibidor de entrada no competitivo.

La Figura 8 muestra curvas log-sigmoideas de virus resistentes a UK-427.857, que indican que la resistencia a este inhibidor de entrada se manifiesta como una reducción del porcentaje máximo de inhibición.

**Figura 9:** Reproducibilidad de la meseta de la curva de inhibición para un inhibidor de entrada no competitivo.

La Figura 9 muestra la reproducibilidad del porcentaje máximo de inhibición observada para un inhibidor de entrada no competitivo representativo, el UK-427.857. Tal como se muestra en la Figura 9, medidas múltiples del porcentaje máximo de inhibición se agrupan de manera reproducible.

## 5. Definiciones

Tal como se usan en la presente memoria, los siguientes términos presentarán los siguientes significados:

5 Un “ensayo fenotípico” es una prueba que mide un fenotipo de un virus particular, tal como por ejemplo el VIH, o de una población de virus, tal como por ejemplo la población de VIH que infecta a un sujeto. Los fenotipos que pueden medirse incluyen, aunque sin limitación, la resistencia o susceptibilidad a un virus, o de una población de virus, a un agente anti-viral específico o que mide la capacidad de replicación de un virus.

10 Un “ensayo genotípico” es un ensayo que determina un genotipo de un organismo, una parte de un organismo, una población de organismos, un gen, una parte de un gen o una población de genes. Típicamente, un ensayo genotípico implica la determinación de la secuencia de ácido nucleico del gen o genes relevantes. Dichos ensayos se llevan a cabo frecuentemente en el VIH para establecer, por ejemplo, si determinadas mutaciones están asociadas a resistencia a fármaco o hay presente una capacidad de replicación alterada o una resistencia. Los genotipos se describen de forma rutinaria como la secuencia de proteína derivada codificada por el gen o genes de interés.

15 La expresión “% de identidad de secuencia” se usa de manera intercambiable en la presente memoria con la expresión “% de identidad” y se refiere al nivel de identidad de secuencia de aminoácidos entre dos o más secuencias de péptidos, o al nivel de identidad de secuencia de nucleótidos entre dos o más secuencias de nucleótidos, cuando se alinean usando un programa de alineamiento de secuencias. Por ejemplo, tal como se usa en la presente memoria, un 80% de identidad significa lo mismo que un 80% de identidad de secuencia determinada mediante un algoritmo definido, y significa que una secuencia es idéntica en al menos un 80% a otra longitud de otra secuencia. Los ejemplos de niveles de identidad de secuencia incluyen, aunque sin limitación, 60, 70, 80, 85, 90, 95, 98% o más de identidad de secuencia con respecto a una secuencia dada.

25 La expresión “% de homología de secuencia” se usa de manera intercambiable en la presente memoria con la expresión “% de homología” y se refiere al nivel de homología de secuencia de aminoácidos entre dos o más secuencias de péptidos, o al nivel de homología de secuencia de nucleótidos entre dos o más secuencias de nucleótidos, cuando se alinean usando un programa de alineamiento de secuencia. Por ejemplo, tal como se usa en la presente memoria, un 80% de homología significa lo mismo que un 80% de homología de secuencia determinada mediante un algoritmo definido, y por consiguiente un homólogo de una secuencia dada tiene más del 80% de homología de secuencia a lo largo de una longitud de la secuencia dada. Los ejemplos de niveles de homología de secuencia incluyen, aunque sin limitación, 60, 70, 80, 85, 90, 95, 98% o más de homología de secuencia con respecto a una secuencia dada.

30 Los ejemplos de programas de ordenador que pueden usarse para determinar la identidad entre dos secuencias incluyen, aunque sin limitación, el conjunto de programas BLAST, por ejemplo BLASTN, BLASTX y TBLASTX, BLASTP y TBLASTN, disponibles públicamente en internet en la página web de NCBI. Véase también Altschul y col., 1990, *J. Mol. Biol.*, 215: 403-10 (con referencia especial a los parámetros por defecto publicados, es decir los parámetros  $w=4$ ,  $t=17$ ) y Altschul y col., 1997, *Nucleic Acids Res.*, 25: 3389-3402. Las búsquedas de secuencias se llevan a cabo típicamente usando el programa BLASTP cuando se evalúa una secuencia de aminoácidos dada respecto a las secuencias de aminoácidos del “GenBank Protein Sequences” y otras bases de datos públicas. Se prefiere el programa BLASTX para la búsqueda de secuencias de ácido nucleico que han sido traducidas en todos los marcos de lectura contra las secuencias de aminoácidos del “GenBank Protein Sequences” y otras bases de datos públicas. Tanto el BLASTP como el BLASTX se ejecutan usando parámetros por defecto con una penalización de hueco abierto de 11,0, y una penalización de hueco extendido de 1,0, y utilizan la matriz BLOSUM-62. Véase la referencia citada anteriormente.

45 Se lleva a cabo un alineamiento preferido de secuencias seleccionadas con el objetivo de determinar el “% de identidad” entre dos o más secuencias, usando por ejemplo el programa CLUSTAL-X, operado con los parámetros por defecto, que incluyen una penalización de hueco de 10,0, una penalización de hueco extendido de 0,1 y una matriz de similitud BLOSUM 30.

50 “Aminoácido polar” se refiere a un aminoácido hidrofílico que tiene una cadena lateral que no está cargada a pH fisiológico, pero que tiene al menos un enlace en el que el par de electrones compartido en común por los dos átomos está más próximo a uno de los dos átomos. Los aminoácidos polares codificados genéticamente incluyen Asn (N), Gln (Q), Ser (S) y Thr (T).

“Aminoácido no polar” se refiere a un aminoácido hidrofóbico que tiene una cadena lateral que no está cargada a pH fisiológico y que tiene enlaces en los que el par de electrones compartido en común por los dos átomos generalmente está a igual distancia de ambos átomos (es decir, la cadena lateral es no polar). Los aminoácidos no polares codificados genéticamente incluyen Ala (A), Gly (G), Ile (I), Leu (L), Met (M) y Val (V).

55 “Aminoácido hidrofílico” se refiere a un aminoácido que presenta un hidrofobicidad inferior a cero de acuerdo a la escala normalizada de consenso de Eisenberg y col., 1984, *J. Mol. Biol.* 179: 125-142. Los aminoácidos hidrofílicos codificados genéticamente incluyen Arg (R), Asn (N), Asp (D), Glu (E), Gln (Q), His (H), Lys (K), Ser (S) y Thr (T).

“Aminoácido hidrofóbico” se refiere a un aminoácido que exhibe una hidrofobicidad superior a cero de acuerdo a la escala normalizada de consenso de Eisenberg y col., 1984, *J. Mol. Biol.* 179: 125-142. Los aminoácidos hidrofóbicos codificados genéticamente incluyen Ala (A), Gly (G), Ile (I), Leu (L), Met (M), Phe (F), Pro (P), Trp (W), Tyr (Y) y Val (V).

5 “Aminoácido ácido” se refiere a un aminoácido hidrofílico que tiene un valor pK de cadena lateral inferior a 7. Los aminoácidos ácidos normalmente presentan cadenas laterales cargadas negativamente a pH fisiológico debido a la pérdida de un ion hidrógeno. Los aminoácidos ácidos codificados genéticamente incluyen Asp (D) y Glu (E).

10 “Aminoácido básico” se refiere a un aminoácido hidrofílico que tiene un valor pK de cadena lateral superior a 7. Los aminoácidos básicos normalmente presentan cadenas laterales cargadas positivamente a pH fisiológico debido a la asociación con un ion hidrógeno. Los aminoácidos básicos codificados genéticamente incluyen Arg (R), His (H) y Lys (K).

15 Una “mutación” es un cambio en una secuencia de ácido nucleico o en una secuencia de aminoácidos correspondiente respecto a un ácido nucleico o polipéptido de referencia. Para realizaciones de la invención que comprenden VIH proteasa o transcriptasa inversa, el ácido nucleico de referencia que codifica proteasa o transcriptasa inversa es la secuencia codificadora de proteasa o transcriptasa inversa, respectivamente, presente en el VIH NL4-3 (Nº de acceso del GenBank AF324493).

20 Asimismo, el polipéptido de proteasa o de transcriptasa inversa de referencia es aquel codificado por la secuencia de VIH NL4-3. Aunque la secuencia de aminoácidos de un péptido puede determinarse directamente mediante, por ejemplo, degradación de Edman o espectroscopia de masas, más típicamente, la secuencia de aminoácidos de un péptido se infiere de la secuencia de nucleótidos de un ácido nucleico que codifica el péptido. Se puede usar cualquier método para determinar la secuencia de un ácido nucleico conocido en la técnica, por ejemplo, el secuenciamiento de Maxam-Gilbert (Maxam y col., 1980, *Methods in Enzymology* 65: 499), secuenciamiento didesoxi (Sanger y col., 1977, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 5463) o estrategias basadas en hibridación (véase, por ejemplo, Sambrook y col., 2001, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, 3ª edición, NY; y Ausubel y col., 1989, *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates y Wiley Interscience, NY).

Un “mutante” es un virus, gen o proteína que tiene una secuencia que presenta uno o más cambios respecto a un virus, gen o proteína de referencia.

Los términos “péptido”, “polipéptido” y “proteína” se usan de manera intercambiable en toda la memoria.

30 El término “natural” se refiere a un genotipo vírico que no comprende una mutación que se sepa que está asociada a resistencia a fármaco.

Los términos “polinucleótido”, “oligonucleótido” y “ácido nucleico” se usan de manera intercambiable en toda la memoria.

## **6. Descripción detallada de la invención**

35 En determinados aspectos, la invención proporciona un método para determinar si un VIH es resistente a un inhibidor de entrada de VIH. Los métodos son útiles, por ejemplo, para guiar decisiones terapéuticas en sujetos en tratamiento infectados con VIH, tanto recién infectados como en tratamiento, que incluye tratamiento que está fallando, y para el escrutinio de compuestos para identificar compuestos que inhibirán virus resistentes a otros inhibidores de entrada. Otros usos de dichos métodos serán evidentes para los especialistas en la técnica.

### **6.1. Métodos para determinar si un VIH o una población de VIH es resistente a inhibidores de entrada**

40 En un aspecto, la invención proporciona un método para determinar si un VIH es resistente a un inhibidor de entrada de VIH. Los métodos generalmente comprenden la determinación de la susceptibilidad fenotípica al fármaco de un VIH o una población de VIH usando, por ejemplo, los ensayos de susceptibilidad fenotípica a fármaco presentados en el Ejemplo 1, y determinar si el VIH o población de VIH es resistente a un inhibidor de entrada, tal como se ha descrito anteriormente en la presente memoria. Sin embargo, en principio se puede usar cualquier ensayo de susceptibilidad de ese tipo conocido por el especialista en la técnica en los métodos de determinación de susceptibilidad fenotípica a fármaco. La susceptibilidad a fármaco se puede representar, por ejemplo, como el porcentaje de inhibición frente al  $\log_{10}$  de la concentración de fármaco, y definirse en base a, por ejemplo, la  $IC_{50}$  y el porcentaje de inhibición a la mayor concentración de fármaco. Dicho porcentaje de inhibición observado a la mayor concentración de fármaco para un VIH de referencia, tal como, por ejemplo, HXB2, NL4-3 o SF2, es el máximo porcentaje de inhibición (% de inhibición máx.).

55 Se pueden usar los métodos para identificar resistencia a inhibidores de entrada que exhiban cinéticas competitivas, es decir, que compitan con proteínas víricas para acceder a componentes víricos o celulares que medien en la entrada del virus. Dichos inhibidores de entrada incluyen, aunque sin limitación, T-20 y AMD-3100, discutidos anteriormente. Los virus que son resistentes a dichos inhibidores de entrada exhiben un aumento de la  $IC_{50}$  respecto

a los virus susceptibles.

En otras realizaciones, los métodos se pueden usar para identificar resistencia a inhibidores de entrada que exhiban cinéticas no competitivas, es decir, que no compitan directamente con proteínas víricas por el acceso a componentes víricos o celulares que medien en la entrada, sino que en su lugar alteren la conformación del componente celular y/o la proteína vírica de un modo que altere la interacción entre dichas proteínas y componentes. Los ejemplos de dichos inhibidores no competitivos incluyen, aunque sin limitación, inhibidores de entrada tales como SCH-C, TNX-355, UK-427.857, SCH-D, GW-873 y TAK-220. Por vez primera, los solicitantes han identificado virus resistentes a dichos inhibidores de entrada que exhiben una cinética no competitiva para la inhibición.

Los virus resistentes a dichos inhibidores de entrada no competitivos manifiestan dicha resistencia de al menos dos maneras diferentes. Primero, los virus resistentes a inhibidores de entrada no competitivos no pueden ser inhibidos completamente. Es decir, no existe una concentración de inhibidor de entrada que pueda inhibir completamente la interacción entre proteína de cápsula y receptor superficial celular. Por tanto, cuando se representa una curva log-sigmoidea que compara una medida de entrada de virus con la concentración de fármaco, la curva se estabiliza a menos del 100% de inhibición. Como tal, cuando una curva log-sigmoidea generada como se ha descrito en la presente memoria indica que no importa cuánto inhibidor de entrada se añada a la mezcla de ensayo, el virus sigue siendo capaz de entrar en la célula a un nivel detectable, el virus es resistente al inhibidor de entrada.

En segundo lugar, dichos virus exhiben menores porcentajes máximos de inhibición respecto a los virus susceptibles. Por tanto, observando que un virus particular o una población de virus presente un menor porcentaje máximo de inhibición respecto a un virus o población vírica de referencia, se puede determinar que el virus o población vírica exhibe menos susceptibilidad (resistencia) al inhibidor de entrada evaluado. El virus o población vírica de referencia puede ser un virus o población vírica obtenidos de un sujeto u otra fuente antes de una terapia de exposición a un inhibidor de entrada. Alternativamente, el virus o población vírica de referencia puede ser una cepa de referencia, tal como, por ejemplo, SF2, HXB2 o NL4-3. Como otra alternativa adicional, el porcentaje máximo de inhibición observada para el virus o población vírica de referencia puede ser un porcentaje máximo de inhibición promedio derivado de una serie de virus o poblaciones víricas.

Por tanto, en determinadas realizaciones, la invención proporciona un método para determinar si un VIH es resistente a un inhibidor de entrada de VIH que comprende generar una curva log-sigmoidea de inhibición que comprende puntos de datos que miden la entrada del VIH en una célula en presencia de concentraciones variables del inhibidor de entrada de VIH; y comparar la curva de inhibición de la etapa (a) con una curva de inhibición log-sigmoidea correspondiente a un VIH de referencia. Un descenso en el porcentaje de inhibición máxima observado para el VIH respecto al observado para el VIH de referencia indica que el VIH es resistente al inhibidor de entrada de VIH, y que el inhibidor de entrada de VIH es un inhibidor de entrada de VIH no competitivo.

En determinadas realizaciones, el inhibidor de entrada se selecciona del grupo que consiste en BMS-488.403 (Bristol-Meyers Squibb; Nueva York, NY), Pro-542 (Progenics Pharmaceuticals, Inc.; Tarrytown, NY), mAb B4 (United BioMedical, Inc.; Hauppauge, NY), TNX-355 (Tanox Inc.; Houston, TX), UK-427.857 (Pfizer Inc.; Nueva York, NY), SCH-D (Schering-Plough; Kenilworth, N.J.), GW-873.140 (GlaxoSmithKline; Research Triangle, NC), AMD-11070 (AnorMED Inc.; Langley, Canadá), TAK-220 (Takeda Chemical Industries, Ltd.; Osaka, Japón), Pro-140 (Progenics Pharmaceuticals, Inc.; Tarrytown, NY), y mAb004 (Human Genome Sciences Inc.; Rockville, Md). En determinadas realizaciones, el inhibidor de entrada se selecciona del grupo que consiste en TNX-355, UK-427.857, SCH-D, GW-873.140, AMD-11070 y TAK-220. En determinadas realizaciones, el inhibidor de entrada se selecciona del grupo que consiste en SCH-C, SCH-D, UK-427857 y TNX-355. En determinadas realizaciones, el inhibidor de entrada es BMS-488.403. En determinadas realizaciones, el inhibidor de entrada es Pro-542. En determinadas realizaciones, el inhibidor de entrada mAb B4. En determinadas realizaciones, el inhibidor de entrada es TNX-355. En determinadas realizaciones, el inhibidor de entrada es UK-427.857. En determinadas realizaciones, el inhibidor de entrada es SCH-D. En determinadas realizaciones, el inhibidor de entrada es GW-873.140. En determinadas realizaciones, el inhibidor de entrada es AMD-11070. En determinadas realizaciones, el inhibidor de entrada es TAK-220. En determinadas realizaciones, el inhibidor de entrada es Pro-140. En determinadas realizaciones, el inhibidor de entrada es mAb004. En determinadas realizaciones, el VIH de referencia es HXB2, nL4-3 o SF2. En determinadas realizaciones, el VIH procede de un sujeto infectado con VIH.

En determinadas realizaciones, los puntos de datos que miden la entrada de VIH en la célula se determinan poniendo en contacto una partícula vírica de VIH con la célula en presencia del inhibidor de entrada de VIH, en donde la célula expresa un receptor superficial celular al cual se une la partícula vírica, y en donde la partícula vírica comprende: (i) un vector de expresión vírico que carece de un ácido nucleico que codifique una proteína de cápsula vírica, pero que comprende un ácido nucleico indicador que produce una señal detectable cuando se introduce en la célula, y (ii) una proteína de cápsula vírica codificada por un ácido nucleico del VIH; y medir la cantidad de la señal detectable producida por la célula. En determinadas realizaciones, la señal detectable es una señal fluorescente. En determinadas realizaciones, el ácido nucleico indicador codifica luciferasa. En determinadas realizaciones, la partícula vírica se produce co-transfectando en una célula (i) un ácido nucleico que codifica una proteína de cápsula vírica del VIH, y (ii) un vector de expresión vírico que carece de un ácido nucleico que codifica una proteína de

cápsula, en donde el vector comprende un ácido nucleico indicador que produce una señal detectable. En determinadas realizaciones, el receptor superficial celular es CD4. En determinadas realizaciones, la célula también expresa un receptor de quimioquina. En determinadas realizaciones, el receptor de quimioquina es CXCR4 o CCR5. En determinadas realizaciones, el ácido nucleico de VIH codifica gp160, gp120 o gp41.

5 En otros aspectos, la invención proporciona un método para determinar si una población de VIH es resistente a un inhibidor de entrada de VIH que comprende generar una curva de inhibición log-sigmoidea que comprende puntos de datos que miden la entrada de la población de VIH a la célula en presencia de concentraciones variables del inhibidor de entrada de VIH; y comparar la curva de inhibición de la etapa (a) con una curva de inhibición log-sigmoidea correspondiente a una población de VIH de referencia. Un descenso en el porcentaje de inhibición  
10 máxima observada para la población de VIH respecto al observado para la población de VIH de referencia indica que el VIH es resistente al inhibidor de entrada de VIH, y que el inhibidor de entrada de VIH es un inhibidor de entrada de VIH no competitivo.

En determinadas realizaciones, el inhibidor de entrada se selecciona del grupo que consiste en SCH-C, SCH-D, UK-427857 y TNX-355. En determinadas realizaciones, el inhibidor de entrada se selecciona del grupo que consiste en  
15 BMS-488.403, Pro-542, mAb B4, TNX-355, UK-427.857, SCH-D, GW-873.140, AMD-11070, TAK-220, Pro-140 y mAb004. En determinadas realizaciones, el inhibidor de entrada se selecciona del grupo que consiste en TNX-355, UK-427.857, SCH-D, GW-873.140, AMD-11070 y TAK-220. En determinadas realizaciones, el inhibidor de entrada se selecciona del grupo que consiste en TNX-355, UK-427.857, SCH-D, GW-873.140 y TAK-220. En determinadas realizaciones, el inhibidor de entrada es BMS-488.403. En determinadas realizaciones, el inhibidor de entrada es Pro-542. En determinadas realizaciones, el inhibidor de entrada es mAb B4. En determinadas realizaciones, el inhibidor de entrada es TNX-355. En determinadas realizaciones, el inhibidor de entrada es UK-427.857. En determinadas realizaciones, el inhibidor de entrada es SCH-D. En determinadas realizaciones, el inhibidor de entrada es GW-873.140. En determinadas realizaciones, el inhibidor de entrada es AMD-11070. En determinadas realizaciones, el inhibidor de entrada es TAK-220. En determinadas realizaciones, el inhibidor de entrada es Pro-140. En determinadas realizaciones, el inhibidor de entrada es mAb004. En determinadas realizaciones, el VIH de referencia es HXB2, nL4-3 o SF2. En determinadas realizaciones, el VIH procede de un sujeto infectado con VIH.

En determinadas realizaciones, los puntos de datos que miden la entrada de la población de VIH en la célula se determinan poniendo en contacto una pluralidad de partículas víricas de VIH con la célula en presencia del inhibidor de entrada de VIH, en donde la célula expresa un receptor superficial celular al cual se unen las partículas víricas, y  
30 en donde cada una de la pluralidad de partículas víricas comprende: (i) un vector de expresión vírico que carece de un ácido nucleico que codifique una proteína de cápsula vírica, pero que comprende un ácido nucleico indicador que produce una señal detectable cuando se introduce en la célula, y (ii) una proteína de cápsula vírica codificada por un ácido nucleico de la población de VIH; y medir la cantidad de señal detectable producida por la célula. En determinadas realizaciones, la señal detectable es una señal fluorescente. En determinadas realizaciones, el ácido nucleico indicador codifica luciferasa. En determinadas realizaciones, cada una de la pluralidad de partículas víricas de VIH comprende la misma proteína de cápsula vírica. En determinadas realizaciones, la pluralidad de partículas víricas son producidas co-transfectando en una célula (i) una pluralidad de ácidos nucleicos que codifican cada uno una proteína de cápsula vírica de la población de VIH, y (ii) un vector de expresión vírico que carece de un ácido nucleico que codifica una proteína de cápsula, en donde el vector comprende un ácido nucleico indicador que produce una señal detectable. En determinadas realizaciones, el receptor superficial celular es CD4. En determinadas realizaciones, la célula también expresa un receptor de quimioquina. En determinadas realizaciones, el receptor de quimioquina es CXCR4 o CCR5. En determinadas realizaciones, el ácido nucleico de VIH codifica gp160, gp120 o gp41.

En otros aspectos, la invención proporciona un método para determinar si un VIH es resistente a un inhibidor de entrada de VIH que comprende determinar una curva de inhibición log-sigmoidea que comprende puntos de datos para la entrada del VIH en presencia de concentraciones variables del inhibidor de entrada de VIH, en donde si la entrada del VIH no puede ser completamente inhibida por el inhibidor de entrada de VIH, el VIH es resistente al inhibidor de entrada de VIH.

En determinadas realizaciones, el inhibidor de entrada se selecciona del grupo que consiste en SCH-C, SCH-D, UK-427857 y TNX-355. En determinadas realizaciones, el inhibidor de entrada se selecciona del grupo que consiste en  
50 BMS-488.403, Pro-542, mAb B4, TNX-355, UK-427.857, SCH-D, GW-873, AMD-11070, TAK-220, Pro-140 y mAb004. En determinadas realizaciones, el inhibidor de entrada se selecciona del grupo que consiste en TNX-355, UK-427.857, SCH-D, GW-873.140, AMD-11070 y TAK-220. En determinadas realizaciones, el inhibidor de entrada se selecciona del grupo que consiste en TNX-355, UK-427.857, SCH-D, GW-873.140 y TAK-220. En determinadas realizaciones, el inhibidor de entrada es BMS-488.403. En determinadas realizaciones, el inhibidor de entrada es Pro-542. En determinadas realizaciones, el inhibidor de entrada es mAb B4. En determinadas realizaciones, el inhibidor de entrada es TNX-355. En determinadas realizaciones, el inhibidor de entrada es UK-427.857. En determinadas realizaciones, el inhibidor de entrada es SCH-D. En determinadas realizaciones, el inhibidor de entrada es GW-873.140. En determinadas realizaciones, el inhibidor de entrada es AMD-11070. En determinadas realizaciones, el inhibidor de entrada es TAK-220. En determinadas realizaciones, el inhibidor de entrada es Pro-140. En determinadas realizaciones, el inhibidor de entrada es mAb004. En determinadas realizaciones, el VIH procede de un sujeto infectado con VIH.

En determinadas realizaciones, los puntos de datos que miden la entrada del VIH en la célula se determinan: poniendo en contacto una partícula vírica de VIH con la célula en presencia del inhibidor de entrada de VIH, en donde la célula expresa un receptor superficial celular al cual se une la partícula vírica, y en donde la partícula vírica comprende: (i) un vector de expresión vírico que carece de un ácido nucleico que codifica una proteína de cápsula vírica, pero que comprende un ácido nucleico indicador que produce una señal detectable cuando se introduce en la célula, y (ii) una proteína de cápsula vírica codificada por un ácido nucleico del VIH; y medir la cantidad de la señal detectable producida por la célula. En determinadas realizaciones, la señal detectable es una señal fluorescente. En determinadas realizaciones, el ácido nucleico indicador codifica luciferasa. En determinadas realizaciones, la partícula vírica es producida co-transfectando en una célula (i) un ácido nucleico que codifica una proteína de cápsula vírica del VIH, y (ii) un vector de expresión vírico que carece de un ácido nucleico que codifica una proteína de cápsula, en donde el vector comprende un ácido nucleico indicador que produce una señal detectable. En determinadas realizaciones, el receptor superficial celular es CD4. En determinadas realizaciones, la célula también expresa un receptor de quimioquina. En determinadas realizaciones, el receptor de quimioquina es CXCR4 o CCR5. En determinadas realizaciones, el ácido nucleico de VIH codifica gp160, gp120 o gp41.

La descripción proporciona un método para determinar si una población de VIH es resistente a un inhibidor de entrada de VIH, que comprende determinar una curva de inhibición log-sigmoidea que comprende puntos de datos para la entrada de la población de VIH en presencia de concentraciones variables del inhibidor de entrada de VIH, en donde si la entrada de la población de VIH no puede ser inhibida completamente por el inhibidor de entrada de VIH, la población de VIH es resistente al inhibidor de entrada de VIH.

En determinadas realizaciones, el inhibidor de entrada se selecciona del grupo que consiste en SCH-C, SCH-D, UK-427857 y TNX-355. En determinadas realizaciones, el inhibidor de entrada se selecciona del grupo que consiste en BMS-488.403, Pro-542, mAb B4, TNX-355, UK-427.857, SCH-D, GW-873.140, AMD-11070, TAK-220, Pro-140 y mAb004. En determinadas realizaciones, el inhibidor de entrada se selecciona del grupo que consiste en TNX-355, UK-427.857, SCH-D, GW-873.140, AMD-11070 y TAK-220. En determinadas realizaciones, el inhibidor de entrada se selecciona del grupo que consiste en TNX-355, UK-427.857, SCH-D, GW-873.140 y TAK-220. En determinadas realizaciones, el inhibidor de entrada es BMS-488.403. En determinadas realizaciones, el inhibidor de entrada es Pro-542. En determinadas realizaciones, el inhibidor de entrada es mAb B4. En determinadas realizaciones, el inhibidor de entrada es TNX-355. En determinadas realizaciones, el inhibidor de entrada es UK-427.857. En determinadas realizaciones, el inhibidor de entrada es SCH-D. En determinadas realizaciones, el inhibidor de entrada es GW-873.140. En determinadas realizaciones, el inhibidor de entrada es AMD-11070. En determinadas realizaciones, el inhibidor de entrada es TAK-220. En determinadas realizaciones, el inhibidor de entrada es Pro-140. En determinadas realizaciones, el inhibidor de entrada es mAb004. En determinadas realizaciones, la población de VIH procede de un sujeto infectado con VIH.

En determinadas realizaciones, los puntos de datos que miden la entrada de la población de VIH en la célula se determinan poniendo en contacto las partículas víricas de VIH con la célula en presencia del inhibidor de entrada de VIH, en donde la célula expresa un receptor superficial celular al cual se unen las partículas víricas, y en donde cada una de la pluralidad de partículas víricas comprende: (i) un vector de expresión vírico que carece de un ácido nucleico que codifica una proteína de cápsula vírica, pero que comprende un ácido nucleico indicador que produce una señal detectable cuando se introduce en la célula, y (ii) una proteína de cápsula vírica codificada por un ácido nucleico de la población de VIH; y midiendo la cantidad de señal detectable producida por la célula. En determinadas realizaciones, la señal detectable es una señal fluorescente. En determinadas realizaciones, el ácido nucleico codifica luciferasa. En determinadas realizaciones, cada una de la pluralidad de partículas víricas de VIH comprende la misma proteína de cápsula vírica. En determinadas realizaciones, la pluralidad de partículas víricas es producida co-transfectando en una célula (i) una pluralidad de ácidos nucleicos que codifican cada uno una proteína de cápsula vírica de la población de VIH, y (ii) un vector de expresión vírico que carece de un ácido nucleico que codifica una proteína de cápsula, en donde el vector comprende un ácido nucleico indicador que produce una señal detectable. En determinadas realizaciones, el receptor superficial celular es CD4. En determinadas realizaciones, la célula también expresa un receptor de quimioquina. En determinadas realizaciones, el receptor de quimioquina es CXCR4 o CCR5. En determinadas realizaciones, el ácido nucleico de VIH codifica gp160, gp120 o gp41.

En realizaciones de la invención en las que los métodos determinan si una población de VIH es resistente a un inhibidor de entrada de VIH, la población de VIH puede ser una población heterogénea. En determinadas realizaciones, la población de VIH puede ser una población homogénea. Preferiblemente, la población de VIH corresponde a una población de VIH que infecta a un sujeto. Por ejemplo, determinando la curva de inhibición log-sigmoidea de muchos, por ejemplo 50, 100 o más, elementos aislados *env* individuales del sujeto, se pueden determinar la resistencia o la susceptibilidad de la población de VIH que infecta al sujeto.

En determinadas realizaciones, el ácido nucleico indicador comprende un gen indicador. En otra realización de esta invención, el gen indicador es un gen de luciferasa.

En determinadas realizaciones, el receptor superficial celular es CD4. En determinadas realizaciones, el receptor superficial celular es un receptor de quimioquina. En determinadas realizaciones, el receptor superficial celular es CXCR4 o CCR5. En determinadas realizaciones, el receptor superficial celular es CXCR4 y CCR5.

En determinadas realizaciones, el sujeto está infectado con el virus VIH-1, un virus de hepatitis (tal como VHC o VHB), o cualquier otro virus.

En determinadas realizaciones, el ácido nucleico comprende ADN que codifica gp160, gp120 y/o gp41.

En determinadas realizaciones, el vector de expresión vírico comprende ácido nucleico de VIH.

5 En determinadas realizaciones, el vector de expresión vírico comprende un gen gag-pol de VIH.

En determinadas realizaciones, el vector de expresión vírico comprende ADN que codifica vif, vpr, tat, rev, vpu y nef.

En determinadas realizaciones, la célula es una célula de mamífero. En determinadas realizaciones, la célula de mamífero es una célula humana. En determinadas realizaciones, la célula humana es una célula embrionaria humana de riñón. En determinadas realizaciones, la célula embrionaria humana de riñón es una célula 293. En determinadas realizaciones, la célula es una célula T humana. En determinadas realizaciones, la célula es una línea celular de leucemia de células T. En determinadas realizaciones, la célula es una célula mononuclear sanguínea periférica. En determinadas realizaciones, la célula es una célula de astroglioma. En determinadas realizaciones, la célula de astroglioma es una célula U87. En determinadas realizaciones, la célula es una célula de osteosarcoma humana. En determinadas realizaciones, la célula de osteosarcoma humana es una célula HT4. En determinadas realizaciones, la célula es una célula que no expresa de forma natural CD4, CXCR4 y/o CCR5, pero que ha sido modificada para expresar uno o más de dichos receptores. En determinadas realizaciones, la célula ha sido modificada para expresar CD4. En determinadas realizaciones, la célula ha sido diseñada para expresar CXCR4. En determinadas realizaciones, la célula ha sido modificada para expresar CCR5.

En determinadas realizaciones, el inhibidor de entrada de VIH se une al receptor superficial celular. En determinadas realizaciones, el compuesto es un ligando del receptor superficial celular. En determinadas realizaciones, el compuesto comprende un anticuerpo, o un fragmento de unión a antígeno del mismo. En determinadas realizaciones, el compuesto inhibe la fusión de membrana. En determinadas realizaciones, el compuesto es un péptido, un peptidomimético, una molécula orgánica o un compuesto sintético. En determinadas realizaciones, el compuesto se une a la proteína de cápsula vírica.

En otro aspecto, la invención proporciona un método para determinar la susceptibilidad de un virus frente a un compuesto que inhibe la entrada celular de virus que comprende: (a) obtener un ácido nucleico que codifica una proteína de cápsula vírica de un sujeto infectado con el virus; (b) co-transfectar en una primera célula (i) el ácido nucleico de la etapa (a), y (ii) un vector de expresión vírico que carece de un ácido nucleico que codifica una proteína de cápsula, y que comprende un ácido nucleico indicador que produce una señal detectable, de tal modo que la primera célula produce partículas víricas que comprenden la proteína de cápsula codificada por el ácido nucleico obtenido del sujeto; (c) poner en contacto las partículas víricas producidas en la etapa (b) con una segunda célula en presencia del compuesto, en donde la segunda célula expresa un receptor superficial celular al cual se une el virus; (d) medir la cantidad de señal producida por la segunda célula con el objetivo de determinar la capacidad de infección de las partículas víricas; y (e) comparar la cantidad de señal medida en la etapa (d) con la cantidad de señal producida en ausencia del compuesto, en donde un descenso de la cantidad de señal medida en presencia del compuesto indica que el virus es susceptible al compuesto.

La invención proporciona un método para determinar si un virus ha desarrollado resistencia a un inhibidor de entrada que comprende: (a) determinar si un virus es resistente a un inhibidor de entrada de acuerdo al método de la invención, en donde un ácido nucleico que codifica una proteína de cápsula vírica se obtiene de un sujeto en un primer momento; (b) determinar si un virus es resistente a un inhibidor de entrada de acuerdo a un método de la invención, en donde el ácido nucleico que codifica la proteína de cápsula vírica se obtiene del sujeto en un segundo momento posterior; y (c) comparar las susceptibilidades determinadas en las etapas (a) y (b), en donde un descenso en la susceptibilidad en el segundo momento posterior indica que el virus ha desarrollado una susceptibilidad reducida o una resistencia al inhibidor de entrada.

La descripción proporciona un método para identificar una mutación en un virus que confiere resistencia a un compuesto que inhibe la entrada en una célula que comprende: (a) determinar la secuencia de ácido nucleico o la secuencia de aminoácidos del virus antes de cualquier tratamiento del virus con el compuesto; (b) obtener un virus resistente al compuesto; (c) determinar la secuencia de ácido nucleico o la secuencia de aminoácidos del virus resistente de la etapa (b); y (d) comparar la secuencia de ácido nucleico o las secuencias de aminoácidos de las etapas (a) y (c), respectivamente, para identificar la mutación en el virus que le confiere resistencia al compuesto.

El virus obtenido en la etapa (b) puede ser el virus de la etapa (a) cultivado en presencia del compuesto hasta que se desarrolla la resistencia.

El virus obtenido en la etapa (b) puede aislarse de un sujeto que ha sido sometido a tratamiento con el compuesto.

Esta descripción proporciona además los medios y el método para descubrir, optimizar y caracterizar fármacos nuevos o novedosos que estén dirigidos contra varias etapas, definidas y aún sin definir, de la unión del virus y del proceso de entrada.

Esta descripción proporciona además los medios y el método para descubrir, optimizar y caracterizar vacunas de VIH-1 (tanto preventivas como terapéuticas) que estén dirigidas contra varias etapas, definidas o aún sin definir, de la unión del virus y el proceso de entrada.

5 Esta descripción proporciona los medios y el método para identificar sustituciones/mutaciones de aminoácidos en proteínas de cápsula de VIH-1 (gp41 y/o gp120) que alteran la susceptibilidad a inhibidores de entrada del virus.

Esta descripción proporciona además los medios y el método para determinar sustituciones/mutaciones de aminoácidos en la cápsula de VIH-1 que se observan frecuentemente, tanto solas como en combinación, en virus que exhiben una susceptibilidad alterada frente a inhibidores de entrada de virus.

10 Esta descripción proporciona además los medios y el método para usar la susceptibilidad a inhibidor de entrada de virus para guiar el tratamiento de sujetos en los que el tratamiento con fármacos antirretrovirales ha fallado.

Esta descripción proporciona además los medios y los métodos para usar la susceptibilidad a inhibidor de entrada para guiar el tratamiento de sujetos recién infectados con VIH-1.

15 En otro aspecto de la descripción, los métodos comprenden determinar que un sujeto está infectado con un VIH que es resistente a un inhibidor de entrada de VIH de acuerdo a un método de la invención, aconsejar entonces a un profesional médico de la opción de tratamiento de administrar al sujeto un régimen terapéutico que no incluye el inhibidor de entrada de VIH. En determinadas realizaciones, el inhibidor de entrada de VIH es SCH-C, SCH-D, UK-427857 o TNX-355. En determinadas realizaciones, el inhibidor de entrada se selecciona del grupo que consiste en BMS-488.403, Pro-542, mAb B4, TNX-355, UK-427.857, SCH-D, GW-873.140, AMD-11070, TAK-220, Pro-140 y mAb004. En determinadas realizaciones, el inhibidor de entrada se selecciona del grupo que consiste en TNX-355, UK-427.857, SCH-D, GW-873.140, AMD-11070 y TAK-220. En determinadas realizaciones, el inhibidor de entrada se selecciona del grupo que consiste en TNX-355, UK-427.857, SCH-D, GW-873.140 y TAK-220. En determinadas realizaciones, el inhibidor de entrada es BMS-488.403. En determinadas realizaciones, el inhibidor de entrada es Pro-542. En determinadas realizaciones, el inhibidor de entrada es mAb B4. En determinadas realizaciones, el inhibidor de entrada es TNX-355. En determinadas realizaciones, el inhibidor de entrada es UK-427.857. En determinadas realizaciones, el inhibidor de entrada es SCH-D. En determinadas realizaciones, el inhibidor de entrada es GW-873.140. En determinadas realizaciones, el inhibidor de entrada es AMD-11070. En determinadas realizaciones, el inhibidor de entrada es TAK-220. En determinadas realizaciones, el inhibidor de entrada es Pro-140. En determinadas realizaciones, el inhibidor de entrada es mAb004.

30 En otro aspecto de la descripción, los métodos comprenden determinar si un sujeto está infectado con un VIH que es resistente a un inhibidor de entrada de VIH de acuerdo a un método de la invención, entonces aconsejar a un profesional médico que no trate al sujeto con el inhibidor de entrada a VIH. En determinadas realizaciones, el inhibidor de entrada de VIH es SCH-C, SCH-D, UK-427857 o TNX-355. En determinadas realizaciones, el inhibidor de entrada se selecciona del grupo que consiste en BMS-488.403, Pro-542, mAb B4, TNX-355, UK-427.857, SCH-D, GW-873.140, AMD-11070, TAK-220, Pro-140 y mAb004. En determinadas realizaciones, el inhibidor de entrada se selecciona del grupo que consiste en TNX-355, UK-427.857, SCH-D, GW-873.140, AMD-11070 y TAK-220. En determinadas realizaciones, el inhibidor de entrada se selecciona del grupo que consiste en TNX-355, UK-427.857, SCH-D, GW-873.140 y TAK-220. En determinadas realizaciones, el inhibidor de entrada es Pro-542. En determinadas realizaciones, el inhibidor de entrada es mAb B4. En determinadas realizaciones, el inhibidor de entrada es TNX-355. En determinadas realizaciones el inhibidor de entrada es UK-427.857. En determinadas realizaciones, el inhibidor de entrada es SCH-D. En determinadas realizaciones, el inhibidor de entrada es GW-873.140. En determinadas realizaciones, el inhibidor de entrada es AMD-11070. En determinadas realizaciones, el inhibidor de entrada es TAK-220. En determinadas realizaciones, el inhibidor de entrada es Pro-140. En determinadas realizaciones, el inhibidor de entrada es mAb004.

45 En otro aspecto adicional de la descripción, los métodos comprenden determinar si un sujeto está infectado con un VIH que es resistente a un inhibidor de entrada de VIH de acuerdo a un método de la invención, y administrar al sujeto una combinación de agentes anti-VIH que no comprende el inhibidor de entrada de VIH. En determinadas realizaciones, el inhibidor de entrada de VIH es SCH-C, SCH-D, UK-427857 o TNX-355. En determinadas realizaciones, el inhibidor de entrada de VIH es SCH-C, SCH-D, UK-427857 o TNX-355. En determinadas realizaciones, el inhibidor de entrada se selecciona del grupo que consiste en BMS-488.403, Pro-542, mAb B4, TNX-355, UK-427.857, SCH-D, GW-873.140, AMD-11070, TAK-220, Pro-140 y mAb004. En determinadas realizaciones, el inhibidor de entrada se selecciona del grupo que consiste en TNX-355, UK-427.857, SCH-D, GW-873.140, AMD-11070 y TAK-220. En determinadas realizaciones, el inhibidor de entrada se selecciona del grupo que consiste en TNX-355, UK-427.857, SCH-D, GW-873.140 y TAK-220. En determinadas realizaciones, el inhibidor de entrada es BMS-488.403. En determinadas realizaciones, el inhibidor de entrada es Pro-542. En determinadas realizaciones, el inhibidor de entrada es mAb B4. En determinadas realizaciones, el inhibidor de entrada es TNX-355. En determinadas realizaciones, el inhibidor de entrada es UK-427.857. En determinadas realizaciones, el inhibidor de entrada es SCH-D. En determinadas realizaciones, el inhibidor de entrada es GW-873.140. En determinadas realizaciones, el inhibidor de entrada es AMD-11070. En determinadas realizaciones, el inhibidor de entrada es TAK-220. En determinadas realizaciones, el inhibidor de entrada es Pro-140. En determinadas realizaciones, el inhibidor de entrada es mAb004.

En otro aspecto adicional de la descripción, los métodos comprenden determinar si un sujeto está infectado con un VIH que es hipersusceptible a un inhibidor de entrada de VIH de acuerdo a un método de la invención, entonces aconsejar a un profesional médico sobre la opción de tratamiento de administrar al sujeto una combinación de agentes anti-VIH que no comprende una cantidad efectiva del inhibidor de entrada de VIH. En determinadas realizaciones, el inhibidor de entrada de VIH es SCH-C, SCH-D, UK-427857 o TNX-355. En determinadas realizaciones, el inhibidor de entrada se selecciona del grupo que consiste en BMS-488.403, Pro-542, mAb B4, TNX-355, UK-427.857, SCH-D, GW-873.140, AMD-11070, TAK-220, Pro-140 y mAb004. En determinadas realizaciones, el inhibidor de entrada se selecciona del grupo que consiste en TNX-355, UK-427.857, SCH-D, GW-873.140, AMD-11070 y TAK-220. En determinadas realizaciones, el inhibidor de entrada es BMS-488.403. En determinadas realizaciones, el inhibidor de entrada es Pro-542. En determinadas realizaciones, el inhibidor de entrada es mAb B4. En determinadas realizaciones, el inhibidor de entrada es TNX-355. En determinadas realizaciones, el inhibidor de entrada es UK-427.857. En determinadas realizaciones, el inhibidor de entrada es SCH-D. En determinadas realizaciones, el inhibidor de entrada es GW-873.140. En determinadas realizaciones, el inhibidor de entrada es AMD-11070. En determinadas realizaciones, el inhibidor de entrada es TAK-220. En determinadas realizaciones, el inhibidor de entrada es Pro-140. En determinadas realizaciones, el inhibidor de entrada es mAb004.

En otro aspecto adicional de la descripción, los métodos comprenden determinar si un sujeto está infectado con un VIH que es resistente a un inhibidor de entrada de VIH de acuerdo a un método de la invención en un primer momento, entonces determinar si el sujeto permanece infectado con un VIH que es resistente a un inhibidor de entrada de VIH de acuerdo a un método de la invención en un segundo momento posterior. En otras realizaciones, los métodos comprenden determinar si un sujeto está infectado con un VIH que es resistente a un inhibidor de entrada de VIH de acuerdo a un método de la invención en un primer momento, entonces determinar si el sujeto está infectado con un VIH que ya no es resistente a un inhibidor de entrada de VIH de acuerdo a un método de la invención en un segundo momento.

## **6.2. Medición de la resistencia a un inhibidor de entrada**

En esta sección se describen los métodos para llevar a cabo ensayos de capacidad de infección de ronda sencilla que determinan la capacidad de un virus para entrar en una célula. Estos métodos se pueden usar, por ejemplo, para determinar puntos de datos para representar una curva log-sigmoidea para determinar si un VIH es resistente a un inhibidor de entrada. En una realización, se construye un vector de expresión de cápsula capaz de expresar proteínas de cápsula de VIH-1 en células transfectadas. Se han descrito vectores de expresión relacionados, incluyendo un plásmido (pAmphoEnv) construido para expresar proteína de cápsula de virus de leucemia murina anfotrópica (A-MLV), tal como se describe en la Patente de EE.UU. N° 5.837.464 y en Petropoulos y col., 2000. El vector pAmphoEnv usa el promotor de gen temprano inmediato del citomegalovirus humano (CMV) y la secuencia señal de poliadenilación SV40 para producir ARNm de cápsula de A-MLV en células transfectadas. El plásmido pAmphoEnv se modifica eliminando el gen de cápsula A-MLV e introduciendo sitios de ruptura enzimática de restricción que pueden permitir la inserción de fragmentos de cápsula vírica derivados de una variedad de elementos aislados, tal como VIH-1. En el caso del VIH-1, el marco de lectura abierto de la cápsula se expande aproximadamente 2600 nucleótidos y codifica la poliproteína de cápsula, gp160. La poliproteína gp160 es dividida por una proteasa celular de tipo furina para producir dos subunidades, la proteína de transmembrana gp41 y la proteína superficial gp120. Los vectores de expresión de cápsula de VIH-1 se pueden construir por etapas como se indica a continuación:

### **6.2.1. Reemplazar las secuencias de ácido nucleico de cápsula de A-MLV del vector de expresión de cápsula (pAmphoEnv) con un poliligando de sitio de clonación múltiple:**

Las secuencias de ácido nucleico de cápsula de A-MLV se pueden eliminar del vector pAmphoEnv mediante digestión con enzima de restricción. El vector digerido se puede recircularizar mediante ligación a un poliligando de oligonucleótido dúplex que contiene cuatro sitios de restricción internos únicos (a, b, c, d) para la inserción de secuencias de cápsula. La reacción de ligación se puede usar para transformar *Escherichia Coli* y clones moleculares que contienen la secuencia de poliligando correcta se pueden identificar y confirmar mediante cartografiado de restricción y secuenciamiento de ADN, respectivamente. La introducción de múltiples sitios de clonación únicos en el vector puede facilitar la inserción de secuencias de cápsula de VIH-1. Los sitios de restricción dentro del poliligando pueden elegirse en base a su ocurrencia infrecuente en secuencias de cápsula de VIH-1 (base de datos de VIH-1 LANL). Este vector se puede denominar pCX. La funcionalidad del vector pCX se puede demostrar insertando un gen indicador o un ácido nucleico indicador, tal como luciferasa de luciérnaga, en el sitio de clonación múltiple de pCX y midiendo una señal procedente de la actividad del ácido nucleico indicador o del gen indicador en las células transfectadas. Tal como se usa en la presente memoria, "ácido nucleico indicador" se refiere a un ácido nucleico que codifica una proteína, estructura de ADN o ARN que, bien directamente o bien a través de una reacción, da lugar a una señal detectable y mensurable, por ejemplo, color o luz de longitud de onda mensurable, o generación de una estructura de ADN o ARN específica usada como indicador, que podría ser amplificada usando uno cualquiera de una serie de ensayos de amplificación cuantitativos.

#### 6.2.2. Insertar secuencias de cápsula vírica en el vector de expresión de cápsula pCX:

Usando cebadores mutagénicos para amplificación PCR, se generan fragmentos de cápsula vírica que contienen dos sitios de restricción únicos (a, b y c, d, respectivamente) adyacentes a los codones de inicio y terminación de, por ejemplo, el marco de lectura abierto de cápsula de VIH-1. La introducción de dos sitios de restricción únicos en cada extremo del marco de lectura abierto de cápsula puede mejorar las opciones de clonación de fragmentos de cápsula de VIH-1 que albergan sitios de restricción internos para cada una de las enzimas encontradas en el sitio de clonación múltiple del vector pCX.

En el caso de VIH-1, se pueden usar dos clones moleculares de VIH-1 bien caracterizados con diferencias conocidas en el gen de cápsula, NL4-3 (una cepa de laboratorio de célula T trópica inductora de sincitio) y JR-CSF (un elemento aislado primario de macrófago trópico no inductor de sincitio) como plantilla para la amplificación PCR. Los ~2.600 productos de amplificación de nucleótido pueden ser digeridos con dos enzimas de restricción (cada enzima ejerciendo la división en un extremo del fragmento; por ejemplo a y c ó b y d) y posteriormente insertados en el vector pCX mediante ligación y transformación de *Escherichia Coli*. Los clones moleculares que contienen las secuencias de cápsula apropiadas pueden identificarse mediante cartografiado de restricción y confirmarse mediante secuenciamiento de ADN. Los plásmidos resultantes, pHIVenv (NL4-3) y pHIVenv (JR-CSF), pueden usarse para expresar proteínas de cápsula de VIH-1 en células transfectadas (Figura 1A). La funcionalidad de los vectores de expresión de cápsula, tales como los vectores pHIVenv, puede demostrarse midiendo la síntesis de cápsula vírica en células transfectadas (análisis de transferencia Western), y por su capacidad para seudotipar vectores de retrovirus deficientes en cápsula. Se han demostrado títulos de virus elevados usando la línea celular 293 de riñón embrionario humano (Petropoulos y col., 2000), sin embargo la presente invención no está restringida a dichas líneas celulares. Otras líneas celulares adecuadas usadas como primera célula para transfección de ácido nucleico obtenido del sujeto que codifica una proteína de cápsula vírica incluyen, a modo de ejemplo y no como limitación de la presente invención, 5.25; HOX; U87; MT2; PM1; CEM; etc. La línea celular será diseñada de manera óptima para expresar uno o más co-receptores.

#### 6.2.3. Modificar el vector pCX para mejorar la eficacia de clonación de secuencias de cápsula vírica:

Para mejorar la eficacia de clonación de fragmentos de cápsula vírica, se puede modificar el vector de expresión pCX insertando una casete de gen asesino bacteriano (por ejemplo, gen de control de muerte celular b (ccdB) o un miembro de la familia de genes asesinos hok) bajo el control del promotor lac de *Escherichia Coli* en el sitio de clonación múltiple (The y col., 1990; Bernard y Couturier, 1992; Bernard y col, 1993). Este vector modificado se denomina pCXccdB. La transcripción del gen asesino ccdB está reprimida en cepas bacterianas que expresan el represor lac i, tal como la JM109. Se puede usar ésta o una cepa equivalente para propagar plásmidos que portan el gen asesino ccdB que están bajo el control del promotor lac. Inversamente, en este sistema las cepas bacterianas que no sobreexpresan el represor lac i<sup>q</sup>, tal como DH5α y Top10, no pueden mantener plásmidos que expresan el gen ccdB. Los transformantes pueden ser asesinados debido a la actividad ccdB. Las células DH5α y Top10 pueden adquirirse de varios comercializadores (Life Technologies o Invitrogen). Usando esta estrategia de clonación selectiva, el vector de expresión parental se propaga en una cepa bacteriana lac i<sup>q</sup>. El vector es digerido con dos enzimas de restricción que eliminan la casete de gen ccdB y, en el caso del VIH-1, son compatibles con la inserción de secuencias de cápsula de VIH-1 (a, b, c, d). Después de ligar el vector y los fragmentos de cápsula, se transforma una cepa de bacterias que carece de lac i<sup>q</sup>. Una vez transformadas, las bacterias que contienen plásmidos en los que los insertos de cápsula vírica han reemplazado al gen asesino ccdB pueden crecer. Las bacterias que contienen plásmidos que conservan o reconstituyen el gen asesino ccdB no pueden sobrevivir. De este modo, la población de bacterias transformadas se enriquece en plásmidos que contienen insertos de cápsula vírica, pero que carecen del vector parental que contiene el gen ccdB. La construcción del vector pCXccdB no es esencial para llevar a la práctica la presente invención, pero es de esperar que mejore significativamente la eficacia de clonación de secuencias de cápsula de VIH-1 derivadas de muestras del sujeto; por tanto, se puede mejorar la probabilidad de mantener la heterogeneidad de secuencias víricas. La estructura del vector pCXccdB se puede confirmar mediante cartografiado de restricción y secuenciamiento de ADN.

#### 6.2.4. Insertar secuencias de cápsula vírica en el vector de expresión pCXccdB:

La funcionalidad del vector pCXccdB puede evaluarse mediante reacciones de ligación que contengan secuencias de cápsula vírica y ADN digerido incompletamente con vector pCXccdB. Después de la transformación bacteriana, se puede preparar ADN plásmido a partir de clones bacterianos individuales y analizarse mediante digestión de restricción para determinar la presencia de fragmentos de cápsula vírica y la ausencia de secuencias ccdB. La posibilidad de esta estrategia se evalúa amplificando la región de cápsula de un total de 13 clones VIH-1 disponibles (pCRII-91 US005.11, pCRII-91006.10, pCRII-92US657.1, pCRII-92US711.14, pCRII91US712.4, pCRII-92US714.1, pCRII-91HT652.11, pCRII-92BR020.4, pCRII-91HT651.1A, pCRII-92HT593.1, pCRII-92HT594.10, pCRII92HT596.4, pCRII-92HT599.24), obtenibles a través del programa de referencia de reactivos de investigación del SIDA (ARRRP), Rockville, Maryland. Cada fragmento puede ser insertado en pCXccdB y la estructura de los vectores de expresión pHIVenv resultantes puede confirmarse mediante cartografiado de restricción y/o secuenciamiento de ADN. La funcionalidad de cada vector pHIVenv puede demostrarse midiendo la síntesis de proteína de cápsula VIH-1 en células transfectadas (análisis de transferencia Western), y por su capacidad para seudotipar vectores de retrovirus deficientes en cápsula.

### **6.3. Construcción de un vector de expresión vírico bio-seguro que comprende ácido nucleico indicador en lugar de la proteína de cápsula codificadora.**

Se construye un vector bio-seguro para evaluar inhibidores de entrada vírica de acuerdo a métodos y medios similares a los descritos en la Patente de EE.UU. n° 5.837.464 y Petropoulos y col., 2000, usados para evaluar inhibidores de PR y RT. El vector de expresión vírico de la presente invención puede co-transfectarse en células junto con los vectores de expresión de cápsula (descritos anteriormente) para producir reservas de virus de título elevado. Dichas reservas de virus pueden ser evaluadas para determinar su susceptibilidad a inhibidores de entrada de virus, que incluye fármacos antivirales y anticuerpos neutralizantes. En el caso del VIH-1, el vector de expresión vírico se puede generar a partir de NL4-3, un clon molecular infeccioso bien caracterizado de VIH-1. La repetición terminal larga 5' (LTR) que controla la expresión génica puede modificarse de tal modo que la transcripción de los genes víricos en células transfectadas es dirigida por el promotor temprano inmediato de CMV (Naviaux y col., 1996). La mayor parte del gen de cápsula puede ser borrada, pero se mantienen elementos de control importantes tales como el elemento de respuesta rev (RRE) y las regiones de codificación de proteína accesorias (rev, tat). En lugar de las secuencias de cápsula eliminadas, se inserta un ácido nucleico indicador, tal como una casete de gen indicador de luciferasa de luciérnaga, que está bajo el control de secuencias promotor-potenciador de CMV (Figuras 1B y 3). La infección del virus se puede monitorizar midiendo la actividad de luciferasa en las células infectadas. Es concebible, aunque improbable, que la recombinación inter-plásmido entre el vector retroviral y, por ejemplo, las secuencias de pHIVenv en células transfectadas pueda conducir a la generación de VIH-1 infeccioso. En un esfuerzo por generar un vector bioseguro, se puede llevar a cabo la introducción de varias alteraciones genéticas en el genoma de VIH. Por ejemplo, también se puede realizar la eliminación de la mayoría del gen de cápsula, pero manteniendo la importante secuencia de control, RRE, y también la eliminación de las secuencias potenciadoras transcripcionales de la región U3 del LTR 3' del vector (Figura 2). Durante la replicación del genoma retroviral, la región U3 localizada en el extremo 3' del genoma del virus sirve como plantilla para la región U3 del LTR 5' del provirus en células infectadas. Dichos provirus carecen del elemento promotor fuerte en la región U3 del LTR 5' y por tanto son incapaces de producir ARN retroviral en células infectadas. Esta estrategia de auto-desactivación (SIN, del inglés "self-inactivating") ha sido usada con éxito para varios sistemas de vectores retrovirales, incluyendo el VIH-1 (Hwang y col., 1997; Miyoshi y col., 1998). En el ensayo de la presente invención, la expresión génica vírica no es requerida en células infectadas debido a que la infección de virus se mide mediante la señal detectable producida por el ácido nucleico indicador, tal como la producción de actividad de luciferasa, dirigida por su propio promotor separado (Figura 1B). La eliminación de secuencias de cápsula y de la región potenciadora transcripcional (U3) se puede llevar a cabo mediante procedimientos de clonación molecular estándares, y cada eliminación se puede verificar mediante análisis de secuencia de ADN.

La funcionalidad de este vector, por ejemplo en el caso del VIH-1, designado pHIVlucΔU3, puede demostrarse mediante la co-transfección de células 293 con el vector pHIVenv descrito anteriormente. La tras-complementación eficiente de proteínas víricas producida por ambos vectores en las células transfectadas puede conducir a la producción de partículas víricas. Las partículas víricas pueden recolectarse a partir de sobrenadantes de cultivos y ser analizadas mediante ensayo de transferencia Western. Los títulos de virus se pueden cuantificar mediante aplicaciones rutinarias de ELISA p24, PCR cuantitativa o ensayos TaqMan.

No es necesario producir un vector de expresión vírico auto-desactivante para llevar a cabo la presente invención, pero es deseable mejorar la reproducibilidad y la bioseguridad del ensayo.

### **6.4. Identificación de líneas celulares adecuadas que expresan receptores y co-receptores y apoyan la infección vírica.**

Se pueden evaluar diferentes líneas celulares de mamíferos que han sido descritas con anterioridad y que son conocidas por apoyar la infección de un virus particular. Tal como se discute en la presente memoria para una realización relacionada con el VIH-1, el ensayo se puede llevar a cabo (a) co-transfectando una primera célula con pHIVenv y pHIVlucΔU3, (b) recolectando el virus tras la transfección, (c) usando este virus para infectar una segunda célula, tanto en presencia como en ausencia de inhibidores de entrada de virus, y (d) midiendo la producción de luciferasa en las células infectadas.

La Tabla 1 enumera ejemplos representativos de dichas líneas celulares evaluadas para la infección de VIH-1, que incluyen la línea celular y su receptor/co-receptor asociado. Varias de estas líneas celulares se pueden obtener de repositorios de células públicos.

Las partículas víricas recolectadas a partir de cultivos de células 293 transfectadas se pueden usar para infectar una variedad de diferentes líneas celulares. En el caso del VIH-1, el vector pHIVlucΔU3 contiene eliminaciones en el gen de cápsula y el promotor-potenciador U3 tal como se ha descrito anteriormente, por lo tanto la infección de una línea celular permisiva con partículas de virus producidas por este vector está restringida a una única ronda de replicación. Esto incluye (a) unión y entrada del virus, mediada por las proteínas de cápsula víricas, producidas en trans por el vector pHIVenv tal como se ha descrito, (b) la conversión de ARN vírico de cadena sencilla en ADN de cadena doble mediante RT, y (c) la integración de ADN vírico en el genoma de la célula hospedante (formación de provirus). La transcripción activa de genes víricos mediante ARN polimerasa II que normalmente se produce en células infectadas después de la integración provírica se puede restringir eliminando secuencias promotor-

potenciador víricas esenciales en el vector pHIVlucΔU3. Sin embargo, esta restricción no puede interferir con la expresión de gen de luciferasa en células infectadas, ya que este gen está dirigido independientemente de la expresión génica vírica usando un promotor de CMV interno (Figura 1B). La cantidad de actividad de luciferasa producida después de la infección se puede usar como medida de la capacidad de infección vírica.

- 5 La unión y entrada de VIH-1 en células hospedantes requiere la interacción con un receptor primario (CD4) y uno de varios co-receptores, habitualmente CCR5 o CXCR4. Se pueden escrutar líneas celulares que se sepa que expresan varias combinaciones de CD4, CCR5 y CXCR4. Específicamente, se evalúan las líneas celulares enumeradas en la Tabla 1 que expresan (a) CD4 más CCR5, (b) CD4 más CXCR4, y (c) CD4 más CCR5 más CXCR4. Las líneas celulares que expresan solo el receptor CD4, o bien solo el co-receptor CCR5 o CXCR4, pueden servir como controles útiles y se pueden usar para evaluar elementos aislados de VIH-1 que no requieren la unión de CD4 o que usan co-receptores diferentes a CCR5 y CXCR4. El principal criterio para juzgar la adecuación de la línea celular puede ser la capacidad de infección medida mediante la producción de luciferasa ( $10^4$ - $10^6$  unidades lumínicas relativas). Además, las líneas celulares se pueden evaluar en base a las tasas de crecimiento, la viabilidad, la estabilidad y otros parámetros, según se juzgue necesario. Se pueden seleccionar líneas celulares que sean fáciles de mantener y, por ejemplo, producen grandes cantidades de actividad de luciferasa después de la infección, que pueden ser infectadas mediante tropismos de receptor de cápsula diferentes, por ejemplo CD4/CXCR4 y CD4/CCR5. Otras líneas celulares adicionales bien caracterizadas que apoyan, por ejemplo, la replicación de VIH y que expresan receptor y co-receptores de VIH-1 (por ejemplo, CEM-NKr-CCR5; categoría de liberación a) están disponibles en repositorios públicos tales como el ARRRP.
- 10
- 15
- 20 Además, las líneas celulares pueden potenciarse usando procedimientos estándares, tal como promoviendo la infección mediante la adición de polibreno a células (Porter y col., 1998). Por ejemplo, en el caso del VIH, se pueden identificar otras líneas celulares potenciales para uso con la presente invención mediante la infección con cepas de laboratorio de VIH-1, o transfectando células directamente con plásmidos de expresión vírica descritos en la presente memoria, y puntuando la producción vírica. La acumulación de transcritos víricos puede comprobarse usando un ensayo RT-PCR cuantitativo. Las líneas celulares adecuadas para otros virus se pueden identificar de manera similar.
- 25

La presente invención puede optimizar las condiciones de ensayo y permitir una evaluación de alta capacidad de muestras de sujeto usando automatización. Los métodos de preparación de muestras se pueden optimizar para capturar de forma eficiente ARNs víricos de cápsula y genómicos. Las condiciones de RT-PCR se pueden optimizar para permitir la amplificación de secuencias de cápsula víricas derivadas de pacientes, tal como secuencias de cápsula de VIH-1 (~2.600 pares base) a bajas cargas víricas (~500 copias por mL).

30

#### 6.5. Demostración de la utilidad del ensayo.

La utilidad del ensayo de la presente invención se demuestra a través de los resultados obtenidos en: (1) la evaluación de la inhibición dependiente de dosis de la entrada de virus en presencia de inhibidores bien caracterizados; y (2) en la evaluación de la inhibición dependiente de dosis de la infección en presencia de anticuerpos neutralizantes de VIH-1 bien caracterizados.

35

Se evaluaron las siguientes aplicaciones para el ensayo de entrada de virus de la presente invención:

- (i) detectar la inhibición de la replicación de VIH-1 mediante inhibidores de unión y entrada de virus (que incluyen inhibidores de fusión, receptor y co-receptor);
- 40 (ii) medir cambios en la susceptibilidad a la unión de VIH-1 e inhibidores de entrada;
- (iii) detectar la actividad de neutralización de anticuerpos generados en respuesta a vacunas dirigidas contra proteínas de cápsula de VIH-1; y
- (iv) determinar tropismo de co-receptor.

En determinadas realizaciones, el ensayo se puede llevar a cabo (a) co-transfectando una primera célula con vectores pHIVenv y pHIVlucΔU3, (b) recolectar virus aproximadamente 48 h tras la transfección, (c) usar dicho virus para infectar una segunda célula, tanto en presencia como en ausencia de inhibidores de entrada de virus, y (d) medir la producción de luciferasa aproximadamente 48-72 h después de la infección. La inhibición dependiente de dosis de la replicación de VIH-1 se puede evaluar frente a un amplio intervalo de concentraciones de inhibidor de entrada usando un formato de 96 pocillos. El intervalo de concentración apropiado se puede determinar empíricamente para cada inhibidor. Los datos se pueden representar como porcentaje de inhibición de actividad de luciferasa frente a concentración de fármaco ( $\log_{10}$ ). El análisis de datos se puede llevar a cabo usando software de ordenador. Las curvas de inhibición se pueden usar para determinar concentraciones de inhibidor al 50% ( $IC_{50}$ ) para fármacos o anticuerpos específicos.

45

50

Las proteínas de cápsula derivadas de una variedad de elementos aislados de VIH-1 bien caracterizados son evaluadas usando vectores de pHIVenv construidos como se ha descrito anteriormente. Para definir el tropismo de co-receptor de cápsula, en el caso del VIH-1, se evalúa la infección usando células que expresan CD4 más CXCR4

55

y CD4 más CCR5 tal como se ha descrito anteriormente. Se puede usar una amplia variedad de compuestos que son conocidos inhibidores de entrada de VIH-1 (Tabla 2), que incluyen agentes no específicos tales como polianiones sulfonados (dextrano sulfato y heparina) con el ensayo de la presente invención. Quimioquinas tales como Rantes y SDF-1, los ligandos naturales para los receptores de quimioquina de CCR5 y CXCR4, respectivamente (véase Alkhatib y col., 1996; Bleul y col., 1996) también son adecuados para uso con la presente invención. Además, se usaron inhibidores de entrada de virus tales como T-20 y T1249 (Trimeris, Inc.), PRO 542 (Progenics), TNX 355 (Tanox) para evaluar la utilidad del ensayo de la presente invención.

La toxicidad de fármaco en células diana se evalúa usando ensayos estándares de viabilidad o citotoxicidad (por ejemplo, exclusión de colorante, MTS, ATP).

Se han descrito mutantes de VIH-1 que presentan una susceptibilidad reducida al inhibidor de fusión T20 (Rimsky y col., 1998) y los determinantes genéticos (mutaciones) que permiten a estos virus replicarse en presencia de fármaco dentro de la proteína de cápsula (gp41-TM). Para demostrar que el ensayo de la presente invención es capaz de medir cambios en la susceptibilidad a fármaco (es decir, resistencia), (a) se generan vectores pHIVenv que portan estos genes de cápsula mutantes, (b) primero se co-transfectan células usando estos vectores y el vector pHIVlucΔU3, (c) se recolectan los virus que portan estas proteínas de cápsula mutantes, y (d) se evalúan los virus para determinar la capacidad de infección en presencia de T20. Se evalúa la susceptibilidad a fármaco reducida a T20 comparando la IC<sub>50</sub> de virus que portan las proteínas de cápsula mutantes con aquellos que carecen de las mutaciones de resistencia a fármaco definidas. Los virus que portan proteínas de cápsula de virus con mutaciones de resistencia a fármaco pueden exhibir valores de IC<sub>50</sub> superiores a los virus que portan proteínas de cápsula que carecen de mutaciones de resistencia a fármaco, es decir la inhibición puede requerir una mayor concentración de fármaco. Las mutaciones de resistencia a fármaco se pueden introducir en vectores de expresión de cápsula (pHIVenv) usando técnicas de mutagénesis dirigida a sitio estandarizadas según los protocolos estándares (Petropoulos y col., 2000; Ziermann y col., 2000).

Es ampliamente aceptado que las vacunas efectivas que protegen contra la infección de VIH-1 deberían provocar una fuerte respuesta inmune humoral que se caracteriza por anticuerpos neutralizantes ampliamente reactivos. Consecuentemente, el suero de individuos vacunados se evalúa rutinariamente para determinar la presencia de elevados títulos de anticuerpos neutralizantes contra el inmunógeno. Más recientemente, usando el modelo de macaco de virus quimérico (SHIV) de virus de inmunodeficiencia de VIH-1/simio, Mascola y col. han demostrado que la transferencia pasiva de dichos anticuerpos neutralizantes condujo a un descenso de la carga vírica después de exposición mucosal (Mascola y col., 2000). El ensayo de la presente invención se puede usar para determinar rápida y fiablemente la actividad neutralizante vírica de los anticuerpos generados en respuesta a vacunas dirigidas con antígenos de cápsula, tales como antígenos de cápsula de VIH-1. Por ejemplo, el ensayo de la presente invención puede (a) generar vectores pHIVenv que expresan una variedad de proteínas de cápsula bien caracterizadas, (b) co-transfectar una primera célula usando estos vectores y el vector pHIVlucΔU3, (c) recolectar virus e incubar con diluciones en serie de preparaciones de anticuerpos o suero de vacuna, (d) evaluar dichos virus para determinar la capacidad de infección en una segunda célula. El análisis de datos y las determinaciones de IC<sub>50</sub> se pueden llevar a cabo como se ha descrito previamente y en la bibliografía. En el caso del VIH-1, los virus pueden seleccionarse para representar diferentes historiales genéticos de VIH-1 (por ejemplo, clade A, B, C, D, E, F), diferentes tropismos de célula y de co-receptor (inductor de sincitio y de no sincitio, crecimiento adaptado en laboratorio o elemento aislado primario) (Tabla 2). Puede ser beneficioso preparar reservas de un título definido de cada virus para optimizar la sensibilidad y la reproducibilidad del ensayo usando una entrada de virus de aproximadamente 20-100 TCID<sub>50</sub>/pocillo y haciendo ajustes según fuera necesario. Las preparaciones de anticuerpos se pueden seleccionar en base a propiedades de neutralización documentadas previamente, tanto funcionales, como su capacidad para neutralizar elementos aislados primarios, como físicas, como su capacidad para unirse a epítopos específicos de gp120 o gp41 (Tabla 2). La realización del ensayo de la presente invención se puede juzgar contra la actividad de dichos reactivos de anticuerpos bien caracterizados en ensayos de neutralización de virus convencionales tal como se describe en la bibliografía científica. Se puede usar suero de un grupo ampliamente representativo de individuos infectados con VIH-1 para establecer un intervalo apropiado de diluciones de suero que puede maximizar la sensibilidad del ensayo, pero minimizando la citotoxicidad. La citotoxicidad se puede evaluar usando ensayos de viabilidad o citotoxicidad estándares (por ejemplo, exclusión de colorante, MTS, ATP).

#### **6.6. Métodos implementados por ordenador y composiciones para determinar si un virus es resistente a un inhibidor de entrada.**

En otro aspecto, la presente invención proporciona métodos implementados por ordenador para determinar si un VIH es resistente a un inhibidor de entrada. En dichas realizaciones, los métodos de la invención son adaptados para tomar ventaja de la potencia de procesamiento de los ordenadores modernos. Un especialista en la técnica puede adaptar fácilmente los métodos de ese modo. Por tanto, en determinadas realizaciones, la invención proporciona un método implementado por ordenador para determinar si un VIH es resistente a un inhibidor de entrada que comprende introducir información fenotípica en un sistema de memoria de un ordenador, en donde la información fenotípica comprende puntos de datos que representan la capacidad del VIH para entrar en una célula en presencia de concentraciones variables del inhibidor de entrada de VIH; introducir una correlación entre la incapacidad del inhibidor de entrada de VIH para inhibir completamente la entrada por el VIH y la resistencia del VIH frente al inhibidor de entrada de VIH, y determinar si el VIH es resistente al inhibidor de entrada.

5 En determinadas realizaciones, el método implementado por ordenador para determinar si un VIH es resistente a un inhibidor de entrada comprende introducir información fenotípica en un sistema de memoria de un ordenador, en donde la información fenotípica comprende la curva log-sigmoidea de inhibición que comprende puntos de datos que miden la entrada del VIH en una célula en presencia de concentraciones variables del inhibidor de entrada de VIH; introducir una curva log-sigmoidea de inhibición para un VIH de referencia; y comparar la curva log-sigmoidea de la etapa (a) con la curva log-sigmoidea del VIH de referencia, determinando con ello si el VIH es resistente al inhibidor de entrada. En determinadas realizaciones, un descenso del porcentaje de inhibición máximo observado para el VIH con respecto al observado para el VIH de referencia indica que el VIH es resistente al inhibidor de entrada de VIH.

10 En otros aspectos, la invención proporciona un método implementado por ordenador para determinar si una población de VIH es resistente a un inhibidor de entrada que comprende introducir información fenotípica en un sistema de memoria de un ordenador, en donde la información fenotípica comprende puntos de datos que representan la capacidad de la población de VIH para entrar en una célula en presencia de concentraciones variables del inhibidor de entrada de VIH; introducir una correlación entre la incapacidad del inhibidor de entrada de VIH para inhibir completamente la entrada de la población de VIH y la resistencia de la población de VIH al inhibidor de entrada de VIH, y determinar si la población de VIH es resistente al inhibidor de entrada.

15 En determinadas realizaciones, el método implementado por ordenador para determinar si una población de VIH es resistente a un inhibidor de entrada comprende introducir información fenotípica en un sistema de memoria de un ordenador, en donde la información fenotípica comprende una curva de inhibición log-sigmoidea que comprende puntos de datos que miden la entrada de la población del VIH en una célula en presencia de concentraciones variables del inhibidor de entrada de VIH; introducir una curva log-sigmoidea de inhibición correspondiente a una población de VIH de referencia; y comparar la curva log-sigmoidea de la etapa (a) con la curva log-sigmoidea de la población de VIH de referencia, determinando con ello si la población de VIH es resistente al inhibidor de entrada. En determinadas realizaciones, un descenso en el porcentaje máximo de inhibición observado para la población de VIH respecto al observado para la población de VIH de referencia indica que la población de VIH es resistente al inhibidor de entrada de VIH.

20 En determinadas realizaciones, los métodos comprenden además mostrar si el VIH es resistente a un inhibidor de entrada en una pantalla del ordenador. En determinadas realizaciones, los métodos comprenden además imprimir si el VIH es resistente a un inhibidor de entrada.

25 En otro aspecto, la invención proporciona un medio tangible que indica si un VIH es resistente a un inhibidor de entrada producido de acuerdo a un método de la invención. En determinadas realizaciones, el medio tangible es un documento en papel. En determinadas realizaciones, el medio tangible es un medio que se puede leer en un ordenador. En determinadas realizaciones, el documento en papel es un documento impreso, por ejemplo, una impresión de ordenador. En otro aspecto adicional, la invención proporciona un medio que se puede leer en un ordenador que comprende datos que indican si un VIH es resistente a un inhibidor de entrada producido de acuerdo a un método de la invención.

30 En otro aspecto adicional, la invención proporciona un medio que se puede leer en un ordenador que comprende datos que indican si un VIH es resistente a un inhibidor de entrada producido de acuerdo a un método de la invención. En determinadas realizaciones, el medio que se puede leer en un ordenador es una memoria de acceso aleatorio (RAM). En determinadas realizaciones, el medio que se puede leer en un ordenador es un disco duro. En determinadas realizaciones, el medio que se puede leer en un ordenador es un disquete. En determinadas realizaciones, el medio que se puede leer en un ordenador es un dispositivo de memoria portátil, tal como, por ejemplo una llave USB o un iPod™.

35 En otro aspecto adicional, la invención proporciona un artículo de fabricación que comprende instrucciones que se pueden leer en un ordenador para llevar a cabo un método de la invención. En determinadas realizaciones, el artículo de fabricación es una memoria de acceso aleatorio. En determinadas realizaciones, el artículo de fabricación es un disco duro. En determinadas realizaciones, el artículo de fabricación es un disquete. En determinadas realizaciones, el artículo de fabricación es un dispositivo de memoria portátil, tal como, por ejemplo, una llave USB o un iPod™.

40 En otro aspecto adicional, la invención proporciona un medio que se puede leer en un ordenador que comprende datos que indican si un VIH es resistente a un inhibidor de entrada e instrucciones que se pueden leer en un ordenador para llevar a cabo un método de la invención. En determinadas realizaciones, el medio que se puede leer en un ordenador es una memoria de acceso aleatorio (RAM). En determinadas realizaciones, el medio que se puede leer en un ordenador es un disco duro. En determinadas realizaciones, el medio que se puede leer en un ordenador es un disquete. En determinadas realizaciones, el medio que se puede leer en un ordenador es un dispositivo de memoria portátil, tal como, por ejemplo, una llave USB o un iPod™.

45 En otro aspecto adicional, la invención proporciona un ordenador que se configura para llevar a cabo un método de la invención.

## 7. Ejemplos

Los siguientes ejemplos se presentan para ilustrar más detalladamente y para explicar la presente invención y no deberían considerarse como limitantes en aspecto alguno. Algunos de estos experimentos también se han descrito en la Solicitud de patente de EE.UU. N° 09/874.475 y 10/077.027 (Números de publicación internacional US7247439 y WO3070985).

### 7.1. Ejemplo 1: medición de la susceptibilidad a fármaco fenotípica frente a inhibidores de entrada de VIH-1.

Este ejemplo proporciona los medios y el método para medir con precisión y reproducibilidad la susceptibilidad frente a inhibidores de unión y entrada (referidos a partir de este punto de forma colectiva "entrada") de VIH-1. En base a este ejemplo, los medios y el método para medir la susceptibilidad frente a inhibidores de entrada de VIH-1 se puede adaptar a otros virus, que incluyen, aunque sin limitación, otros lentivirus (por ejemplo el VIH-2), otros retrovirus (por ejemplo HTLV-1 y 2), hepadnavirus (virus de la hepatitis B humana), flavivirus (virus de la hepatitis C humana) y herpesvirus (citomegalovirus humano). Este ejemplo proporciona además los medios y un método para medir alteraciones (incrementos o descensos) de la susceptibilidad frente a inhibidores de entrada.

Las medidas de susceptibilidad a inhibidor de entrada se llevan a cabo usando adaptaciones de los medios y métodos para la susceptibilidad fenotípica a fármacos y los ensayos de resistencia descritos en la Patente de EE.UU. n° 5.837.464 (Número de publicación internacional WO 97/27319).

Se diseña un vector, un ejemplo del vector de expresión de cápsula (pHIVenv), para expresar la poliproteína de cápsula (gp160) codificada por secuencias de cápsula de VIH derivado de sujeto (Figura 1). A continuación la gp160 se divide mediante proteasa celular para generar las subunidades de superficie (gp120SU) y transmembrana (gp41TM) que comprenden la proteína de cápsula sobre la superficie de partículas víricas de VIH-1. Se diseña un segundo vector, un ejemplo del vector de expresión vírico (pHIVluc o pHIVlucΔU3) para expresar ARNs víricos genómicos o subgenómicos y todas las proteínas de VIH excepto la poliproteína de cápsula (Figuras 1A-1B).

En esta solicitud, el(los) segmento(s) derivado(s) de paciente corresponde(n) a la región codificadora (~2.600 nucleótidos) de la poliproteína de cápsula de VIH-1 (gp160) y representan (a) secuencias de cápsula amplificadas mediante el método de reacción en cadena de polimerasa de transcripción inversa (RT-PCR) usando ARN vírico aislado del virus derivado de individuos infectados con VIH, o (b) secuencias de cápsula derivadas de clones moleculares de individuos infectados con VIH-1, o (c) secuencias de cápsula derivadas de clones moleculares de VIH-1 que contienen mutaciones específicas introducidas mediante mutagénesis dirigida a sitio de un clon molecular parental (típicamente NL4-3).

El aislamiento de ARN vírico se llevó a cabo usando procedimientos estándares (por ejemplo, RNAagents Total RNA Isolation System, Promega, Madison WI ó RNAzol, Tel-Test, Friendswood, TX). El protocolo RT-PCR se dividió en dos etapas. Se usó una transcriptasa inversa retroviral [por ejemplo, Superscript II (Invitrogen, Life Technologies) transcriptasa inversa Moloney MuLV (Roche Molecular Systems, Inc., Branchburg, NJ), o transcriptasa inversa de virus de mieloblastosis aviar (AMV), (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN)] para copiar ARN vírico en ADNc de primera cadena. A continuación el ADNc se amplificó hasta un número de copias elevado usando una polimerasa de ADN termoestable [por ejemplo, Taq (Roche Molecular Systems, Inc., Branchburg, NJ), Tth (Roche Molecular Systems, Inc., Branchburg, NJ), PrimeZyme (aislado de *Thermus brockianus*, Biometra, Göttingen, Alemania)] o una combinación de polimerasa termoestables como se describe para la realización de "PCR larga" (Barnes, W.M., (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 2216-2220) [por ejemplo Expand High Fidelity PCR System (Taq + Pwo), (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN) OR GeneAmp XL PCR kit (Tth + Vent), (Roche Molecular Systems, Inc., Branchburg, NJ), Advantage-2 (CloneTech).

Se usó oligo-dT para transcripción inversa de ARN vírico en ADNc de primera cadena. Los cebadores de PCR de cápsula, el cebador directo Xho/Pin y el cebador inverso Mlu/Xba (Tabla 3) se usaron para amplificar los segmentos derivados de paciente. Dichos cebadores se diseñan para amplificar el gen de cápsula de ~2.600 nucleótidos que codifica la poliproteína de cápsula gp160, a la vez que introduce sitios de reconocimiento Xho I y Pin AI en el extremo 5' del producto de amplificación PCR, y sitios Mlu y Xba I en el extremo 3' del producto de amplificación PCR.

Se insertaron segmentos derivados de sujeto (producto de amplificación de secuencia de cápsula de 2,5 kB) en vectores de expresión de cápsula de VIH-1 usando métodos de digestión de endonucleasa de restricción, ligación de ADN y transformación bacteriana descritos en la Patente de EE.UU. número 5.837.464 (Número de publicación internacional WO 97/27319), con adaptaciones menores. El producto de amplificación de ~2.600 nucleótidos fue digerido con Xho I ó Pin AI en el extremo 5' y Mlu I ó Xba I en el extremo 3'. Los productos de digestión resultantes fueron ligados, usando ligasa de ADN, en los sitios 5' Xho I/Pin AI y 3' Mlu I/Xba I de vectores de expresión pCXAS o pCXAT modificados. La construcción de los vectores de pCXAS y pCXAT se ha descrito en la Patente de EE.UU. n° 5.837.464 (Número de publicación internacional WO 97/27319)). Los vectores pCXAS y pCXAT modificados contienen un sitio de restricción Pin AI además de los sitios de restricción Xho I, Mlu I y Xba I que existen en pCXAS y pCXAT. El sitio Pin AI fue introducido entre los sitios Xho I y Mlu I mediante mutagénesis dirigida a sitio, de tal

modo que los cuatro sitios están localizados 5' a 3' en el siguiente orden; Xho I, Pin AI, Mlu I y Xba I. En una realización preferida, los productos de amplificación de ~2.600 nucleótidos fueron dirigidos con Pin AI y Mlu I y ligados en el sitio 5' Pin AI y el sitio 3' Mlu I del vector de expresión pCXAS modificado. Se usaron los productos de reacción de ligación para transformar *E. coli*. Después de un periodo de incubación de 24-36 h a 30-37°C, ADN de plásmido de vector de expresión fue purificado a partir de cultivos de *E. coli*. Para asegurar que las preparaciones de vector de expresión representan de forma adecuada las cuasi-especies de VIH presentes en el suero de un sujeto dado, se reunieron muchos transformantes de *E. coli* independientes (>100) y se usaron para las preparaciones de ADN de plásmido de pHIVenv. Los vectores que se preparan de este modo para los propósitos de expresar virus de sujeto derivado de proteínas de cápsula son denominados de forma colectiva pHIVenv (Figuras 1 y 3).

Los vectores de expresión de VIH genómicos pHIVluc y pHIVlucΔU3 se diseñan para transcribir ARN genómico de VIH y ARNs subgenómicos y para expresar todas las proteínas de VIH excepto la poliproteína de cápsula (Figura 1B). En estos vectores, una porción del gen de cápsula ha sido eliminada para acomodar una casete de gen indicador funcional, en este caso, "Luciferasa de Luciérnaga" que se usa para monitorizar la capacidad del virus para replicarse en presencia o en ausencia de fármacos antivirales. En el pHIVlucΔU3, una porción de la región 3' U3 ha sido eliminada para prevenir la transcripción de ARNs víricos de la 5' LTR de células infectadas.

Los ensayos de susceptibilidad para inhibidores de entrada de VIH-1 se llevaron a cabo usando células hospedantes empaquetadas que consisten en la línea celular de riñón embrionario humano 293 (Cell Culture Facility, UC San Francisco, SF, CA) y células hospedantes diana que consisten en la línea celular de osteosarcoma humano (HOS) que expresan CD4 (HT4) más CCR5, y CXCR4, o líneas celulares de astrocitoma (U-87) que expresan CD4 y CCR5 o CD4 y CXCR4.

Los ensayos de susceptibilidad a fármaco se llevaron a cabo usando pHIVenv y pHIVluc o pHIVlucΔU3. Se produjeron partículas de VIH que contienen proteínas de cápsula codificadas por el segmento derivado del sujeto mediante la transfección de una célula hospedante empaquetada (HEK 293) con ADN vector de test de resistencia. Se recolectaron partículas víricas aproximadamente 48 h después de la transfección y se usaron para infectar células diana (HT4/CCR5/CXCR4, o U-87/CD4/CXCR4, o U-87/CD4/CCR5) que expresan el receptor de VIH (es decir, CD4) y co-receptores (es decir, CXCR4, CCR5). Tras la infección (~72 h) las células diana son lisadas y se mide la actividad de luciferasa. El VIH debe completar una ronda de replicación para infectar con éxito la célula hospedante diana y producir actividad de luciferasa. La cantidad de actividad de luciferasa detectada en las células infectadas se usa como medida directa de la "intensidad" (Figura 1 y 2). Si por cualquier razón (por ejemplo, carencia del receptor o co-receptor apropiado, actividad inhibidora de fármaco, unión a anticuerpo neutralizante), el virus es incapaz de entrar en la célula diana, la actividad de luciferasa disminuye. La susceptibilidad a fármaco se determina comparando la capacidad de infección en ausencia de fármaco con la capacidad de infección en presencia del fármaco. La susceptibilidad relativa a fármaco se puede cuantificar comparando la susceptibilidad al virus de "ensayo" con la susceptibilidad de un virus de referencia bien caracterizado (natural) derivado de un clon molecular de VIH-1, por ejemplo NL4-3 o HXB2.

Se sembraron células hospedantes empaquetadas en platos de 10 cm de diámetro y se transfectaron un día después de ser llevadas a placa con pHIVenv y pHIVluc o pHIVlucΔU3. Las transfecciones se llevaron a cabo usando un procedimiento de co-precipitación de calcio-fosfato. El medio de cultivo celular que contiene el precipitado de ADN se reemplazó con medio fresco, entre una y 24 horas, tras la transfección. El medio de cultivo celular que contiene partículas víricas se recolectó típicamente 2 días después de la transfección y se hizo pasar a través de un filtro de 0,45 mm. Antes de la infección, las células diana fueron llevadas a placa en medio de cultivo celular. Los fármacos inhibidores de entrada se añaden típicamente a las células diana en el momento de la infección (un día antes de la infección en alguna ocasión). Típicamente, 3 días después de la infección se evalúa la actividad de luciferasa de las células diana usando el reactivo Steady-Glo (Promega) y un luminómetro.

**7.2. Ejemplo 2: identificación de sustituciones/mutaciones de aminoácidos de cápsula que alteran la susceptibilidad a inhibidores de entrada de virus.**

Este ejemplo proporciona los medios y el método para identificar mutaciones en la cápsula de VIH-1 que confieren una susceptibilidad reducida/resistencia a inhibidores de entrada de virus. Este ejemplo también proporciona los medios y el método para cuantificar el grado de susceptibilidad reducida a inhibidores de entrada conferida por mutaciones de cápsula específicas.

Las secuencias de cápsula derivadas de muestras del sujeto, o de clones individuales derivados de muestras del sujeto, o de secuencias de cápsula modificadas mediante mutagénesis dirigida a sitio para contener mutaciones específicas, son evaluadas en el ensayo de entrada para cuantificar la susceptibilidad a fármaco en base en un estándar de referencia bien caracterizado (por ejemplo, NL4-3, HXB2).

En una realización, se evalúa la susceptibilidad a muestras de sujeto longitudinal (virus recolectados del mismo sujeto a diferentes tiempos). Por ejemplo, la susceptibilidad a inhibidores de entrada se mide antes de iniciar la terapia, antes o después de cambios en el tratamiento con fármacos, o antes o después de cambios en marcadores virológicos (número de copia de ARN), inmunológicos (recuento de células T CD4<sup>+</sup>) o clínicos (infección oportunista) de progresión de la enfermedad.

7.2.1. Análisis genotípico de muestras de VIH del sujeto:

Secuencias de cápsula que representan los grupos de muestras del sujeto, o clones derivados de los grupos del sujeto, pueden analizarse mediante cualquier método de secuenciamiento de ADN disponible ampliamente. En una realización de la invención, las secuencias de muestra de VIH de sujeto se determinan usando purificación de ARN vírico, RT/PCR y química de secuenciamiento de terminador de cadena de didesoxinucleótido y electroforesis de gel capilar (Applied Biosystems, Foster City, CA). Las secuencias de cápsula de los grupos de virus de sujeto o de los clones se comparan con secuencias de referencia, otras muestras de sujeto, o con una muestra obtenida del mismo sujeto antes del inicio de la terapia, si está disponible. Se examina el genotipo para determinar secuencias que son diferentes de la secuencia de referencia o de pre-tratamiento y se correlacionan con diferencias en la susceptibilidad a inhibidor de entrada.

7.2.2. Susceptibilidad a inhibidor de entrada de mutantes dirigidos a sitio:

Los cambios genotípicos que se correlacionan con cambios en la aptitud se evalúan construyendo vectores de expresión de cápsula (pHIVenv) que contienen la mutación específica sobre un fondo genético definido susceptible a fármaco (por ejemplo, la cepa de referencia NL4-3). Las mutaciones se pueden incorporar solas y/o en combinación con otras mutaciones que se cree que modulan la susceptibilidad a inhibidor de entrada. Las mutaciones de cápsula se introducen en vectores pHIVenv usando cualquiera de una serie de métodos ampliamente disponibles para la mutagénesis dirigida a sitio. En determinadas realizaciones se usa el método PCR de mega-cebador para la mutagénesis dirigida a sitio (Sarkar, G. y Summer, S.S., 1990). Se evalúa un vector pHIVenv que contiene una mutación o grupo de mutaciones específicas de cápsula usando el ensayo de entrada de virus descrito en el Ejemplo 1. La susceptibilidad a fármaco del virus que contiene mutaciones de cápsula se compara con la susceptibilidad a fármaco de un virus susceptible a fármaco definido genéticamente que carece de mutaciones específicas en evaluación. Los cambios observados en la susceptibilidad a inhibidor de entrada se atribuyen a las mutaciones específicas introducidas en el vector pHIVenv.

**7.3. Ejemplo 3: medición de la susceptibilidad a inhibidores de entrada de virus para guiar decisiones de tratamiento.**

Este ejemplo proporciona los medios y un método para usar la susceptibilidad a inhibidor de entrada de virus para guiar el tratamiento de VIH-1. Este ejemplo proporciona además los medios y un método para usar la susceptibilidad a entrada de virus para guiar el tratamiento de sujetos que han recibido un tratamiento antirretroviral previo con un inhibidor de entrada de virus. Esta invención proporciona además los medios y el método para usar la susceptibilidad a inhibidor de entrada de virus para guiar el tratamiento de sujetos que no han recibido un tratamiento previo con un inhibidor de entrada de virus.

En una realización, la susceptibilidad de los virus del sujeto a inhibidores de entrada de virus se usa como guía para el tratamiento de sujetos en los que han fallado regímenes antirretrovirales que incluyen uno o más inhibidores de entrada de virus. El fallo en el tratamiento (también denominado fallo virológico) se define generalmente como un tratamiento antiviral parcialmente supresivo que da como resultado niveles detectables de virus, que normalmente se mide en el plasma del sujeto). La guía puede incluir, aunque sin limitación, (a) aclaración de las opciones de tratamiento con fármacos disponibles, (b) selección de regímenes de tratamiento más activos, (c) aclaración de la etiología de aumentar la carga vírica en sujetos tratados (es decir, adherencia pobre, resistencia a fármaco), y (d) reducción del uso de fármacos inactivos y potencialmente tóxicos. En esta realización, los vectores del ensayo de resistencia se derivan de muestras de virus de un sujeto y se evalúan para determinar la susceptibilidad a diversos inhibidores de entrada de virus usando el ensayo de entrada de virus fenotípico. Los inhibidores de entrada de virus pueden incluir, aunque sin limitación, inhibidores de fusión (por ejemplo, T-20, T-1249), antagonistas de co-receptores (AMD3100, AMD8664, TAK779, PR0542 y compuestos de peperidin-lil butano) y antagonistas de CD4 (MAb 5A8). Las decisiones apropiadas se basan en los resultados del ensayo de entrada de virus (véase, por ejemplo, la Figura 4B) y en los resultados de ensayos de laboratorio relevantes adicionales y en información clínica.

En otra realización, la susceptibilidad de los virus del sujeto a inhibidores de entrada de virus se usa para guiar el tratamiento de sujetos que no han sido tratados previamente con regímenes antirretrovirales que incluyen uno o más inhibidores de entrada de virus. La guía puede incluir, aunque sin limitación, (a) aclaración de las opciones de tratamiento con fármacos disponibles, (b) selección de regímenes de tratamiento más activos, (c) aclaración de la susceptibilidad de línea base a inhibidores de entrada de virus, y (d) reducción en el uso de fármacos inactivos y potencialmente tóxicos. La determinación de la susceptibilidad de línea base de los inhibidores de entrada de virus en el tratamiento de sujetos nuevos es importante por dos razones. En primer lugar, la susceptibilidad natural de virus a inhibidores de entrada puede variar ampliamente (véase, por ejemplo, la Figura 4A). En segundo lugar, el aumento del uso de inhibidores de entrada de virus sin duda dará como resultado la generación de variantes resistentes a fármaco que pueden transmitirse a nuevos individuos infectados. En esta realización, los vectores de ensayo de resistencia se derivan de muestras de virus de sujeto y se evalúan para determinar la susceptibilidad a diversos inhibidores de entrada de virus usando el ensayo de entrada de virus fenotípico. Los inhibidores de entrada de virus pueden incluir, aunque sin limitación, inhibidores de fusión (por ejemplo, T-20, T-1249), antagonistas de co-receptores (por ejemplo, AMD3100, AMD8664, TAK-355, PR0542, y compuestos de peperidin-lil butano) y antagonistas de CD4 (MAb 5A8). Las decisiones apropiadas se basan en los resultados del ensayo de entrada de

virus y en los resultados adicionales de ensayos de laboratorio relevantes y en información clínica.

#### 7.4. **Ejemplo 4: determinación de la resistencia a inhibidores de entrada de VIH.**

Este ejemplo proporciona los medios y métodos para determinar si un VIH particular o una población de VIH particular es resistente o susceptible a un inhibidor de entrada. Dichos medios y métodos son útiles, por ejemplo, para guiar decisiones terapéuticas en el tratamiento de sujetos infectados con VIH, tanto nuevos infectados como los que han fallado en otros tratamientos, y para el escrutinio de compuestos para identificar compuestos que afectarán a virus resistentes a otros inhibidores de entrada. Otros usos de dichos métodos serán evidentes para los especialistas en la técnica.

Los métodos generalmente se basan en la determinación fenotípica de la susceptibilidad a fármaco de un VIH o población de VIH usando, por ejemplo, los ensayos fenotípicos de susceptibilidad a fármaco presentados en el Ejemplo 1. Sin embargo, en principio se puede usar cualquier ensayo de susceptibilidad de este tipo conocido por el especialista en la técnica en los métodos para la determinación fenotípica de la susceptibilidad a fármaco. La susceptibilidad a fármaco se puede representar, por ejemplo, como el porcentaje de inhibición frente al  $\log_{10}$  de la concentración de fármaco y definirse en base a, por ejemplo, la  $IC_{50}$  y el porcentaje de inhibición a la mayor concentración de fármaco. Dicho porcentaje de inhibición observado a la mayor concentración de fármaco para un VIH de referencia, tal como, por ejemplo SF2, es el máximo porcentaje de inhibición (máx. % inhibición). En este ejemplo, se usó el ensayo fenotípico de susceptibilidad a fármaco del Ejemplo 1 para determinar una curva log-sigmoidea que muestra la resistencia de VIH mutante a SCH-C, TNX-355, T-20 y AMD-3100.

La resistencia a determinados de estos inhibidores de entrada se manifiesta con una cinética competitiva, es decir, los inhibidores compiten con proteínas víricas por el acceso a componentes víricos o celulares que median en la entrada de virus. Dichos inhibidores de entrada incluyen, aunque sin limitación, T-20 y AMD-3100, discutidos anteriormente. Los virus que son resistentes a dichos inhibidores de entrada exhiben un aumento de la  $IC_{50}$  respecto a los virus susceptibles. Véase la Figura 5, que demuestra que el VIH resistente a T-20 y a AMD-3100 exhibe un aumento de la  $IC_{50}$  para la inhibición de la entrada por acción de estos compuestos respecto a un virus de referencia sensible, y la Figura 7, en la que dicho aumento de  $IC_{50}$  respecto a virus sensibles se puede observar en poblaciones mixtas de virus.

La resistencia a determinados de estos inhibidores de entrada se manifiesta con cinéticas no competitivas, es decir, los inhibidores no compiten directamente con proteínas víricas por el acceso a componentes víricos o celulares que median en la entrada, sino que en su lugar alteran la conformación del componente celular y/o proteína vírica de un modo que destruye la interacción entre dichas proteínas y componentes. Dichos inhibidores de entrada incluyen, aunque sin limitación, UK-427857, SCH-C, SCH-D y TNX-355. Los virus que son resistentes a dichos inhibidores de entrada no competitivos exhiben porcentajes de inhibición máxima reducidos respecto a los virus susceptibles. Véase la Figura 6, que demuestra que los virus resistentes a SCH-C y TNX-355 exhiben porcentajes de inhibición máxima reducidos con respecto a virus sensibles, la Figura 8, que demuestra que los virus resistentes a UK-427.857 exhiben porcentajes de inhibición máxima reducidos con respecto a virus sensibles, y la Figura 7, que demuestra que dichos porcentajes de inhibición máxima reducidos respecto a los virus sensibles pueden observarse en poblaciones de virus mixtas. Dichos virus resistentes a inhibidores de entrada no competitivos también pueden detectarse debido a que dichos virus no pueden ser inhibidos completamente con elevadas concentraciones del inhibidor. Es decir, no importa cuánto inhibidor se añada a la mezcla de ensayo, se podría detectar la entrada de partículas víricas que expresan las proteínas de cápsula resistentes.

Finalmente, las reducciones en el porcentaje de inhibición máxima observadas para los virus resistentes fueron reproducibles. La Figura 9 muestra el porcentaje de inhibición máxima determinado como se ha descrito anteriormente correspondiente a elementos aislados víricos particulares repetido 9 veces. Como se muestra en la Figura 9, el porcentaje de inhibición máxima observado para un elemento aislado particular se reproduce bien, lo que indica que los ensayos para la determinación del porcentaje máximo de inhibición son reproducibles.

#### 8. Referencias

Adachi, A., H. E. Gendelman, S. Koenig, T. Folks, R. Caney, A. Rabson y M. A. Martin. 1986. Production of Acquired Immunodeficiency Syndrome-associated Retrovirus in Human and Nonhuman Cells Transfected with an Infectious Molecular Clone. *J. Virol.* 59: 284-291.

Alkhatib, G., C. Comadiere, C.C. Broder, Y.Feng, P.E. Kennedy, P.M. Murphy y E.A. Berger. 1996. CC CKR5: A Rantes, MIP-1 alpha, MIP-1 Beta Receptor as a Fusion Cofactor for Macrophage-tropic HIV-1. *Science* 272: 1955-8.

Allaway G.P., Ryder A.M., Beaudry G.A. y Maddon P.J. 1993. Synergistic Inhibition of HIV-1 Envelope-Mediated Cell Fusion by CD4-based Molecules in Combination with Antibodies to Gp120 or Gp41. *Aids Res. Hum. Retroviruses* 9: 581-7.

Baba, M., O. Nishimura, N. Kanzaki, M. Okamoto, H. Sawada, Y. Iizawa, M. Shiraishi, Y. Aramaki, K. Okonogi, Y. Ogawa, K. Meguro y M. Fijino. 1999. A Small-molecule, Nonpeptide CCR5 Antagonist with Highly Potent and Selective Anti-hiv-1 Activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 5698-703.

- Baxter, J., D. Mayers, D. Wentworth, J. Neaton y T. Merigan. 1999. A Pilot Study of the Short-term Effects of Antiretroviral Management Based on Plasma Genotypic Antiretroviral Resistance Testing (Gart) in Subjects Failing Antiretroviral Therapy. Presentado en 6<sup>th</sup> Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. Chicago, IL.
- 5 Bernard P., Kezdy K.e., Van Melderen L., Steyaert J., Wyns L., Pato M.L., Higgins P.N. y Couturier M. 1993. The F Plasmid CcdB protein Induces Efficient ATP-dependent Dna Cleavage by Gyrase. J. Mol. Biol. 23: 534-41.
- Bernard P. y Couturier, M. 1992. Cell Killing by the F Plasmid Ccdb protein Involves Poisoning of DNA topoisomerase II Complexes. J. Mol. Biol. 226: 735-45.
- Bleul, C.C., M. Farzan, H. Choe, C. Parolin, I. Clark-Lewis, J. Sodroski y T.A. Springer. 1996. The Lymphocyte Chemoattractant Sdf-1 Is a Ligand for Lestr/fusin and Blocks Hiv-1 Entry. Nature 382: 829-33.
- 10 Bridger G.J., Skerlj R.T., Padmanabhan S., Martellucci S.A., Henson G.W., Struyf S., Witvrouw M., Schols D. y De Clercq E. 1999. Synthesis and Structure-activity Relationships of Phenylenebis(methylene)-linked Bis-azamacrocycles That Inhibit HIV-1 and HIV-2 Replication by Antagonism of the Chemokine Receptor CXCR4. J. Med. Chem. 42: 3971-81.
- 15 Carpenter, C.J., Cooper D.A., Fischl, M.A., Gatell J.M., Gazzard B.G., Hammer S.M., Hirsh M.S., Jacobsen D.M., Katzenstein D.A., Montaner J.S., Richman D., Saag M.S., Schechter M., Schooley R.T., Thompson M.A., Vello S., Yeni P.G. y Volberding P.A. 2000. Antiretroviral Therapy in Adults. JAMA 283: 381-89.
- CDC (Center for Disease Control and Prevention). HIV/AIDS Surveillance Report, 1999; 11 (nº 1).
- Coffin, J.M. 1995. HIV Population Dynamics in Vivo: Implications for Genetic Variation, Pathogenesis and Therapy. Science 267: 483-489.
- 20 DHHS (Department of Health and Human Services). Henry Kaiser Family Foundation: Guidelines for the Use of Antiretroviral Agents in HIV-infected Adults and Adolescents. (28 de enero de 2000).
- Gerdes, K., L.K. Poulsen, T. Thisted, A.K. Nielson, J. Martinussen y P.H. Andreasen. 1990. The Hok Killer Gene Family in Gram-negative Bacteria. The New Biologist: 2: 946-956.
- 25 Hertogs, K., M.P. De Béthune, V. Miller, T. Ivens, P. Schel, A. V. Cauwenberge, C. Van Den Eynde, V. Van Gerwen, H. Azijn, M. Van Houtte, F. Peeters, S. Staszewski, M. Conant, S. Bloor, S. Kemp., B. Larder y R. Pauwels. 1998. 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 Subjects Treated with Antiretroviral Drugs. Antimicrob. Agents. Chemother. 42: 269-276.
- 30 Hwang, J.-j., L. Li, W.f. Anderson. 1997. A Conditional Self-inactivating Retrovirus Vector That Uses a Tetracycline-responsive Expression System. J. Virol. 71: 7128-7131.
- Japour, A. J., D. L. Mayers, V. A. Johnson, D. R. Kuritzkes, L. A. Beckett, J. M. Arduino, J. Lane, B. R.J., P.S. Reichelderfer, R. T. D-aquila, C. S. Crumpacker, T.R.-S. Group, T.A.C.T. Group y V. C.R.W. Group. 1993. Standardized Peripheral Blood Mononuclear Cell Culture Assay for Determination of Drug Susceptibilities of Clinical Human Immunodeficiency Virus Type 1 Isolates. Antimicrob. Agents Chemother. 37: 1095-1101.
- 35 Judice J.K., Tom J.Y., Huang W., Wrin T., Vennari J., Petropoulos C.J. y Mcdowell R.S. 1997. Inhibition HIV Type 1 Infectivity by Constrained Alpha-helical Peptides: Implications for the Viral Fusion Mechanism. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 13426-30.
- 40 Kilby J.M., Hopkins S., Venetta Tm, Dimassimo B., Cloud Ga, Lee Jy, Alldrdge L, Hunter E., Lambert D., Bolognesi D., Matthews T., Johnson Mr. Nowak Ma, Shaw Gm y Saag Ms. 1998. Potent Suppression of HIV-1 Replication in Humans by T-20, a Peptide Inhibitor of Gp41-mediated Virus Entry. Nat Med. 4: 1302-7.
- Mascola, J.R., G. Stiegler, T.C. Vancott, H. Katinger, C.B. Carpenter, C.E. Hanson, H. Beary, D. Hayes, S.S. Frankel, D.L. Birx y M.G. Lewis. 2000. Protection of Macaques Against Vaginal Transmission of a Pathogenic HIV-1/siv Chimeric Virus by Passive Infusion of Neutralizing Antibodies. Nature Med. 6: 207-210.
- 45 Miyoshi, H., B. Ulrike, M. Takahashi, F.H. Gage e I.M. Verma. 1998. Development of a Self-inactivating Lentivirus Vector. J. Virol. 72: 8150-5157.
- Naviaux, R.K., E. Costanzi, M. Haas e I.M. Verma. 1996. The Pcl Vector System: Rapid production of Helper-free, High-titer, Recombinant Retroviruses. J. Virol. 70: 5701-2705.
- Petropoulos, C.J., N.T. Parkin, K.L. Limoli, Y.S. Lie, T. Wrin, W. Huang, H. Tian, D. Smith, G.A. Winslow, D. Capon y J.M. Whitcomb. 2000. A Novel Phenotypic Drug Susceptibility Assay for HIV-1. Antimicrob. Agents & Chem. 44: 920-928.
- 50

Pharma (Pharmaceutical Research and Manufacturers of America). New Medicines in Development for Aids 1999.

- 5     Piketty, C., E. Race, P. Castiel, L. Belec, G. Peytavin, A. si-Mohamed, G. Gonzalez-Canali, L. Weiss, F. Clavel y M. Kazatchkine. 1999. Efficacy of a Five-drug Combination Including Ritonavir, Saquinavir and Efavirenz in Subjects Who Failed on a Conventional Triple-drug Regimen: Phenotypic Resistance to protease Inhibitors predicts Outcome of Therapy. Aids: 13: f71-f77.
- Porter, C.C., K.V. Lukacs, G. Box, Y. Takeuchi y M.K.L. Collins. 1998. Cationic Liposomes Enhance the Rate of Transduction by a Recombinant Retroviral Vector in Vitro and in Vivo. J. Virol. 72: 4832-4840.
- 10     Reimann K.A., Cate R.L., Wu Y., Palmer L., Olson D., Waite B.C., Letvin N.L. y Burkly L.C. 1995. In Vivo Administration of CD4-specific Monoclonal Antibody: Effect on provirus Load in Rhesus Monkeys Chronically Infected with the Simian Immunodeficiency Virus of Macaques. Aids Res. Hum. Retroviruses 11: 517-25.
- Retroviruses. Coffin, J., S. Hughes, H. Varmus (Eds). 1997. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Richman, D. 1998. Nailing down Another HIV Target. Nature Med. 4: 1232-1233.
- 15     Rimsky, L.T., D.C. Shugars y T.J. Matthews. 1998. Determinants of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Resistance to Gp41-derived Inhibitory Peptides. J. Virol. 72: 986-993.
- Rodriguez-Rosado, R., Briones, C. y Soriano, V. 1999. Introduction of HIV Drug-resistance Testing in Clinical Practice. Aids 13: 1007-1014.
- Schinazi, R.F., Larder, B.A. y Mellors, J.W. 1999. Mutations in Retroviral Genes Associated with Drug Resistance. Intl. Antiviral News: 7: 46-49.
- 20     Shi C. y J.W. Mellors. 1997. A Recombinant Retroviral System for Rapid in Vivo Analysis of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Susceptibility to Reverse Transcriptase Inhibitors. Antimicrob. Agents Chemother. 41: 2781-2785.
- Schurmann D. y col. SCH D: antiviral activity of a CCR5 receptor antagonist. Eleventh Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, San Francisco, resumen 140LB, 2004.
- 25     Stephenson, J. 1999. New Class of Anti-HIV Drugs. Jama 282: 1994.
- Who, Unaid/ Organización Mundial de la Salud. Informe: Aids Epidemic Update: December 1999.
- Wild, C., T. Oak, C. Mcdanal, D. Bolognesi y T. Matthews. 1992. A Synthetic Peptide Inhibitor of HIV Replication: Correlation Between Solution Structure and Viral Inhibition. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 10537-10541.
- 30     Zennou, V., F. Mammamo, S. Paulous, D. Mathez y F. Clavel. 1998. Loss of Viral Fitness Associated with Multiple Gag and Gag-pol processing Defects in Human Immunodeficiency Virus Type 1 Variants Selected for Resistance to Protease Inhibitors in vivo. J. Virol. 72: 3300-06.
- Ziermann, R., K. Limoli, K. Das, E. Arnold, C.J. Petropoulos y N.T. Parkin. 2000. A Mutation in HIV-1 Protease, N88s, That Causes in Vitro Hypersensitivity to Amprenavir. J. Virol. 74: 4414-4419.

Tabla 1

Células	
Célula	Receptor
5.25	CXCR4, CD4, CCR5 (no expresado bien) BONZO
5.25.Luc4.M7	CD4, CCR5, BONZO
HOS.CD4.CCR5	CD4, CCR5
HOS.CD4.CXCR4	CD4, CXCR4
HOS.CD4	CD4, bajo nivel de expresión de CCR5 y CXCR4
HOS.HT4 R5 GFP wt	CD4, CXCR4, CCR5
HOS.CD4.CCR5.GFP.M7#6*	CD4, CXCR4, CCR5
P4.CCR5	CD4, CXCR4, CCR5
U87.CD4	CD4
U87.CD4 R5	CD4, CCR5
U87.CD4 X4	CD4, CXCR4
MT2	CD4, CXCR4
MT4	CD4, CXCR4
PM1	CD4, CXCR4, CCR5
CEM NKr CCR5	CD4, CXCR4, CCR5

Tabla 2

Virus y reactivos representativos		
Virus	Cápsula <sup>a</sup>	Fuente
89.6, SF2	R5-X4/SI/B	ARRRP <sup>b</sup>
92BR014, 92US076	R5-X4/SI/B	ARRRP
JR-CSF, 91US005	R5/NSI/B	ARRRP
91US054	SI/B	ARRRP
NL43, MN, ELI	X4/B	ARRRP
92HT599	X4	ARRRP
92UG031	R5/NSI/A	ARRRP (IN-HOUSE)
92TH014, 92TH026	R5/NSI/B	ARRRP (IN-HOUSE)
92BR025, 93MW959	R5/SI/C	ARRRP (IN-HOUSE)
92UG035	R5/NSI/D	ARRRP (IN-HOUSE)
92TH022, 92TH023	R5/NSI/E	ARRRP (IN-HOUSE)
93BR020	R5-X4/SI/F	ARRRP (IN-HOUSE)
Anticuerpos	Epítipo	FUENTE
Mabs 2F5, 1577	gp41 TM	ARRRP
Mabs IG1b12, 2G12, 17b, 48D	gp120 SU	ARRRP
Sueros de neutralización #2, HIV-1G	policlonal	ARRRP
Inhibidores de entrada	Diana	Fuente
CD4-IG	gp120 SU	Genentech
CD4-IGG2	gp120 SU	Adarc
SCD4	Sigma	Progenics
T20 (DP178)	gp41 TM	Trimeris
Rantes, MIPla/b	CCR5	SIGMA/ARRRP
SDF1a/b	CXCR4	SIGMA/ARRRP
AMD 3100	CXCR4	AnorMed
Dextrano sulfato, Heparina	No específico	Sigma
<sup>a</sup> R5 (co-receptor CCR5), X4 (co-receptor CXCR4) SI (inductor de sincitio), NSI (no inductor de sincitio), A, B, C, D, E, F (designación de clase de cápsula) <sup>b</sup> AIDS Research and Reference Reagent Program		

**Tabla 3**

Cebadores evaluados para la amplificación de cápsula de VIH	
<b>CEBADORES RT</b>	
Cebador 1	5'-GGA GCA TTT ACA AGC AGC AAC ACA GC-3'
Cebador 2	5'-TTC CAG TCA VAC CTC AGG TAC-3'
Cebador 3	5'-AGA CCA ATG ACT TAY AAG G-3'
<b>CEBADORES PRC 5'</b>	
Cebador 4	5'-GGG CTC GAG ACC GGT CAG TGG CAA TGA GAG TGA AG-3'
Cebador 5	5'-GGG CTC GAG ACC GGT GAG CAG AAG ACA GTG GCA ATG A-3'
Cebador 6	5'-GGG CTC GAG ACC GGT GAG CAG AAG ACA GTG GCA ATG-3'
<b>CEBADORES PRC 3'</b>	
Cebador 7	5'-GGG TCT AGA ACG CGT TGC CAC CCA TCT TAT AGC AA-3'
Cebador 8	5'-GGG TCT AGA ACG CGT CCA CTT GCC ACC CAT BTT ATA GC-3'
Cebador 9	5'-GGG TCT AGA ACG CGT CCA CTT GCC ACC CAT BTT A-3'
Cebador 10	5'-GAT GGT CTA AGA CGC TGT TCA ATA TCC CTG CTT AAC TC-3'

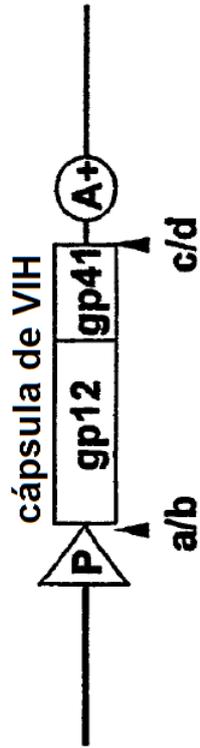
**REIVINDICACIONES**

- 1.- Un método para determinar si una población de VIH es resistente a un inhibidor de entrada de VIH, que comprende:
- 5 (a) generar una curva log-sigmoidea de inhibición que comprende puntos de datos que miden la entrada de la población de VIH en una célula en presencia de concentraciones variables del inhibidor de entrada de VIH que muestra un porcentaje de inhibición máxima para la población de VIH; y
- (b) comparar la curva de inhibición de la etapa (a) con una curva log-sigmoidea de inhibición correspondiente a una población de VIH de referencia,
- 10 en donde un descenso en el porcentaje de inhibición máxima observado para la población de VIH respecto al observado para la población de VIH de referencia indica que el inhibidor de entrada de VIH es un inhibidor de entrada no competitivo y que el VIH es resistente al inhibidor de entrada de VIH no competitivo.
- 2.- El método de la reivindicación 1, en el que el inhibidor de entrada se selecciona del grupo que consiste en SCH-C, SCH-D, UK-427857 y TNX-355.
- 15 3.- El método de la reivindicación 1, en el que la población de VIH de referencia es una población de HXB2, NL4-3 o SF2.
- 4.- El método de la reivindicación 1, en el que la población de VIH procede de un sujeto infectado con VIH.
- 5.- El método de la reivindicación 1, en el que los puntos de datos que miden la entrada de la población de VIH en la célula se determinan:
- 20 (a) poniendo en contacto una pluralidad de partículas víricas de VIH con la célula en presencia del inhibidor de entrada de VIH, en donde la célula expresa un receptor celular superficial al cual se unen las partículas víricas, y en donde cada una de la pluralidad de partículas víricas comprende: (i) un vector de expresión vírica que carece de un ácido nucleico que codifica una proteína de cápsula vírica, pero que comprende un ácido nucleico indicador que produce una señal detectable cuando se introduce en la célula, y (ii) una proteína de cápsula vírica codificada por un ácido nucleico de la población de VIH; y
- 25 (b) midiendo la cantidad de señal detectable producida por la célula.
- 6.- El método de la reivindicación 5, en el que cada una de la pluralidad de partículas víricas de VIH comprende la misma proteína de cápsula vírica.
- 7.- El método de la reivindicación 5, en el que la señal detectable es una señal fluorescente.
- 8.- El método de la reivindicación 5, en el que el ácido nucleico indicador codifica luciferasa.
- 30 9.- El método de la reivindicación 5, en el que la pluralidad de partículas víricas son producidas co-transfectando en una célula (i) una pluralidad de ácidos nucleicos que contienen cada uno una proteína de cápsula vírica de la población de VIH, y (ii) un vector de expresión vírico que carece de un ácido nucleico que codifica una proteína de cápsula, en donde el vector comprende un ácido nucleico indicador que produce una señal detectable.
- 10.-El método de la reivindicación 5, en el que el receptor celular superficial es CD4.
- 35 11.-El método de la reivindicación 5, en el que la célula también expresa un receptor de quimioquina.
- 12.-El método de la reivindicación 11, en el que el receptor de quimioquina es CXCR4 o CCR5.
- 13.-El método de la reivindicación 11, en el que la célula expresa CXCR4 y CCR5.
- 14.-El método de la reivindicación 5, en el que el ácido nucleico de VIH codifica gp120 o gp41.
- 40 15.-Un método para determinar si una población de VIH es resistente a un inhibidor de entrada de VIH, que comprende determinar una curva log-sigmoidea de inhibición que comprende puntos de datos para la entrada de la población de VIH en presencia de concentraciones variables del inhibidor de entrada de VIH, en donde si la entrada de la población de VIH no puede ser inhibida completamente por el inhibidor de entrada de VIH, el inhibidor de VIH es un inhibidor de entrada no competitivo y la población de VIH es resistente al inhibidor de entrada de VIH no competitivo.
- 45 16.-El método de la reivindicación 15, en el que el inhibidor de entrada se selecciona del grupo que consiste en SCH-C, SCH-D, UK-427857 y TNX-355.
- 17.-El método de la reivindicación 15, en el que la población de VIH procede de un sujeto infectado con VIH.

- 18.**-El método de la reivindicación 15, en el que los puntos de datos que miden la entrada de la población de VIH en la célula se determinan:
- (a) poniendo en contacto una pluralidad de partículas víricas de VIH con la célula en presencia del inhibidor de entrada de VIH, en donde la célula expresa un receptor celular superficial al cual se unen las partículas víricas, y en donde cada una de la pluralidad de partículas víricas comprende: (i) un vector de expresión vírica que carece de un ácido nucleico que codifica una proteína de cápsula vírica, pero que comprende un ácido nucleico indicador que produce una señal detectable cuando se introduce en la célula, y (ii) una proteína de cápsula vírica codificada por un ácido nucleico de la población de VIH; y
  - (b) midiendo la cantidad de señal detectable producida por la célula.
- 19.**-El método de la reivindicación 18, en el que cada una de la pluralidad de partículas de VIH comprende la misma proteína de cápsula vírica.
- 20.**-El método de la reivindicación 18, en el que la señal detectable es una señal fluorescente.
- 21.**-El método de la reivindicación 18, en el que el ácido nucleico indicador codifica luciferasa.
- 22.**-El método de la reivindicación 18, en el que la pluralidad de partículas víricas se producen co-transfectando en una célula (i) una pluralidad de ácidos nucleicos que codifican cada uno una proteína de cápsula vírica de la población de VIH, y (ii) un vector de expresión vírico que carece de un ácido nucleico que codifica una proteína de cápsula, en donde el vector comprende un ácido nucleico indicador que produce una señal detectable.
- 23.**-El método de la reivindicación 18, en el que el receptor celular superficial es CD4.
- 24.**-El método de la reivindicación 18, en el que la célula también expresa un receptor de quimioquina.
- 25.**-El método de la reivindicación 24, en el que el receptor de quimioquina es CXCR4 o CCR5.
- 26.**-El método de la reivindicación 24, en el que la célula expresa CXCR4 y CCR5.
- 27.**-El método de la reivindicación 18, en el que el ácido nucleico de VIH codifica gp120 o gp41.

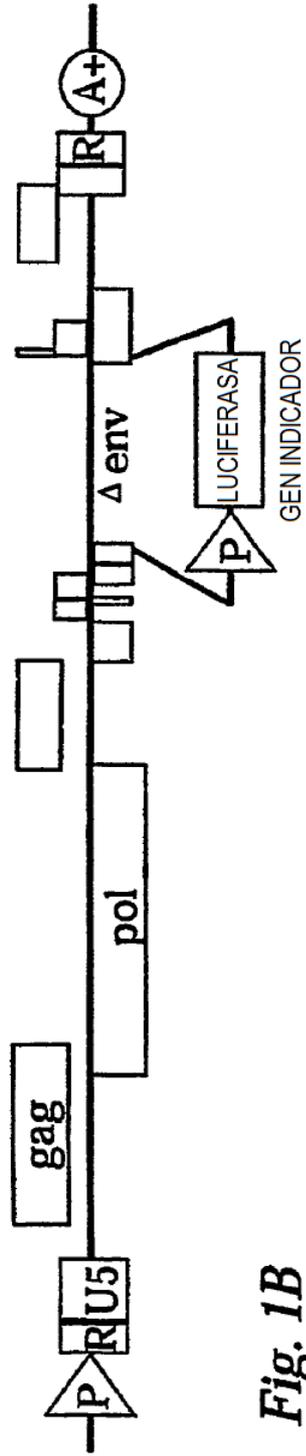
*Ensayo de entrada de VIH PhenoSense*

Vector de Expresión de Cápsula: pHIVenv



*Fig. 1A*

Vector de Expresión de VIH-1: pHIVlucΔU3



*Fig. 1B*

# Ensayo VIH: Célula PhenoSense™

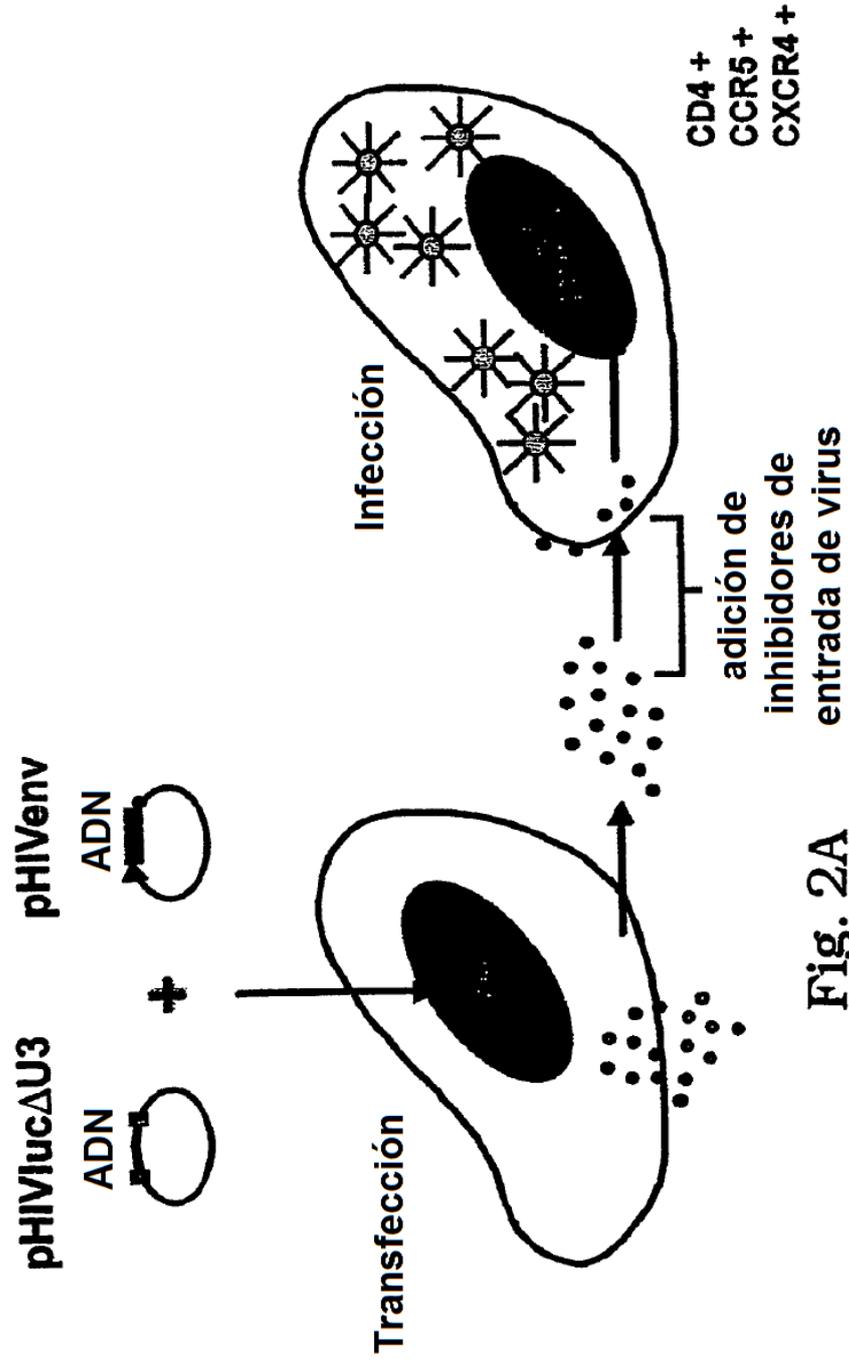
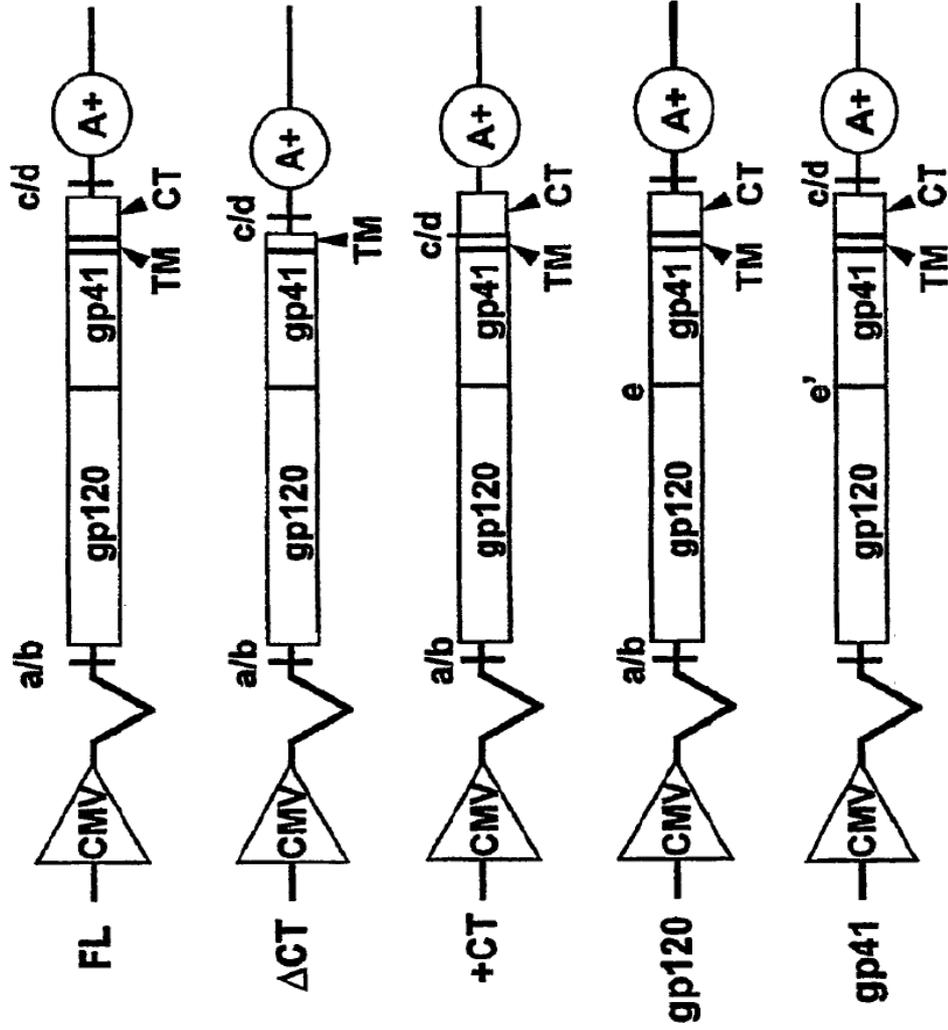
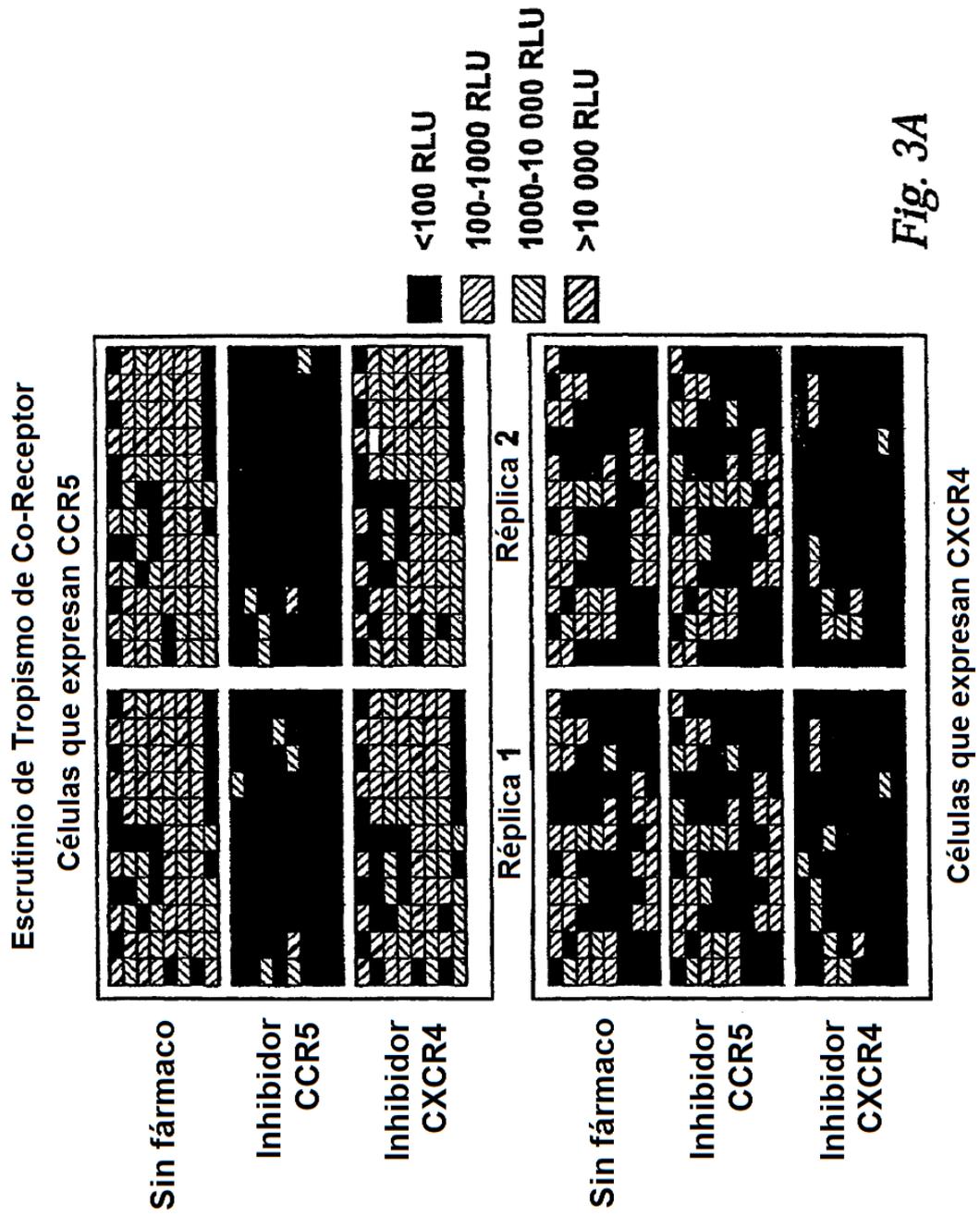


Fig. 2A

*Estrategias de Expresión de Cápsula de VIH*

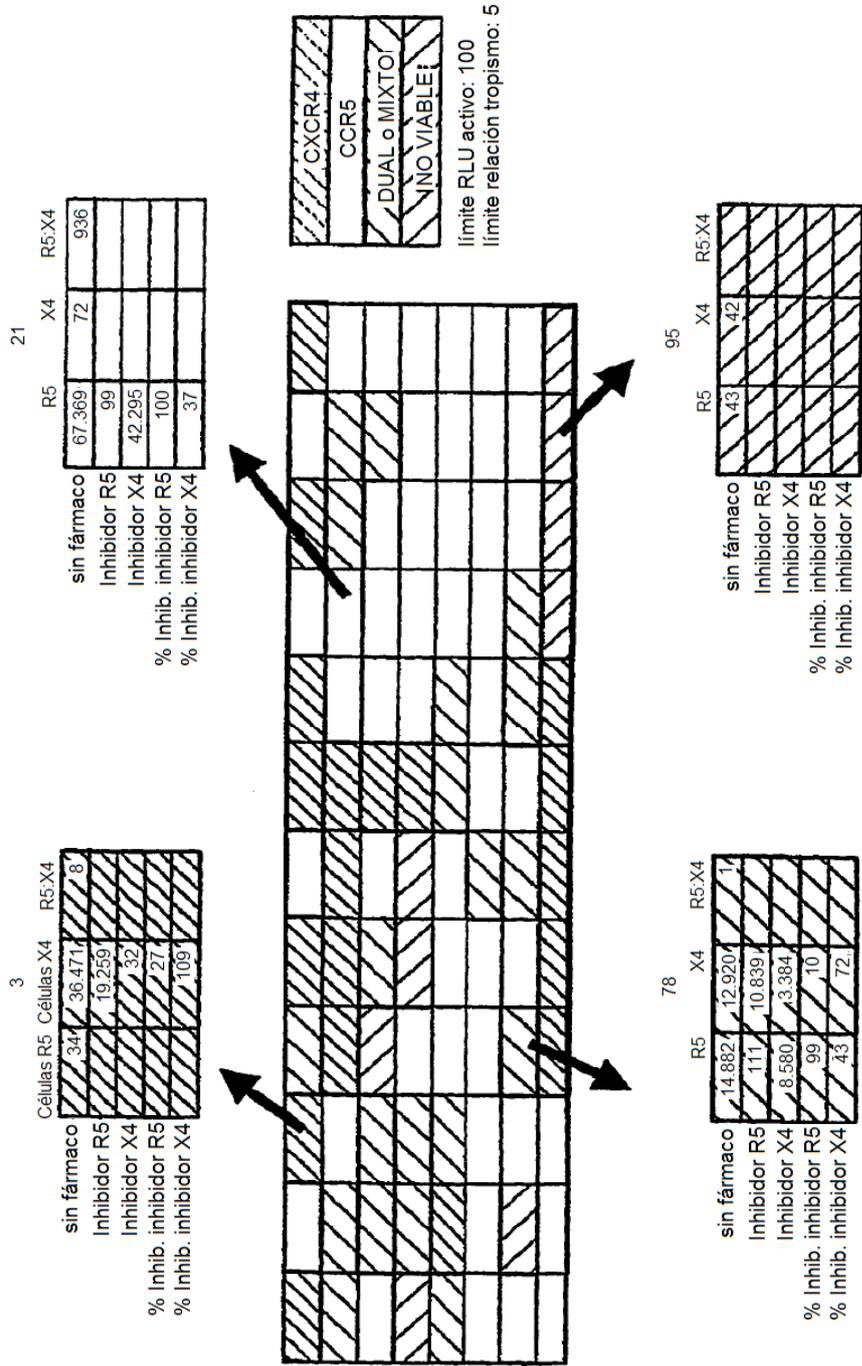


**Fig. 2B**



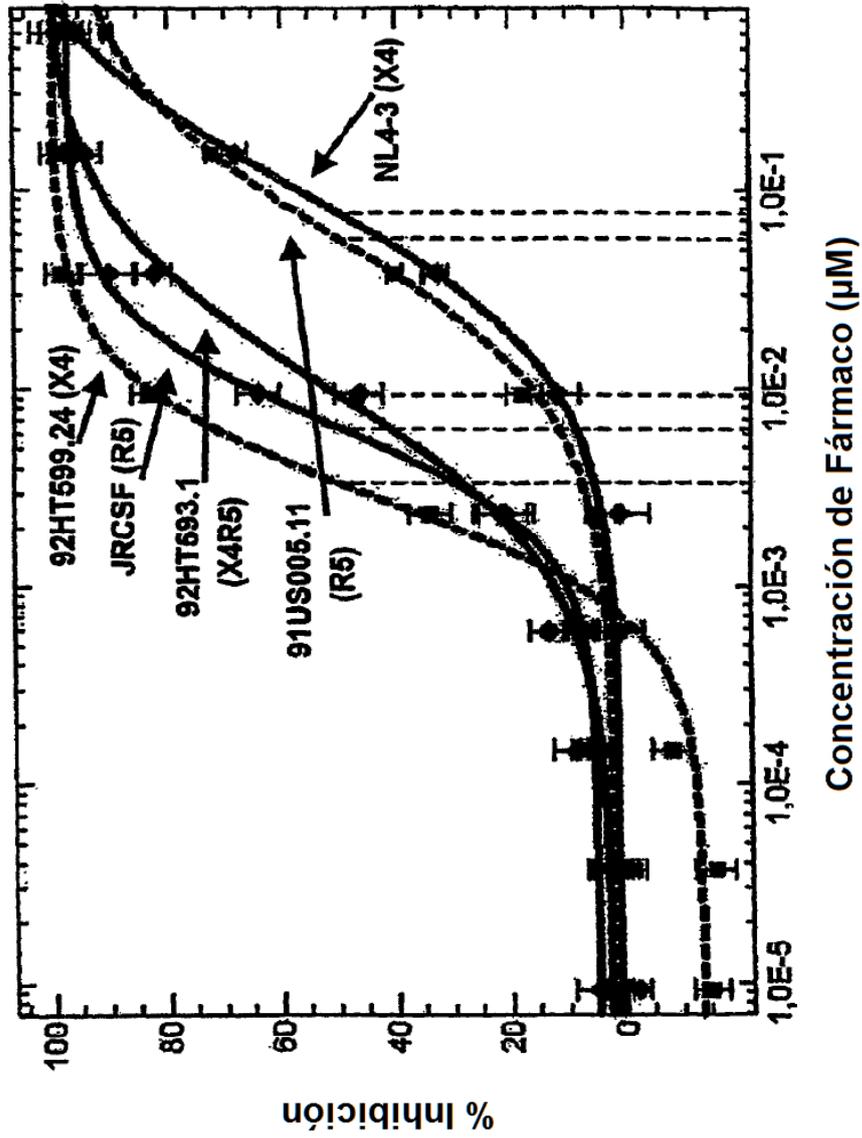
*Fig. 3A*

**Interpretación del Ensayo de Tropismo de Co-Receptor**

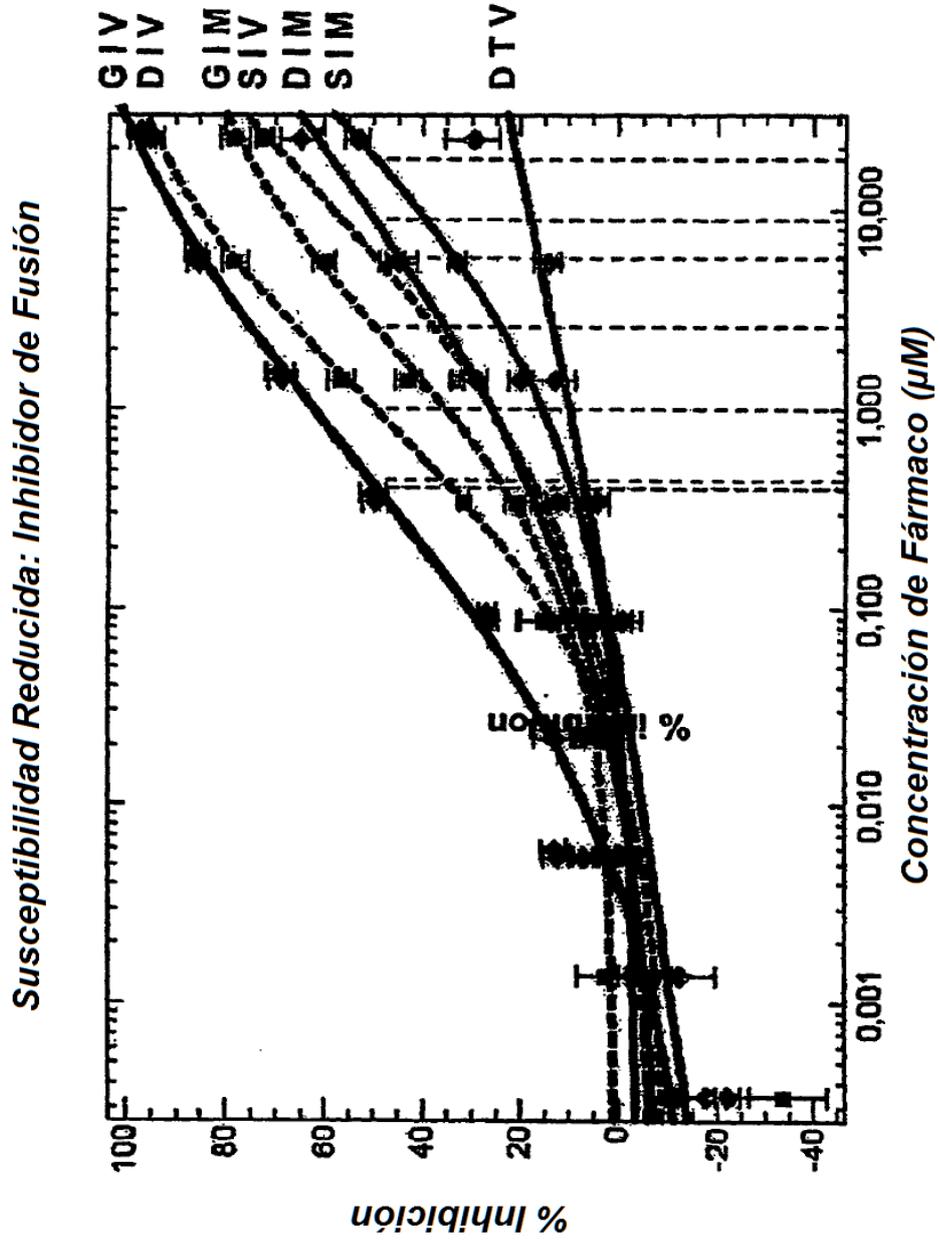


**Fig. 3B**

*Susceptibilidad a Inhibidor de Entrada: Inhibidor de Fusión*

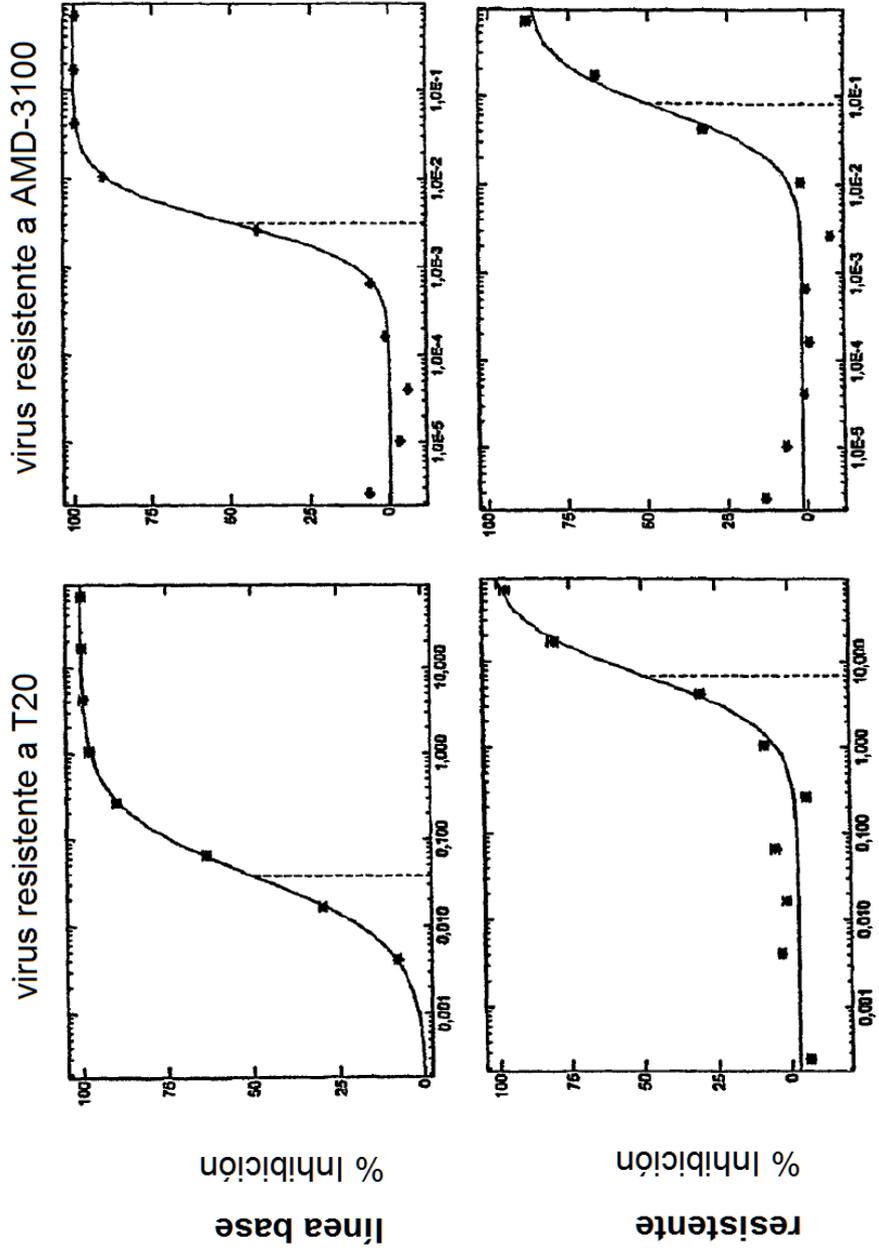


*Fig. 4A*



*Fig. 4B*

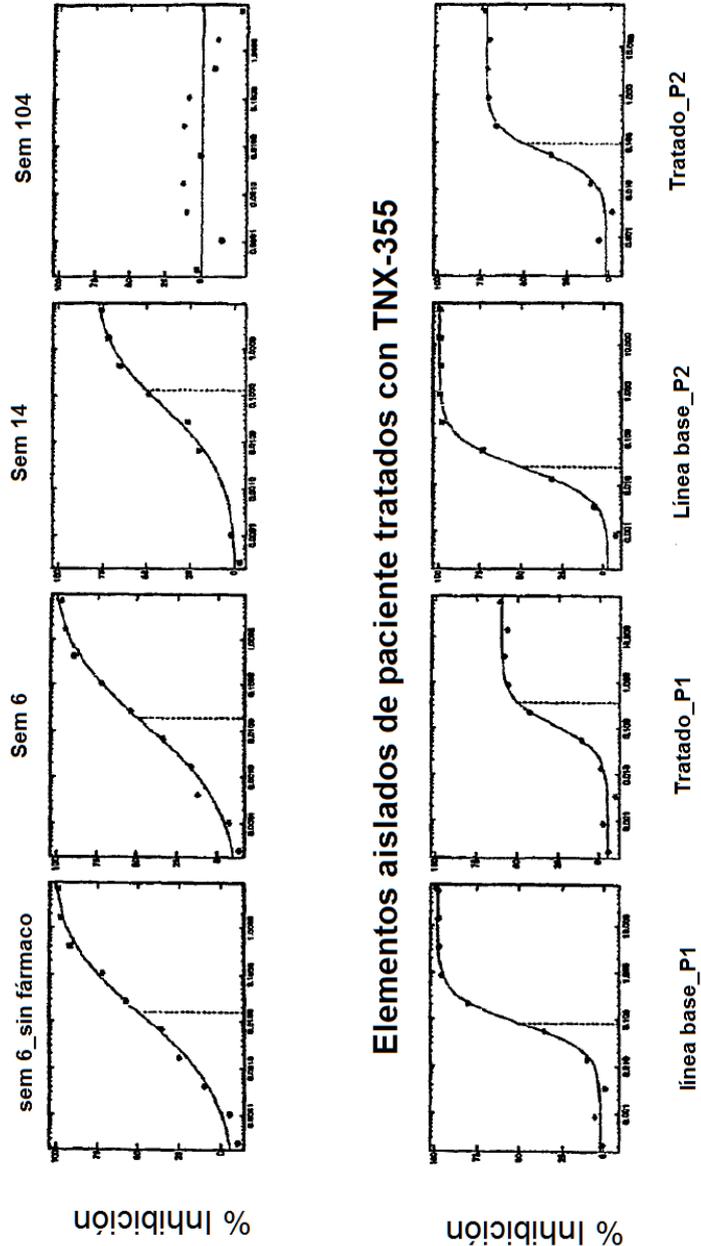
**Resistencia a Inhibidor de Entrada I:  
virus con aumento de IC50**



**Fig. 5**

**Resistencia a Inhibidor de Entrada II:  
virus con descenso de % inhibición máxima**

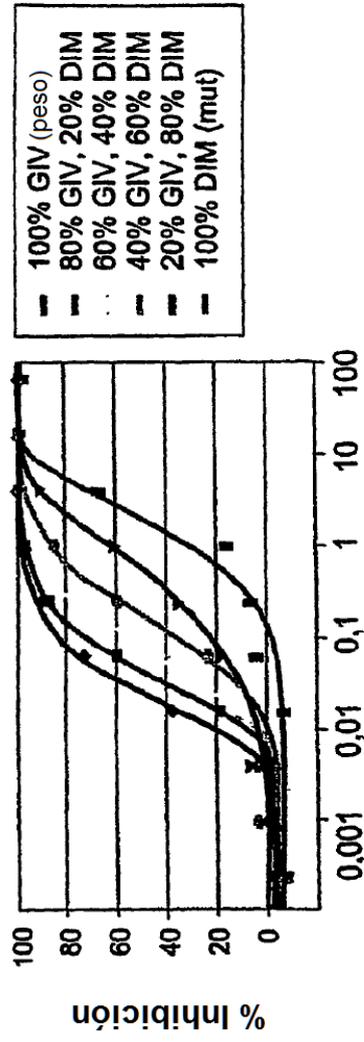
**Clones de virus resistentes a SCH-C (selección in vitro)**



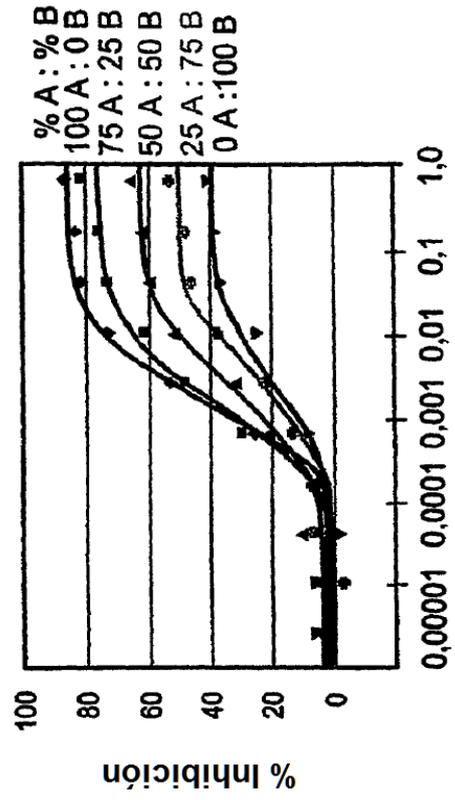
**Fig. 6**

Fig. 7

**Detección de Variantes Resistentes:  
Experimentos de Mezclamiento de ADN**



Inhibidor de Fusión



Antagonista de Co-receptor

Fig. 8

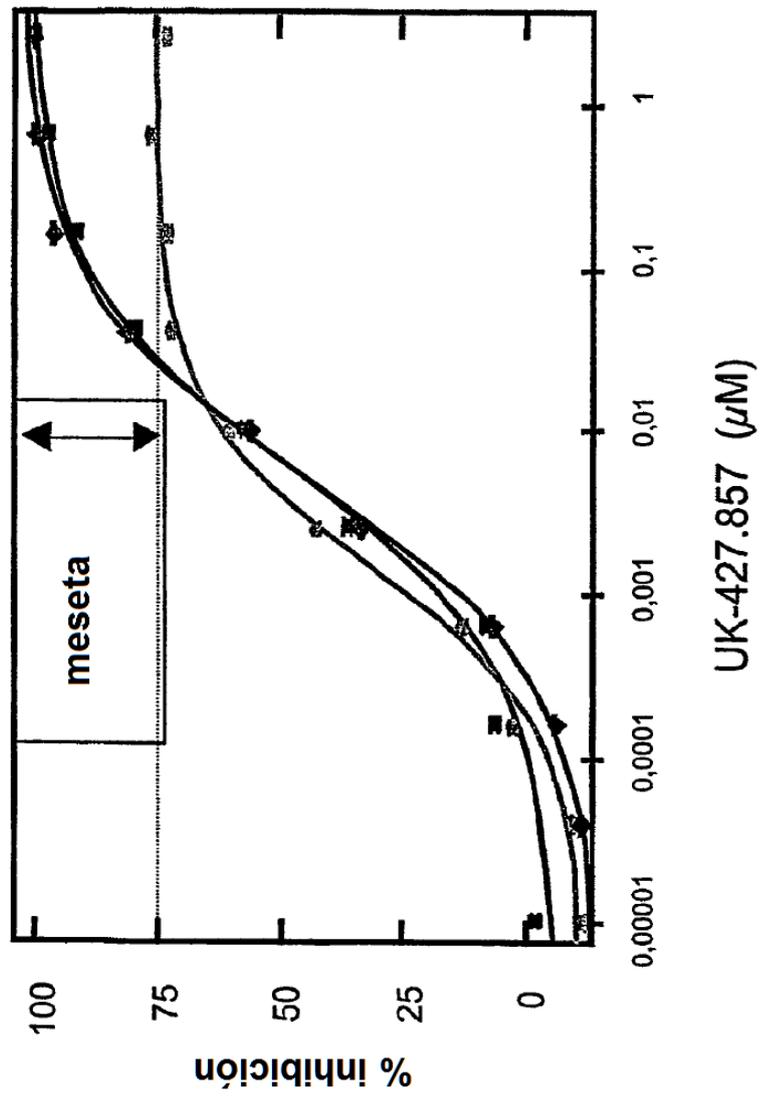


Fig. 9

