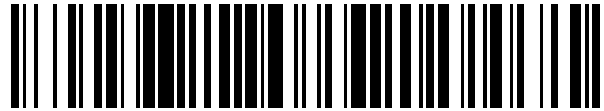


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 396 342**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/70** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.06.2002 E 02756136 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.08.2012 EP 1402076**

54 Título: **Métodos de evaluación del tratamiento de un paciente con inhibidores de la entrada viral por medio de ensayos de virus recombinantes**

30 Prioridad:

**04.06.2001 US 874475**  
**04.06.2001 US 295871 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**20.02.2013**

73 Titular/es:

**MONOGRAM BIOSCIENCES, INC. (100.0%)**  
**345 Oyster Point Boulevard**  
**San Francisco, CA 94080, US**

72 Inventor/es:

**PETROPOULOS, CHRISTOS J.;**  
**PARKIN, NEIL T.;**  
**WHITCOMB, JEANETTE y**  
**HUANG, WEI**

74 Agente/Representante:

**RIZZO, Sergio**

**ES 2 396 342 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).

**MÉTODOS DE EVALUACIÓN DEL TRATAMIENTO DE UN PACIENTE CON INHIBIDORES DE LA ENTRADA VIRAL POR MEDIO DE ENSAYOS DE VIRUS RECOMBINANTES**

**Descripción**

**[0001]** A lo largo de esta solicitud, se hace referencia a varias publicaciones por autor y fecha dentro del texto. Las citas completas de dichas publicaciones están enumeradas en orden alfabético al final de la especificación que precede a las reivindicaciones.

**CAMPO DE LA INVENCIÓN**

**[0002]** La entrada viral es un nuevo objetivo atractivo para el tratamiento antiviral. Alrededor de 10 fármacos diseñados para bloquear la adhesión del virus o la fusión de la membrana están siendo evaluados en la actualidad en estudios pre-clínicos o clínicos (Richman, 1998; PhRMA, 1999; Stephenson, 1999). Los virus animales envueltos se adhieren a la célula huésped y penetran en ella por medio de la interacción de proteínas virales en la membrana del virión (proteínas de la envoltura) y proteínas de la superficie celular (receptores de virus). El reconocimiento y la unión de los receptores son intercedidos por la proteína de envoltura de la superficie.

**BREVE RESUMEN DE LA INVENCIÓN**

**[0003]** Esta revelación alude a un ensayo fenotípico rápido y sensible que mide la sensibilidad de un virus a los inhibidores de la entrada viral.

**[0004]** Esta revelación alude a un sistema de vectores retrovirales que produce partículas virales que contienen proteínas de la envoltura viral derivadas de una variedad de fuentes y a la identificación de líneas celulares que expresan receptores virales y son permisivas para la replicación viral.

**[0005]** Esta revelación alude a un vector de expresión para la envoltura viral que es capaz de aceptar segmentos derivados de pacientes que codifican los genes de la envoltura.

**[0006]** Esta revelación alude a un vector bioseguro que representa la mayor parte del genoma viral del VIH-1, pero que transporta un gen reportero luciferasa en lugar de la región de la envoltura.

**[0007]** Esta revelación alude a un ensayo fenotípico que reduce la probabilidad de formar VIH-1 infeccioso recombinante al proporcionar un vector de expresión viral que transporta una delección en una región transcripcional reguladora (la copia 3' de U3) del genoma del VIH-1.

**[0008]** Esta revelación alude a un ensayo capaz de identificar y determinar el tropismo por el receptor/correceptor, que identifica rápidamente y con precisión a los pacientes infectados por cepas del virus trópico.

**[0009]** La presente invención proporciona un método para guiar el tratamiento de un paciente que comprende la identificación de la sensibilidad de los virus de un paciente a un compuesto diseñado para inhibir la penetración de un virus en una célula al:

a) Suministrar una muestra del paciente compuesta por ácido nucleico que codifica las proteínas de la envoltura viral

b) Transfectar dentro de una primera célula

i. El ácido nucleico del paso a) y

ii. Un vector de expresión viral que carece de un ácido nucleico que codifica una proteína de la envoltura y que comprende un ácido nucleico indicador que produce una señal detectable,

tal que la primera célula produce partículas virales que constan de las proteínas de la envoltura codificadas por el ácido nucleico del paso a);

c) Poner en contacto las partículas virales producidas en el paso b) con una segunda célula en presencia del compuesto, en el cual la segunda célula expresa un receptor de la superficie celular al que el virus se une;

d) Medir la cantidad de señal producida por la segunda célula para determinar la infectividad de las partículas virales; y

e) Comparar la cantidad de señal medida en el paso d) con la cantidad de señal producida en ausencia del compuesto, en el cual una cantidad reducida de señal medida en presencia del compuesto indica la sensibilidad de los virus de un paciente al compuesto;

en el cual, los compuestos a los que los virus de un paciente son sensibles pueden ser utilizados en el tratamiento del paciente.

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

##### **[0010]**

**Figura 1A.** Estructura de los vectores de expresión viral y vectores de expresión de la envoltura

El vector de expresión de la envoltura del VIH-1 (pHIUVenv) es modificado para aceptar las secuencias de la envoltura que han sido amplificadas desde muestras de plasma de paciente. Las designaciones a/b y c/d se refieren a sitios de endonucleasa de restricción que se encuentran en los extremos 5' y 3' de la poliproteína de la envoltura del VIH-1 (gp160). El vector de expresión del VIH (pHIVluc $\Delta$ U3) codifica todas las proteínas del VIH a excepción de la poliproteína de la envoltura. Una parte del gen de la envoltura se ha eliminado para alojar un cassette génico indicador. La "luciferasa de luciérnaga" que se utiliza para

controlar la habilidad de un virus de reproducirse en presencia o ausencia de fármacos antivirales. La región 3' U3 se ha eliminado parcialmente para prevenir la transcripción desde la repetición terminal larga (LTR) 5' en células infectadas. El virus producido en este sistema es limitado a una única ronda de replicación.

5 **Figura 1B.** Ensayo de entrada basado en la célula

Las pruebas de sensibilidad farmacológica, tropismo por el correceptor y neutralización viral se realizan mediante la cotransfección de pHIVenv y pHIVlucU3 en la célula huésped. La célula huésped produce partículas de VIH pseudotipadas con secuencias de la envoltura del VIH derivadas del virus de prueba o de la muestra de paciente. Las partículas virales se recogen (~48h) después de la transfección y se utilizan para infectar células diana que expresan los receptores (ej. CD4) y los correceptores (ej. CXCR4, CCR5) del VIH. Después de la infección (~72h), las células diana se lisan y la actividad de luciferasa se mide. El VIH tiene que completar una ronda de replicación para infectar la célula huésped diana con éxito y producir actividad de luciferasa. Si el virus es incapaz de penetrar en la célula diana, la actividad de luciferasa disminuye. Este sistema se puede utilizar para evaluar la sensibilidad a los inhibidores de entrada, el tropismo por el receptor y por el correceptor y la neutralización viral.

20 **Figura 2.** Vectores de expresión de la envoltura del VIH

Las secuencias de la envoltura del VIH se amplifican desde muestras de paciente y se insertan dentro de vectores de expresión por medio de sitios de endonucleasa de restricción (5' a/b y 3' c/d). La transcripción de la envoltura es conducida por el gen temprano promotor del citomegalovirus (CMV) humano. El ARN de la envoltura es poliadenilado mediante una secuencia de señal (A+) de la poliadenilación del virus del simio 40 (SV40). Un intrón que se encuentra entre el promotor del CMV y las secuencias de la envoltura del VIH está diseñado para incrementar los niveles de ARNm de la envoltura en células transfectadas. FL- expresa proteínas de la envoltura de longitud completa (gp120, gp41). ΔCT- expresa proteínas de la envoltura (gp120, gp41) que carecen del dominio de la cola citoplasmática del C-terminal de gp41. +CT- expresa proteínas de la envoltura (gp120, gp41) que contienen un dominio constante y predefinido de la cola citoplasmática de gp41. gp120- expresa proteínas gp120 derivadas del paciente junto con una gp41 constante predefinida. gp41- expresa una constante predefinida gp120 junto con las proteínas gp41 derivadas del paciente.

**Figura 3A.** Ensayo de evaluación del tropismo por el correceptor

En esta figura, los ensayos se realizan mediante dos líneas celulares. Una línea celular expresa CD4 más CCR5 (los seis cuadros de arriba). La otra línea celular expresa CD4 y CXCR4 (los seis cuadros de abajo). El ensayo se realiza mediante la infección de células con un gran número de reservas de virus recombinantes derivadas de células transfectadas con los vectores pHIVenv y pHIVluc $\Delta$ U3. El ejemplo que se muestra representa el análisis de 96 virus en formato de placas de 96 pocillos. Las infecciones se realizan en ausencia de fármacos (sin fármacos) o en presencia de un fármaco que inhibe preferiblemente o a los virus trópicos R5 (inhibidor de CCR5) o a los virus trópicos X4 (inhibidor de CXCR4). El tropismo por el correceptor se evalúa mediante la comparación de la cantidad de actividad de luciferasa producida en cada tipo de célula, tanto en presencia como en ausencia de fármaco (ver Figura 3B para la interpretación de los resultados del ensayo).

**Figura 3B.** Determinación del tropismo el correceptor

En esta figura, los resultados del ensayo se interpretan mediante la comparación de la habilidad de cada virus de muestra de infectar (producir actividad de luciferasa) en células que expresan CD4/CCR5 (células R5) o células que expresan CD4/CXCR4 (células X4). También se evalúa la habilidad de un inhibidor de CCR5 o CXCR4 de bloquear selectivamente la infección (inhibir actividad de luciferasa). Los virus trópicos X4 (cuadros verdes) infectan las células X4, pero no las células R5. La infección de las células X4 es bloqueada por el inhibidor de CXCR4. Los virus trópicos R5 (cuadros azules) infectan las células R5, pero no las células X4. La infección de las células R5 es bloqueada por el inhibidor de CCR5. Los virus trópicos duales o mixtos X4/R5 (cuadros amarillos) infectan las células X4 y R5. La infección de las células R5 es bloqueada por el inhibidor de CCR5 y la infección de las células X4 es bloqueada por el inhibidor de CXCR4. Los virus no viables (cuadros rojos) no se reproducen ni en células X4 ni en células R5.

**Figura 4A.** Medición de la sensibilidad a los inhibidores de entrada: Inhibidor de fusión

En esta figura, se demuestra la sensibilidad al inhibidor de fusión T-20. Las células que expresan CD4, CCR5 y CXCR4 fueron infectadas en ausencia de T-20 y sobre una amplia gama de concentraciones de T-20 (eje de x escala log<sub>10</sub>). El porcentaje de inhibición de replicación viral (eje de y) se determinó mediante la comparación de la cantidad de luciferasa producida en las células infectadas

en presencia de T-20 con la cantidad de luciferasa producida en ausencia de T-20. Los virus trópicos R5, X4 y los virus trópicos duales fueron examinados. La sensibilidad a los fármacos se cuantificó al determinar la concentración de T-20 requerida para inhibir la replicación viral en un 50% ( $IC_{50}$  está expresado con líneas verticales discontinuas). Los virus con valores de  $IC_{50}$  más bajos son más sensibles a T-20 que los virus con valores de  $IC_{50}$  más altos. NL4-3: cepa bien identificada de X4 trópico. JRCSF: cepa bien identificada de R5 trópico. 91US005.11: cepa aislada de R5 trópico obtenido del Programa de Referencia de Reactivos de Investigación del SIDA del Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos (NIH AIDS Research Reagent Reference Program, ARRRP). 92HT593.1: cepa aislada trópica dual (X4R5) obtenido del NIH ARRRP. 92HT599.24: cepa aislada de X4 trópico obtenido del NIH ARRRP.

**Figura 4B.** Medición de la sensibilidad a los inhibidores de entrada: Mutaciones de resistencia farmacológica

En esta figura, se demuestra la sensibilidad reducida al inhibidor de fusión T-20 otorgada por mutaciones de resistencia farmacológica específicas en la proteína de la envoltura gp41. Las células que expresan CD4, CCR5 y CXCR4 fueron infectadas en ausencia de T-20 y sobre una amplia gama de concentraciones de T-20 (eje de x escala log<sub>10</sub>). El porcentaje de inhibición de replicación viral (eje de y) se determinó mediante la comparación de la cantidad de luciferasa producida en las células infectadas en presencia de T-20 con la cantidad de luciferasa producida en ausencia de T-20. Los virus isogénicos que contienen una mutación específica o dos en la proteína transmembrana de la envoltura gp41 se examinaron (resaltados en rojo en la leyenda de figuras). La sensibilidad a los fármacos se cuantifica al determinar la concentración de T-20 requerida para inhibir la replicación viral en un 50% ( $IC_{50}$  está expresado con líneas verticales discontinuas). Los virus con valores de  $IC_{50}$  más bajos son más sensibles a T-20 que los virus con valores de  $IC_{50}$  más altos.

Sin mutaciones (secuencia de tipo salvaje): GIV

Mutaciones simples: GIV, DIM, SIV

Mutaciones dobles: DIM, SIM, DTV

**Figura 5A.** Medición de la sensibilidad a los inhibidores de entrada: Inhibidor de CCR5

En esta figura, se demuestra la sensibilidad al inhibidor de CCR5 (compuesto de Merck). Las células que expresan CD4 y CCR5 (células R5) fueron infectadas en ausencia del inhibidor de CCR5 y sobre una amplia gama de concentraciones

del inhibidor de CCR5 (eje de x escala log10). El porcentaje de inhibición de replicación viral (eje de y) se determinó mediante la comparación de la cantidad de luciferasa producida en las células infectadas en presencia del inhibidor de CCR5 con la cantidad de luciferasa producida en ausencia del inhibidor de CCR5. Los virus trópicos R5, X4 y los virus trópicos duales fueron examinados. La sensibilidad a los fármacos se cuantificó al determinar la concentración del inhibidor de CCR5 requerida para inhibir la replicación viral en un 50% (IC<sub>50</sub> está expresado con líneas verticales discontinuas). Los virus con valores de IC<sub>50</sub> más bajos son más sensibles al inhibidor de CCR5 que los virus con valores de IC<sub>50</sub> más altos. El virus trópico X4 no infectó las células R5. NL4-3: cepa bien identificada de X4 trópico. JRCSF: cepa bien identificada de R5 trópico. 92HT593.1: cepa aislada trópica dual (X4R5) obtenido del NIH ARRRP.

**Figura 5B.** Medición de la sensibilidad a los inhibidores de entrada: Inhibidor de CXCR4

En esta figura, se demuestra la sensibilidad al inhibidor de CXCR4 (AMD3100). Las células que expresan CD4 y CXCR4 (células X4) fueron infectadas en ausencia del inhibidor de CXCR4 y sobre una amplia gama de concentraciones del inhibidor de CXCR4 (eje de x escala log10). El porcentaje de inhibición de replicación viral (eje de y) se determinó al comparar la cantidad de luciferasa producida en las células infectadas en presencia del inhibidor de CXCR4 con la cantidad de luciferasa producida en ausencia del inhibidor de CXCR4. Los virus trópicos R5, X4 y los virus trópicos duales fueron examinados. La sensibilidad a los fármacos se cuantificó al determinar la concentración del inhibidor de CXCR4 requerida para inhibir la replicación viral en un 50% (IC<sub>50</sub> está expresado con líneas verticales discontinuas). Los virus con valores de IC<sub>50</sub> más bajos son más sensibles a CCR5 que los virus con valores de IC<sub>50</sub> más altos. El virus trópico R5 no infectó a las células X4.

NL4-3: cepa bien identificada de X4 trópico.

JRCSF: cepa bien identificada de R5 trópico.

92HT593.1: cepa aislada trópica dual (X4R5) obtenido del NIH ARRRP.

**Figura 6.** Sensibilidad a los inhibidores de entrada: Inhibidor de fusión

Esta figura demuestra que los amplicones que corresponden a la secuencia de la envoltura de longitud larga o la secuencia de la envoltura eliminada de la cola citoplasmática son generados. Los números de las filas corresponden al tropismo por el correceptor mostrado al lado de cada número a la derecha de los geles.

**Figura 7.** Sensibilidad reducida: Se muestran los diagramas de dispersión de los inhibidores de fusión que indican los resultados de los ensayos de citofluorometría de flujo (fluorescence activated cell sorting o FACS) en los que se utilizan anticuerpos contra CCR5 ó CXCR4 (mostrados en la eje de y). Las líneas celulares expresan los correceptores enumerados debajo de los diagramas y el fluorescente de CD4 aparece a lo largo del eje de x. El anticuerpo anti-CXCR4 se une con más fuerza con las células que expresan el correceptor correspondiente, CXCR4.

**Figura 8.** Sensibilidad a los inhibidores de entrada: La inhibición del inhibidor de CCR5 se muestra después de la administración de los antagonistas de los correceptores.

**Figura 9.** Sensibilidad a los inhibidores de entrada: El mapa del inhibidor de CXCR4 y la secuencia de aminoácidos se muestran para un péptido que es un inhibidor de fusión entra una membrana viral y una membrana celular.

**Figura 10.** Inhibición por medio de los antagonistas de los correceptores.

**Figura 11.** Mutaciones de resistencia a T-20.

**Figura 12.** Identificación de las mutaciones de resistencia a los inhibidores de entrada.

**Figura 13.** Péptidos inhibidores de fusión.

**[0011]** La invención, con sus características particulares, puede quedar más clara después la descripción detallada siguiente que está relacionada con las figuras y ejemplos adjuntos.

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

**[0012]** Esta invención proporciona un método para guiar el tratamiento de un paciente, que comprende la identificación de la sensibilidad de los virus de un paciente a un compuesto diseñado para inhibir la penetración de un virus en una célula al: (a) suministrar una muestra de paciente compuesta por ácido nucleico que codifica las proteínas de la envoltura viral; (b) transfectar dentro de una primera célula (i) el ácido nucleico del paso (a) y (ii) un vector de expresión viral que carece de un ácido nucleico que codifica una proteína de la envoltura y que comprende un ácido nucleico indicador que produce una señal detectable, tal que la primera célula produce partículas virales que constan de proteínas de la envoltura codificadas por el ácido nucleico del paso (a); (c) poner en contacto las partículas virales producidas en el paso (b) con una segunda célula en presencia del compuesto, en el cual la segunda célula expresa un receptor de la superficie celular al que el virus se une; (d) medir la cantidad de señal producida por la segunda célula para determinar la infectividad de las partículas virales; y (e)



comparar la cantidad de señal medida en el paso (d) con la cantidad de señal producida en ausencia del compuesto, en el cual una cantidad reducida de señal medida en presencia del compuesto indica la sensibilidad de los virus de un paciente al compuesto; en el cual, los compuestos a los que los virus de un paciente son vulnerables pueden ser utilizados en el tratamiento del paciente.

**[0013]** En un modo de realización de esta invención, el ácido nucleico indicador comprende un gen indicador. En otro modo de realización de esta invención, el gen indicador es un gen de luciferasa.

**[0014]** En un modo de realización de esta invención, el receptor de la superficie celular es CD4. En un modo de realización de esta invención, el receptor de la superficie celular es un receptor de quimiocina. En un modo de realización de esta invención, el receptor de la superficie celular es CXCR4 o CCR5.

**[0015]** En un modo de realización de esta invención, el paciente es infectado por el virus del VIH-1, un virus de la hepatitis (como el virus VHC o VHB), o cualquier otro virus.

**[0016]** En un modo de realización de esta invención, el ácido nucleico del paso (a) comprende ADN que codifica gp120 y gp41.

**[0017]** En un modo de realización de esta invención, el vector de expresión viral comprende ácido nucleico del VIH.

**[0018]** En un modo de realización de esta invención, el vector de expresión viral comprende un gen gag-pol del VIH.

**[0019]** En un modo de realización de esta invención, el vector de expresión viral comprende ADN que codifica vif, vpr, tat, rev, vpu y nef.

**[0020]** En un modo de realización de esta invención, la primera célula es una célula de mamífero.

**[0021]** En un modo de realización de esta invención, la célula de mamífero es una célula humana.

**[0022]** En un modo de realización de esta invención, la célula humana es una célula de riñón embrionaria humana.

**[0023]** En un modo de realización de esta invención, la célula de riñón embrionaria humana es una célula 293.

**[0024]** En un modo de realización de esta invención, la segunda célula es un linfocito T humano.

**[0025]** En un modo de realización de esta invención, la segunda célula es una línea celular de leucemia de linfocitos T humanos.

**[0026]** En un modo de realización de esta invención, la segunda célula es una célula

mononuclear de sangre periférica.

**[0027]** En un modo de realización de esta invención, la segunda célula es una célula de astroglioma.

5 **[0028]** En un modo de realización de esta invención, la célula de astroglioma es una célula U87.

**[0029]** En un modo de realización de esta invención, la segunda célula es una célula de osteosarcoma humano.

**[0030]** En un modo de realización de esta invención, la célula de osteosarcoma humano es una célula HT4.

10 **[0031]** En un modo de realización de esta invención, el compuesto se une al receptor de la superficie celular.

**[0032]** En un modo de realización de esta invención, el compuesto es un ligando del receptor de superficie celular.

15 **[0033]** En un modo de realización de esta invención, el compuesto comprende un anticuerpo.

**[0034]** En un modo de realización de esta invención, el compuesto inhibe la fusión de la membrana.

**[0035]** En un modo de realización de esta invención, el compuesto es un péptido, un péptido-mimético, una molécula orgánica o un compuesto sintético.

20 **[0036]** En un modo de realización de esta invención, el compuesto se une a la proteína de la envoltura viral.

**[0037]** También se revela un método para hacer una composición que comprende la mezcla del compuesto identificado por el método de examen (método para guiar el tratamiento de un paciente descrito aquí con un portador).

25 **[0038]** El portador puede ser una solución salina, polietilenglicol, un tampón químico, un almidón o un disolvente orgánico.

**[0039]** Un método para identificar un receptor de la superficie celular que está unido por un virus sobre el que la infección de una célula por el virus puede comprender: (a) la obtención de partículas virales que comprenden (i) un ácido nucleico viral y (ii) un ácido nucleico indicador que produce una señal detectable; (b) el contacto una célula que expresa un receptor de la superficie celular con las partículas virales del paso (a); y (c) la medición de la cantidad de señal detectable producida dentro de la célula, en la cual la producción de la señal indica que el receptor de la superficie celular expresado por la célula está unido al virus, determinando, así, que el receptor de superficie celular está unido por el virus a la infección de la célula.

35 **[0040]** Un método para identificar si un anticuerpo inhibe la entrada de un virus a una

célula puede comprender: (a) la obtención de ácido nucleico que codifica una proteína de la envoltura viral de un paciente infectado por un virus; (b) la cotransfección dentro de una primera célula de (i) el ácido nucleico del paso (a) y (ii) un vector de expresión viral que carece de un ácido nucleico que codifique una proteína de la envoltura y que  
5 comprende un ácido nucleico indicador que produce una señal detectable, tal que la primera célula produce partículas virales que comprenden la proteína de la envoltura codificada por el ácido nucleico obtenido del paciente; (c) el contacto de las partículas virales producidas en el paso (b) con una segunda célula en presencia del anticuerpo, en el cual la segunda célula expresa un receptor de la superficie celular al que el virus  
10 se une; (d) la medición de la cantidad de señal producida por la segunda célula para determinar la infectividad de las partículas virales; y (e) la comparación de la cantidad de señal medida en el paso (d) con la cantidad de señal producida en ausencia del compuesto, en el cual una cantidad reducida de señal medida en presencia del anticuerpo indica que el anticuerpo inhibe la penetración del virus en la segunda  
15 célula.

**[0041]** Un método para determinar la sensibilidad de un virus a un compuesto que inhibe la penetración viral en una célula puede comprender: (a) la obtención de ácido nucleico que codifica una proteína de la envoltura viral de un paciente infectado por el virus; (b) la cotransfección dentro de una primera célula de (i) el ácido nucleico del  
20 paso (a) y (ii) un vector de expresión viral que carece de un ácido nucleico que codifica una proteína de la envoltura y que comprende un ácido nucleico indicador que produce una señal detectable, tal que la primera célula produce partículas virales que comprenden la proteína de la envoltura codificada por el ácido nucleico obtenido del paciente; (c) el contacto de las partículas virales producidas en el paso (b) con una  
25 segunda célula en presencia del anticuerpo, en el cual la segunda célula expresa un receptor de la superficie celular al que el virus se une; (d) la medición de la cantidad de señal producida por la segunda célula para determinar la infectividad de las partículas virales; y (e) la comparación de la cantidad de señal medida en el paso (d) con la cantidad de señal producida en ausencia del compuesto, en el cual una cantidad  
30 reducida de señal medida en presencia del compuesto indica que el virus es sensible al compuesto.

**[0042]** Un método para determinar la resistencia de un virus a un compuesto que inhibe la penetración viral en una célula puede comprender: (a) la determinación de la sensibilidad de un virus a un compuesto según el método de la reivindicación 33, en el  
35 cual un ácido nucleico que codifica una proteína de la envoltura viral se obtiene de un paciente en una primera ocasión; (b) la determinación de la sensibilidad del virus al

compuesto según el método de la reivindicación 33, en el cual el ácido nucleico que codifica la proteína de la envoltura viral se obtiene del paciente en una posterior segunda ocasión; y (c) la comparación de las sensibilidades determinadas en los pasos (a) y (b), en los cuales una disminución de la sensibilidad en una posterior  
5 segunda ocasión indica la resistencia del virus al compuesto.

**[0043]** Un método para identificar una mutación en un virus que confiere resistencia a un compuesto que inhibe la penetración viral en una célula puede comprender: (a) la determinación de la secuencia del ácido nucleico o de la secuencia de aminoácidos del virus antes de cualquier tratamiento del virus con el compuesto; (b) la obtención de  
10 un virus resistente al compuesto; (c) la determinación de la secuencia de ácido nucleico o de la secuencia de aminoácidos del virus resistente del paso (b); y (d) la comparación de la secuencia de ácido nucleico o de las secuencias de aminoácidos de los pasos (a) y (c), respectivamente, para identificar la mutación en el virus que confiere resistencia al compuesto.

**[0044]** El virus obtenido en el paso (b) puede ser el virus del paso (a) cultivado en presencia del compuesto hasta que se desarrolla resistencia.

**[0045]** El virus obtenido en el paso (b) puede estar aislado de un paciente que se ha estado sometiendo a un tratamiento con el compuesto.

**[0046]** Sólo para contexto.

**[0047]** Estos métodos pueden servir para medir con precisión y reproducibilidad la sensibilidad del VIH-1 a los inhibidores de la entrada viral.

**[0048]** Estos métodos pueden servir para medir con precisión y reproducibilidad el tropismo del VIH-1 por el correceptor.

**[0049]** Estos métodos pueden servir para medir con precisión y reproducibilidad la  
25 neutralización del VIH-1 con anticuerpos.

**[0050]** Estos métodos pueden servir para descubrir, optimizar y caracterizar fármacos novedosos o nuevos que están dirigidos a varios pasos definidos y todavía indefinidos en el proceso de adhesión y de penetración del virus.

**[0051]** Estos métodos pueden servir para descubrir, optimizar y caracterizar vacunas  
30 contra el VIH-1 (o preventivas, o terapéuticas) que están dirigidas a varios pasos definidos y todavía indefinidos en la adhesión del virus y el proceso de penetración.

**[0052]** Estos métodos pueden servir para identificar sustituciones/mutaciones de aminoácidos en las proteínas de la envoltura del VIH-1 (gp41TM y gp120SU) que alteran la sensibilidad a los inhibidores de la entrada viral.

**[0053]** Estos métodos pueden servir para cuantificar el efecto que tienen las  
35

mutaciones específicas de la envoltura del VIH-1 en la sensibilidad a los inhibidores de la entrada viral.

**[0054]** Estos métodos pueden servir para determinar sustituciones/mutaciones de aminoácidos de la envoltura del VIH-1 que se observan con frecuencia, solas o en combinación, en virus que presentan una sensibilidad alterada a los inhibidores de la entrada viral.

**[0055]** Estos métodos pueden servir para identificar las sustituciones/mutaciones de aminoácidos en las proteínas de la envoltura del VIH-1 (gp41TM y gp120SU) que alteran el tropismo por el receptor o correceptor.

**[0056]** Estos métodos pueden servir para cuantificar el efecto que tienen las mutaciones específicas de la envoltura del VIH-1 en el tropismo por el receptor o correceptor.

**[0057]** Estos métodos pueden servir para identificar las sustituciones/mutaciones de aminoácidos de la envoltura del VIH-1 que se observan con frecuencia, solas o en combinación, en virus que presentan tropismo por los correceptores CXCR4 o CCR5.

**[0058]** Estos métodos pueden servir para identificar las sustituciones/mutaciones de aminoácidos en las proteínas de la envoltura del VIH-1 (gp41TM y gp120SU) que alteran la neutralización con anticuerpos.

**[0059]** Estos métodos pueden servir para cuantificar el efecto que tienen las mutaciones específicas de la envoltura del VIH-1 en la neutralización con anticuerpos.

**[0060]** Estos métodos pueden servir para identificar las sustituciones/mutaciones de aminoácidos de la envoltura del VIH-1 que se observan con frecuencia, solas o en combinación, en virus que presentan neutralización viral con anticuerpos.

**[0061]** Estos métodos pueden servir para identificar anticuerpos que se observan con frecuencia en virus de muestras de pacientes que son capaces de neutralizar el VIH-1.

**[0062]** Estos métodos pueden servir para la identificación de virus que requieren la unión a CD4 para la infección.

**[0063]** Estos métodos pueden servir para la identificación de virus que no requieren la unión a CD4 para la infección.

**[0064]** Estos métodos pueden servir para identificar la incidencia de muestras de pacientes que presentan una infección independiente de CD4.

**[0065]** Estos métodos pueden servir para la identificación de virus que requieren la unión a CD8 para la infección.

**[0066]** Estos métodos pueden servir para identificar la incidencia de virus de pacientes que presentan una infección dependiente de CD8.

**[0067]** Estos métodos pueden servir para la identificación de virus que requieren la unión al receptor de quimiocina CXCR4, la unión del receptor de quimiocina CCR5 o la unión de CXCR4 o CCR5 (trópico dual) para la infección.

5 **[0068]** Estos métodos pueden servir para identificar la incidencia de virus que requieren la unión al receptor de quimiocina CXCR4, la unión al receptor de quimiocina CCR5 o la unión de CXCR4 o CCR5 (trópico dual) para la infección.

10 **[0069]** Estos métodos pueden servir para identificar las sustituciones/mutaciones de aminoácidos de la envoltura del VIH-1 que se observan con frecuencia, solas o en combinación, en virus que presentan (a) una sensibilidad alterada a los inhibidores de la entrada viral, (b) tropismo por los correceptores CXCR4 o CCR5 y (c) neutralización viral con anticuerpos.

**[0070]** En un modo de realización preferido, esta invención proporciona un medio y método para utilizar la sensibilidad a los inhibidores de la entrada viral para guiar el tratamiento del VIH-1.

15 **[0071]** En un modo de realización preferido, esta invención también proporciona el medio y método para utilizar la sensibilidad a los inhibidores de la entrada viral para guiar el tratamiento de pacientes en los que el tratamiento con fármacos antirretrovirales ha fallado.

20 **[0072]** En un modo de realización preferido, esta invención también proporciona los medios y métodos para utilizar la sensibilidad a los inhibidores de la entrada viral para guiar el tratamiento de pacientes recién infectados por el VIH-1.

25 **[0073]** En un modo de realización preferido, esta invención también proporciona un medio y método para utilizar el tropismo del VIH-1 por el correceptor para guiar el tratamiento del VIH-1 o para guiar el tratamiento de pacientes en los que el tratamiento con fármacos antirretrovirales ha fallado.

**[0074]** En un modo de realización preferido, esta invención también proporciona el medio y método para utilizar el tropismo del VIH-1 por el correceptor para guiar el tratamiento de pacientes recién infectados por el VIH-1.

30 **[0075]** Estos métodos pueden servir para medir la neutralización del VIH-1 con anticuerpos para controlar la respuesta inicial de los anticuerpos protectores después de la vacunación.

**[0076]** Estos métodos pueden servir para medir la neutralización del VIH-1 con anticuerpos para controlar la respuesta inicial de los anticuerpos terapéuticos después de la vacunación.

35 **[0077]** Estos métodos pueden servir para medir la neutralización del VIH-1 con anticuerpos con el paso del tiempo para controlar la durabilidad de la respuesta inicial

de los anticuerpos protectores después de la vacunación.

**[0078]** Estos métodos pueden servir para medir la neutralización del VIH-1 con anticuerpos para desarrollar y optimizar el calendario de vacunación de estímulo primario que maximizan la potencia y la durabilidad de la vacunación.

5 **[0079]** Por ejemplo, en el caso del VIH-1, la proteína SU (gp120-SU) está estrechamente asociada con la proteína transmembrana de la envoltura (gp41-TM) que ancla el complejo a la membrana viral. Las proteínas de la envoltura gp120 y gp41 están derivadas mediante escisión de gp160, el precursor sin escindir del gen de la envoltura. La unión del VIH-1 a su receptor celular (CD4) y a su correceptor (o CCR5 o  
10 CXCR4) promueve cambios de conformación en la proteína TM que dan lugar a la fusión de la membrana viral y la celular y la penetración de la cápside viral en el citoplasma (Retroviruses, 1997). Aunque los nuevos inhibidores de la entrada del VIH se dirigen a las proteínas de la envoltura viral (gp120/gp41) o las proteínas del huésped (CD4, CCR5, CXCR4), se supone que la mayoría de las mutaciones  
15 asociadas con la resistencia en el VIH-1 se encuentran en el gen de la envoltura viral, ej. una forma probable en que los virus podrían evolucionar cambiará la utilización del correceptor. Los bloqueadores de entrada constituyen una clase novedosa de fármacos antirretrovirales, y tienen un potencial alto para una ofrecer una amplia actividad contra las actuales variantes de VIH-1 resistentes a múltiples fármacos.  
20 Dentro de la clase de los posibles bloqueadores de la entrada viral, se encuentran los inhibidores de fusión, los antagonistas del receptor/correceptor y las vacunas.

**[0080]** Sin embargo, es probable que los inhibidores de la entrada viral generen virus resistentes a los fármacos (a través de la mutación del gen de la envoltura) y compliquen, así, el tratamiento del paciente de forma similar a lo observado en el  
25 tratamiento del VIH con inhibidores de la proteasa (Protease Inhibitor, PRI) e inhibidores de la transcriptasa inversa (Reverse Transcriptase Inhibitor, RTI). De hecho, la aprobación de la agencia de Administración de Alimentos y Medicamentos del gobierno de los Estados Unidos (*Food and Drug Administration* o FDA) de cualquier otro fármaco nuevo que bloquee la entrada viral requerirá la evaluación de  
30 los datos de resistencia. La necesidad de una prueba de diagnóstico que mida la sensibilidad a los bloqueadores de entrada ha sido documentada en el caso del inhibidor de fusión T-20. Los virus que presentan una sensibilidad reducida a T-20 se han registrado después del paso in vitro en presencia del fármaco. En este momento, no hay disponibles ensayos fenotípicos convenientes que sean capaces de medir la  
35 sensibilidad a los fármacos que bloquean la entrada viral. En consecuencia, los médicos pronto se enfrentarán con el desafío de adaptar la terapia en ausencia de las

herramientas necesarias para tratar la sensibilidad a los fármacos. Por lo tanto, un ensayo fiable que evalúe con precisión la sensibilidad a los fármacos que inhiben la entrada viral en pacientes infectados resultaría muy valioso.

**[0080]** Por ejemplo, estimaciones recientes de la Organización Mundial de la Salud indican que, en todo el mundo, más de 33 millones de personas están infectadas por el VIH-1, el agente causante de la pandemia de SIDA. En los Estados Unidos, están infectadas casi un millón de personas, de las que 300.000 están recibiendo actualmente una terapia antiviral (CDC, 1999; WHO, 1999). Combatir el SIDA se ha convertido en un objetivo común en un esfuerzo sin precedentes de las agencias gubernamentales, los laboratorios académicos y la industria biotecnológica/farmacéutica. Catorce fármacos antivirales han sido aprobados por el FDA para el tratamiento de la infección del VIH-1 (Carpenter et al., 2000) y más de 20 fármacos adicionales están siendo evaluados en pruebas clínicas en la actualidad (PHRMA, 1999). Los fármacos aprobados inhiben la replicación del VIH-1 al interferir en las actividades enzimáticas de la proteasa (PR), o de la transcriptasa inversa (RT). Los inhibidores de PR (PRIs) bloquean la formación adecuada de las proteínas virales que son necesarias para la infección y la replicación del virus, mientras que los inhibidores de RT (RTIs) impiden que el virus copie su material genético. Debido a una potencia sub-óptima, los PRIs y RTIs actuales se utilizan casi siempre en combinación para reprimir la replicación viral (Carpenter et al., 2000).

**[0082]** Por lo tanto, se desea proporcionar un ensayo viral rápido, preciso y seguro capaz de evaluar:

33. la actividad de los inhibidores de la adhesión y la entrada viral (entre los que se incluyen los inhibidores de fusión, los inhibidores del receptor y del correceptor);
34. el tropismo viral por el receptor/correceptor para facilitar el diseño de fármacos inhibidores de la entrada viral;
35. los cambios en la sensibilidad de los virus a los fármacos de pacientes a los inhibidores de adhesión y entrada; y
36. la actividad de neutralización viral generada como respuesta a la vacunación mediante antígenos de proteínas de la envoltura viral

**[0083]** Los métodos de esta invención se pueden utilizar para cualquier enfermedad viral que pueda responder a un inhibidor de la entrada viral y en la que la sensibilidad a los fármacos antivirales y la resistencia a un inhibidor de la entrada viral constituyan una preocupación, por ejemplo, incluyendo, sin carácter limitativo, otros lentivirus (ej. el VIH-2), otros retrovirus (ej. el VLTH-1 y 2), hepadnavirus (ej. el virus humano de la hepatitis B), flavivirus (ej. el virus humano de la hepatitis C) y herpesvirus (ej. el



citomegalovirus humano).

**[0084]** Los bloqueadores de entrada constituyen una clase novedosa de fármacos antirretrovirales, y tienen un potencial alto para una ofrecer una amplia actividad contra las actuales variantes de VIH-1 resistentes a múltiples fármacos. Dentro de la clase de los posibles bloqueadores de la entrada viral, se encuentran los inhibidores de fusión, los antagonistas del receptor/correceptor y las vacunas.

#### Inhibidores de fusión

**[0085]** Los compuestos diseñados para inhibir de forma competitiva el cambio de conformación de TM, llamados inhibidores de fusión, son potentes inhibidores de la replicación del VIH-1. Aunque su actividad se ha demostrado tanto en sistemas de cultivo celular como en pacientes infectados por el VIH-1 (Wild et al., 1992; Judice et al., 1997; Kilby et al., 1998), ningún inhibidor de fusión ha sido aprobado todavía para el tratamiento de la infección del VIH-1 en los Estados Unidos. Los fármacos pertenecientes a esta clase, como T-20 y T-1249 (Trimeris Inc., USA), están sujetos a estudios clínicos avanzados.

#### Antagonistas del receptor/correceptor

**[0086]** Además de los inhibidores de fusión, que actúan después de que el VIH-1 haya interactuado con los receptores, se está trabajando mucho para desarrollar fármacos que impidan que el VIH-1 interactúe con CD4 o cualquiera de sus dos correceptores principales. La habilidad de dichos reactivos de inhibir la infección del VIH-1 se ha demostrado en sistemas de cultivo celular y en modelos animales. Se ha identificado compuestos de partida dirigidos a gp120, CD4, al correceptor CCR5 que utilizan los virus macrófago-trópicos (R5), o al correceptor CXCR4 que utilizan los virus trópicos de linfocitos T (X4) (Allaway et al., 1993; Reimann et al., 1995; Baba et al., 1999; Bridger et al., 1999).

**[0087]** En la actualidad, ningún antagonista del correceptor está aprobado para el tratamiento de la infección del VIH-1 en los Estados Unidos. Los fármacos pertenecientes a esas clases, como PRO 542 (Progenics Inc., USA), 5a8 (Tanox, USA), TAK-779 (Takeda Inc., Japan), y AMD-3100 (Anormed Inc., Canada), son los sujetos de estudios preclínicos o de estudios clínicos en fase inicial. Por lo tanto, un ensayo capaz de identificar y determinar el tropismo por el receptor/correceptor, que identifica con rapidez y precisión a los pacientes que están infectados por cepas de un virus trópico (ej. VIH-1), facilitaría el diseño y el tratamiento de fármacos inhibidores de la entrada viral.

#### Vacunas

**[0088]** Las vacunas también han demostrado ser una estrategia eficaz en la lucha

contra las infecciones virales patogénicas en humanos. Varias vacunas candidatas a prevenir la infección del VIH-1 están en desarrollo clínico. Las proteínas de la envoltura gp120 y gp41 son las candidatas más evidentes en la intensa búsqueda de una vacuna contra el VIH-1; muchas de las 11 vacunas candidatas en la evaluación clínica están basadas en la envoltura (PHRMA, 1999). En general, se cree que una vacuna de la envoltura efectiva puede generar anticuerpos neutralizantes que bloqueen la infección viral (Mascola et al., 2000). Por lo tanto, se necesita urgentemente un ensayo de rendimiento sensible que evalúe con fiabilidad la eficacia de dichos anticuerpos neutralizantes y no requiera un cultivo de virus prolongado. Dicho ensayo podría ayudar de forma significativa en la búsqueda de una vacuna contra el SIDA efectiva. Esto es especialmente cierto si se considera que las pruebas clínicas en fase avanzada incluyen a grandes poblaciones de miles de pacientes. Ya que los anticuerpos neutralizantes deberían prevenir la infección de células diana con éxito, un ensayo del receptor de la envoltura sería beneficioso como ensayo de neutralización viral.

**[0089]** Desafortunadamente, la mayoría de estas combinaciones farmacológicas son efectivas sólo durante un tiempo limitado debido, en gran parte, a la emergencia de virus resistentes a los fármacos. La falta de funciones de corrección inherentes a la RT y ARN polimerasa II junto con la replicación de alto nivel, que es propensa a sufrir errores, permite que los virus como el VIH-1 muten fácilmente (Coffin, 1995). Esta alta frecuencia de mutación contribuye a la habilidad del VIH-1 de evadir con éxito la terapia farmacológica a largo plazo. Como resultado, se produce un rebote de la carga viral. Se han descrito las mutaciones asociadas con la resistencia a cada uno de los 14 fármacos aprobados así como a muchos compuestos experimentales (Schinazi et al., 1999). En consecuencia, las variantes del VIH-1 resistentes a múltiples fármacos plantean un problema creciente en el cuidado de pacientes infectados. Para alcanzar un beneficio clínico a largo plazo, es conveniente seleccionar aquellos fármacos que reprimen al máximo la replicación viral y evitar los fármacos a los que el virus de un paciente es resistente (DHHs, 2000). Las soluciones a largo plazo pueden contar con pruebas de resistencia farmacológica que pueden guiar a los médicos en la selección de los fármacos más efectivos contra el virus del paciente. La necesidad de realizar pruebas de resistencia ha quedado confirmada en las directrices recientes del Departamento de Salud y Servicios Humanos de los Estados Unidos (*Department of Health and Human Services*, DHHs), que recomienda que las pruebas de resistencia se tienen que realizar de forma rutinaria cuando se trata a pacientes infectados por el VIH-1. Pruebas de sensibilidad también pueden servir de ayuda en el desarrollo de

nuevos fármacos dirigidos a los virus resistentes. Un reciente comité asesor del FDA (noviembre de 1999) recomendó que las pruebas de resistencia fueran utilizadas en el desarrollo de nuevos fármacos antivirales contra el VIH-1.

5 **[0090]** Se han aplicado varias estrategias a la evaluación de la sensibilidad a los fármacos antivirales. Las pruebas genotípicas analizan las mutaciones en la secuencia de nucleótidos subyacente, o genotipo, e intentan correlacionar esas mutaciones con la resistencia a los fármacos (Rodríguez-Rosado et al., 1999; Schinazi et al, 1999). Sin embargo, la relación entre genotipo y fenotipo es compleja y no se interpreta fácilmente y los resultados de dichas pruebas no son cuantitativos. El uso de datos de  
10 sensibilidad genotípica a los fármacos requiere la interpretación de expertos (Baxter et al., 1999) o de algoritmos informáticos y no predice siempre el resultado del tratamiento (Piketty et al., 1999).

**[0091]** Los ensayos de sensibilidad fenotípica a los fármacos miden directamente y cuantifican la habilidad de los virus de replicarse en presencia del fármaco. Las  
15 pruebas fenotípicas iniciales requerían un cultivo de virus prolongado y eran, en consecuencia, lentas, laboriosas y no se podían automatizar fácilmente para obtener un rendimiento alto (Japour et al., 1993). Como resultado, esas pruebas fenotípicas iniciales no se consideraban prácticas para la gestión de pacientes. El desarrollo de ensayos de virus recombinantes (Shi and Mellors, 1997); Hertogs et al., 1998)  
20 simplificó las pruebas fenotípicas y aumentó el rendimiento. Sin embargo, una desventaja importante de esos ensayos era un tiempo de respuesta prolongado de 4-8 semanas. Más recientemente, se han desarrollado ensayos de virus recombinantes y otros que son capaces de medir la sensibilidad a los fármacos durante una ronda simple de replicación (Zennou et al., 1998; Petropoulos et al., 2000), Como resultado,  
25 se ha producido una reducción espectacular del tiempo de respuesta a 8-10 días. Los pacientes en los que la terapia antirretroviral no ha tenido éxito pueden beneficiarse de los ensayos fenotípicos. Dichos ensayos son herramientas atractivas para la gestión de pacientes porque proporcionan una medida rápida y directa de la sensibilidad a los fármacos.

30 **[0092]** El ensayo de esta invención puede utilizarse con otras infecciones virales que surjan de infecciones debidas a otros virus pertenecientes a estas familias así como infecciones virales que surjan de virus de otras familias virales. Además, la prueba de sensibilidad y resistencia a los fármacos de esta invención es útil para examinar compuestos que crean enfermedades virales para las que no existe una terapia  
35 disponible en la actualidad.

**[0093]** La estructura, el ciclo vital y los elementos genéticos de los virus que podrían ser evaluados en la prueba de sensibilidad y resistencia farmacológica de esta invención serían conocidos en una de las destrezas comunes en la técnica. Para la práctica de esta invención, resulta útil, por ejemplo, la comprensión del ciclo de vida de un retrovirus, así como de los genes virales que se requieren para el rescate y la infectividad del retrovirus. Las células infectadas de forma retroviral liberan un virus de la membrana que contiene un genoma diploide del ARN. El virus, incrustado con una glicoproteína de la envoltura (que sirve para determinar el rango de infectividad del huésped), se adhiere a un receptor celular en la membrana plasmática de la célula que va a ser infectada. Después de su unión al receptor, el virus se internaliza y brota a medida que pasa por el citoplasma de la célula huésped. Durante su camino hacia el núcleo o ya en el mismo núcleo, las moléculas de transcriptasa inversa residentes en la cápside viral dirigen la síntesis del provirus de ADN bicatenario, una síntesis que se inicia con la unión de una molécula ARNt al ARN genómico viral. El provirus de ADN bicatenario se integra posteriormente en el genoma de la célula huésped, donde funciona como plantilla de transcripción para ambos ARNm que codifican las proteínas virales y el ARN del virión genómico, que serán empaquetados dentro de las partículas de la cápside viral. Durante el proceso de salida de la célula infectada, las partículas de la cápside viral se mueven a través del citoplasma, se adhieren al interior de la membrana plasmática de la célula recién infectada, y brotan, tomando trechos de la membrana que contienen el producto genético de la glicoproteína de la envoltura codificado de forma viral. Este ciclo de infección de la transcripción inversa, transcripción, traducción, ensamblaje del virión y geminación se repite una y otra vez a medida que la infección se extiende.

**[0094]** El ARN viral y, como resultado, el ADN proviral codifican varios elementos cis-reguladores que son esenciales para la finalización del ciclo vital de los virus. El ARN del virión transporta al promotor viral en su extremo 3'. Las acrobacias replicativas colocan al promotor viral en el extremo 5' del genoma proviral mientras el genoma viral se transcribe de forma inversa. Sólo en las repeticiones terminales largas (LTR) retrovirales 3' a 5' se encuentra el sitio de empaquetamiento viral. El ciclo de vida retroviral requiere la presencia de factores de transacción codificados de forma viral. La ADN polimerasa (pol)–transcriptasa inversa dependiente del ARN viral también está contenida dentro de la cápside viral y es esencial en el ciclo de vida viral, ya que es responsable de la conversión del ARN genómico en ADN proviral intermedio integrado. La glicoproteína de la envoltura viral, env, se necesita para la adhesión viral a la célula no infectada y para la propagación viral. También existen factores transactivadores de

transcripción, los llamados transactivadores, que pueden funcionar para modular el nivel de transcripción del provirus parental integrado. Normalmente, los virus de replicación competente (no defectuosos) son autosuficientes ya que codifican todos estos factores de transacción. Sus homólogos defectuosos no son autosuficientes.

5 **[0095]** En el caso de un virus de ADN, como el hepadnavirus, la comprensión del ciclo vital y de los genes virales requeridos para la infección es útil en la práctica de esta invención. El proceso de entrada del VHB no se ha definido bien. La replicación del VHB utiliza una plantilla de ARN intermedia. En la célula infectada, el primer paso de la replicación es la conversión del ADN asimétrico circular relajado (ADNrc) en ADN  
10 circular cerrado mediante un enlace covalente (ADNccc). Este proceso, que ocurre dentro del núcleo de las células hepáticas infectadas, implica la finalización de la síntesis de la cadena positiva de ADN y la ligación de los extremos del ADN. En el segundo paso, el ADNccc es transcrito por la ARN polimerasa huésped para generar una plantilla de ARN de 3,5 kB (el pregenoma). Este pregenoma está combinado con  
15 proteínas en la cápside viral. El tercer paso implica la síntesis de la primera cadena negativa del ADN al copiar el ARN pregenómico utilizando la transcriptasa inversa de la proteína P codificada de forma viral. La proteína P también funciona como iniciador de ADN en la cadena negativa. Por último, la síntesis de la segunda cadena de ADN en sentido positivo ocurre al copiar la primera cadena de ADN, mediante la actividad  
20 de la ADN polimerasa de la proteína P y un oligómero del ARN viral como iniciador. El pregenoma también transcribe ARNm para las principales proteínas estructurales de la cápside.

Diseño y métodos

37) Construcción de un vector de expresión para una proteína de la envoltura viral que  
25 es capaz de aceptar segmentos derivados de pacientes que codifican la proteína de la envoltura

**[0096]** En un modo de realización, se construyó un vector de expresión de la envoltura capaz de expresar las proteínas de la envoltura del VIH-1 en células transfectadas. Se han descrito vectores de expresión similares, incluyendo un plásmido (pAmphoEnv)  
30 construido para expresar la proteína de la envoltura del virus anfotrópico de la leucemia murina (A-MLV) como se describe en la patente estadounidense número 5.837.464 y en Petropoulos et al., 2000. El vector pAmphoEnv utiliza el gen de expresión inmediata temprana promotor del citomegalovirus (CMV) humano y la secuencia de señal de poliadenilación del SV40 para producir ARNm de la envoltura  
35 de A-MLV en células transfectadas. El plásmido pAmphoEnv es modificado al suprimir el gen de envoltura de A-MLV e introducir sitios de escisión de la enzima de restricción

que puedan permitir la inserción de fragmentos de la envoltura viral derivados de una variedad de cepas aisladas, como el VIH-1. En el caso del VIH-1, el marco abierto de lectura de la envoltura abarca aproximadamente 2.600 nucleótidos y codifica la poliproteína de envoltura, gp160. La poliproteína gp160 es escindida por una proteasa celular como la furina para producir dos subunidades: gp41 y gp120. Los vectores de expresión de la envoltura del VIH-1 se pueden construir en las siguientes fases:

(a) Sustitución de las secuencias de ácido nucleico de la envoltura de A-MLV a partir del vector de expresión de la envoltura (pAmphoEnv) con un sitio poliligador de clonación múltiple:

10 **[0097]** Las secuencias de ácido nucleico de la envoltura de A-MLV pueden ser suprimidas del vector pAmphoEnv mediante digestión con enzimas de restricción. El vector digerido puede ser recirculado mediante ligación a un poliligador oligonucleótido dúplex que contiene cuatro sitios de restricción interna únicos (a, b, c, d) para la inserción de las secuencias de la envoltura. La reacción de ligación puede utilizarse  
15 para transformar *Escherichia coli* y los clones moleculares que contienen la secuencia de poliligadores correcta se pueden identificar y confirmar mediante mapas de restricción y secuenciación de ADN, respectivamente. La introducción de sitios únicos de clonación múltiple en el vector puede facilitar la inserción de secuencias de la envoltura del VIH-1. Los sitios de restricción dentro del poliligador se pueden elegir  
20 basados en la aparición poco frecuente en secuencias de la envoltura del VIH-1 (base de datos del VIH-1 del Laboratorio Nacional de Los Alamos, Estados Unidos, [www.lanl.gov](http://www.lanl.gov)). Este vector se puede llamar pCX. La funcionalidad del vector pCX se puede demostrar insertando un gen reportero o ácido nucleico indicador, como la luciferasa de luciérnaga, en el sitio de clonación múltiple del pCX y midiendo una señal  
25 a partir de la actividad del ácido nucleico indicador o del gen reportero en células transfectadas. Como se utiliza aquí, "ácido nucleico indicador" se refiere a ácido nucleico que codifica una proteína, estructura de ADN o ARN que o directamente o mediante una reacción da lugar a una señal calculable o perceptible, ej. el color o la luz de longitud de onda calculable o la generación de una estructura específica de  
30 ADN o ARN utilizada como un indicador que podría ser amplificada por medio de cualquier prueba entre una variedad de pruebas de amplificación cuantitativa.

(b) Inserción de las secuencias de envoltura viral en el vector de expresión de la envoltura pCX:

35 **[0098]** Utilizando iniciadores mutagénicos para la amplificación de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), los fragmentos de la envoltura viral que se generan contienen dos sitios únicos de restricción (a, b y c, d, respectivamente) adyacentes a

los codones de inicio y de terminación de, por ejemplo, el marco abierto de lectura de la envoltura del VIH-1. La introducción de dos sitios de restricción únicos en cada extremo del marco abierto de lectura de la envoltura puede mejorar las posibilidades de clonar fragmentos de la envoltura del VIH-1 que albergan sitios de restricción interna para cualquiera de las enzimas que se encuentran en el sitio de clonación múltiple del vector pCX.

**[0099]** En el caso del VIH-1, dos clones moleculares del VIH-1 bien identificados con diferencias conocidas en el gen de la envoltura, NL4-3 (cepa de laboratorio de linfocitos T trópicos inductores de sincitios) y JR-CSF (una cepa aislada primaria macrofagotrópica no inductora de sincitios), se pueden utilizar como plantilla para la amplificación de la reacción en cadena de la polimerasa. Los productos de la amplificación de 2.600 nucleótidos pueden ser digeridos con dos enzimas de restricción (cada enzima escindiendo en un extremo del fragmento; ej. a y c o b y d) e insertadas después en el vector pCX mediante ligación y transformación de *Escherichia coli*. Los clones moleculares que contienen las secuencias de la envoltura apropiadas pueden ser identificados por mapas de restricción y confirmados por secuenciación de ADN. Los plásmidos resultantes, pHIVenv (NL4-3) y pHIVenv (JR-CSF), pueden utilizarse para expresar proteínas de la envoltura del VIH-1 en células transfectadas (**Figura 1A**). La funcionalidad de los vectores de expresión de la envoltura, como en los vectores pHIVenv, se puede demostrar al evaluar la síntesis de la envoltura viral en células transfectadas (Western Blot), y mediante su habilidad de pseudotipar los vectores de retrovirus deficientes de la envoltura. Las reservas de virus con títulos altos que utilizan líneas de células de riñón embrionarias humanas 293 han sido probadas (Petropoulos et al., 2000). Sin embargo, la presente invención no está restringida a esas líneas celulares. Otras líneas celulares adecuadas utilizadas como una primera célula para la transfección de ácido nucleico obtenido del paciente que codifica una proteína de la envoltura viral incluyen, como un ejemplo y sin estar limitadas a la presente invención, 5.25; HOX; U87; MT2; PM1; CEM; etc. La línea celular será manipulada de forma óptima para expresar uno o más correceptores.

(c) Modificación del vector pCX para mejorar la eficiencia de clonación de las secuencias de la envoltura viral:

**[0100]** Para mejorar la eficiencia de clonación de los fragmentos de la envoltura viral, el vector de expresión pCX se puede modificar insertando un cassette de genes killer de bacterias (ej. control del gen b de muerte celular (ccdB) o de un miembro de la familia genética hok-killer) bajo control del promotor *lac* de *Escherichia Coli* en el sitio de clonación múltiple (the et al., 1990; Bernard and Couturier, 1992; Bernard et al.,

1993). El vector modificado se llama pCXccdB. La transcripción del gen killer ccdB es reprimida en cepas bacterianas que expresan el represor lacI<sup>q</sup>, como el JM109. Esta cepa o una equivalente se pueden utilizar para propagar los plásmidos que son portadores del gen asesino ccdB que están bajo control del promotor lac. Al contrario, en este sistema las cepas bacterianas que no sobreexpresan el represor lacI<sup>q</sup>, como DH5á y Top10, no pueden mantener los plásmidos que expresan el gen ccdB. La actividad de ccdB puede matar a los transformantes. Las células DH5á y Top10 se pueden comprar de varios vendedores (Life Technologies o Invitrogen). Utilizando este enfoque de clonación selectiva, el vector de expresión parental se propaga en una cepa bacteriana lacI<sup>q</sup>. El vector es digerido con dos enzimas de restricción que eliminan el cassette génico ccdB y, en el caso del VIH-1, son compatibles con la inserción de secuencias de la envoltura del VIH-1 (a, b, c, d). Después de la ligación del vector y de los fragmentos de la envoltura, una cepa de bacterias que carecen de lacI<sup>q</sup> se transforma. Una vez transformadas, las bacterias que contienen plásmidos en los que las inserciones de la envoltura viral han reemplazado al gen killer ccdB pueden crecer. Las bacterias que contienen plásmidos que retienen o reconstituyen el gen killer ccdB no pueden sobrevivir. De ese modo, la población de bacterias transformadas es enriquecida por los plásmidos que contienen inserciones de la envoltura viral, pero carecen del vector parental que contiene el gen killer ccdB. La construcción del vector pCXccdB no es esencial para el éxito de la fase I de este proyecto, pero se espera que mejore significativamente la eficiencia de la clonación de secuencias de la envoltura del VIH-1 derivadas de muestras de pacientes. Así, se puede mejorar la probabilidad de mantener la heterogeneidad de las secuencias virales. La estructura del vector pCXccdB se puede confirmar mediante mapas de restricción y secuenciación de ADN.

(d) Inserción de las secuencias de la envoltura viral en el vector de expresión pCXccdB

**[0101]** La funcionalidad del vector pCXccdB se puede evaluar estableciendo reacciones de ligación que contienen secuencias de la envoltura viral y ADN del vector pCXccdB digerido de manera incompleta. Después de la transformación bacteriana, el ADN plásmido se puede preparar desde clones individuales de bacterias y analizar mediante digestión de restricción para la presencia de fragmentos de la envoltura viral y la ausencia de secuencias de ccdB. La viabilidad de este enfoque se evalúa por medio de la amplificación de la región de la envoltura desde un total de 13 clones del VIH-1 disponibles (pCRII-91US005.11, pCRII-91006.10, pCRII-92US657.1, pCRII-92US711.14, pCRII-91US712.4, pCRII-92US714.1, pCRII-91HT652.11, pCRII-92BR020.4, pCRII-91HT651.1A, pCRII-92HT593.1, pCRII-92HT594.10, pCRII-



92HT596.4, pCRII-92HT599.24), que se pueden obtener a través del programa de referencia de reactivos de investigación del SIDA (AIDS Research Reagent Reference Program, ARRRP) de Rockville, Maryland. Cada fragmento se puede insertar en pCXccdB y la estructura de los vectores de expresión pHIVenv resultantes se puede confirmar mediante mapas de restricción y/o secuenciación de ADN. La funcionalidad de cada vector pHIVenv se puede demostrar al medir la síntesis de las proteínas de la envoltura del VIH-1 en células transfectadas (Western Blot), y mediante su habilidad de pseudotipar vectores de retrovirus con deficiencias en la envoltura.

2) Construcción de un vector de expresión viral bioseguro que comprende ácido nucleico indicador en lugar de la región que codifica la proteína de la envoltura

**[0102]** Un vector viral bioseguro se construye para evaluar inhibidores de la entrada viral de acuerdo con medios y métodos similares como se describe en la patente estadounidense número 5.837.464 y en Petropoulos et al., 2000 utilizados para evaluar inhibidores de PR y RT. El vector de expresión viral puede ser cotransfectado dentro de células junto con los vectores de expresión de la envoltura (descritos arriba) para producir reservas de virus con títulos altos. Dichas reservas de virus pueden ser evaluadas para medir su sensibilidad a los inhibidores de la entrada viral, incluyendo fármacos antivirales y anticuerpos neutralizantes. En el caso del VIH-1, el vector de expresión viral puede ser generado a partir de NL4-3, un clon molecular infeccioso del VIH-1 bien identificado. La repetición terminal larga (LTR) 5' que controla la expresión del gen viral puede ser modificada para que la transcripción de los genes virales en células transfectadas sea conducida por el promotor temprano intermedio de CMV (Naviaux et al., 1996). La mayor parte del gen de la envoltura se puede eliminar, pero los elementos de control importantes como el elemento de respuesta de rev (RRE) y proteínas accesorias que codifican regiones (rev, tat) se retienen. En lugar de las secuencias de la envoltura eliminadas, se inserta un ácido nucleico indicador, como un cassette de genes reporteros de luciferasa de luciérnaga que está bajo control de las secuencias promotoras-amplificadoras del CMV (Figuras 1B y 3). La infección del virus se puede controlar midiendo la actividad de luciferasa en células infectadas. Es concebible, aunque improbable, que la recombinación interplásmida entre el vector retroviral y, por ejemplo, las secuencias de pHIVenv en células transfectadas pueda llevar a la generación de VIH-1 infeccioso. En un esfuerzo de generar un vector bioseguro, se puede llevar a cabo la introducción de varias alteraciones genéticas en el genoma del VIH. Por ejemplo, se puede conseguir la delección de la mayor parte del gen de envoltura, a la vez que se retiene la secuencia de control importante, RRE, y también la delección de las secuencias transcripcionales de amplificación en la región

U3 de la LTR 3' del vector (Figura 2). Durante la replicación del genoma retroviral, la región U3 que se encuentra en el extremo 3' del genoma del virus funciona como la plantilla para la región U3 de la LTR 5' del provirus en células infectadas. Dichos provirus carecen del elemento promotor fuerte en la región U3 de la LTR 5' y, por tanto, son incapaces de producir ARN retroviral en células infectadas. Esta estrategia de auto-inactivación (SIN) se ha utilizado con éxito para varios sistemas de vectores retrovirales, incluyendo el VIH-1 (Hwang et al., 1997; Miyoshi et al, 1998). En el ensayo de la presente invención, la expresión del gen viral no se requiere en células infectadas porque la infección viral se mide con una señal detectable producida por el ácido nucleico indicador, como la producción de actividad de luciferasa, conducida por su propio promotor independiente (Figura 1B). La eliminación de las secuencias de la envoltura y de la región transcripcional de amplificación (U3) se puede realizar mediante procesos de clonación molecular estándar y cada delección se puede verificar con un análisis de secuencias de ADN.

**[0103]** La funcionalidad de este vector, por ejemplo en el caso del VIH-1, llamado pHIVlucU3, se puede demostrar mediante la co-transfección de células 293 con el vector pHIVenv descrito arriba. La transcomplementación eficiente de proteínas virales producida por ambos vectores en las células transfectadas puede llevar a la producción de partículas virales. Las partículas virales se pueden cultivar desde sobrenadantes de cultivo y se pueden analizar mediante Western blot. Los títulos de virus pueden cuantificarse mediante solicitudes rutinarias de p24 ELISA, PCR reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa o ensayos TaqMan.

**[0104]** No es necesario producir un vector de expresión viral auto-inactivante para llevar a cabo la presente invención, pero es aconsejable para mejorar la reproducibilidad y la bioseguridad del ensayo.

3) Identificación de líneas celulares adecuadas que expresan receptores y correceptores y que refuerzan la infección viral

**[0105]** Las distintas líneas celulares de mamíferos que se han descrito antes y son conocidas por reforzar la infección de un virus concreto pueden ser evaluadas. Como se ha tratado aquí para un modo de realización relacionado con el VIH-1, el ensayo se puede realizar (a) cotransfectando una primera célula con pHIVenv y pHIVlucU3, (b) cultivando virus después de la transfección, (c) utilizando dicho virus para infectar una segunda célula, tanto en presencia como en ausencia de inhibidores de la entrada viral y (d) midiendo la producción de luciferasa en células infectadas.

**[0106]** La tabla 1 enumera los ejemplos representativos de dichas líneas celulares evaluadas para la infección del VIH-1, incluyendo la línea celular y su

receptor/correceptor asociado. Varias de estas líneas de células se pueden obtener de bancos públicos de células.

**[0107]** Las partículas virales recogidas de cultivos de células 293 transfectadas se pueden utilizar para infectar una variedad de líneas celulares diferentes. En el caso del VIH-1, el vector pHIVluc $\Delta$ U3 contiene deleciones en el gen de la envoltura y el promotor-amplificador de U3 como se ha descrito anteriormente. Por lo tanto, la infección de una línea celular permisiva con partículas virales producidas por ese vector se restringe a una única ronda de replicación. Esto incluye (a) la adhesión y la entrada del virus, intervenidas por las proteínas de la envoltura viral producidas en trans mediante el vector pHIVenv como se ha descrito, (b) la conversión de ARN monocatenario viral en ADN bicatenario mediante transcriptasa inversa, y (c) la integración del ARN viral en el genoma de la célula huésped (formación del provirus). La transcripción activa de los genes virales mediante ARN polimerasa II que ocurre normalmente en células infectadas después de la integración proviral se puede restringir a través de la supresión de secuencias promotoras-amplificadoras virales esenciales in el vector pHIVluc $\Delta$ U3. Sin embargo, esa restricción no puede interferir con la expresión del gen de luciferasa en células infectadas, ya que ese gen es conducido, independientemente de la expresión del gen viral, mediante un promotor de CMV interno (**Figura 1B**). La cantidad de actividad de luciferasa que se produce después de la infección se puede utilizar como medida de la infectividad viral.

**[0108]** La adhesión y la entrada del VIH-1 en las células huésped requieren una interacción con un receptor primario (CD4) y uno de los varios correceptores, normalmente CCR5 o CXCR4. Las líneas celulares que expresan varias combinaciones de CD4, CCR5 y CXCR4 pueden ser evaluadas. En particular, 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 el receptor CD4 por sí solo o, o el correceptor CCR5 por sí solo o el correceptor CXCR4 por sí solo, pueden funcionar como controles útiles y se pueden utilizar para evaluar las cepas de VIH-1 aisladas que no requieren unión con CD4 o que utilizan correceptores distintos de CCR5 y CXCR4. El criterio principal para juzgar la idoneidad de las líneas celulares puede ser la infectividad medida por la producción de luciferasa ( $10^4$ - $10^6$  unidades ligeras relativas). Además, las líneas celulares se pueden evaluar basadas en tasas de crecimiento, viabilidad, estabilidad y otros parámetros que se consideren necesarios. Las líneas celulares se pueden seleccionar para que sean fáciles de mantener y, por ejemplo, produzcan grandes cantidades de actividad de luciferasa después de la infección, que puede ser realizada mediante

distintos tropismos por los receptores de la envoltura, ej. CD4/CXCR4 y CD4/CCR5. Líneas celulares adicionales bien identificadas que refuerzan, por ejemplo, la replicación del VIH y expresan el receptor y los correceptores del VIH-1 (ej. CEM-NKr-CCR5; categoría de liberación a) están disponibles a través de bancos públicos como el ARRRP.

**[0109]** Asimismo, las líneas celulares se pueden amplificar mediante procedimientos estándar, como la promoción de la infección al añadir Polybrene a las células (Porter et al., 1998). Por ejemplo, en el caso del VIH, se puede identificar otras posibles líneas celulares para su utilización con la presente invención mediante la infección de cepas de VIH-1 del laboratorio y la comparación de las títulos de infectividad de virus recombinantes a las obtenidas con VIH-1 infeccioso o mediante la transfección de células directamente con los plásmidos de expresión viral descritos en esta publicación, y la puntuación para la producción de virus. La acumulación de transcripciones virales se puede comprobar con la utilización de una reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR) cuantitativa. Las líneas celulares apropiadas para otros virus se pueden identificar de una manera similar.

**[0110]** La presente invención puede optimizar las condiciones del ensayo y permitir las pruebas de alto rendimiento de muestras de pacientes mediante automatización. Los métodos de preparación de muestras pueden ser optimizados para capturar de manera eficiente los ARNs virales del genoma y de la envoltura. Las condiciones de la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa se pueden optimizar para posibilitar la amplificación de las secuencias de la envoltura viral derivadas de pacientes, como las secuencias de la envoltura del VIH-1 (~2,600 pares de bases) a bajas cargas virales (~500 copias por ml).

#### 4) Demostración de la utilidad de la prueba

**[0111]** La utilidad del ensayo de la presente invención se demuestra con los resultados logrados a partir de: (1) pruebas de inhibición, dependiente de la dosis, de la entrada viral en presencia de inhibidores bien identificados y (2) pruebas de inhibición, dependiente de la dosis, de la infección en presencia de anticuerpos neutralizantes del VIH-1 bien identificados.

**[0112]** Las siguientes aplicaciones para el ensayo de entrada viral han sido evaluadas:

- i) detectar la inhibición de la replicación del VIH-1 mediante inhibidores de la adhesión y la entrada del virus (incluyendo inhibidores de fusión, de receptor y de correceptor);
- ii) medir los cambios en la sensibilidad de los inhibidores de la adhesión y la entrada del VIH-1, y
- iii) detectar la actividad neutralizante de los anticuerpos generada en respuesta a las

vacunas dirigidas contra las proteínas de la envoltura del VIH-1.

**[0113]** En un modo de realización preferido, el ensayo se puede realizar (a) cotransfectando una primera célula con los vectores pHIVenv y pHIVluc $\Delta$ U3, (b) cultivando virus después de aproximadamente 48 horas después de la transfección, (c) utilizando ese virus para infectar a una segunda célula, tanto en presencia como en ausencia de inhibidores de la entrada viral y (d) midiendo la producción de luciferasa aproximadamente 48-72 horas después de la infección. La inhibición, dependiente de la dosis, de la replicación del VIH-1 se puede evaluar en contraste con una amplia gama de concentraciones de inhibidores de la entrada viral utilizando un formato de 96 pocillos. La gama de concentración apropiada puede ser determinada empíricamente para cada inhibidor. Los datos pueden ser determinados como el porcentaje de inhibición de actividad de luciferasa vs. la concentración farmacológica ( $\log_{10}$ ). El análisis de los datos se puede realizar mediante un software informático. Las curvas de inhibición se utilizan para determinar las concentraciones inhibidoras en un 50% ( $IC_{50}$ ) para fármacos o anticuerpos específicos (**Figura 6**).

**[0114]** Las proteínas de la envoltura derivadas de una variedad de cepas aisladas del VIH-1 bien identificadas se evalúan mediante los vectores pHIVenv construidos como se describe anteriormente. Para definir el tropismo por el correceptor de la envoltura, en el caso del VIH-1, la infección mediante células que expresan CD4 más CXCR4 y CD4 más CCR5 se evalúa como se describe anteriormente. Una amplia variedad de compuestos que se conocen por inhibir la entrada del VIH-1 (Tabla 2), incluyendo agentes no específicos como polianiones sulfonados (sulfato de dextrano y heparina) se pueden utilizar en el ensayo de la presente invención. Quimiocinas como Rantes y SDF-1, los ligandos naturales de los receptores de quimiocina CCR5 y CXCR4, respectivamente (ver Alkhatib et al., 1996; Bleul et al., 1996), son también apropiados para ser utilizados con la presente invención. Asimismo, inhibidores de la entrada viral como T20 y T1249 (Trimeris, Inc.), PRO 542 (Progenics), 5a8 (Tanox) han sido utilizados para evaluar la utilidad del ensayo de la presente invención.

**[0115]** La toxicidad farmacológica en células diana se evalúa por medio de los ensayos estándar de viabilidad o citotoxicidad (ej. tinción por exclusión, MTS\_ ATP).

**[0116]** Se han descrito los VIH-1 mutantes que muestran sensibilidad reducida al inhibidor de fusión T20 (Rimsky et al., 1998) y las determinaciones genéticas (mutaciones) que permiten que esos virus se repliquen en presencia del mapa farmacológico dentro de la proteína de la envoltura (gp41-TM). Para demostrar que el ensayo de la presente invención es capaz de medir cambios en sensibilidad a los fármacos (ej. resistencia), (a) se generan vectores pHIVenv que transportan dichos

genes mutantes de la envoltura, (b) se cotransfectan las primeras células por medio de esos vectores y el vector pHIVluc $\Delta$ U3, (c) se cultivan los virus que transportan dichas proteínas mutantes de la envoltura y (d) se evalúa la infectividad de los virus en presencia de T20. Una sensibilidad farmacológica reducida a T20 es evaluada mediante la comparación de la IC<sub>50</sub> de los virus que portan proteínas mutantes de la envoltura con los que carecen de las mutaciones de resistencia farmacológica definidas. Los virus que portan las proteínas de la envoltura con mutaciones de resistencia farmacológica pueden mostrar valores de IC<sub>50</sub> más altos que los virus que portan proteínas de la envoltura que carecen de mutaciones de resistencia farmacológica. Es decir, la inhibición puede requerir una concentración farmacológica más alta (equivalente a los datos que presenta la **Figura 8**). Las mutaciones de resistencia farmacológica se pueden introducir en vectores de expresión de la envoltura (pHIVenv) mediante técnicas estándar de mutagénesis de sitio dirigido según protocolos estándar (Petropoulos et al., 2000; Ziermann et al., 2000).

**[0117]** Es por todos aceptado que las vacunas efectivas que protegen de la infección del VIH-1 deberían provocar una fuerte respuesta inmunitaria humoral caracterizada por anticuerpos neutralizantes de reacción cruzada en general. En consecuencia, el suero de los individuos vacunados se evalúa habitualmente para comprobar la presencia de anticuerpos neutralizantes con títulos altos dirigidos al inmunogen. Más recientemente, utilizando el modelo macaco del virus quimérico (VISH) del virus de la inmunodeficiencia del simio (VIS)/VIH-1, Mascola y sus compañeros han mostrado que la transferencia pasiva de tales anticuerpos neutralizantes causó la carga viral reducida después del desafío de las mucosas (Mascola et al., 2000). El ensayo de entrada viral se puede utilizar con rapidez y fiabilidad para determinar la actividad de neutralización viral de los anticuerpos generada como respuesta a las vacunas dirigidas a antígenos de la envoltura, como los antígenos de la envoltura del VIH-1. Por ejemplo, el ensayo puede (a) generar vectores pHIVenv que expresen una variedad de proteínas de la envoltura bien identificadas, (b) cotransfectar una primera célula mediante esos vectores y el vector pHIVluc $\Delta$ U3, (c) cultivar virus e incubar con diluciones en serie de preparados de anticuerpos o suero de vacunación, (d) hacer un análisis para determinar la infectividad de esos virus en una segunda célula. El análisis de los datos y las determinaciones de IC<sub>50</sub> se pueden realizar como se ha descrito anteriormente y en el material publicado. En el caso del VIH-1, los virus se pueden seleccionar para que representen distintos antecedentes genéticos del VIH-1 (ej. clado A, B, C, D, E, F), tropismos por células y correceptores distintos (macrófago/CCR5, linfocito T/CXCR4) y distintas propiedades de la envoltura (crecimiento adaptado al

laboratorio o cepa aislada, inductor y no inductor de sinticios (Tabla 2). Puede ser beneficioso preparar reservas de un título definido de cada virus para optimizar la sensibilidad y reproducibilidad del ensayo mediante una entrada de virus de aproximadamente 20-100 TCID<sub>50</sub>/pocillo y hacer ajustes según sea necesario. Los  
 5 preparados de anticuerpos pueden ser seleccionados a partir de propiedades de neutralización que hayan sido previamente documentadas, o bien propiedades funcionales, como la habilidad de neutralizar cepas aisladas primarias, o bien físicas, como la habilidad para unir epítomos gp120 o gp41 específicos (Tabla 2). La realización del ensayo de la presente invención puede juzgarse a la luz de la actividad  
 10 de esos reactivos de anticuerpos bien identificados en ensayos de neutralización viral convencionales como se describe en las publicaciones científicas. El suero de un grupo representativo en general de individuos infectados por el VIH-1 se puede utilizar para establecer una variedad apropiada de diluciones de suero que puede maximizar la sensibilidad del ensayo, pero minimizar la citotoxicidad. La citotoxicidad se puede  
 15 evaluar mediante viabilidad estándar o ensayos de citotoxicidad (ej. tinción de exclusión, MTS, ATP)

**[0118]** Los siguientes ejemplos se presentan para ilustrar y explicar más la presente invención y no deberían ser considerados con carácter limitativo en ningún caso.

**EJEMPLO 1**

20 **Medición de la sensibilidad farmacológica fenotípica a los inhibidores de la entrada del VIH-1**

**[0119]** Este ejemplo proporciona un medio y método para calcular con precisión y reproducibilidad la sensibilidad a los inhibidores de adhesión y entrada del VIH-1 (hasta ahora referidos en conjunto como entrada). Basado en este ejemplo, el medio y  
 25 método para calcular la sensibilidad a los inhibidores de entrada del VIH-1 se puede adaptar a otros virus, incluyendo, sin carácter limitativo, otros lentivirus (ej. VIH-2), otros retrovirus (ej. VLTH-1 and 2), hepadnavirus (ej. el virus humano de la hepatitis B), flavivirus (ej. el virus humano de la hepatitis C) y herpesvirus (ej. el citomegalovirus humano). Este ejemplo proporciona también un medio y método para calcular  
 30 alteraciones (incrementos y disminuciones) en la sensibilidad a los inhibidores de entrada.

**[0120]** Las mediciones de la sensibilidad a los inhibidores de entrada se realizan mediante las adaptaciones del medio y método de pruebas fenotípicas de sensibilidad y resistencia farmacológica descritas en la patente estadounidense 5.837.464  
 35 (Publicación internacional número WO 97/27319).

**[0121]** Un vector, un ejemplo del vector de expresión de la envoltura, (pHIVenv) está

diseñado para expresar la poliproteína de la envoltura (gp160) codificada por las secuencias de la envoltura del VIH derivadas de pacientes (**Figura 1**). Después, gp160 es escindido por una proteasa celular para generar las subunidades de la superficie (gp120SU) y transmembrana (gp41TM) que comprenden la proteína de la envoltura en la superficie de las partículas del virus del VIH-1. Un segundo vector, un ejemplo del vector de expresión viral, (o pHIVluc o pHIVluc U3) está diseñado para expresar ARNs genómicos y subgenómicos y todas las proteínas del VIH excepto la poliproteína de la envoltura (**Figuras 1A-1B**).

**[0122]** En esta aplicación, el/los segmento(s) derivados del paciente corresponden a la región codificadora (~2,5 kB) de la poliproteína de envoltura del VIH-1 (gp160) y representan o (a) secuencias de la envoltura amplificadas por la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR) mediante ARN viral aislado del virus derivado de individuos infectados por el VIH, o (b) secuencias de la envoltura derivadas de clones moleculares del VIH-1 que contienen mutaciones específicas introducidas por medio de mutagénesis de sitio dirigido de un clon molecular parental (normalmente NL4-3).

**[0123]** El aislamiento de ARN viral fue realizado mediante procedimientos estándar, ej. RNeasy Total RNA Isolation System, Promega, Madison WI o RNeasy, Tel-Test, Friendswood, TX). El protocolo RT-PCR fue dividido en dos pasos. Una transcriptasa inversa retroviral [ej. Superscript II (Invitrogen, Life Technologies) la transcriptasa inversa del M-MuLV de Moloney (Roche Molecular Systems, Inc., Branchburg, NJ) o la transcriptasa inversa del virus de la mieloblastosis aviar (AMV), (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN)] fue utilizada para copiar ARN viral en la primera cadena del ADNc. Después, el ADNc se amplificó a un número alto de copias por medio de la ADN polimerasa termoestable [ej. Taq (Roche Molecular Systems, Inc., Branchburg, NJ), Tth (Roche Molecular Systems, Inc., Branchburg, NJ), PrimeZyme (aislado de *Thermus brockianus*, Biometra, Gottingen, Germany)] o una combinación de polimerasas termoestables como se describe para la realización de “reacción en cadena de la polimerasa larga” (Barnes, W.M., (1994) Proc. Natl. Acad. Sci, USA 91, 2216-2220) [ej. Expand High Fidelity PCR System (Taq + Pwo), (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN) O GeneAmp XL PCR kit (Tth + Vent), (Roche Molecular Systems, Inc., Branchburg, NJ), Advantage-2, (CloneTech).

**[0124]** El Oligo-dT fue utilizado para la transcripción inversa del ARN viral en la primera cadena de ADNc. Los iniciadores de la reacción en cadena de la polimerasa de la envoltura, el indicador directo Xho/Pin y el iniciador reverso Mlu/Xba (**Tabla 3**) fueron utilizados para amplificar los segmentos derivados de pacientes. Estos



iniciadores están diseñados para amplificar el gen de la envoltura de -2,5 kB que codifica la poliproteína de la envoltura gp160, mientras introduce los sitios de reconocimiento Xho I y Pin AI en el extremo 5' del producto de amplificación de la reacción en cadena de la polimerasa y los sitios Mlu I y Xba I en el extremo 3' del producto de amplificación de la reacción en cadena de la polimerasa.

**[0125]** Los segmentos derivados de pacientes (producto de amplificación de la secuencia de envoltura 2,5 kB) se insertaron en los vectores de expresión de la envoltura del VIH-1 por medio de la digestión de la endonucleasa de restricción, la ligación del ADN y los métodos de transformación bacteriana como se describen en la patente estadounidense número 5.837.464 (Publicación internacional número WO 97/27319), con adaptaciones de poca importancia. El producto de amplificación de ~2,5 kB fue digerido con Xho I o Pin AI en el extremo 5' y Mlu I o Xba en el extremo 3'. La productos de digestión resultantes fueron ligados, mediante ADN ligasa, en los sitios 5' Xho I/Pin AI y 3' Mlu I/Xba I de los vectores de expresión pCXAS o pCXAT modificados. Se ha descrito la construcción de los vectores pCXAS y pCXAT [ejemplo 6, patente estadounidense 5.837.464 (Publicación internacional número WO 97/27319)]. Los vectores modificados pCXAS y pCXAT 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 de sitio dirigido, para que los cuatro sitios se localizaran del 5' al 3' en el siguiente orden: Xho I, Pin AI, Mlu I y Xba I. En un modo de realización preferido, los productos de amplificación de 2,5 kB fueron digeridos con Pin AI y Mlu I y ligados en el 5' Pin AI y en el 3' Mlu I del vector de expresión pCXAS modificado. Los productos de reacción de ligación se utilizaron para transformar E.coli. Después de un período de incubación de 24-36 horas a 30-37° C, el ADN plásmido del vector de expresión fue purificado a partir de los cultivos de E.coli. Para asegurar que los preparados del vector de expresión representan adecuadamente las cuasi-especies del VIH presentes en el suero de un paciente dado, muchas (>100) transformantes de E.coli independientes se juntaron y se utilizaron para los preparados de ADN plásmido de pHIVenv. Los vectores que se recopilan de esta manera a fin de expresar proteínas de la envoltura derivadas de virus de pacientes se llaman en conjunto pHIVenv (**Figuras 1 y 3**).

**[0126]** Los vectores de expresión del VIH genómico pHIVluc y pHIVluc@U3 están diseñados para transcribir el ARN genómico del VIH y los ARNm subgenómicos y para expresar todas las proteínas del VIH excepto la poliproteína de la envoltura (**Figura 1B**). En esos vectores, una parte del gen de la envoltura se ha suprimido para

acomodar un cassette génico indicador funcional, en este caso, la luciferasa de luciérnaga que se utiliza para controlar la habilidad de replicación del virus en presencia o ausencia de fármacos antivirales. En pHIVluc@U3, una parte de la región 3' U3 se ha suprimido para prevenir la transcripción de ARNs virales de las LTR 5' en células infectadas.

**[0127]** Los ensayos de sensibilidad para los inhibidores de la entrada del VIH-1 se realizaron mediante células huésped de empaquetamiento que están compuestas de la línea de células de riñón embrionarias humanas 293 (Cell Culture Facility, UC San Francisco, SF, CA) y células huésped diana que están compuestas de la línea celular de osteosarcoma humano que expresa CD4 (HT4) más CCR5 y CXCR4 o la línea celular de astrocitoma (U-87) que expresa CD4 y CCR5 ó CD4 y CXCR4.

**[0128]** Las pruebas de sensibilidad farmacológica se realizaron por medio de pHIVenv y pHIVluc o pHIVluc U3. Las partículas del VIH pseudotipado que contienen proteínas de la envoltura codificadas por el segmento derivados de paciente fueron producidas mediante la transfección de una célula huésped de empaquetamiento (HEK 293) con el ADN vector de la prueba de resistencia. Las partículas virales se recogieron (-48 h) después de la transfección y se utilizaron para infectar las células diana (HT4/CCR5/CXCR4, o U-87/CD4/CXCR4, o U-87/CD4/CCR5) que expresan receptores (es decir, CD4) y correceptores (es decir, CXCR4, CCR5) del VIH. Después de la infección (-72h), las células diana son lisadas y la actividad de luciferasa es medida. El VIH debe completar una ronda de replicación para infectar la célula huésped diana con éxito y producir actividad de luciferasa. La cantidad de actividad de luciferasa detectada en las células infectadas se utiliza como medida directa de "infectividad" (**Figuras 1 y 2**). Si por cualquier razón (ej. falta del receptor o correceptor adecuado, actividad farmacológica inhibitoria, unión con los anticuerpos neutralizantes), el virus es incapaz de entrar en la célula diana, la actividad de luciferasa disminuye. La sensibilidad farmacológica se evalúa mediante la comparación de la infectividad en ausencia de fármacos con la la infectividad en presencia de fármacos. La sensibilidad farmacológica relativa se puede cuantificar mediante la comparación de la sensibilidad del virus de prueba con la sensibilidad de un virus de referencia bien identificado (en estado natural) derivado de un clon molecular del VIH-1, por ejemplo NL4-3 o HXB2.

**[0129]** Las célula huésped de empaquetamiento fueron sembradas en placas de 10 cm de diámetro y fueron transfectadas un día después de la siembra con pHIVenv y pHIVluc o pHIVluc@U3. Las transfecciones se realizaron mediante un procedimiento de coprecipitación de calcio-fosfato. Los medios de cultivo celular que contenían la

precipitación de ADN fueron reemplazados por el medio fresco, de una a 24 horas, después de la transfección. Los medios de cultivo celular que contenían partículas virales fueron cultivados normalmente dos días después de la transfección y fueron filtrados con un filtro de 0,45- $\mu$ m. Antes de la infección, las células diana fueron sembradas en medios de cultivo celular. Los fármacos inhibidores de entrada fueron añadidos a células diana normalmente en el momento de la infección (ocasionalmente, un día antes de la infección). Normalmente, 3 días después de la infección, las células diana se analizaron para medir la actividad de luciferasa mediante el reactivo Steady-Glo (Promega) y un luminómetro.

10 **[0130]** En un modo de realización, se demostró la sensibilidad a los fármacos inhibidores de fusión (T-20, también llamados DP178; Trimeris, Research Triangle Park, NC) (**Figura 6**). Las células diana (HT4/CCR5/CXCR4) que expresan CD4, CCR5 y CXCR4 fueron infectadas en ausencia de T-20 y sobre una amplia gama de concentraciones de T-20 (eje de x escala log<sub>10</sub>). El porcentaje de inhibición de replicación viral (eje de y) se determinó mediante la comparación de la cantidad de luciferasa producida en las células infectadas en presencia de T-20 con la cantidad de luciferasa producida en ausencia de T-20. Los virus trópicos R5 (JRCSF, 91US005.11), los virus trópicos X4 (NL4-3, 92HT599.24) y los virus trópicos duales (92HT593.1) fueron examinados. La sensibilidad farmacológica se cuantificó mediante la determinación de la concentración de T-20 requerida para inhibir la replicación viral en un 50% (IC<sub>50</sub> está expresado con líneas discontinuas verticales en la **Figura 6**). Los virus con valores de IC<sub>50</sub> más bajos son más sensibles a T-20 que los virus con valores de IC<sub>50</sub> más altos.

25 **[0131]** En otros modos de realización, la sensibilidad a una amplia variedad de inhibidores de entrada se puede medir. Dichos inhibidores incluyen, sin carácter limitativo, los fármacos y compuestos que aparecen en la Tabla 4 (tabla de fármacos contra el VIH).

30 **[0132]** En un segundo modo de realización, se demostró la sensibilidad a un inhibidor de CCR5 perteneciente a la clase de compuestos de butano 4-(piperidin-1-yl) [Dorn, C.P. et al., (2001), Finke, P.E. et al., (2001); Merck, West Point, PA]. Las células diana (U-87/CD4/CCR5) que expresan CD4 y CCR5 (células R5) fueron infectadas en ausencia del inhibidor de CCR5 y sobre una amplia gama de concentraciones de inhibidores de CCR5 (eje de x escala log<sub>10</sub>). El porcentaje de inhibición de replicación viral (eje de y) se determinó mediante la comparación de la cantidad de luciferasa producida en las células infectadas en presencia del inhibidor de CCR5 con la cantidad de luciferasa producida en ausencia del inhibidor de CCR5. Los virus trópicos R5

(JRCSF), los virus trópicos X4 (NL4-3) y los virus trópicos duales (92HT593.1) fueron examinados. La sensibilidad farmacológica se cuantificó mediante la determinación de la concentración del inhibidor de CCR5 requerida para inhibir la replicación viral en un 50% ( $IC_{50}$  está expresado con líneas de puntos/discontinuas verticales en la **Figura 8**).

5 Los virus con valores de  $IC_{50}$  más bajos son más sensibles al inhibidor de CCR5 que los virus con valores de  $IC_{50}$  más altos. Los virus trópicos X4 no infectaron a las células diana U-87/CD4/CCR5.

**[0133]** En un tercer modo de realización, se demostró la sensibilidad a un inhibidor de CXCR4 (AMD3100; AnorMED). Las células diana (U-87/CD4/ CXCR4) que expresan  
10 CD4 y CXCR4 (células R5) fueron infectadas en ausencia del inhibidor de CXCR4 y sobre una amplia gama de concentraciones de inhibidores de CXCR4 (eje de x escala log10). El porcentaje de inhibición de replicación viral (eje de y) se determinó mediante la comparación de la cantidad de luciferasa producida en las células infectadas en presencia del inhibidor de CXCR4 con la cantidad de luciferasa producida en ausencia  
15 del inhibidor de CXCR4. Los virus trópicos R5 (JRCSF), los virus trópicos X4 (NL4-3) y los virus trópicos duales (92HT593.1) fueron examinados. La sensibilidad a los fármacos se cuantificó mediante la determinación de la concentración del inhibidor de CXCR4 requerida para inhibir la replicación viral en un 50% ( $IC_{50}$  está expresado con líneas discontinuas verticales en la **Figura 9**). Los virus con valores de  $IC_{50}$  más bajos  
20 son más sensibles al inhibidor de CCR5 que los virus con valores de  $IC_{50}$  más altos. Los virus trópicos R5 no infectaron las células diana U-87/CD4/ CXCR4.

**[0134]** La sensibilidad a un inhibidor de CD4 (ej. al anticuerpo monoclonal murino 5A8; Tanox, Houston, TX) se puede medir. Las células diana (ej. HT4/CCR5/CXCR4, U-  
25 87/CD4/CXCR4, o U-87/CD4/CCR5) que expresan CD4 y uno o ambos correceptores pueden ser infectadas en ausencia del fármaco inhibidor de CD4 y sobre una amplia gama de concentraciones farmacológicas de inhibidores de CD4 (eje de x escala log10). El porcentaje de inhibición de replicación viral (eje de y) se puede determinar mediante la comparación de la cantidad de luciferasa producida en las células infectadas en presencia del inhibidor de CD4 con la cantidad de luciferasa producida  
30 en ausencia del inhibidor de CD4. Los virus trópicos R5 (ej. JRCSF), los virus trópicos X4 (ej. NL4-3) y los virus trópicos duales (ej. 92HT593.1) se pueden examinar. La sensibilidad a los fármacos se puede cuantificar mediante la determinación de la concentración del inhibidor de CD4 requerida para inhibir la replicación viral en un 50% ( $IC_{50}$ ). Los virus con valores de  $IC_{50}$  más bajos son más sensibles al inhibidor de CD4  
35 que los virus con valores de  $IC_{50}$  más altos.

## EJEMPLO 2

**Descubrimiento, optimización y caracterización de inhibidores de la entrada viral nuevos y novedosos**

**[0135]** En un modo de realización, el ensayo de entrada viral se puede utilizar para identificar nuevos compuestos o entes químicos que inhiben la entrada viral. Las células diana (ej. HT4/CCR5/CXCR4, U-87/CD4/CXCR4, o U-87/CD4/CCR5) que expresan CD4 y uno o ambos correceptores pueden ser infectadas en presencia de miembros individuales de quimiotecas grandes (pruebas de alto rendimiento, high throughput screening o HTS). La habilidad de un compuesto de inhibir la replicación viral (una HTS) se puede determinar mediante la comparación de la cantidad de luciferasa producida en las células diana infectadas en presencia de un compuesto específico con la cantidad de luciferasa producida en ausencia del compuesto.

**[0136]** En otro modo de realización, el ensayo de entrada viral se puede utilizar para optimizar la actividad antiviral de los compuestos de partida identificados por la HTS. Los derivados químicos modificados de compuestos de partida se pueden examinar para identificar derivados específicos que han amplificado la actividad inhibidora de la entrada viral. Las células diana (ej. HT4/CCR5/CXCR4, U-87/CD4/CXCR4, o U-87/CD4/CCR5) que expresan CD4 y uno o ambos correceptores pueden ser infectadas en ausencia del inhibidor candidato y sobre una amplia gama de concentraciones de candidatos inhibidores (eje de x escala log10). El porcentaje de inhibición de replicación viral (eje de y) se puede determinar mediante la comparación de la cantidad de luciferasa producida en las células infectadas en presencia del candidato inhibidor con la cantidad de luciferasa producida en ausencia del inhibidor candidato. La sensibilidad farmacológica se puede cuantificar mediante la determinación de la concentración del inhibidor candidato requerida para inhibir la replicación viral en un 50% ( $IC_{50}$ ). Los compuestos derivados con valores de  $IC_{50}$  más bajos son inhibidores de entrada viral más potentes (tienen una mayor actividad antiviral) que los derivados con valores de  $IC_{50}$  más altos.

**[0137]** En otro modo de realización, el ensayo de entrada viral se puede utilizar para caracterizar el mecanismo de acción de nuevos fármacos inhibidores de la entrada viral candidatos y la actividad viral en contraste con un espectro de virus que pueden diferir en sensibilidad. Las células diana (ej. HT4/CCR5/CXCR4, U-87/CD4/CXCR4, o U-87/CD4/CCR5) que expresan CD4 y uno o ambos correceptores pueden ser infectadas en ausencia del nuevo fármaco inhibidor de entrada candidato y sobre una amplia gama de concentraciones de fármacos inhibidores de entrada (eje de x escala log10). El porcentaje de inhibición de replicación viral (eje de y) se puede determinar mediante la comparación de la cantidad de luciferasa producida en las células

infectadas en presencia del nuevo inhibidor de entrada con la cantidad de luciferasa producida en ausencia del nuevo inhibidor de entrada. Los virus trópicos R5 (ej. JRCSF), los virus trópicos X4 (ej. NL4-3) y los virus trópicos duales (ej. 92HT593.1) se pueden examinar. La sensibilidad a los fármacos se puede cuantificar mediante la  
 5 determinación de la concentración de inhibidor de CD4 requerida para inhibir la replicación viral en un 50% (IC<sub>50</sub>).

**[0138]** Para determinar si el nuevo inhibidor de entrada actúa bloqueando los correceptores CCR5 o CXCR4, los virus trópicos R5 se ponen a prueba contra el nuevo inhibidor en células U-87/CD4/CCR5 y los virus trópicos X4 se ponen a prueba  
 10 contra el nuevo inhibidor en células U-87/CD4/CXCR4. La inhibición de la infección de los virus R5 revela el antagonismo del correceptor CCR5 y, a la inversa, la inhibición de la infección de los virus X4 revela el antagonismo del correceptor CXCR4. La inhibición de la infección de los virus R5 y X4 puede revelar el antagonismo de CD4 o la inhibición de la fusión de la membrana.

**[0139]** Para caracterizar la actividad de un nuevo inhibidor contra virus que muestran resistencia, o tienen una sensibilidad reducida, a otros inhibidores de la entrada viral del mismo tipo, o de tipo distinto, cuadros seleccionados de virus resistentes a los fármacos se pueden analizar en el ensayo de entrada viral mediante el nuevo inhibidor de entrada viral. El cuadro puede incluir virus con niveles variados de sensibilidad a los  
 15 inhibidores de CCR5, los inhibidores de CXCR4, los inhibidores de CD4 e inhibidores de fusión de la membrana. El cuadro puede incluir virus con una mutación específica o más que estén asociadas con una sensibilidad/resistencia reducida a un inhibidor de entrada o más.

### **EJEMPLO 3**

#### **25 Identificación de sustituciones/mutaciones de aminoácidos de la envoltura que alteran la sensibilidad a los inhibidores de la entrada viral**

**[0140]** Este ejemplo proporciona un medio y método para identificar mutaciones en la envoltura del VIH-1 que confieren una sensibilidad/resistencia reducida a los inhibidores de la entrada viral. Este ejemplo también proporciona un medio y método  
 30 para cuantificar el grado de sensibilidad reducida a los inhibidores de entrada que confieren las mutaciones en la envoltura específicas.

**[0141]** Las secuencias de la envoltura derivadas de muestras de pacientes, o los clones individuales derivados de muestras de pacientes, o las secuencias de la envoltura diseñadas mediante mutagénesis de sitio dirigido para que contengan  
 35 mutaciones específicas, se analizan en el ensayo de entrada para cuantificar la sensibilidad a los fármacos basada en un estándar de referencia bien identificado (ej.

NL4-3, HXB2).

**[0142]** En un modo de realización, se evalúa la sensibilidad a las muestras longitudinales del paciente (virus recogidos del mismo paciente en diferentes fechas de evaluación). Por ejemplo, la sensibilidad a los inhibidores de entrada se mide antes  
5 de iniciar la terapia, antes o después de introducir cambios en el tratamiento farmacológico, o antes o después de introducir cambios en marcadores virológicos (número de copia de ARN), inmunológicos (linfocitos T CD4) o clínicos (infección oportunista) de progresión de la enfermedad.

#### **Análisis genotípico de muestras del VIH de pacientes**

**[0143]** Las secuencias de la envoltura que representan conjuntos de muestras de  
10 pacientes, o clones derivados de conjuntos de pacientes, pueden ser analizadas mediante todos los métodos de secuenciación de ADN de amplia disponibilidad. En un modo de realización, las secuencias de muestras del VIH de pacientes son determinadas por medio de la purificación del ARN viral, RT/PCR y electroforesis  
15 química y capilar en gel que secuencia los finalizadores de cadena dideoxynucleótidos (Applied Biosystems, Foster City, CA). Las secuencias de la envoltura de conjuntos de virus de pacientes o clones son comparadas con secuencias de referencia, otras muestras de pacientes o con una muestra obtenida del mismo paciente antes de la iniciación de la terapia, si existe disponibilidad. El genotipo es examinado para analizar  
20 las secuencias que son distintas de la secuencia de referencia o de pre-tratamiento y están correlacionadas con las diferencias en la sensibilidad a los inhibidores de entrada.

#### **Sensibilidad a los inhibidores de entrada de mutantes de sitio dirigido**

**[0144]** Los cambios genotípicos que se correlacionan con los cambios de salud se  
25 evalúan con la construcción de vectores de expresión de la envoltura (pHIVenv) que contienen la mutación específica en un contexto genético definido, sensible a los fármacos (ej. cepa de referencia NL4-3). Las mutaciones pueden incorporarse por sí solas y/o en combinación con otras mutaciones que se cree que modulan la sensibilidad al inhibidor de entrada. Las mutaciones en la envoltura se introducen  
30 dentro de vectores pHIVenv mediante cualquiera de los métodos de amplia disponibilidad para la mutagénesis de sitio dirigido. En un modo de realización, se utiliza el método mega-iniciador de la reacción en cadena de la polimerasa para la mutagénesis de sitio dirigido (Sarkar, G. and Summer, S.S., 1990). Un vector pHIVenv que contiene una mutación o grupo de mutaciones específicas en la envoltura se  
35 analiza mediante el ensayo de entrada viral descrito en el Ejemplo 1. La sensibilidad a los fármacos del virus con mutaciones en la envoltura se compara con la sensibilidad a

los fármacos de un virus definido genéticamente sensible a los fármacos que carece de las mutaciones específicas bajo evaluación. Los cambios observados en la sensibilidad a los inhibidores de entrada se atribuyen a las mutaciones introducidas en el vector pHIVenv.

5 **[0145]** En un modo de realización, se demuestra la sensibilidad reducida al inhibidor de fusión T-20 que confieren las mutaciones específicas de resistencia farmacológica en la proteína de la envoltura gp41 (Figura 7). Las células que expresan CD4, CCR5 y CXCR4 fueron infectadas en ausencia de T-20 y sobre una amplia gama de concentraciones de T-20 (eje de x escala log10). El porcentaje de inhibición de  
10 replicación viral (eje de y) fue determinado mediante la comparación de la cantidad de luciferasa producida en las células infectadas en presencia de T-20 con la cantidad de luciferasa producida en ausencia de T-20. Los virus isogénicos que contienen una mutación específica o dos en la proteína transmembrana de la envoltura gp41 se analizaron (resaltados en rojo en la leyenda de figuras; Rimsky et al., J. Virol. 72: 986-  
15 993). La sensibilidad a los fármacos se puede cuantificar al determinar la concentración de T-20 requerida para inhibir la replicación viral en un 50% (IC<sub>50</sub>, expresado con líneas verticales de puntos). Los virus con valores de IC<sub>50</sub> más bajos son más sensibles a T-20 que los virus con valores de IC<sub>50</sub> más altos.

**[0146]** En un modo de realización, fueron introducidas mutaciones de resistencia farmacológica en virus trópicos X4 (NL4-3) y virus trópicos R5 (JRCSF) bien identificados. La sensibilidad a T-20 se midió mediante el ensayo de entrada viral (**Figura 7**). El número de veces que cambió la sensibilidad a T-20 para cada virus fue determinado al dividir la IC<sub>50</sub> del virus de prueba entre la IC<sub>50</sub> de la cepa HXB2 del VIH-1. La sensibilidad a T-20 de virus mutantes similares ha sido documentada en las  
25 publicaciones científicas (Rimsky et al.). En este modo de realización, los virus con una mutación dentro del motivo de GIV de gp41 (DIV, GIM, SIV) fueron menos sensibles a T-20 que el virus en estado natural (GIV) (**Figura 11**). Los virus con dos mutaciones dentro del motivo de GIV (DIM, SIM, DTV) fueron menos sensibles a T-20 que los virus con una o ninguna mutación en el motivo de GIV (**Figura 11**).

30 **[0147]** En otro modo de realización, las mutaciones que pueden conferir una reducida (o incrementada) sensibilidad al inhibidor de entrada son identificados mediante la secuenciación de los genes de envoltura de los virus sensibles y resistentes. Las deducidas secuencias de aminoácidos de los virus sensibles y resistentes se comparan para identificar mutaciones candidatas de resistencia a los fármacos. La  
35 habilidad de una mutación específica de conferir sensibilidad a los fármacos alterada se confirma o refuta por medio de la introducción de la mutación en un virus sensible a



los fármacos y la medición de la sensibilidad del virus mutante en el ensayo de entrada viral. En el ejemplo representado aquí, una extensión corta de secuencias de aminoácidos dentro de la primera repetición heptad (HR-1) de la proteína transmembrana de la envoltura gp41 del VIH-1 se alinea para virus que muestren diferentes sensibilidades a T-20 (**Figura 11**). Los aminoácidos resaltados representan mutaciones que confieren una sensibilidad reducida a T-20.

**[0148]** Análisis fenotípicos y genotípicos similares se pueden utilizar para identificar secuencias de aminoácidos de la envoltura que (a) alteran/influencian la sensibilidad a los inhibidores de CCR5 o CXCR4, (b) especifican X4, R5 y el tropismo dual y (c) obtienen anticuerpos neutralizantes.

**[0149]** En un modo de realización, se demuestra la sensibilidad reducida a los inhibidores de los correceptores (CCR5, CXCR4) otorgada por secuencias/mutaciones de aminoácidos de la envoltura específicas.

**[0150]** También en otro modo de realización, se demuestra la sensibilidad reducida inhibidores del receptor (CD4) otorgada por secuencias/mutaciones de aminoácidos de la envoltura específicas.

#### **EJEMPLO 4**

##### **Determinación del tropismo del VIH-1 por los receptores y correceptores**

**[0151]** Este ejemplo proporciona un medio y método para determinar el tropismo por los correceptores del VIH-1. Este ejemplo también proporciona un medio y método para determinar el tropismo por los receptores del VIH-1.

**[0152]** En un modo de realización, se identificó a virus que utilizan el correceptor CCR5. En un modo de realización relacionado, se identificó a virus que utilizan el correceptor CXCR4. En un modo de realización también relacionado, se identificaron virus que utilizan CCR5 y CXCR4. En un modo de realización también relacionado, se identificaron virus que utilizan correceptores diferentes de CCR5 o CXCR4.

**[0153]** En un modo de realización, se identificaron virus que utilizan el receptor CD4. En un modo de realización relacionado, se identificaron virus que utilizan CD8. En un modo de realización también relacionado, se identificaron virus que no requieren CD4 o CD8 para infectar células.

**[0154]** En este modo de realización, el ensayo se realiza mediante dos líneas celulares. Una línea celular expresa CD4 más CCR5 (U-87/CD4/CCR5), también llamadas células R5 en esta solicitud. La otra línea celular expresa CD4 and CXCR4 (U-87/CD4/CXCR4), también llamadas células X4 en esta solicitud. El ensayo de entrada viral se realiza mediante la infección de cultivos de células individuales con

reservas de virus recombinantes derivadas de células transfectadas con vectores pHIVenv y pHIV luc o pHIVlucDU3. Los vectores pHIVenv contienen secuencias derivadas de virus de pacientes y expresan proteínas de la envoltura del VIH-1 (gp120SU, gp41TM). En este modo de realización, los virus son evaluados utilizando

5 células diana R5 y X4 cultivadas en placas de 96 pocillos. **(Figura 3A)**. Normalmente, las células R5 y X4 se siembran un día antes de la infección. La infección con cada reserva de virus se realiza en ausencia de fármaco (sin fármaco), en presencia de concentraciones inhibitoras de un fármaco que preferiblemente inhibe los virus trópicos R5 (inhibidor de CCR5, ej. un compuesto de butano piperidin 1yl) y en

10 presencia de concentraciones inhibitoras de un fármaco que preferiblemente inhibe los virus trópicos X4 (inhibidor de CXCR4, ej. AMD3100). El tropismo por los correceptores se evalúa mediante la comparación de la cantidad de luciferasa producida en cada tipo de célula, tanto en presencia como en ausencia de fármacos. En este modo de realización, los resultados del ensayo se interpretan al comparar la

15 habilidad de cada virus para infectar preferiblemente (producir actividad de luciferasa) células R5 o células X4, o tanto células X4 como R5 si el virus es trópico dual. La habilidad del inhibidor de CCR5 o CXCR4 de bloquear selectivamente la infección (inhibir actividad de luciferasa) también se evalúa **(Figura 3B)**. En este modo de realización, los virus trópicos X4 infectan células X4 pero no células R5 y la infección

20 de células X4 es bloqueada por el inhibidor de CXCR4 (AMD3100). En este modo de realización, los virus trópicos R5 infectan células R5 pero no células X4 y la infección de células R5 es bloqueada por el inhibidor de CCR5 (compuesto de butano piperidin 1yl). En este modo de realización, los virus trópicos duales, o mezclas de virus trópicos X4 y R5, infectan tanto células X4 como R5 y la infección de células R5 es bloqueada

25 por el inhibidor de CCR5 y la infección de células X4 es bloqueada por el inhibidor de CXCR4. En este modo de realización, los virus no viables no se replican ni en células X4 ni R5 (no se produce actividad de luciferasa).

**[0155]** En otro modo de realización, el ensayo se realiza mediante tres o más líneas celulares. Una línea celular expresa CD4 más CCR5 (U-87/CD4/CCR5), también

30 llamadas células R5 en esta solicitud. La otra línea celular expresa CD4 y CXCR4 (U-87/CD4/CXCR4), también llamadas células X4 en esta solicitud. Las líneas celulares adicionales expresan CD4 más otros correceptores candidatos del VIH-1, incluyendo, sin carácter limitativo, BONZO, BOB, etc. Ver Tabla 1. Estas líneas celulares adicionales expresan otros correceptores candidatos, pero no expresan CCR5 o

35 CXCR4. El ensayo de entrada viral se realiza mediante la infección de cultivos de células individuales con reservas de virus recombinantes derivadas de células

transfectadas con vectores pHIVenv y pHIV luc o pHIVlucDU3. Los vectores pHIVenv contienen secuencias derivadas de virus de pacientes y expresan proteínas de la envoltura del VIH-1(gp120SU, gp41TM). En este modo de realización, los virus son evaluados utilizando células cultivadas en placas de 96 pocillos. La infección con cada reserva de virus se realiza en células R5, células X4 y las líneas celulares que expresan CD4 más los correceptores candidatos. El tropismo por los correceptores se evalúa mediante la comparación de la cantidad de actividad de luciferasa producida en cada tipo de célula. En este modo de realización, los resultados del ensayo se interpretan mediante la comparación de la habilidad de cada virus para infectar preferiblemente (producir actividad de luciferasa) células R5 o células X4 o la línea celular que expresa el correceptor candidato. En este modo de realización, los virus trópicos X4 infectan células X4 pero no células R5. En este modo de realización, los virus trópicos R5 infectan células R5 pero no células X4. En este modo de realización, los virus trópicos duales, o mezclas de virus trópicos X4 y R5, infectan tanto células X4 como R5. En este modo de realización, la infección de las líneas celulares que expresan correceptores candidatos alternativos (ni CCR5 ni CXCR4) se atribuye al tropismo por el correceptor alternativo. En este modo de realización, los virus no viables no se replican ni en células X4 ni R5.

**[0156]** En otro modo de realización, el ensayo se realiza mediante cuatro líneas celulares. Una línea celular expresa CD4 más CCR5 (U-87/CD4/CCR5), también llamadas células R5 en esta solicitud. Una segunda línea celular expresa CD4 y CXCR4 (U-87/CD4/CXCR4), también llamadas células X4 en esta solicitud. Una tercera línea celular expresa CD8 y CCR5 (U-87/CD8/CCR5), también llamadas células CD8/R5 en esta solicitud. Una cuarta línea celular expresa CD8 y CXCR4 (U-87/CD8/CXCR4), también llamadas células CD8/X4 en esta solicitud. El ensayo de entrada viral se realiza mediante la infección de cultivos de células individuales con reservas de virus recombinantes derivadas de células transfectadas con vectores pHIVenv y pHIV luc o pHIVlucDU3. Los vectores pHIVenv contienen secuencias derivadas de virus de pacientes y expresan proteínas de la envoltura del VIH-1(gp120SU, gp41TM). En este modo de realización, los virus se evalúan utilizando células cultivadas en placas de 96 pocillos. La infección con cada reserva de virus se realiza en células R5, células X4, células CD8/R5 y células CD8/X4. El tropismo por los correceptores se evalúa mediante la comparación de la cantidad de actividad de luciferasa producida en cada tipo de célula. En este modo de realización, los resultados del ensayo se interpretan mediante la comparación de la habilidad de cada virus para infectar preferiblemente (producir actividad de luciferasa) células R5, células

X4, células CD8/R5 o células CD8/X4. En este modo de realización, los virus trópicos CD4 infectan células X4 y/o células R5. En este modo de realización, los virus trópicos CD8 infectan células CD8/R5 y/o células CD8/X4. En este modo de realización, los virus trópicos duales (utilización de receptores CD4 y CD8) infectan células X4 y/o células R5 más células CD8/X4 o células CD8/R5. En este modo de realización, la infección de las líneas celulares que expresan CD8 pero no CD4 se atribuye al tropismo por el receptor CD8. En este modo de realización, los virus no viables no se replican ni en células X4 ni R5.

**[0157]** En otro modo de realización también relacionado, el ensayo se realiza mediante dos líneas celulares. Una línea celular expresa CD4 más CCR5 y CXCR4 (HT4/CCR5/CXCR4). Una segunda línea celular expresa CD8 más CCR5 y CXCR4 (HOS/CD8/CCR5/CXCR4). El ensayo de entrada viral se realiza mediante la infección de cultivos de células individuales con reservas de virus recombinantes derivadas de células transfectadas con vectores pHIVenv y pHIV luc o pHIVlucDU3. Los vectores pHIVenv contienen secuencias derivadas de virus de pacientes y expresan proteínas de la envoltura del VIH-1 (gp120SU, gp41TM). En este modo de realización, los virus son evaluados utilizando células cultivadas en placas de 96 pocillos. La infección con cada reserva de virus se realiza en células HT4/CCR5/CXCR4 y células HOS/CD8/CCR5/CXCR4. El tropismo por los correceptores se evalúa mediante la comparación de la cantidad de actividad luciferasa producida en cada tipo de célula. En este modo de realización, los resultados del ensayo se interpretan mediante la comparación de la habilidad de cada virus para infectar preferiblemente (producir actividad de luciferasa) células HT4/CCR5/CXCR4 o células HOS/CD8/CCR5/CXCR4. En este modo de realización, los virus trópicos CD4 infectan células HT4/CCR5/CXCR4, pero no células HOS/CD8/CCR5/CXCR4. En este modo de realización, los virus trópicos CD8 infectan células HOS/CD8/CCR5/CXCR4, pero no células HT4/CCR5/CXCR4. En este modo de realización, los virus trópicos duales (utilización de receptores CD4 y CD8) infectan tanto células HT4/CCR5/CXCR4 como células HOS/CD8/CCR5/CXCR4. En este modo de realización, la infección de las líneas celulares que expresan CD8 pero no CD4 se atribuye al tropismo por el receptor CD8. En este modo de realización, los virus no viables no se replican en células X4 ni R5.

**[0158]** En otro modo de realización, el ensayo se realiza mediante dos líneas celulares. Una línea celular expresa CD4 más CCR5 y CXCR4 (HT4/CCR5/CXCR4). Una segunda línea celular expresa CCR5 y CXCR4, pero no CD4 ni CD8 (HOS/CCR5/CXCR4). El ensayo de entrada viral se realiza mediante la infección de

cultivos de células individuales con reservas de virus recombinantes derivadas de células transfectadas con vectores pHIVenv y pHIV luc o pHIVlucDU3. Los vectores pHIVenv contienen secuencias derivadas de virus de pacientes y expresan proteínas de la envoltura del VIH-1 (gp120SU, gp41TM). En este modo de realización, los virus se evalúan utilizando células cultivadas en placas de 96 pocillos. La infección con cada reserva de virus se realiza en células HT4/CCR5/CXCR4 y células HOS/CCR5/CXCR4. La infección independiente de CD4 y CD8 se evalúa mediante la comparación de la cantidad de actividad de luciferasa producida en cada tipo de célula. En este modo de realización, los resultados del ensayo se interpretan mediante la comparación de la habilidad de cada virus de infectar preferiblemente (producir actividad de luciferasa) células HT4/CCR5/CXCR4 o células HOS/CCR5/CXCR4. En este modo de realización, los virus dependientes de CD4 infectan células HT4/CCR5/CXCR4, pero no células HOS/CCR5/CXCR4 células. En este modo de realización, los virus trópicos CD4 infectan tanto células HOS/CCR5/CXCR4 como células HT4/CCR5/CXCR4. En este modo de realización, la infección de las líneas celulares que carecen de la expresión de CD4 se atribuye a la infección independiente de CD4. En este modo de realización, los virus no viables no se replican ni en células X4 ni en células R5.

#### **EJEMPLO 5**

#### **20 Identificación de sustituciones/mutaciones de aminoácidos de la envoltura que alteran el tropismo por los correceptores y receptores**

**[0159]** Este ejemplo proporciona un medio y método para identificar las secuencias de aminoácidos de la envoltura del VIH-1 que especifican, o alteran, el tropismo por los correceptores (X4 vs. R5 vs. X4/R5 dual). Este ejemplo también proporciona un medio y método para identificar las secuencias de aminoácidos de la envoltura del VIH-1 que especifican el uso de correceptores distintos a CXCR4 o CCR5. Este ejemplo también proporciona un medio y método para identificar las secuencias de aminoácidos de la envoltura del VIH-1 que especifican el tropismo por los receptores (CD4 vs. CD8).

**[0160]** Las secuencias de la envoltura derivadas de muestras de pacientes, los clones individuales derivados de muestras de pacientes o las secuencias de la envoltura diseñadas mediante mutagénesis de sitio dirigido para que contengan mutaciones específicas, se evalúan en el ensayo de entrada para determinar el tropismo por los correceptores como se describe en el **Ejemplo 4**.

**[0161]** En un modo de realización, se evaluó el tropismo por los correceptores de muestras longitudinales de pacientes (virus recogidos del mismo paciente en diferentes puntos temporales). Por ejemplo, el tropismo por los correceptores se

evaluó antes de iniciar la terapia, antes o después de introducir cambios en el tratamiento farmacológico, o antes o después de introducir cambios en marcadores virológicos (número de copia de ARN), inmunológicos (linfocitos T CD4) o clínicos (infección oportunista) de progresión de la enfermedad.

- 5 **[0162]** En otro modo de realización, el tropismo por los correceptores se evaluó para analizar muestras recogidas de un gran número de pacientes diferentes. En un modo de realización más tardío, el tropismo por los correceptores se evaluó para analizar muestras recogidas de un gran número de pacientes representando poblaciones de virus y poblaciones de pacientes diferentes. Dichas poblaciones de pacientes pueden
- 10 incluir, sin carácter limitativo, pacientes recién infectados, pacientes con infección crónica, pacientes con un estado avanzado de la enfermedad y pacientes sometidos a terapia o inmunoterapia antirretroviral. Dichas poblaciones de virus pueden incluir, sin carácter limitativo, virus con características genéticas distintas (clado A, B, C, D, E, F, G), virus sensibles a los fármacos antirretrovirales, virus con
- 15 una sensibilidad/resistencia reducida a los fármacos antirretrovirales.

#### **Análisis genotípico de muestras de VIH de pacientes**

- [0163]** Las secuencias de la envoltura que representan conjuntos de muestras de pacientes, o clones derivados de conjuntos de pacientes, pueden ser analizados mediante todos los métodos de secuenciación de ADN de amplia disponibilidad. En un
- 20 modo de realización, se determinan secuencias de muestras de VIH de pacientes mediante la purificación del ARN viral, RT/PCR y electroforesis química y capilar en gel que secuencia los finalizadores de cadena didesoxinucleótidos (Applied Biosystems, Foster City, CA). Las secuencias de la envoltura de conjuntos de virus de pacientes o clones se comparan con secuencias de referencia, otras muestras de
- 25 pacientes o con una muestra obtenida del mismo paciente antes del inicio de la terapia, si existe disponibilidad. El genotipo se evalúa para analizar las secuencias que son distintas de la secuencia de referencia o pretratamiento y están correlacionadas con diferencias en la sensibilidad a los inhibidores de entrada.

#### **Tropismo por los receptores y correceptores de virus caracterizados genéticamente**

30

- [0164]** Las secuencias de aminoácidos que se correlacionan con el tropismo por los correceptores se evalúan mediante la construcción de vectores de expresión de la envoltura (pHIVenv) que contienen una mutación específica en un contexto genético definido (ej. NL4-3 para el tropismo de X4, JRCSF para el tropismo de R5). Las
- 35 mutaciones pueden incorporarse por sí solas y/o en combinación con otras mutaciones que se cree que modulan el uso de los correceptores. Las mutaciones de la envoltura

se introducen dentro de vectores pHIVenv mediante cualquiera de los métodos de amplia disponibilidad para la mutagénesis de sitio dirigido. En un modo de realización, se utiliza el método mega-iniciador de la reacción en cadena de la polimerasa para la mutagénesis de sitio dirigido (Sarkar, G. and Summer, S.S., 1990). Un vector pHIVenv que contiene una mutación o grupo de mutaciones específicas de la envoltura se evalúa mediante el ensayo de entrada viral descrito en el Ejemplo 1. El tropismo por los correceptores del virus que contiene mutaciones en la envoltura se compara con el tropismo por los correceptores de un virus genéticamente definido que carece de las mutaciones específicas bajo evaluación. La habilidad de una mutación específica de conferir tropismo por los correceptores alterado se confirma o refuta por medio de la introducción de la mutación en un virus de referencia bien identificado y la evaluación del tropismo por los correceptores del virus mutante en el ensayo de entrada viral como se describe en el **Ejemplo 4**. Los cambios observados en el tropismo por los correceptores se atribuyen a las mutaciones introducidas en el vector pHIVenv.

**[0165]** En un modo de realización, los determinantes genéticos del tropismo de R5 son identificados mediante la evaluación de secuencias de aminoácidos dentro de la región V3 de la proteína de envoltura de la superficie gp120. Las secuencias de aminoácidos bajo evaluación son identificadas mediante la comparación de secuencias de aminoácidos de grandes números de virus X4 trópicos y R5 trópicos. Se seleccionan diferencias consistentes entre los virus X4 y R5 para evaluación. Los virus isogénicos basados en un clon parental de X4 bien identificado (ej. NL4-3, HXB2) que contiene mutaciones específicas “candidatas de R5” de la región V3 de la proteína de la envoltura gp120 se construyen mediante mutagénesis de sitio dirigido y se examinan para analizar el tropismo por los correceptores como se describe en el **Ejemplo 4**. Las células que expresan CD4 más CCR5 (ej. U-87/CD4/CCR5) o CD4 más CXCR4 (U-87/CD4/CXCR4) son infectadas en ausencia de un inhibidor de R5 (compuesto de butano piperidin 1yl) y de X4 (AMD3100) y en presencia de concentraciones inhibitoras de R5 y concentraciones farmacológicas de X4. Las sustituciones de aminoácidos que cambian el virus trópico X4 en un virus trópico R5 están caracterizadas como determinantes genéticos del tropismo de R5.

**[0166]** En un modo de realización relacionado, los determinantes genéticos del tropismo de X4 son identificados mediante la evaluación de secuencias de aminoácidos dentro de la región V3 de la proteína de envoltura de la superficie gp120. Las secuencias de aminoácidos bajo evaluación son identificadas mediante la comparación de secuencias de aminoácidos de grandes números de virus X4 trópicos y R5 trópicos. Se seleccionan diferencias consistentes entre los virus X4 y R5 para

evaluación. Los virus isogénicos basados en un clon parental de R5 bien identificado (ej. JRCSF) que contiene mutaciones específicas “candidatas de X4” en la región V3 de la proteína de envoltura gp120 se construyen mediante mutagénesis de sitio dirigido y se examinan para analizar el tropismo por los correceptores como se describe en el **Ejemplo 4**. Las células que expresan CD4 más CCR5 (ej. U-87/CD4/CCR5) o CD4 más CXCR4 (U-87/CD4/CXCR4) son infectadas en ausencia de un inhibidor de R5 (compuesto de butano piperidin 1yl) y de X4 (AMD3100) y en presencia de concentraciones inhibitoras de R5 y concentraciones farmacológicas de X4. Las sustituciones de aminoácidos que cambian el virus trópico X4 en un virus trópico R5 están caracterizadas como determinantes genéticos del tropismo de R5.

**[0167]** En un modo de realización relacionado, los determinantes genéticos del tropismo de X4 o R5 son identificados por medio de la evaluación de las secuencias de aminoácidos dentro de la totalidad de la proteína de envoltura de la superficie gp120.

**[0168]** En un modo de realización relacionado, los determinantes genéticos del tropismo de X4 o R5 son identificados por medio de la evaluación de las secuencias de aminoácidos dentro de la proteína transmembrana de la envoltura gp41.

**[0169]** En un modo de realización relacionado, los determinantes genéticos que especifican el uso de correceptores diferentes de CCR5 y CXCR4 son identificados por medio de la evaluación de las secuencias de aminoácidos dentro de la región V3 de la proteína de envoltura de la superficie gp120. Las secuencias de aminoácidos bajo evaluación son identificadas mediante la comparación de las secuencias de aminoácidos de virus que son capaces de replicarse en células que no expresan CXCR4 o CCR5, pero que sí que expresan otros correceptores candidatos. Se seleccionan diferencias consistentes en las secuencias de aminoácidos entre esos virus que no son X4 ni R5 y los virus X4 y R5 para evaluación. Los virus isogénicos basados en un clon parental de un X4 bien identificado (ej. NL4-3) o de un R5 bien identificado (ej. JRCSF) que contiene mutaciones candidatas específicas que no son de X4 ni de R5 en la región V3 de la proteína de envoltura gp120 se construyen mediante mutagénesis de sitio dirigido y se examinan para analizar el tropismo por los correceptores como se describe en el **Ejemplo 4**. Las células que expresan CD4 más CCR5 (ej. U-87/CD4/CCR5), CD4 más CXCR4 (U-87/CD4/CXCR4) y CD4 más otros correceptores candidatos (U-87/CD4/X) son infectadas en ausencia de un inhibidor de R5 (compuesto de butano piperidin 1yl) y de X4 (AMD3100) y en presencia de concentraciones inhibitoras de R5 y concentraciones farmacológicas de X4. Las sustituciones de aminoácidos que confieren tropismo por un correceptor que no sea de



X4 ni de R5 están caracterizadas como determinantes genéticos del tropismo por el correceptor específico.

**[0170]** En un modo de realización relacionado, los determinantes genéticos del tropismo por otros correceptores son identificados por medio de la evaluación de las secuencias de aminoácidos dentro de toda la proteína de envoltura de la superficie gp120.

**[0171]** En un modo de realización relacionado, los determinantes genéticos del tropismo por otros correceptores son identificados por medio de la evaluación de las secuencias de aminoácidos dentro de la proteína transmembrana de la envoltura gp41.

**[0172]** En otro modo de realización, los determinantes genéticos que especifican el uso de CD8 (además de, o en lugar de CD4) como receptor del VIH-1 son identificados por medio de la evaluación de las secuencias de aminoácidos dentro de la región V3 de la proteína de envoltura de la superficie gp120. Las secuencias de aminoácidos bajo evaluación son identificadas mediante la comparación de las secuencias de aminoácidos de virus que son capaces de replicarse en células que no expresan CD4, pero que expresan CD8. Diferencias consistentes en las secuencias de aminoácidos entre dichos virus trópicos CD4 y virus trópicos CD8 son seleccionadas para evaluación. Los virus isogénicos basados en clones parentales trópicos de CD4 bien identificados (ej. NL4-3, JRCSF) que contienen mutaciones específicas “candidatas de CD8” en la región V3 de la proteína de envoltura gp120 se construyen mediante mutagénesis de sitio dirigido y se examinan para analizar el tropismo por el receptor CD8 como se describe en el **Ejemplo 4**. Las células que expresan CD4 más CCR5 (ej. U-87/CD4/CCR5), CD4 más CXCR4 (U-87/CD4/CXCR4) CD8 más CCR5 (ej. U-87/CD8/CCR5), CD8 más CXCR4 (U-87/CD8/CXCR4) son infectadas. Las sustituciones de aminoácidos que permiten la replicación en células que expresan CD8 pero no expresan CD4 están caracterizadas como determinantes genéticos del tropismo por CD8.

**[0173]** En un modo de realización relacionado, los determinantes genéticos del tropismo por CD8 son identificados por medio de la evaluación de las secuencias de aminoácidos dentro de la totalidad de la proteína de envoltura de la superficie gp120.

**[0174]** En un modo de realización relacionado, los determinantes genéticos del tropismo por CD8 son identificados por medio de la evaluación de las secuencias de aminoácidos dentro de la totalidad de la proteína transmembrana de la envoltura gp41.

## **EJEMPLO 6**

### **Medición de la neutralización de los anticuerpos del VIH-1**

**[0175]** Este ejemplo proporciona un medio y método para evaluar la neutralización del VIH-1 con anticuerpos, también llamada neutralización viral en esta solicitud. Este ejemplo también proporciona un medio y método para evaluar la actividad de neutralización viral de los anticuerpos dentro de los pacientes infectados por el VIH-1.

5 Este ejemplo también proporciona un medio y método para evaluar la actividad de neutralización viral de los anticuerpos dentro de individuos o animales vacunados con vacunas terapéuticas y vacunas candidatas. Este ejemplo también proporciona un medio y método para evaluar la actividad de neutralización viral de los anticuerpos dentro de individuos o animales vacunados con vacunas protectoras (preventivas o  
10 profilácticas) y vacunas candidatas. Este ejemplo también proporciona un medio y método para evaluar la actividad de neutralización viral o los preparados de anticuerpos monoclonales o policlonales específicos.

**[0176]** Secuencias de la envoltura derivadas de muestras de pacientes, clones individuales derivados de muestras de pacientes o secuencias de la envoltura  
15 diseñadas mediante mutagénesis de sitio dirigido para que contengan mutaciones específicas son examinados en el ensayo de entrada para evaluar la neutralización con anticuerpos.

**[0177]** En un modo de realización, se evaluó la neutralización con anticuerpos en muestras longitudinales de pacientes (virus recogidos del mismo paciente en  
20 diferentes puntos temporales). Por ejemplo, la neutralización con anticuerpos se evaluó antes de la vacunación, durante el curso de la vacunación y en puntos temporales graduales después de que se complete la vacunación.

En un modo de realización relacionado, los sueros de animales incluyendo, sin carácter limitativo, ratones, ratas, conejos, cerdos y ganado se evalúan antes de la  
25 inoculación con vacunas candidatas, durante un curso de la inoculación repetida y en puntos temporales graduales después de que se complete la inoculación. En un modo de realización, la neutralización viral se evalúa para vacunas preventivas y vacunas candidatas. En otro modo de realización, la neutralización viral se evalúa para vacunas terapéuticas.

30 **[0178]** En otro modo de realización, la neutralización viral es evaluada para/en muestras recogidas de un gran número de pacientes diferentes.

**[0179]** En otro modo de realización, la neutralización viral es evaluada para/en muestras recogidas de un gran número de pacientes diferentes que representan distintas poblaciones de pacientes y distintas poblaciones de virus. Las “poblaciones  
35 de pacientes” pueden incluir, sin carácter limitativo, pacientes recién infectados, pacientes con infección crónica, pacientes con un estado avanzado del VIH/SIDA,

pacientes con una progresión de la enfermedad rápida, pacientes con una progresión de la enfermedad lenta (llamados normalmente no progresadores a largo plazo), pacientes que están sometiéndose a terapia o inmunoterapia antirretroviral (ej. interleukin-2 u otras citocinas), pacientes vacunados y no vacunados. Las “poblaciones de virus” pueden incluir, sin carácter limitativo, virus con características genéticas y orígenes geográficos distintos (clado A; B, C, D, E, F, G), virus sensibles a los fármacos antirretrovirales, virus con una sensibilidad/resistencia reducida a los fármacos antirretrovirales, cepas primarias aisladas, cepas aisladas adaptadas al crecimiento en cultivo celular (llamados a menudo virus adaptados al laboratorio), virus inductores de sinticios (SI), virus no inductores de sinticios (NSI), virus trópicos macrófagos (M), virus trópicos de linfocitos T (T) y virus trópicos duales (M y T).

**Caracterización de anticuerpos de pacientes (anticuerpos de pacientes vs. cuadro de virus estándar)**

**[0180]** En este modo de realización, el ensayo se realiza mediante una línea de células diana que expresa el receptor CD4 del VIH-1 más los correceptores CCR5 y CXCR4 (HT4/CCR5/CXCR4) del VIH-1. Dicha línea celular es capaz de evaluar la actividad neutralizante de anticuerpos para tanto los virus trópicos R5 como X4. En un modo de realización relacionado, el ensayo se realiza mediante dos líneas de células diana. Una línea celular expresa CD4 más CCR5 (U-87/CD4/CCR5) y se utiliza para evaluar los virus trópicos R5. Otra línea celular expresa CD4 más CXCR4 (U-87/CD4/CXCR4) y se utiliza para evaluar los virus trópicos X4. El ensayo de entrada viral se realiza al infectar los cultivos de células diana individuales con reservas de virus recombinantes derivadas del empaquetamiento de células huésped transfectadas con los vectores pHIVenv y pHIVluc o pHIVlucDU3. En este modo de realización, los vectores pHIVenv contienen secuencias de la envoltura de virus específicos bien identificados y expresan proteínas de la envoltura del VIH-1 (gp120SU, gp41TM). Dichos virus representan un “cuadro de virus estándar” (ver descripción de población de virus arriba). Algunos, pero no todos, ejemplos razonables de virus que pueden constituir un cuadro estándar se enumeran en la Tabla 4. Un cuadro de virus estándar se utiliza para comparar la actividad de anticuerpos neutralizantes de los sueros obtenidos de muchos pacientes diferentes y/o animales (ver descripción de población de pacientes arriba). En este modo de realización, los virus son evaluados utilizando células diana R5 y X4 cultivadas en placas de 96 pocillos. Normalmente, las células diana se plated en 5.000 células por pocillo para HT4/CCR5/CXCR4 o 10.000 células por pocillo para U-87/CD4/CCR5 y U-87/CD4/CXCR4 un día antes de la infección. Antes de la infección de la célula diana, cada reserva de virus es preincubada con los

sueros o preparados de anticuerpos (normalmente durante 1 hora) que se están evaluando. Los sueros o preparados de anticuerpos se examinan sin diluir y en disoluciones incrementalmente mayores (normalmente de cuatro a cinco disoluciones consecutivas de 10 veces). La infección de células diana con cada reserva de virus también se realiza en ausencia de anticuerpos (sin anticuerpos). La neutralización viral se evalúa mediante la comparación de la cantidad de actividad de luciferasa producida en células diana, tanto en presencia como en ausencia de anticuerpos. En este modo de realización, los resultados del ensayo se interpretan al comparar la habilidad de cada anticuerpo para bloquear selectivamente la infección de las células diana (reducir o eliminar la actividad de luciferasa). La actividad de neutralización viral se cuantifica al observar la disolución de anticuerpos más alta (más diluida) que es capaz de bloquear la infección de la célula diana (ej. la disolución más alta que sea capaz de reducir en un 50% la actividad de luciferasa producida en ausencia del anticuerpo).

**Caracterización del VIH-1 de pacientes (virus de pacientes vs. cuadro estándar de virus)**

**[0181]** En este modo de realización, el ensayo se realiza mediante una línea de células diana que expresa el receptor CD4 del VIH-1 más los correceptores CCR5 y CXCR4 (HT4/CCR5/CXCR4) del VIH-1. Dicha línea celular es capaz de evaluar la actividad neutralizante de anticuerpos para tanto los virus trópicos R5 como los X4. En un modo de realización relacionado, el ensayo se realiza mediante dos líneas de células diana. Una línea celular expresa CD4 más CCR5 (U-87/CD4/CCR5) y se utiliza para examinar los virus trópicos R5. Otra línea celular expresa CD4 más CXCR4 (U-87/CD4/CXCR4) y se utiliza para evaluar los virus trópicos X4. El ensayo de entrada viral se realiza al infectar los cultivos de células diana individuales con reservas de virus recombinantes derivadas del empaquetamiento de células huésped transfectadas con los vectores pHIVenv y pHIVluc o pHIVlucDU3. En este modo de realización, los vectores pHIVenv contienen secuencias de la envoltura derivadas de virus de pacientes y expresan proteínas de la envoltura del VIH-1 (gp120SU, gp41TM). En este modo de realización, los virus de poblaciones de pacientes diferentes (ver descripción de población de pacientes arriba), y/o poblaciones de virus diferentes (ver descripción de población de virus arriba) se utilizan para construir vectores pHIVenv. VIH pseudotipado derivado de vectores pHIVenv es evaluado en el ensayo de entrada viral para determinar si éstos son sensibles a la neutralización mediante un cuadro de preparados de anticuerpos específicos bien identificados. Dichos anticuerpos representan un “cuadro de anticuerpos estándar”. Algunos, pero no todos, ejemplos razonables de virus que pueden constituir un cuadro estándar se enumeran en la

Tabla 4. En este modo de realización, la neutralización de virus se evalúa utilizando células diana R5 y X4 cultivadas en placas de 96 pocillos. Normalmente, las células diana se plated en 5.000 células por pocillo para HT4/CCR5/CXCR4 o 10.000 células por pocillo para U-87/CD4/CCR5 y U-87/CD4/CXCR4 un día antes de la infección.

5 Antes de la infección de la célula diana, cada reserva de virus es incubada con cada uno de los preparados de anticuerpos (normalmente durante 1 hora) en el cuadro de anticuerpos estándar. Los sueros o preparados de anticuerpos se examinan sin diluir y en disoluciones (normalmente de cuatro a cinco disoluciones consecutivas de 10 veces). La infección de células diana con cada reserva de virus también se realiza en  
10 ausencia de fármacos (sin fármacos). La neutralización viral se evalúa al comparar la cantidad de actividad de luciferasa producida en células diana, tanto en presencia como en ausencia de anticuerpo. En este modo de realización, los resultados del ensayo se interpretan al comparar la habilidad de cada anticuerpo de bloquear selectivamente la infección de las células diana (reducir o eliminar la actividad de  
15 luciferasa). La actividad de neutralización viral se cuantifica al observar la disolución de anticuerpos más alta (más diluida) que es capaz de bloquear la infección de la célula diana (ej. la disolución más alta que sea capaz de reducir en un 50% la actividad de luciferasa producida en ausencia del anticuerpo).

#### **EJEMPLO 7**

20 **Identificación de secuencias de aminoácidos de la envoltura del VIH-1 que obtienen, alteran o previenen las respuestas de anticuerpos neutralizantes**

[0182] Este ejemplo proporciona un medio y método para identificar secuencias de aminoácidos de la envoltura del VIH-1 que obtienen, alteran o previenen la neutralización de la infección del VIH-1 con anticuerpos (también llamada  
25 neutralización viral en esta solicitud).

[0183] Las secuencias de la envoltura derivadas de muestras de pacientes, los clones individuales derivados de muestras de pacientes, o las secuencias de la envoltura diseñadas mediante mutagénesis de sitio dirigido para que contengan mutaciones específicas, se evalúan en el ensayo de entrada para determinar el tropismo por los  
30 correceptores como se describe en el **Ejemplo 6**.

[0184] En un modo de realización, se evalúa la neutralización con anticuerpos en las muestras longitudinales de pacientes (virus recogidos del mismo paciente en diferentes puntos temporales). Por ejemplo, la neutralización viral se evalúa antes de la vacunación, durante el curso de la vacunación y en puntos temporales graduales  
35 después de que se completara la vacunación. En un modo de realización, la neutralización viral es evaluada para vacunas preventivas. En otro modo de

realización, la neutralización viral es evaluada para vacunas terapéuticas.

**[0185]** En otro modo de realización, la neutralización viral es evaluada para/en muestras recogidas de un gran número de pacientes diferentes. En también otro modo de realización, la neutralización viral es evaluada para/en muestras recogidas de un gran número de pacientes diferentes que representan distintas poblaciones de pacientes y distintas poblaciones de virus. Dichas “poblaciones de pacientes” pueden incluir, sin carácter limitativo, pacientes recién infectados, pacientes con infección crónica, pacientes con enfermedad avanzada, pacientes que están sometiéndose a terapia o inmunoterapia antirretroviral, individuos vacunados y no vacunados. Las “poblaciones de virus” pueden incluir, sin carácter limitativo, virus con características genéticas distintas (clado A; B, C, D, E, F, G), virus sensibles a los fármacos antirretrovirales, virus con una sensibilidad/resistencia reducida a los fármacos antirretrovirales, cepas primarias aisladas, cepas aisladas adaptadas al crecimiento en el cultivo celular (llamados a menudo virus adaptados al laboratorio), virus inductores de sinticios (SI), virus no inductores de sinticios (NSI), virus trópicos macrófagos (M), virus trópicos de linfocitos T (T) y virus trópicos duales (M y T).

#### **Análisis genotípico de muestras de VIH de pacientes**

**[0186]** Las secuencias de la envoltura que representan conjuntos de muestras de pacientes, o clones derivados de conjuntos de pacientes, pueden ser analizados mediante todos los métodos de secuenciación de ADN de amplia disponibilidad. En un modo de realización, las secuencias de muestras de VIH de pacientes son determinadas por medio de la purificación del ARN viral, RT/PCR y electroforesis química y capilar en gel que secuencia los finalizadores de cadena didesoxinucleótidos (Applied Biosystems, Foster City, CA). Las secuencias de la envoltura de conjuntos de virus de pacientes o clones se comparan con secuencias de referencia, muestras de otros pacientes o con una muestra obtenida del mismo paciente antes de la iniciación de la terapia, si existe disponibilidad. El genotipo se evalúa para analizar las secuencias que son distintas de la secuencia de referencia o de pretratamiento y están correlacionadas con las diferencias en la sensibilidad a los inhibidores de entrada.

#### **Neutralización con anticuerpos de virus genéticamente caracterizados**

**[0187]** Las secuencias de aminoácidos de la envoltura que se correlacionan con la neutralización viral son evaluadas mediante la construcción de vectores de expresión de la envoltura (pHIVenv) que contienen una mutación específica en un contexto genético definido (ej. NL4-3 para el tropismo de X4, JRCSF para el tropismo de R5). Las mutaciones pueden ser incorporadas por sí solas y/o en combinación con otras mutaciones que se cree que modulan la neutralización viral. Las mutaciones de la

envoltura se introducen dentro de vectores pHIVenv utilizando cualquiera de los métodos de amplia disponibilidad para la mutagénesis de sitio dirigido. En un modo de realización, se utiliza el método mega-iniciador de la reacción en cadena de la polimerasa para la mutagénesis de sitio dirigido (Sarkar, G. and Summer, S.S., 1990).

- 5 Un vector pHIVenv que contiene una mutación o grupo de mutaciones de la envoltura específica se evalúa mediante el ensayo de entrada viral descrito en el **Ejemplo 6**. Preparados de anticuerpos específicos (ej. preparados de anticuerpos monoclonales o policlonales bien identificados), suero de pacientes infectados por el VIH o suero de individuos vacunados se puede seleccionar para comparar la actividad neutralizante.
- 10 La neutralización de anticuerpos del virus que contiene mutaciones de la envoltura se compara con la neutralización de anticuerpos de un virus genéticamente definido que carece de las mutaciones específicas bajo evaluación. La habilidad de una mutación específica de conferir, alterar o prevenir la neutralización de anticuerpos se confirma o refuta por medio de la introducción de la mutación en un virus de referencia bien
- 15 identificado y de la evaluación de la neutralización con anticuerpos del virus mutante en el ensayo de entrada viral como se describe en el **Ejemplo 6**. Los cambios observados en la neutralización viral se atribuyen a las mutaciones específicas introducidas en el vector pHIVenv.

- [0188]** En un modo de realización, los determinantes genéticos de la neutralización viral son identificados al evaluar secuencias de aminoácidos dentro de la región V3 de la proteína de envoltura de la superficie gp120. Las secuencias de aminoácidos bajo evaluación son identificadas al comparar secuencias de aminoácidos de grandes
- 20 números de virus que pueden, o no pueden, ser neutralizados por diversos preparados de anticuerpos, sueros de pacientes o sueros de individuos vacunados bien identificados. Diferencias consistentes en las secuencias de aminoácidos de la región V3 entre virus que pueden, o no pueden, ser neutralizados se seleccionan para evaluación. Los virus isogénicos basados en un clon parental bien identificado (ej. NL4-3, HXB2, JRCSF) que contiene mutaciones específicas candidatas de neutralización viral en la región V3 de la proteína de la envoltura gp120 se construyen
- 25 mediante mutagénesis de sitio dirigido y se examinan para analizar la neutralización con anticuerpos como se describe en el **Ejemplo 6**. Las células que expresan CD4 más CCR5 (ej. U-87/CD4/CCR5), CD4 más CXCR4 (U-87/CD4/CXCR4), o CD4 más CCR5 más CXCR4 (HT4/CCR5/CXCR4) son infectadas. Las sustituciones de aminoácidos que cambian, obtienen, alteran o previenen la neutralización de
- 30 anticuerpos se consideran importantes para la neutralización viral.

**[0189]** En un modo de realización relacionado, los determinantes de la neutralización

viral son identificados al evaluar secuencias de aminoácidos dentro de la totalidad de la proteína de envoltura de la superficie gp120.

**[0190]** En un modo de realización relacionado, los determinantes de la neutralización viral son identificados al evaluar secuencias de aminoácidos dentro de la proteína transmembrana de la envoltura gp41.

### **EJEMPLO 8**

#### **Medición de la sensibilidad a los inhibidores de entrada viral para guiar las decisiones terapéuticas**

**[0191]** Este ejemplo proporciona un medio y método para utilizar la sensibilidad a los inhibidores de entrada viral para guiar el tratamiento del VIH-1. Este ejemplo también proporciona un medio y método para utilizar la sensibilidad a los inhibidores de entrada viral para guiar el tratamiento de pacientes que han recibido tratamiento antirretroviral previo con un inhibidor de la entrada viral. Esta invención también proporciona un medio y método para utilizar la sensibilidad a los inhibidores de entrada viral para guiar el tratamiento de pacientes que no han recibido tratamiento antirretroviral previo con un inhibidor de la entrada viral.

**[0192]** En un modo de realización, se utiliza la sensibilidad de los virus de paciente los a inhibidores de la entrada viral para guiar el tratamiento de pacientes en los que han fallado regímenes antirretrovirales que incluyen un inhibidor de la entrada viral o más.

El fracaso del tratamiento (también llamado fracaso virológico) se define en general como el tratamiento antiviral parcialmente supresor que deriva en niveles detectables de virus, que se miden normalmente en el plasma del paciente). La orientación puede incluir, sin carácter limitativo, (a) la clarificación de las opciones de tratamiento farmacológico disponibles, (b) la selección de regímenes de tratamiento más activos, (c) la clarificación de la etiología del aumento de la carga viral en pacientes tratados (ej. adherencia pobre, resistencia a los fármacos) y (d) la reducción de la utilización de fármacos inactivos y posiblemente tóxicos. En este modo de realización, los vectores de prueba de resistencia se derivan de muestras de virus de pacientes y se evalúan para analizar la sensibilidad a diversos inhibidores de la entrada viral utilizando el ensayo fenotípico de entrada viral. Los inhibidores de la entrada viral pueden incluir, sin carácter limitativo, inhibidores de fusión (ej. T-20, T-1249), antagonistas de los correceptores (AMD3100, AMD8664, TAK779, PRO542 y compuestos de butano piperidin 1yl) y antagonistas de CD4 (MAb 5A8). Las decisiones terapéuticas apropiadas están basadas en los resultados del ensayo de la entrada viral (**ej. ver Figura 4B**) y los resultados de las pruebas de laboratorio y la información clínica relevantes adicionales.



**[0193]** En otro modo de realización, la sensibilidad de los virus de pacientes a los inhibidores de la entrada viral se utiliza para guiar el tratamiento de pacientes que no han sido previamente tratados con regímenes antirretrovirales que incluyan un inhibidor de la entrada viral o más. La orientación puede incluir, sin carácter limitativo,

5 (a) la clarificación de las opciones de tratamiento farmacológico disponibles, (b) la selección de regímenes de tratamiento más activos, (c) la clarificación de la sensibilidad de referencia a los inhibidores de la entrada viral y (d) la reducción de la utilización de fármacos inactivos y posiblemente tóxicos. Determinar la sensibilidad de referencia de los inhibidores de entrada viral en pacientes que nunca se han sometido

10 a tratamiento es importante por dos razones. Primero, la sensibilidad natural de los virus a los inhibidores de la entrada viral puede variar en gran medida. **(ej. ver Figura 4A)**. Segundo, la utilización incrementada de inhibidores de la entrada viral derivará sin duda en la generación de variantes resistentes a los fármacos que pueden transmitirse a individuos recién infectados. En este modo de realización, los vectores

15 de prueba de resistencia se derivan de muestras de virus de paciente y se evalúan para examinar la sensibilidad a diversos inhibidores de la entrada viral utilizando un ensayo fenotípico de entrada viral. Los inhibidores de la entrada viral pueden incluir, sin carácter limitativo, inhibidores de fusión (ej. T-20, T-1249), antagonistas de los correceptores (AMD3100, AMD8664, TAK779, PRO542 y compuestos de butano

20 piperidin 1yl) y antagonistas de CD4 (MAb 5A8). Las decisiones terapéuticas apropiadas están basadas en los resultados del ensayo de entrada viral y los resultados de las pruebas de laboratorio y la información clínica relevantes adicionales.

#### **EJEMPLO 9**

25 **Medición del tropismo del VIH-1 por los correceptores para guiar las decisiones terapéuticas**

**[0194]** Este ejemplo proporciona un medio y método para utilizar el tropismo del VIH-1 por los correceptores (CCR5, CXCR4) para guiar el tratamiento del VIH-1. Este ejemplo también proporciona un medio y método para utilizar el tropismo del VIH-1 por

30 los correceptores para guiar el tratamiento de pacientes en los que el tratamiento con fármacos antirretrovirales ha fallado. Esta invención también proporciona un medio y método para utilizar el tropismo del VIH-1 por los correceptores para guiar el tratamiento de pacientes recién infectados por el VIH-1.

**[0195]** Este ejemplo proporciona un medio y método para utilizar el tropismo del VIH-1

35 por los correceptores para guiar el tratamiento del VIH-1. Este ejemplo también proporciona un medio y método para utilizar el tropismo del VIH-1 por los

correceptores para guiar el tratamiento de pacientes que han recibido tratamiento antirretroviral previo con un inhibidor de la entrada viral. Esta invención también proporciona un medio y método para utilizar el tropismo del VIH-1 por los correceptores para guiar el tratamiento de pacientes que no han recibido tratamiento  
5 previo con un inhibidor de la entrada viral.

**[0196]** En un modo de realización, el tropismo por los correceptores del virus de un paciente se utiliza para guiar el tratamiento de un paciente en el que han fallado los regímenes antirretrovirales que incluyen un antagonista de los correceptores o más. El fracaso del tratamiento (también llamado fracaso virológico) se define en general como  
10 el tratamiento antiviral parcialmente supresor que deriva en niveles detectables de virus, que se miden normalmente en el plasma del paciente). La orientación puede incluir, sin carácter limitativo, (a) la clarificación de la etiología del aumento de la carga viral en pacientes tratados (ej. adherencia pobre, resistencia a los fármacos, cambio en el tropismo por los correceptores), (b) la clarificación de las opciones de tratamiento  
15 farmacológico disponibles, (c) la selección de regímenes de tratamiento más activos, y (d) la reducción de la utilización de fármacos inactivos y posiblemente tóxicos. Controlar el tropismo por los correceptores en pacientes que están recibiendo un tratamiento con antagonistas de CCR5 tiene una importancia clínica, ya que la presión farmacológica puede derivar en un cambio al correceptor CXCR4. Los virus X4  
20 (tropismo por los correceptores CXCR4) están asociados con un diagnóstico más pobre comparados con los virus R5 (tropismo por los correceptores CCR5). En este modo de realización, los vectores de prueba de resistencia se derivan de muestras de virus de pacientes y se examinan para analizar la sensibilidad a diversos antagonistas de los correceptores utilizando el ensayo fenotípico de entrada viral. Los antagonistas  
25 de los correceptores pueden incluir, sin carácter limitativo AMD3100, AMD8664, TAK779, PRO542 y compuestos de butano piperidin 1yl. Las decisiones terapéuticas apropiadas están basadas en los resultados del ensayo de entrada viral (**ej. ver Figura 4B**) y los resultados de las pruebas de laboratorio y la información clínica relevantes adicionales.

**[0197]** En otro modo de realización, el tropismo por los correceptores de un virus de paciente se utiliza para guiar el tratamiento de pacientes que no han sido previamente tratados con regímenes antirretrovirales que incluyan un antagonista de los correceptores o más. La orientación puede incluir, sin carácter limitativo, (a) la clarificación del tropismo de referencia por los correceptores a los inhibidores de  
35 entrada viral, (b) la clarificación de las opciones de tratamiento farmacológico disponibles, (c) la selección de regímenes de tratamiento más activos, y (d) la

reducción de la utilización de fármacos inactivos y posiblemente tóxicos. Determinar el tropismo de referencia por los correceptores tiene una importancia clínica significativa. El tratamiento con el antagonista de los correceptores apropiado (tropismo de R5 vs. de X4) o antagonistas (tropismo dual o tropismo mixto) es probable que derive en una  
 5 respuesta más potente y duradera. En este modo de realización, los vectores de prueba de resistencia se derivan de muestras de virus de pacientes y se examinan para analizar la sensibilidad a diversos inhibidores de la entrada viral utilizando el ensayo fenotípico de entrada viral. Los antagonistas de los correceptores pueden incluir, sin carácter limitativo AMD3100, AMD8664, TAK779, PRO542 y compuestos de  
 10 butano piperidin 1yl. Las decisiones terapéuticas apropiadas están basadas en los resultados del ensayo de entrada viral (**ej. ver Figura 4B**) y los resultados de las pruebas de laboratorio y la información clínica relevantes adicionales.

#### Referencias

- 15 **[0198]**
1. Adachi, A., H. E. Gendelman, S. Koenig, T. Folks, R. Caney, A. Rabson, and 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.
  - 20 2. Alkhatib, G., C. Combadiere, C.C. Broder, Y. Feng, P.E. Kennedy, P.M. Murphy, and E.A. Berger. 1996. CCR5: A Rantes, MIP-1alpha, MIP-1 Beta Receptor as a Fusion Cofactor for Macrophage-tropic Hiv-1. *Science* 272:1955-8.
  3. Allaway G.P., Ryder A.M., Beaudry G.A., and Maddon P.J. 1993. Synergistic Inhibition of HIV-1 Envelope-Mediated Cell Fusion by CD4-based Molecules in  
 25 Combination with Antibodies to Gp120 or Gp41. *Aids Res. Hum. Retroviruses* 9:581-7.
  4. Baba, M., O. Nishimura, N. Kanzaki, M. Okamoto, H. Sawada, Y. Iizawa, M. Shiraishi, Y. Aramaki, K. Okonogi, Y. Ogawa, K. Meguro, and M. Fujino. 1999. A Small-molecule, Nonpeptide CCR5 Antagonist with Highly Potent and Selective Anti-hiv-1 Activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:5698-703.
  - 30 5. Baxter, J., D. Mayers, D. Wentworth, J. Neaton, and T. Merigan. 1999. A Pilot Study of the Short-term Effects of Antiretroviral Management Based on Plasma Genotypic Antiretroviral Resistance Testing (Gart) in Patients Failing Antiretroviral Therapy. Presented at the 6th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. Chicago, IL.
  - 35 6. Bernard P., Kezdy K.e., Van Melderen L., Steyaert J., Wyns L., Pato M.I., Higgins

- P.N., and Couturier M. 1993. The F Plasmid CcdB protein Induces Efficient ATP-dependent Dna Cleavage by Gyrase. *J. Mol. Biol.* -23:534-41.
7. Bernard, P. and Couturier, M. 1992. Cell Killing by the F Plasmid Ccdb protein Involves Poisoning of DNA topoisomerase II Complexes. *J. Mol. Bio.* 226:735-45.
- 5 8. Bleul, C.C., M. Farzan, H. Choe, C. Parolin, I. Clark-Lewis, J. Sodroski, and T.A. Springer. 1996. The Lymphocyte Chemoattractant Sdf-1 Is a Ligand for Lestr/fusin and Blocks Hiv-1 Entry. *Nature* 382:829-33.
9. Bridger G.J, Skerlj R.T., Padmanabhan S., Martellucci S.A., Henson G.W., Struyf S., Witvrouw M., Schols D., and De Clercq E. 1999. Synthesis and Structure-activity
- 10 Relationships of Phenylenebis(methylene)-linked Bisazamacrocycles That Inhibit HIV-1 and HIV-2 Replication by Antagonism of the Chemokine Receptor CXCR4. *J. Med. Chem.* 42:3971-81.
10. Carpenter, C.J., Cooper D.A., Fischl, M.A., Gatell J.M., Gazzard B.G., Hammer S.M., Hirsch M.s., Jacobsen D.M., Katzenstein D.A., Montaner J.S., Richman D., Saag
- 15 M.S., Schechter M., Schooley R.T., Thompson M.A., Vello S., Yeni P.G., and Volberding P.A. 2000. Antiretroviral Therapy in Adults. *JAMA* 283:381-89.
11. CDC (Centers for Disease Control and Prevention). HIV/AIDS Surveillance Report, 1999;11(no. 1). 12. Coffin, J.m. 1995. HIV Population Dynamics in Vivo: Implications for Genetic Variation, Pathogenesis, and Therapy. *Science* 267:483-489.
- 20 13. DHHS (Department of Health and Human Services). Henry Kaiser Family Foundation: Guidelines for the Use of Antiretrovirals Agents in HIV-infected Adults and Adolescents. (Jan 28, 2000).
14. Gerdes. K., L.k. Poulsen. T. Thisted, A.k. Nielson, J. MaRTInussen, and P.h. Andreasen. 1990. The Hok Killer Gene Family in Gram-negative Bacteria. *The New*
- 25 *Biologist*: 2:946-956.
15. 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, and R. Pauwels. 1998. A Rapid Method for Simultaneous Detection of Phenotypic Resistance to Inhibitors of protease and
- 30 Reverse Transcriptase in Recombinant Human Immunodeficiency Virus Type 1 Isolates from Patients Treated with Antiretroviral Drugs. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42:269-276.
16. 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-
- 35 7131.

17. 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, and V. C. R. W. Group. 1993. Standardized Peripheral Blood Mononuclear Cell Culture Assay for Determination of Drug Susceptibilities of Clinical  
5 Human Immunodeficiency Virus Type 1 Isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* 37:1095-1101.
18. Judice J.k., Tom J.y., Huang W., Wrin T., Vennari J., Petropoulos C.j., and Mcdowell R.s. 1997. Inhibition of HIV Type 1 Infectivity by Constrained Alpha-helical Peptides: Implications for the Viral Fusion Mechanism. *proc. Natl. Acad. Sci. U S a*  
10 94:13426-30.
19. Kilby Jm, Hopkins S, Venetta Tm, Dimassimo B, Cloud Ga, Lee Jy, Alldredge L, Hunter E, Lambert D, Bolognesi D, Matthews T, Johnson Mr, Nowak Ma, Shaw Gm, and 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.
- 15 20. Mascola, J.r., G. Stiegler, T.c. Vancott, H. Katinger, C.b. Carpenter, C.e. Hanson, H. Beary, D. Hayes, S.s. Frankel, D.I. Birx, and 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.
21. Miyoshi, H., B. Ulrike, M. Takahashi, F.h. Gage, and I.m. Verma. 1998.  
20 Development of a Self-inactivating Lentivirus Vector. *J. Virol.* 72:8150-5157.
22. Naviaux, R.k., E. Costanzi, M. Haas, and I.m. Verma. 1996. The Pcl Vector System: Rapid production of Helperfree, High-titer, Recombinant Retroviruses. *J. Virol.* 70: 5701-5705.
23. Petropoulos, C.j., N.t. Parkin, K.I. Limoli, Y.s. Lie, T. Wrin, W. Huang, H. Tian, D.  
25 Smith, G.a. Winslow, D. Capon and J.m. Whitcomb. 2000. A Novel Phenotypic Drug Susceptibility Assay for Hiv-1. *Antimicrob. Agents & Chem.* 44:920-928.
24. Phrma (Pharmaceutical Research and Manufacturers of America). *New Medicines in Development for Aids 1999.* [Http://www.phrma.org](http://www.phrma.org).
25. Piketty, C., E. Race, P. Castiel, L. Belec,- G. Peytavin, A. Si-mohamed, G.  
30 Gonzalez-canali, L. Weiss, F. Clavel, and M. Kazatchkine. 1999. Efficacy of a Five-drug Combination Including Ritonavir, Saquinavir and Efavirenz in Patients Who Failed on a Conventional Triple-drug Regimen: Phenotypic Resistance to protease Inhibitors predicts Outcome of Therapy. *Aids:* 13:f71-f77.
26. Porter, C.c., K.v. Lukacs, G. Box, Y. Takeuchi, and M.k.I. Collins. 1998. Cationic  
35 Liposomes Enhance the Rate of Transduction by a Recombinant Retroviral Vector in

Vitro and in Vivo. *J. Virol.* 72:4832-4840.

27. Reimann K.a., Cate R.I., Wu Y., Palmer L., Olson D., Waite B.c., Letvin N.I., and Burkly L.c. 1995. In Vivo Administration of CD4-specific Monoclonal Antibody: Effect on provirus Load in Rhesus Monkeys Chronically Infected with the Simian  
5 Immunodeficiency Virus of Macaques. *Aids Res. Hum. Retroviruses* 11:517-25
28. *Retroviruses*. Coffin, J., S. Hughes, H. Varmus (Eds). 1997. Cold Spring Harbor Laboratory press, Cold Spring Harbor, Ny.
29. Richman, D. 1998. Nailing down Another HIV Target. *Nature Med.* 4:1232-1233.
30. Rimsky, L. T., D. C. Shugars, and T. J. Matthews. 1998. Determinants of Human  
10 Immunodeficiency Virus Type 1 Resistance to Gp41-derived Inhibitory Peptides. *J. Virol.* 72:986-993.
31. Rodriguez-rosado, R., Briones, C. and Soriano, V. 1999. Introduction of HIV Drug-resistance Testing in Clinical practice. *Aids* 13:1007-1014.
32. Schinazi, R.f, Larder, B.a., and Mellors, J.w. 1999. Mutations in Retroviral Genes  
15 Associated with Drug Resistance. *Intl. Antiviral News:* 7:46-69
33. Shi C., and 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.
34. Stephenson, J. 1999. New Class of Anti-hiv Drugs. *Jama* 282:1994.
- 20 35. Who, Unaid/world Health Organization. Feport: Aids Epidemic Update: December 1999. [Http://www.unaids.org/publications/documents/epidemiology](http://www.unaids.org/publications/documents/epidemiology).
36. Wild, C., T. Oak, C. Mcdanal, D. Bolognesi, and 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.
- 25 37. Zennou, V., F. Mammamo, S. Paulous, D. Mathez, and 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.
38. Ziermann, R., K. Limoli, K. Das, E. Arnold, C.j. Petropoulos, and N.t. Parkin. 2000.  
30 A Mutation in Hiv-1 protease, N88s, That Causes in Vitro Hypersensitivity to Amprenavir. *J. Virol.* 74:4414-4419.

**Tabla 1**

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

**Tabla 2** Virus y reactivos representativos

Virus	Envoltura <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(INTERNO)
92TH014, 92TH026	R5/NSI/B	ARRRP(INTERNO)

ES 2 396 342 T3

Virus	Envoltura <sup>a</sup>	Fuente
92BR025, 93MW959	R5/SI/C	ARRRP(INTERNO)
92UG035	R5/NSI/D	ARRRP(INTERNO)
92TH022, 92TH023	R5/NSI/E	ARRRP(INTERNO)
93BR020	R5-X4/SI/F	ARRRP(INTERNO)
Anticuerpos	Epitope	FUENTE
Mabs 2F5, 1577	gp41 TM	ARRRP
Mabs IG1b12, 2G12, 17b, 48D	gp120 SU	ARRRP
Sueros de neutralización #2, VIH-IG	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, MIP1a/b	CCR5	SIGMA/ARRRP
SDF1a/b	CXCR4	SIGMA/ARRRP
AMD 3100	CXCR4	AnorMed
Sulfato de dextrano, heparina	No específica	Sigma
<sup>a</sup> R5 (correceptor CCR5), X4 (correceptor CXCR4) SI (inductor de sinticio), NSI (no inductor de sinticio), A,B,C,D,E,F (designación del clado de la envoltura) <sup>b</sup> Programa de Referencia de Reactivos de Investigación del SIDA (AIDS Research and Reference Reagent Program)		



**Tabla 3**

<b>Iniciadores examinados para analizar la amplificación de la envoltura del VIH</b>	
<b>INICIADORES DE RT</b>	
<b>RT env_N3</b>	<b>5'-GGA GCA TTT ACA AGC AGC AAC ACA GC-3'</b>
<b>RT env 9720</b>	<b>5'-TTC CAG TCA VAC CTC AGG TAC-3'</b>
<b>RT env 9740</b>	<b>5'-AGA CCA ATG ACT TAY AAG G-3'</b>
<b>INICIADORES DE PCR 5'</b>	
<b>5'env</b>	<b>5' -GGG CTC GAG ACC GGT CAG TGG CAA TGA GAG TGA AG- 3'</b>
<b>5'env_Xho/Pin</b>	<b>5'-GGG CTC GAG ACC GGT GAG CAG AAG ACA GTG GCA ATG A-3'</b>
<b>5'env_START</b>	<b>5'-GGG CTC GAG ACC GGT GAG CAG AAG ACA GTG GCA ATG -3'</b>
<b>INICIADORES DE PCR 3'</b>	
<b>3' env</b>	<b>5' -GGG TCT AGA ACG CGT TGC CAC CCA TCT TAT AGC AA- 3'</b>
<b>3'env_Xba/Mlu</b>	<b>5'-GGG TCT AGA ACG CGT CCA CTT GCC ACC CAT BTT ATA GC-3'</b>
<b>3'env_STOP</b>	<b>5'-GGG TCT AGA ACG CGT CCA CTT GCC ACC CAT BTT A-3'</b>
<b>3' delta CT</b>	<b>5' -GAT GGT CTA AGA CGC TGT TCA ATA TCC CTG CCT AAC TC- 3'</b>
<b>Todos los experimentos se encuentran en bloque virológico número 0188</b>	

Tabla 4 (Cuadro 1)

## Fármacos contra el VIH

Fármaco/Compuesto	Nombre genérico	Marca	Fabricante
<b>Inhibidores de RT (análogos nucleótidos NRTI)</b>			
AZT, ZDV	Zidovudine	Retrovir	Glaxo/Wellcome
3TC	Lamivudine	Epivir	Glaxo/Wellcome
AZT + 3TC		Combivir	Glaxo/Wellcome
d4T	Stavudine	Zerit	Bristol-Myers/Squibb
ddl	Didanosine	Videx	Bristol-Myers/Squibb
ddC	Zalcitabine	Hivid	Hoffman La Roche
1592U89	Abacavir	Ziagen	Glaxo/Wellcome
AZT + 3TC + 1592U89		Trizivir	Glaxo/Wellcome
(-)FTC (5-fluoro-3TC; <i>Coartem</i> )	Emlicitabine		Triangle Pharmaceuticals
(-)FTC + (+)FTC (50:50)	Racivir		QuadPharma
DAPD (DXG active)	Amdoxovir		Triangle Pharmaceuticals
F-ddA (2-fluoro-ddA)	Lodenosine		MedImmune Oncology (US Bioscience)
BCH-10552, dOTC (2-deoxy-3-oxa-4-thiocytidine)			BioChem Pharma, Inc.
D-d4FC			Triangle Pharmaceuticals (Schinazi)
<b>Inhibidores de RT (análogos nucleótidos NRTI)</b>			
bis-POC PMPA (GS-4331)	Tenofovir		Gilead Sciences
bis-POM PMEA (GS-840)	Adelovir dipivoxil		Gilead Sciences
<b>Inhibidores de RT (no nucleótidos NNRTI)</b>			
BI-RG-587	Nevirapine	Viramune	Boehringer-Ingelheim (Roxanne)
BHAP PNU-90152T	Delavirdine	Rescriptor	Pharmacia & Upjohn
DMP 266 (L-743,726)	Efavirenz	Sustiva	Dupont Pharmaceuticals (Avid)
MKC442 (Coactinon)	Emivirine		Triangle/Mitsubishi-Kasei
AG-1549 (S1153) (on hold)	Capravirine		Agouron Pharmaceuticals
PNU-142721			Pharmacia & Upjohn
DPC-961, -963, -083, -087			DuPont Pharmaceuticals
SJ-3366	También inhibidor de entrada?		Samjin Pharmaceuticals
BHAP PNU-87201	Ateviridine		Upjohn
GW420867X (quinoxaline)	(2 <sup>nd</sup> gen. HBV 097)		Glaxo/Wellcome (Hoechst Bayer)
TMC 120 (R147681)			Tibotec
TMC 125 (R165335)			Tibotec
R66183	tivirapine		Janssen Pharmaceuticals
Calanolide A			Sarawak Medichem Pharmaceuticals
<b>Inhibidores de proteasa (PRI)</b>			
Ro 31-8959	Saquinavir (hgc) Saquinavir (sgc)	Inivase Fortivase	Hoffman-La Roche
MK-639 (L-735,524)	Indinavir	Crixivan	Merck Research Laboratories
ABT-538 (A-84538)	Ritonavir	Norvir	Abbott Laboratories
AG1343	Neffinavir	Viracept	Agouron Pharmaceuticals
141W94 (VX-478)	Amprenavir	Agenerase	Glaxo-Wellcome/Vertex
ABT-378r	Lopinavir/ritonavir	Kaletra	Abbott Laboratories
BMS 232,632 (aza-peptide)			Bristol-Myers-Squibb
FNU-140690	Tipranavir		Pharmacia & Upjohn
DMP 450 (cyclic urea)	Mozenavir		Triangle/Avid (ph I/II)
TMC 126 (Erickson's compound)			Tibotec
GW433908 (VX-175)	amprenavir pro-drug		Glaxo/Wellcome/Vertex
L755,423 (on hold)			Merck
PD-178390 (dihydropyrene)			Parke Davis (Boehringer-Ingelheim)
? new candidate			Roche
DPC 681 and 684			DuPont Pharmaceuticals
AG-1776 (JE-2147 = KNI-764)			Agouron Pharmaceuticals
<b>Inhibidores de receptor/envoltura</b>			
T-20 (gp41)	Pentafuside		Trimeris Pharmaceuticals
T-1249 (gp41)			Trimeris Pharmaceuticals
D-peptide inhibitor (gp41) small mol.	SCH-C		Schering-Plough
AMD-3100 (CXCR4)	(bicyclam)		AnorMED
AMD-8664 (CXCR4)	(macrocyclam)		AnorMED
ALX40-4C (CXCR4)			U. PA
FP21399			Fuji Pharmaceuticals
PRO 542 (gp120)	CD4IgG2		Progenics Pharmaceuticals
PRO-140 (CCR5)	Mab CCR5		Progenics Pharmaceuticals
T-22 (CXCR4)	(peptide, 18-mer)		
Mei-SDF-1 (CXCR4)			
TAK 779 (CCR5 antagonist)			Takeda
AOP-Rantes (CCR5)			Gryphon Sciences

**Tabla 4 (Cuadro 2)**

<b>Rantes 9-68 (CCR5)</b>			
Antagonistas de CCR5	Clase de butano 4-(piperidin-1-yl)		Merck
<b><math>\alpha</math>-Inmunocina -NNS03 (CCR5, CXCR4)</b>	<b><math>\alpha</math>-cobratoxin</b>		PhyloMed Corp.
Inhibidores de integrasa			
<b>AR-177</b>	Zintevir		Aronex Pharmaceuticals
<b>Diketo acids</b>			Merck Research Laboratories
Inhibidores de la nucleocápside			
<b>RB 2121</b>	Mímico de péptido cíclico p7		(see PNAS 96:4886-4891 (1999))
<b>CI-1012</b>			Achelion Pharmaceuticals
Inhibidores de RNasa H			
<b>SP1093V (BBNH Fe+derivada 3)</b>			(Parniak)

Los fármacos aprobados por la FDA se muestran en rojo resaltado = desarrollo discontinuo, azul = estado de desarrollo no seguro

5

**Tabla 4 (Cuadro 3)**

Nombre genérico (abreviación)	Marca	Empresa	Fecha de aprobación por el FDA
zidovudine, AZT	Retrovir	Glaxo Wellcome	marzo 87
didanosine, ddl	Videx	Bristol Myers-Squibb	octubre 91
zalcitabine, ddC	Hivid	Hoffman-La Roche	junio 92
stavudine, d4T	Zerit	Bristol Myers-Squibb	junio 94
lamivudine, 3TC	Epivir	Glaxo Wellcome	noviembre 95
saquinavir, SQV, hgc	Invirase	Hoffman-La Roche	diciembre 95
saquinavir, SQV, sgc	Fortovase	Hoffman-La Roche	noviembre 97
ritonavir, RTV	Norvir	Abbott Laboratories	marzo 96
indinavir, IDV	Crixivan	Merck & Co., Inc.	marzo 96
nevirapine, NVP	Viramune	Boehringer Ingelheim	junio 96
nelfinavir, NFV	Viracept	Agouron Pharmaceuticals	marzo 97
delavirdine, DLV	Rescriptor	Pharmacia & Upjohn	abril 97
ZDV+3TC	Combivir	Glaxo Wellcome	septiembre 97
efavirenz, EFV	Sustiva	DuPont Pharmaceuticals	septiembre 98
abacavir, ABC	Ziagen	Glaxo Wellcome	febrero 99
amprenavir	Agenerase	Glaxo Wellcome	abril 99
lopinavir/ritonavir	Kaletra	Abbott	septiembre 2000

<b>Nombre genérico (abreviación)</b>	<b>Marca</b>	<b>Empresa</b>	<b>Fecha de aprobación por el FDA</b>
ZDV+3TC+ABC	Trizivir	GlaxoSmithKline	noviembre 2000

PLANTILLA DE EXAMEN DEL ENSAYO DEL CORRECEPTOR

Límite ULR activo: 100      Límite de ratio de tropismo: 5      CXCR4      CCR5      DUA1      Fármaco 1: L83      Fármaco 2: AMD

	1	2	3	4	5	6
Sin fármaco ULR	R5 X4 R5:X4 34 26,471 0.00	R5 X4 R5:X4 14 140 55 257.09	R5 X4 R5:X4 46 6,049 0.01	R5 X4 R5:X4 21,056 38,144 0.57	R5 X4 R5:X4 30 7,330 0.00	R5 X4 R5:X4 3,985 31 126.65
L83 ULR	R5 X4 R5:X4 4,557 19,107 0.24	R5 X4 R5:X4 145 276 0.66	R5 X4 R5:X4 67,383 72 935.96	R5 X4 R5:X4 611 19,715 0.03	R5 X4 R5:X4 46 3,946 0.01	R5 X4 R5:X4 742 4,370 0.07
AMD ULR	R5 X4 R5:X4 632 34	R5 X4 R5:X4 45 24	R5 X4 R5:X4 47,235 40	R5 X4 R5:X4 30 14,985 1.07	R5 X4 R5:X4 2,854 39	R5 X4 R5:X4 26 2,844 46
Sin fármaco ULR	R5 X4 R5:X4 67,026 68 997.47	R5 X4 R5:X4 14,982 12,070 1.25	R5 X4 R5:X4 3,766 4,306 0.86	R5 X4 R5:X4 50 37	R5 X4 R5:X4 558 247 2.72	R5 X4 R5:X4 231 35 6.60
L83 ULR	R5 X4 R5:X4 170	R5 X4 R5:X4 111 10,839	R5 X4 R5:X4 59 3,397	R5 X4 R5:X4 146 19,715 0.03	R5 X4 R5:X4 37 22	R5 X4 R5:X4 47
AMD ULR	R5 X4 R5:X4 5,146	R5 X4 R5:X4 8,590 3,364	R5 X4 R5:X4 2,049 538	R5 X4 R5:X4 16 1,072	R5 X4 R5:X4 490 38	R5 X4 R5:X4 21
Sin fármaco ULR	R5 X4 R5:X4 100 39	R5 X4 R5:X4 3,724 2,910 1.61	R5 X4 R5:X4 458 603 0.67	R5 X4 R5:X4 146 24 6.17	R5 X4 R5:X4 37 22	R5 X4 R5:X4 46 61
L83 ULR	R5 X4 R5:X4 100 39	R5 X4 R5:X4 30 2,656 277	R5 X4 R5:X4 37 484 72	R5 X4 R5:X4 55 24 6.17	R5 X4 R5:X4 37 22	R5 X4 R5:X4 46 61
AMD ULR	R5 X4 R5:X4 100 39	R5 X4 R5:X4 1,548 277	R5 X4 R5:X4 206 72	R5 X4 R5:X4 158	R5 X4 R5:X4 37 22	R5 X4 R5:X4 46 61
Sin fármaco ULR	R5 X4 R5:X4 35 107 0.33	R5 X4 R5:X4 83 4,209 0.02	R5 X4 R5:X4 16,095 8,451 2.14	R5 X4 R5:X4 39,257 38 1033.08	R5 X4 R5:X4 5,413 40 135.33	R5 X4 R5:X4 97,733 29 3370.10
L83 ULR	R5 X4 R5:X4 35 107 0.33	R5 X4 R5:X4 83 4,209 0.02	R5 X4 R5:X4 16,095 8,451 2.14	R5 X4 R5:X4 39,257 38 1033.08	R5 X4 R5:X4 5,413 40 135.33	R5 X4 R5:X4 97,733 29 3370.10
AMD ULR	R5 X4 R5:X4 35 107 0.33	R5 X4 R5:X4 83 4,209 0.02	R5 X4 R5:X4 16,095 8,451 2.14	R5 X4 R5:X4 39,257 38 1033.08	R5 X4 R5:X4 5,413 40 135.33	R5 X4 R5:X4 97,733 29 3370.10
Sin fármaco ULR	R5 X4 R5:X4 3760 40 04.20	R5 X4 R5:X4 786 46 16.38	R5 X4 R5:X4 340 21 16.10	R5 X4 R5:X4 5,189 43 120.67	R5 X4 R5:X4 4,218 37 116.70	R5 X4 R5:X4 156 51 3.84
L83 ULR	R5 X4 R5:X4 3760 40 04.20	R5 X4 R5:X4 786 46 16.38	R5 X4 R5:X4 340 21 16.10	R5 X4 R5:X4 5,189 43 120.67	R5 X4 R5:X4 4,218 37 116.70	R5 X4 R5:X4 156 51 3.84
AMD ULR	R5 X4 R5:X4 2,773	R5 X4 R5:X4 797	R5 X4 R5:X4 282	R5 X4 R5:X4 5,356	R5 X4 R5:X4 3,461	R5 X4 R5:X4 184
Sin fármaco ULR	R5 X4 R5:X4 381 76 15.04	R5 X4 R5:X4 98 38	R5 X4 R5:X4 4,448 26 158.89	R5 X4 R5:X4 4,357 9,107 0.48	R5 X4 R5:X4 6,090 105 56.00	R5 X4 R5:X4 1,681 3,635 0.52
L83 ULR	R5 X4 R5:X4 381 76 15.04	R5 X4 R5:X4 98 38	R5 X4 R5:X4 4,448 26 158.89	R5 X4 R5:X4 4,357 9,107 0.48	R5 X4 R5:X4 6,090 105 56.00	R5 X4 R5:X4 1,681 3,635 0.52
AMD ULR	R5 X4 R5:X4 340	R5 X4 R5:X4 3,762	R5 X4 R5:X4 3,762	R5 X4 R5:X4 90 36	R5 X4 R5:X4 4,473 51	R5 X4 R5:X4 272 27
Sin fármaco ULR	R5 X4 R5:X4 610 33 16.45	R5 X4 R5:X4 879 59 16.50	R5 X4 R5:X4 491 33 14.88	R5 X4 R5:X4 300 3,815 0.08	R5 X4 R5:X4 297 3,616 0.08	R5 X4 R5:X4 39 61,594 0.00
L83 ULR	R5 X4 R5:X4 610 33 16.45	R5 X4 R5:X4 879 59 16.50	R5 X4 R5:X4 491 33 14.88	R5 X4 R5:X4 300 3,815 0.08	R5 X4 R5:X4 297 3,616 0.08	R5 X4 R5:X4 39 61,594 0.00
AMD ULR	R5 X4 R5:X4 42 56	R5 X4 R5:X4 55 812	R5 X4 R5:X4 49 216	R5 X4 R5:X4 29 3,601 265 36	R5 X4 R5:X4 32 2,946 256 30	R5 X4 R5:X4 56,739 40
Sin fármaco ULR	R5 X4 R5:X4 30 1,217 0.00	R5 X4 R5:X4 49 1,128 0.04	R5 X4 R5:X4 42,200 70 602.94	R5 X4 R5:X4 45 1,159 0.04	R5 X4 R5:X4 44,580 97 450.66	R5 X4 R5:X4 32 29,118 0.00
L83 ULR	R5 X4 R5:X4 30 1,217 0.00	R5 X4 R5:X4 49 1,128 0.04	R5 X4 R5:X4 42,200 70 602.94	R5 X4 R5:X4 45 1,159 0.04	R5 X4 R5:X4 44,580 97 450.66	R5 X4 R5:X4 32 29,118 0.00
AMD ULR	R5 X4 R5:X4 814 47	R5 X4 R5:X4 934 37	R5 X4 R5:X4 90 33,192	R5 X4 R5:X4 781 33	R5 X4 R5:X4 60 30,510	R5 X4 R5:X4 12,779 31
Sin fármaco ULR	R5 X4 R5:X4 100 5,204 0.02	R5 X4 R5:X4 11,299 57 217.29	R5 X4 R5:X4 1,273 20 63.65	R5 X4 R5:X4 7,375 10,856 0.58	R5 X4 R5:X4 4,397 7,131 0.62	R5 X4 R5:X4 10,111 50 322.20
L83 ULR	R5 X4 R5:X4 100 5,204 0.02	R5 X4 R5:X4 11,299 57 217.29	R5 X4 R5:X4 1,273 20 63.65	R5 X4 R5:X4 7,375 10,856 0.58	R5 X4 R5:X4 4,397 7,131 0.62	R5 X4 R5:X4 10,111 50 322.20
AMD ULR	R5 X4 R5:X4 3,058 34	R5 X4 R5:X4 22 8,232	R5 X4 R5:X4 26 1,129	R5 X4 R5:X4 40 6,455 3,561 2,203	R5 X4 R5:X4 42 3,674 1,626 1,205	R5 X4 R5:X4 66 11,490
Sin fármaco ULR	R5 X4 R5:X4 53 974 0.05	R5 X4 R5:X4 177 37 5.53	R5 X4 R5:X4 24,739 33 745.67	R5 X4 R5:X4 612 45 13.60	R5 X4 R5:X4 2,997 9,639 0.51	R5 X4 R5:X4 411 31 13.42
L83 ULR	R5 X4 R5:X4 53 974 0.05	R5 X4 R5:X4 177 37 5.53	R5 X4 R5:X4 24,739 33 745.67	R5 X4 R5:X4 612 45 13.60	R5 X4 R5:X4 2,997 9,639 0.51	R5 X4 R5:X4 411 31 13.42
AMD ULR	R5 X4 R5:X4 50 626 55	R5 X4 R5:X4 32 361	R5 X4 R5:X4 31 21,767	R5 X4 R5:X4 46 479	R5 X4 R5:X4 22 7,261 925 35	R5 X4 R5:X4 26 2,667 157
Sin fármaco ULR	R5 X4 R5:X4 45 336 0.13	R5 X4 R5:X4 714 45 15.67	R5 X4 R5:X4 11,029 16 612.72	R5 X4 R5:X4 2,906 43 67.63	R5 X4 R5:X4 13,967 52 269.17	R5 X4 R5:X4 24,377 34 716.97
L83 ULR	R5 X4 R5:X4 45 336 0.13	R5 X4 R5:X4 714 45 15.67	R5 X4 R5:X4 11,029 16 612.72	R5 X4 R5:X4 2,906 43 67.63	R5 X4 R5:X4 13,967 52 269.17	R5 X4 R5:X4 24,377 34 716.97
AMD ULR	R5 X4 R5:X4 207 29	R5 X4 R5:X4 31 366	R5 X4 R5:X4 16 8,390	R5 X4 R5:X4 31 2,306	R5 X4 R5:X4 73 12,139	R5 X4 R5:X4 59 16,045
Sin fármaco ULR	R5 X4 R5:X4 9,254 21,840 0.39	R5 X4 R5:X4 5,249 20,393 0.26	R5 X4 R5:X4 470 39 12.05	R5 X4 R5:X4 19,175 126 152.16	R5 X4 R5:X4 513 31 16.55	R5 X4 R5:X4 3,264 26 116.57
L83 ULR	R5 X4 R5:X4 9,254 21,840 0.39	R5 X4 R5:X4 5,249 20,393 0.26	R5 X4 R5:X4 470 39 12.05	R5 X4 R5:X4 19,175 126 152.16	R5 X4 R5:X4 513 31 16.55	R5 X4 R5:X4 3,264 26 116.57
AMD ULR	R5 X4 R5:X4 2,716 40	R5 X4 R5:X4 784 28	R5 X4 R5:X4 310	R5 X4 R5:X4 19,638 35	R5 X4 R5:X4 500	R5 X4 R5:X4 3,038
Sin fármaco ULR	R5 X4 R5:X4 3,853 77 50.04	R5 X4 R5:X4 411 34 12.09	R5 X4 R5:X4 7,657 41 191.63	R5 X4 R5:X4 25,437 38 669.39	R5 X4 R5:X4 17,443 45 387.62	R5 X4 R5:X4 16,707 38 439.66
L83 ULR	R5 X4 R5:X4 3,853 77 50.04	R5 X4 R5:X4 411 34 12.09	R5 X4 R5:X4 7,657 41 191.63	R5 X4 R5:X4 25,437 38 669.39	R5 X4 R5:X4 17,443 45 387.62	R5 X4 R5:X4 16,707 38 439.66
AMD ULR	R5 X4 R5:X4 2,168	R5 X4 R5:X4 253	R5 X4 R5:X4 4,595	R5 X4 R5:X4 14,749	R5 X4 R5:X4 13,700	R5 X4 R5:X4 12,486
Sin fármaco ULR	R5 X4 R5:X4 262 38 6.92	R5 X4 R5:X4 3,800 9,577 0.41	R5 X4 R5:X4 2,089 1,690 1.20	R5 X4 R5:X4 475 43 11.05	R5 X4 R5:X4 8,475 36 223.03	R5 X4 R5:X4 4,107 33 124.45
L83 ULR	R5 X4 R5:X4 262 38 6.92	R5 X4 R5:X4 3,800 9,577 0.41	R5 X4 R5:X4 2,089 1,690 1.20	R5 X4 R5:X4 475 43 11.05	R5 X4 R5:X4 8,475 36 223.03	R5 X4 R5:X4 4,107 33 124.45
AMD ULR	R5 X4 R5:X4 145	R5 X4 R5:X4 84 6,140 98 45	R5 X4 R5:X4 33 1,274 1,106 160	R5 X4 R5:X4 30 155	R5 X4 R5:X4 30 6,862	R5 X4 R5:X4 26 2,571
Sin fármaco ULR	R5 X4 R5:X4 443 13,452 0.03	R5 X4 R5:X4 34 128,236 0.00	R5 X4 R5:X4 22 67	R5 X4 R5:X4 45 33	R5 X4 R5:X4 43 47	R5 X4 R5:X4 46 35
L83 ULR	R5 X4 R5:X4 443 13,452 0.03	R5 X4 R5:X4 34 128,236 0.00	R5 X4 R5:X4 22 67	R5 X4 R5:X4 45 33	R5 X4 R5:X4 43 47	R5 X4 R5:X4 46 35
AMD ULR	R5 X4 R5:X4 451 51	R5 X4 R5:X4 65,018 45				

5

PLANTILLA DE EXAMEN DEL ENSAYO DEL CORRECTOR

Fármaco 1: L83  
Fármaco 2: AMD

Límite ULR activo: 100      Límite de ratio de tropismo: 5      CXCR4      CCPE      DJAL      [REDACTED]

	1			2			3			4			5			6		
Sin fármaco ULR	R5	X4	R5:X4	R5	X4	R5:X4	R5	X4	R5:X4	R5	X4	R5:X4	R5	X4	R5:X4	R5	X4	R5:X4
L83 ULR	34	26,471	0.00	14,149	51	257.09	40	6,845	0.03	21,005	38,144	0.57	30	7,336	0.00	3,008	31	127.65
AMD ULR		18,258		54				4,696		17	25,542		27	5,468		34		127.65
		32		12,186						7,228		32		26		3,694		
Sin fármaco ULR	13			14			15			16			17			18		
L83 ULR	4,552	10,107	0.24	149	226	0.66	67,585	72	931.96	611	19,715	0.03	45	3,548	0.03	294	4,330	0.07
AMD ULR		8,850		40	153		50			30	14,982		33	2,953		36	2,918	
		838		41	74		42,735			76	1,022		152			25		46
Sin fármaco ULR	28			26			27			28			29			30		
L83 ULR	67,328	88	667.47	14,507	12,000	1.25	3,785	4,384	0.86	50	37		658	24	0.01	231	33	6.60
AMD ULR		150		111	10,830		59	1,367					33	221		47		
		51,146		8,580	3,364		2,045	538					403	38		210		
Sin fármaco ULR	37			38			39			40			41			42		
L83 ULR	100	39		3,724	2,310	1.61	450	668	0.67	148	24	6.17	32	22		60	61	
AMD ULR				38	2,654		37	452		33								
				1,884	277		236	72		139								
Sin fármaco ULR	49			50			51			52			53			54		
L83 ULR	35	107	0.33	82	4,200	0.02	18,095	8,451	2.14	35,257	38	1033.05	5,413	40	135.32	87,733	29	3370.10
AMD ULR		60		3,562			13,806	6,220		85			31			30		
		34		88			16,090	0,711		27,032			5,043			48,452		
Sin fármaco ULR	61			62			63			64			65			66		
L83 ULR	3,765	40	94.23	785	48	16.32	310	21	16.19	5,165	43	120.67	4,316	37	116.70	106	51	3.84
AMD ULR		20		35			31									23		
		2,173		787			282			5,356			3,461			184		
Sin fármaco ULR	73			74			75			76			77			78		
L83 ULR	391	76	16.04	80	38		4,440	21	158.89	4,357	5,102	0.45	6,090	105	58.00	1,886	3,635	0.52
AMD ULR		50					42			34	7,032		70	77		28	2,662	
		340					3,752			865	30		4,472	51		279	27	
Sin fármaco ULR	85			86			87			88			89			90		
L83 ULR	510	33	15.45	979	58	16.50	491	33	14.80	300	3,613	0.09	297	3,615	0.06	35	61,994	0.00
AMD ULR		47		55			48			24	9,661		32	2,945			56,739	
		684		813			376			206	35		256	30		40		
Sin fármaco ULR	7			8			9			10			11			12		
L83 ULR	30	1,217	0.02	40	1,178	0.04	42,206	76	602.94	42	1,155	0.04	44,580	97	459.66	32	25,118	0.00
AMD ULR		814		534			50			701			69					
		42		37			33,102			23			30,410					
Sin fármaco ULR	19			20			21			22			23			24		
L83 ULR	100	5,204	0.02	11,290	52	217.29	1,273	26	63.65	7,315	10,856	0.68	4,307	7,139	0.62	16,115	58	377.30
AMD ULR		3,098		22			20			40	6,455		42	3,874		58		
		34		8,232			1,129			3,961	2,280		1,656	1,265		11,686		
Sin fármaco ULR	31			32			33			34			35			36		
L83 ULR	53	974	0.05	177	32	5.53	24,739	32	745.67	512	45	13.80	2,067	9,685	0.31	416	31	13.42
AMD ULR		828		37			31			46			22	7,261		78		
		95		361			21,767			476			165	35		597		
Sin fármaco ULR	43			44			45			46			47			48		
L83 ULR	45	333	0.13	714	45	15.87	11,020	16	612.72	2,908	43	67.63	13,907	52	269.17	24,377	34	715.97
AMD ULR		207		31			18			31			73			56		
		20		365			8,380			2,305			17,139			16,045		
Sin fármaco ULR	53			54			55			56			59			60		
L83 ULR	9,254	23,845	0.39	5,249	20,393	0.26	470	39	12.05	19,175	126	152.18	510	31	16.55	3,254	28	176.57
AMD ULR		43		38	8,200		37			96	183		32			30		
		2,219		784	36		310			19,638	35		500			3,038		
Sin fármaco ULR	67			68			69			70			71			72		
L83 ULR	3,025	77	50.04	411	34	12.05	7,857	41	191.63	25,497	38	689.39	17,443	45	387.62	16,707	38	439.86
AMD ULR		39		27			42			35			40			104		
		7,108		253			4,595			14,749			12,700			12,466		
Sin fármaco ULR	79			80			81			82			83			84		
L83 ULR	263	38	6.92	3,890	9,577	0.41	2,080	1,692	1.23	475	43	11.05	6,475	38	223.03	4,107	33	124.45
AMD ULR		33		44	6,140		33	1,224		30			30			26		
		143		988	45		1,105	180		156			6,862			2,571		
Sin fármaco ULR	91			92			93			94			95			96		
L83 ULR	443	13,452	0.03	34	128,236	0.00	22	62		45	33		45	42		45	35	
AMD ULR		12,051			65,018													
		51			45													

10

PLANTILLA DE EXAMEN DEL ENSAYO DEL CORRECEPTOR

		Limite ULR activo: 100			Limite de ratio de tropismo: 5			CXCR4			CCR5			DUJAL			Limite % inhib. de fármaco: 10			7- L83 (resUltr)			AMD (resUltr)		
		1			2			3			4			5			6								
		R5	X4	R5:X4	R5	X4	R5:X4	R5	X4	R5:X4	R5	X4	R5:X4	R5	X4	R5:X4	R5	X4	R5:X4	R5	X4	R5:X4	R5	X4	R5:X4
Sin fármaco ULR		34	26.471	0.00	14.140	52	757.03	48	5.845	0.03	21.855	38.144	0.57	30	7.326	0.08	3.988	34	17.65						
L83 RLU		19.256			12.282			4.809			7.275	25.542		5.468			3.664								
AMD RLU																									
%inhib por L83		27			100			31			100			25			91								
%inhib por AMD		100			14			89			67			59			9								
Sin fármaco ULR																									
L83 RLU		4.532	19.102	0.24	149	226	0.69	67.384	77	535.96	611	15.715	0.03	46	3.048	0.01	284	4.320	0.07						
AMD RLU		79	9.956	6.00	41	153		42.295			75	1.025		152			25								
%inhib por L83		89			72			100			93			25			87								
%inhib por AMD		82			72			37			88			96			11								
Sin fármaco ULR																									
L83 RLU		67.874	857.47		111	10.835	125	3.788	4.384	0.86	59	3.297		32	2.21		231	35	6.60						
AMD RLU		51.145			8.580	3.384		7.049	5.32		493	39		68			211								
%inhib por L83		100			99			98			95			95			88								
%inhib por AMD		75			43			46			88			25			64								
Sin fármaco ULR																									
L83 RLU		100			3.724	2.310	1.61	450	662	0.67	148	24	6.17	32	22		60	6.1							
AMD RLU					1.984	2.72		205	72		128														
%inhib por L83		99			89			82			76														
%inhib por AMD		47			47			34			89														
Sin fármaco ULR																									
L83 RLU		35			83	4.205	0.07	16.899	8.451	2.14	39.257	38	1033.00	5.413	40	125.33	87.733	26	3370.16						
AMD RLU					3.502			13.896	6.220		85			35			30								
%inhib por L83		36			17			23			100			100			100								
%inhib por AMD		66			90			121			29			7			51								
Sin fármaco ULR																									
L83 RLU		3.769			78.6	48	16.38	340	21	16.19	5.189	43	120.67	4.318	37	116.70	106	5.1	3.84						
AMD RLU		29			39			51			34			28			23								
%inhib por L83		99			92			97			99			20			86								
%inhib por AMD		26			131			17			133			7			51								
Sin fármaco ULR																									
L83 RLU		391			68	38		4.448	28	158.89	4.257	0.102	0.48	6.990	105	58.00	1.886	3.635	0.57						
AMD RLU		50						43			34	7.932		73	77		38	2.902							
%inhib por L83		37			16			16			74			96			27								
%inhib por AMD		13			131			17			133			7			51								
Sin fármaco ULR																									
L83 RLU		510			978	59	16.59	461	33	14.88	300	3.815	0.08	297	3.616	0.08	39	61.59	0.00						
AMD RLU		42			810			376			29	3.661		256	30		48								
%inhib por L83		564			94			80			90			85			100								
%inhib por AMD		111			17			21			11			14			90								

RS		Sin fármaco		X4		Sin fármaco		L83		AMD														
34	14,140	46	21,555	30	3,988	30	49	42,205	45	44,589	32	26,471	70	1,128	31	1,217	1,128	31	1,159	97	28,118			
4,552	149	67,389	611	46	264	100	11,299	1,273	7,375	4,397	16,115	19,102	226	72	19,715	3,949	4,330	5,204	52	20	10,856	7,130	50	50
67,828	14,982	3,788	50	568	231	53	177	24,739	612	2,997	416	68	12,020	4,984	37	242	35	974	32	33	45	9,595	31	31
100	3,724	450	148	32	60	45	714	11,029	2,908	13,997	24,377	39	2,310	668	24	22	51	336	45	18	43	52	34	34
35	83	18,099	39,257	5,413	97,733	9,254	5,249	470	19,175	513	3,264	107	4,209	8,451	38	40	29	23,846	20,393	39	129	31	28	28
3,769	786	340	5,189	4,318	3,853	411	7,857	25,437	17,443	16,707	40	48	21	43	37	51	77	34	41	38	45	38	45	38
361	98	4,449	4,357	6,090	1,866	263	3,890	2,089	475	6,475	4,107	25	38	28	9,102	105	3,635	38	9,577	1,598	43	38	33	33
510	979	491	300	297	39	413	34	22	45	43	45	33	59	33	3,815	3,615	61,594	13,452	129,238	52	33	42	35	35
L83	30	54	29	27	32	34	27	37	90	35	60	40	19,258	32	4,696	25,542	5,468	28	814	934	32	751	46	22,279
28	40	99	30	21	38	32	32	22	26	40	42	68	9,956	153	38	14,985	2,953	2,918	3,058	33	33	6,455	3,874	38
129	111	59	38	47	28	32	47	28	31	48	22	28	43	10,839	3,397	60	221	43	828	33	36	54	7,261	33
29	38	37	33	30	30	32	31	18	31	73	59	30	2,656	463	35	28	65	207	35	23	32	39	33	33
31	115	13,896	85	35	30	43	38	37	96	35	30	68	3,502	6,220	34	33	34	9,150	8,290	33	183	33	33	33
29	39	31	34	28	23	39	22	42	35	40	104	24	38	42	28	28	27	87	34	47	38	43	29	29
50	31	43	34	73	38	33	44	33	30	30	28	35	45	40	7,932	77	2,092	58	6,140	1,224	50	44	30	30
42	55	49	29	32	25	33	35	33	33	36	20	27	42	55	3,661	2,945	56,739	12,051	85,018	33	39	37	25	25
AMD	39	12,186	32	7,226	36	3,664	34	40	33,192	44	30,510	35	32	28	40	32	39	142	42	37	40	33	37	31
838	41	42,295	76	45	25	30	8,232	1,129	3,961	1,556	11,980	34	24	24	32	1,022	152	46	34	35	20	2,283	1,285	33
51,146	8,580	2,049	53	493	219	26	361	21,767	479	925	597	39	3,384	538	49	38	34	34	95	28	34	40	35	30
153	1,984	206	139	33	42	30	366	8,390	2,306	12,139	18,045	28	272	30	26	36	36	29	40	43	30	28	40	40
38	37	16,980	27,832	5,043	48,452	2,219	784	310	19,638	500	3,038	34	68	8,711	35	43	44	38	35	42	47	47	47	47
2,773	797	282	5,356	3,461	184	2,108	253	4,595	14,749	13,708	12,866	41	22	40	39	44	26	34	28	37	38	32	24	24
340	47	3,752	906	4,473	279	143	986	1,105	159	6,862	2,571	34	31	39	36	51	27	33	45	160	36	27	36	36
564	813	376	268	256	35	451	35	27	28	28	44	29	34	69	55	35	30	40	51	45	17	39	41	27

ES 2 396 342 T3

Placa	Repetición	Tiempo de finalización	Temp. de inicio	Temp. de fin.	Código de barras				
1	1	6:39:36 PM	21.6	21.7	N/A				
0.5 CPS (CPS)									
18									
26648	54	6970	37406	7158	38	1386	930	100	1184
19248	262	72	18972	3478	3946	5010	46	14	11004
106	9038	4002	32	238	26	976	34	38	48
38	2000	528	16	16	36	298	52	14	54
122	2984	7264	40	38	20	23344	15340	44	156
36	52	28	40	28	40	62	32	38	22
22	32	28	9858	68	3802	46	11470	1958	42
30	64	36	3846	3390	57858	12620	126186	68	34
Placa	Repetición	Tiempo de finalización	Temp. de inicio	Temp. de fin.	Código de barras				
2	1	6:41:51 PM	21.5	21.6	N/A				
0.5 CPS (CPS)									
34									
26294	56	6728	38882	7514	24	1048	1326	40	1134
18956	190	72	20458	4418	4714	5398	58	26	10708
30	15002	4766	42	246	44	972	30	28	42
40	2620	808	32	28	86	378	38	22	32
92	5434	9638	36	42	38	24348	25446	34	96
44	44	14	46	46	62	92	36	44	54
30	44	28	8346	142	3468	30	7684	1438	44
36	54	30	3784	3840	65330	14284	130290	56	32
Placa	Repetición	Tiempo de finalización	Temp. de inicio	Temp. de fin.	Código de barras				
3		1 6:44:06 PM	21.6	21.6	N/A				
0.5 CPS (CPS)									



ES 2 396 342 T3

Placa	Repetición	Tiempo de finalización	Temp. de inicio	Temp. de fin.	Código de barras				
3		1 6:44:06 PM	21.6	21.6	N/A				
16									
18590	18	4306	23902	5386	30	924	894	32	660
8698	148	34	14088	2880	3142	3160	40	46	7616
30	10252	3542	38	172	34	842	30	32	44
28	2396	370	28	26	66	172	32	22	28
64	3784	4822	32	28	24	6188	5702	34	120
16	28	62	26	28	30	38	38	38	44
38	52	40	7020	68	1798	62	7324	1076	50
32	50	70	3824	3138	53670	13088	104608	32	38
Placa	Repetición	Tiempo de finalización	Temp. de inicio	Temp. de fin.	Código de barras				
4		1 6:46:20 PM	21.7	21.8	N/A				
0.5 CPS (CPS)									
24									
19926	46	5086	27182	5550	26	704	974	32	862
11214	158	42	15882	3026	2694	2956	26	20	5294
56	11426	3252	82	270	52	814	36	40	64
32	2916	556	42	30	64	242	38	24	36
72	3220	7618	36	38	44	12112	10878	32	246
32	48	22	30	28	24	136	30	56	34
32	38	40	8844	86	2386	54	4956	1372	50
22	34	40	3498	2754	59808	11014	65428	34	40
Placa	Repetición	Tiempo de finalización	Temp. de inicio	Temp. de fin.	Código de barras				
5	1	6:48:35 PM	21.9	21.9	N/A				
0.5 CPS (CPS)									
38									
38	28	40	30	38	234	46	30	46	30

ES 2 396 342 T3

Placa	Repetición	Tiempo de finalización	Temp. de inicio	Temp. de fin.	Código de barras				
5	1	6:48:35 PM	21.9	21.9	N/A				
26	20	32	976	190	58	46	24	28	2298
42	3260	420	50	36	34	102	26	34	24
28	378	88	32	34	32	40	42	54	26
36	62	11690	38	44	32	42	42	26	36
46	22	44	38	58	32	38	30	32	36
22	38	52	40	42	26	34	50	200	36
36	80	52	40	36	40	52	54	22	40
Placa	Repetición	Tiempo de finalización	Temp. de inicio	Temp. de fin.	Código de barras				
6	1	6:50:50 PM	21.8	21.9	N/A				
0.5 CPS (CPS)									
30									
26	28	40	34	40	50	38	44	34	36
42	28	32	1068	114	38	22	46	30	2268
36	3508	656	48	40	34	88	30	34	56
28	166	56	28	18	40	18	38	32	34
32	114	5732	32	42	34	38	34	50	34
36	22	36	40	30	20	30	26	42	40
46	24	26	32	60	28	32	40	120	36
32	58	58	32	24	40	50	36	12	38
112	30488								
7474	60								
9736	32								
52	38								
40	32								
44	28								
42	24								

ES 2 396 342 T3

Placa	Repetición	Tiempo de finalización	de	Temp. de inicio	de	Temp. de fin.	de	Código de barras	de				
6	1	6:50:50 PM		21.8		21.9		N/A					
38	36												
82	27748												
6786	40												
9654	30												
52	30												
22	24												
46	48												
34	42												
46	34												
48	23382												
2842	32												
7616	34												
36	26												
34	24												
62	34												
42	32												
50	32												
44	21176												
4906	44												
6906	32												
42	40												
32	42												
24	24												
46	28												

ES 2 396 342 T3

Placa	Repetición	Tiempo de finalización	de	Temp. de inicio	de	Temp. de fin.	Código de barras				
6	1	6:50:50 PM		21.8		21.9	N/A				
24	18										
34	22										
1290	26										
40	24										
30	48										
46	42										
38	12										
34	36										
42	36										
40	40										
1280	40										
30	36										
26	32										
38	52										
26	36										
20	36										
40	18										
1		#####		21.7		21.8	N/A				
0.5 CPS (CPS)											
32											
24	14218	56		21586		28	4034	36	52	42088	40
4780	174	71276		730		48	326	28	12022	1288	7198
69452	15306	4008		44		792	180	50	182	25292	718
72	3922	546		128		44	66	30	900	11984	3194
30	88	18820		40438		4882	105946	8466	4934	470	20386

ES 2 396 342 T3

1		#####	21.7	21.8	N/A				
3420	934	344	6268	5012	170	3546	504	8164	22214
344	82	5344	5330	6710	1880	338	4286	2112	466
580	1018	516	318	302	40	414	32	20	52

Placa	Repetición	Tiempo de finalización	de	Temp. de inicio	Temp. de fin.	Código de barras				
2		1 #####		21.9	21.9	N/A				
0.5 CPS (CPS)										
22										
44	14062	36		21726	32	3942	24	46	42324	50
4324	124	63502		492	44	242	172	10576	1258	7552
66204	14658	3568		56	524	282	56	172	24186	506
128	3526	354		168	20	54	60	528	10074	2622
40	78	17378		38076	5944	89520	10042	5564	470	17964
4118	638	336		4110	3624	222	4160	318	7550	28660
438	114	3554		3384	5470	1892	188	3494	2066	484
440	940	466		282	292	38	472	36	24	38

Placa	Repetición	Tiempo de finalización	de	Temp. de inicio	de	Temp. de fin.	de	Código de barras	de				
3	1	#####		21.9		22		N/A					
0.5 CPS (CPS)													
36													
36	38	28		28		38		28		36	42	114	40
32	34	80		26		16		36		30	18	26	30
126	106	34		42		30		46		22	26	32	58
26	46	42		38		34		20		18	34	24	36
28	146	15756		76		32		26		42	52	36	106
34	50	20		24		32		18		38	18	36	38
38	38	28		36		80		50		38	44	34	38
40	30	38		30		24		22		38	36	34	36

ES 2 396 342 T3

Placa	Repetición	Tiempo de finalización	Temp. de inicio	Temp. de fin.	Código de barras				
4	1	#####	21.9	22	N/A				
0.5 CPS (CPS)									
16									
24	70	30	26	26	40	18	32	66	30
24	46	118	34	26	40	34	26	26	50
132	116	84	34	34	48	34	38	30	38
32	30	32	28	26	40	46	28	12	26
34	84	12036	94	38	34	44	24	38	86
24	28	42	44	24	28	40	26	48	32
62	24	58	32	66	26	28	44	32	22
44	80	60	28	40	28	28	34	32	36

Placa	Repetición	Tiempo de finalización	Temp. de inicio	Temp. de fin.	Código de barras				
5	1	#####	22	22	N/A				
0.5 CPS (CPS)									
34									
38	11132	26	6696	34	3960	44	40	29548	40
762	48	39888	88	40	30	36	8416	1262	4096
52058	8050	2524	60	450	168	32	340	22410	534
106	2080	172	170	38	38	30	444	7478	2458
30	46	16428	25792	4240	45094	2092	630	334	17130
2498	732	358	5044	3236	202	2124	292	4806	13736
290	30	3986	886	4584	240	110	940	1286	162
456	816	438	294	260	44	524	40	34	22

Placa	Repetición	Tiempo de finalización	Temp. de inicio	Temp. de fin.	Código de barras				
6	1	#####	22	22.1	N/A				
0.5 CPS (CPS)									
32									

ES 2 396 342 T3

Placa	Repetición	Tiempo de finalización	Temp. de inicio	Temp. de fin.	Código de barras				
6	1	#####	22	22.1	N/A				
40	13240	38	7756	38	3368	24	40	36836	48
914	34	44702	64	50	20	24	8048	996	3826
50234	9110	1574	46	536	270	20	382	21124	424
200	1888	240	108	28	46	30	288	9302	2154
46	28	17532	29872	5846	51810	2346	938	286	22146
3048	862	206	5668	3686	166	2092	214	4384	15762
390	64	3518	926	4362	318	176	1032	924	156
672	810	314	242	252	26	378	30	20	34
43332	38								
4314	17856								
3572	424								
16106	23794								
548	3376								
15146	19592								
7752	4078								
48	42								
45846	26								
4480	14374								
2422	408								
11888	24960								
478	3152								
19740	13822								
9198	4136								
38	50								
60	46								

ES 2 396 342 T3

Placa	Repetición	Tiempo de finalización	Temp. de inicio	Temp. de fin.	Código de barras				
6	1	#####	22	22.1	N/A				
48	80								
8	28								
100	60								
34	24								
50	58								
30	28								
22	26								
60	34								
36	56								
36	28								
46	58								
36	36								
30	150								
30	28								
18	28								
30628	34								
1598	12372								
1046	512								
10024	15470								
388	2730								
13012	12386								
6768	2204								
38	20								
30392	36								
1714	11588								



ES 2 396 342 T3

Placa	Repetición	Tiempo de finalización	Temp. de inicio	Temp. de fin.	Código de barras				
6	1	#####	22	22.1	N/A				
804	682								
14254	16620								
612	3346								
14404	12586								
6956	2938								
50	38								

	celulas R5	celulas X4	RESX4
Sin fármaco	34	26.471	0
Inhibidor de R5		19.258	
Inhibidor de X4		32	
% inhib. por inhibidor de R5		27	
% inhib. por inhibidor de X4		100	

	R5	X4	RESX4
Sin fármaco	67.389	72	936
Inhibidor de R5	99		
Inhibidor de X4	42.295		
% inhib. por inhibidor de R5	100		
% inhib. por inhibidor de X4	37		

0.00	257.09	0.01	0.57	0.03	129.65	0.02	0.04	602.54	0.04	459.68	0.00
0.24	0.66	935.96	0.03	0.01	0.07	0.02	217.29	63.65	0.02	0.02	322.30
997.47	1.25	0.86	0.72	6.60	0.05	5.53	749.67	13.60	0.31	13.42	
	1.61	0.67	6.17		0.13	15.87	612.72	67.63	269.17	716.97	
0.33	0.02	14	1033.08	135.33	337.01	0.35	0.26	12.05	152.18	16.55	116.57
94.23	16.38	16.19	120.67	116.70	3.64	50.04	12.09	191.63	669.39	387.62	439.66
15.04	15.23	158.85	0.48	58.00	0.57	6.92	0.41	1.23	11.05	223.03	174.45
15.43	16.59	14.88	0.68	0.08	0.03	0.03	0.00				

CXCR4  
CCR5  
DUAL o MIXTO  
MUERTO

	R5	X4	RESX4
Sin fármaco	14.982	12.020	1
Inhibidor de R5	111	10.839	
Inhibidor de X4	8.580	3.384	
% inhib. por inhibidor de R5	99	10	
% inhib. por inhibidor de X4	43	72	

	R5	X4	RESX4
Sin fármaco			
Inhibidor de R5			
Inhibidor de X4			
% inhib. por inhibidor de R5			
% inhib. por inhibidor de X4			

**LISTADO DE SECUENCIAS**

- 5 <110> ViroLogic, Inc.
- <120> COMPOSICIONES Y MÉTODOS PARA EVALUAR LA UTILIZACIÓN DE RECEPTORES/CORRECEPTORES VIRALES E INHIBIDORES DE ENTRADA VIRAL POR MEDIO DE ENSAYOS DE VIRUS RECOMBINANTES
- <130> 2793/65166APCT
- 10 <140> 09/874,475, 60/295,871
- <141> 2001-06-04
- <160> 16
- <170> versión PatentIn 3.1
- <210> 1
- 15 <211> 26
- <212> ADN

<213> Iniciadores de RT para la envoltura del VIH  
 <400> 1  
 ggagcattta caagcagcaa cacagc  
 26  
 <210> 2  
 5 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Iniciador de RT para la envoltura del VIH  
 <400> 2  
 ttccagtcav acctcaggta c  
 21  
 10 <210> 3  
 <211> 19  
 <212> ADN  
 <213> Iniciador de RT para la envoltura del VIH  
 <400> 3  
 agaccaatga cttayaagg  
 15 19  
 <210> 4  
 <211> 35  
 <212> ADN  
 <213> Iniciador de PCR  
 20 <400> 4  
 gggctcgaga ccggtcagtg gcaatgagag tgaag  
 35  
 <210> 5  
 <211> 37  
 <212> ADN  
 25 <213> Iniciador de PCR  
 <400> 5  
 gggctcgaga ccggtgagca gaagacagtg gcaatga  
 37  
 <210> 6  
 <211> 36  
 30 <212> ADN  
 <213> Iniciador de PCR  
 <400> 6  
 gggctcgaga ccggtgagca gaagacagtg gcaatg  
 36  
 <210> 7



ES 2 396 342 T3

Gln Leu Leu Ser Ser Ile Met Gln Gln Gln  
 1 5 10  
 <210> 13  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 5 <213> Mutación de resistencia de inhibidor de la entrada viral  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (5)..(5)  
 <223> Donde X= G or S  
 10 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (7)..(7)  
 <223> Donde X= V or M  
 <400> 13  
 Gln Leu Leu Ser Xaa Ile Xaa Gln Gln Gln  
 1 5 10  
 15 <210> 14  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Mutación de resistencia de inhibidor de la entrada viral  
 20 <400> 14  
 Gln Leu Leu Ser Asp Ile Val Gln Gln Gln  
 1 5 10  
 <210> 15  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 25 <213> Mutación de resistencia de inhibidor de la entrada viral  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (5)..(5)  
 <223> Donde X= G or D  
 30 <400> 15  
 Gln Leu Leu Ser Xaa Ile Val Gln Gln Gln  
 1 5 10  
 <210> 16  
 <211> 36  
 <212> PRT  
 35 <213> Péptido inhibidor de fusión

ES 2 396 342 T3

<400> 16

Tyr Thr Ser Leu Ile His Ser Leu Ile Glu Glu Ser Gln Asn Gln Gl  
n  
1                   5                   10                   15  
Glu Lys Asn Glu Gln Glu Leu Leu Glu Leu Asp Lys Trp Ala Ser Le  
u  
                  20                   25                   30

Trp Asn Trp Phe  
          35

5

10

15

20

25

**Reivindicaciones**

1. Un método para guiar el tratamiento de un paciente, que consta en identificar la sensibilidad de los virus de un paciente a un compuesto diseñado para inhibir la penetración de un virus en una célula al:

- 5 a) Suministrar una muestra de paciente comprendiendo ácido nucleico que codifica proteínas de la envoltura viral
- b) Transfectar dentro de una primera célula
  - (i) El ácido nucleico del paso a) y
  - (ii) Un vector de expresión viral que carece de un ácido nucleico que
  - 10 codifica una proteína de la envoltura y que comprende un ácido nucleico indicador que produce una señal detectable,

De manera que la primera célula produce partículas virales comprendiendo proteínas de la envoltura codificadas por el ácido nucleico del paso a);
- c) Poner en contacto las partículas virales producidas en el paso b) con
- 15 una segunda célula en presencia del compuesto, donde la segunda célula expresa un receptor de superficie celular al que el virus se une;
- d) Medir la cantidad de señal producida por la segunda célula para determinar la infectividad de las partículas virales; y
- e) Comparar la cantidad de señal medida en el paso d) con la cantidad de
- 20 señal producida en ausencia del compuesto, donde una cantidad reducida de señal medida en presencia del compuesto indica la sensibilidad de los virus de un paciente al compuesto;

Donde, los compuestos a los que los virus de un paciente son sensibles pueden ser utilizados en el tratamiento del paciente.

- 25 2. El método de la reivindicación 1, en el cual el ácido nucleico indicador comprende un gen indicador.
- 3. El método de la reivindicación 2, en el cual el gen indicador es un gen de luciferasa.
- 4. El método de la reivindicación 1, en el cual el receptor de superficie celular es CD4.
- 5. El método de la reivindicación 1, en el cual el receptor de superficie celular es un
- 30 receptor de quimiocina.
- 6. El método de la reivindicación 1, en el cual el receptor de superficie celular es CXCR4 o CCR5.
- 7. El método de la reivindicación 1, en el cual el paciente es infectado con el virus VIH-1.
- 35 8. El método de la reivindicación 1, en el cual el ácido nucleico del paso a) comprende ADN que codifica gp120 y gp41.

- 9.** El método de la reivindicación 1, en el cual el vector de expresión viral comprende ácido nucleico del VIH.
- 10.** El método de la reivindicación 9, en el cual el vector de expresión viral comprende un gen gag-pol del VIH.
- 5 **11.** El método de la reivindicación 9, en el cual el vector de expresión viral comprende ADN que codifica vif, vpr, tat, rev, vpu y nef.
- 12.** El método de la reivindicación 1, en el cual la primera célula es una célula de mamífero.
- 13.** El método de la reivindicación 12, en el cual la célula de mamífero es una célula  
10 humana.
- 14.** El método de la reivindicación 13, en el cual la célula humana es una célula de riñón embrionaria humana.
- 15.** El método de la reivindicación 14, en el cual la célula de riñón embrionaria humana es una célula 293.
- 15 **16.** El método de la reivindicación 1, en el cual la segunda célula es un linfocito T humano.
- 17.** El método de la reivindicación 1, en el cual la segunda célula es una línea celular de leucemia de linfocitos T humanos.
- 18.** El método de la reivindicación 1, en el cual la segunda célula es una célula  
20 mononuclear de sangre periférica.
- 19.** El método de la reivindicación 1, en el cual la segunda célula es una célula de astroglioma.
- 20.** El método de la reivindicación 19, en el cual la célula de astroglioma es una célula U87.
- 25 **21.** El método de la reivindicación 1, en el cual la segunda célula es una célula de osteosarcoma humano.
- 22.** El método de la reivindicación 21, en el cual la célula de osteosarcoma humano es una célula HT4.
- 23.** El método de la reivindicación 1, en el cual el compuesto se une al receptor de  
30 superficie celular.
- 24.** El método de la reivindicación 1, en el cual el compuesto es un ligando del receptor de superficie celular.
- 25.** El método de la reivindicación 23, en el cual el compuesto comprende un anticuerpo.
- 35 **26.** El método de la reivindicación 1, en el cual el compuesto inhibe la fusión de la membrana.

**27.** El método de la reivindicación 1, en el cual el compuesto es un péptido, un péptido-mimético, una molécula orgánica o un compuesto sintético.

**28.** El método de la reivindicación 1, en el cual el compuesto se une a la proteína de envoltura viral.

5 **29.** El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el cual el método se utiliza para guiar el tratamiento de pacientes en los que el tratamiento con fármacos antirretrovirales ha fallado.

10

15

20

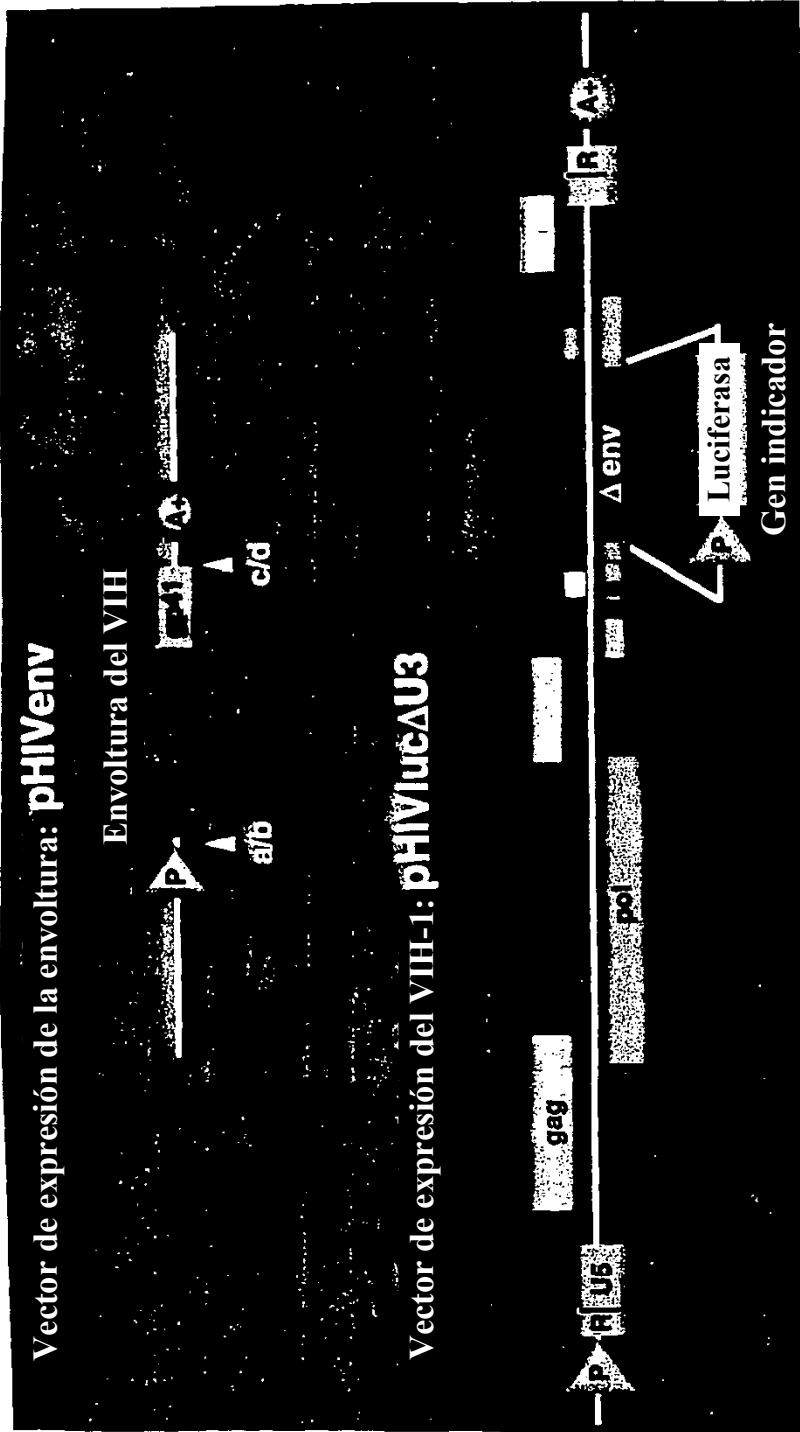
25



FIGURA 1A

MÉTODOS

Vector de expresión de la envoltura: **pHIVenv**



Vector de expresión de la envoltura: **pHIVenv**

Envoltura del VIH



Vector de expresión del VIH-1: **pHIVlucΔU3**

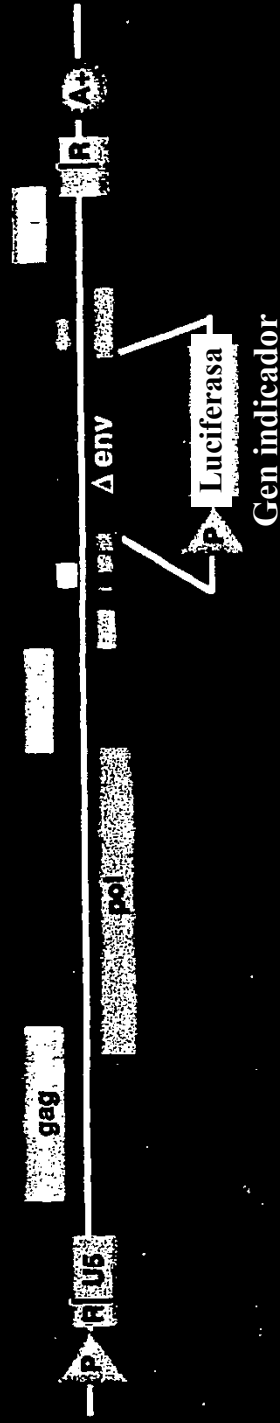
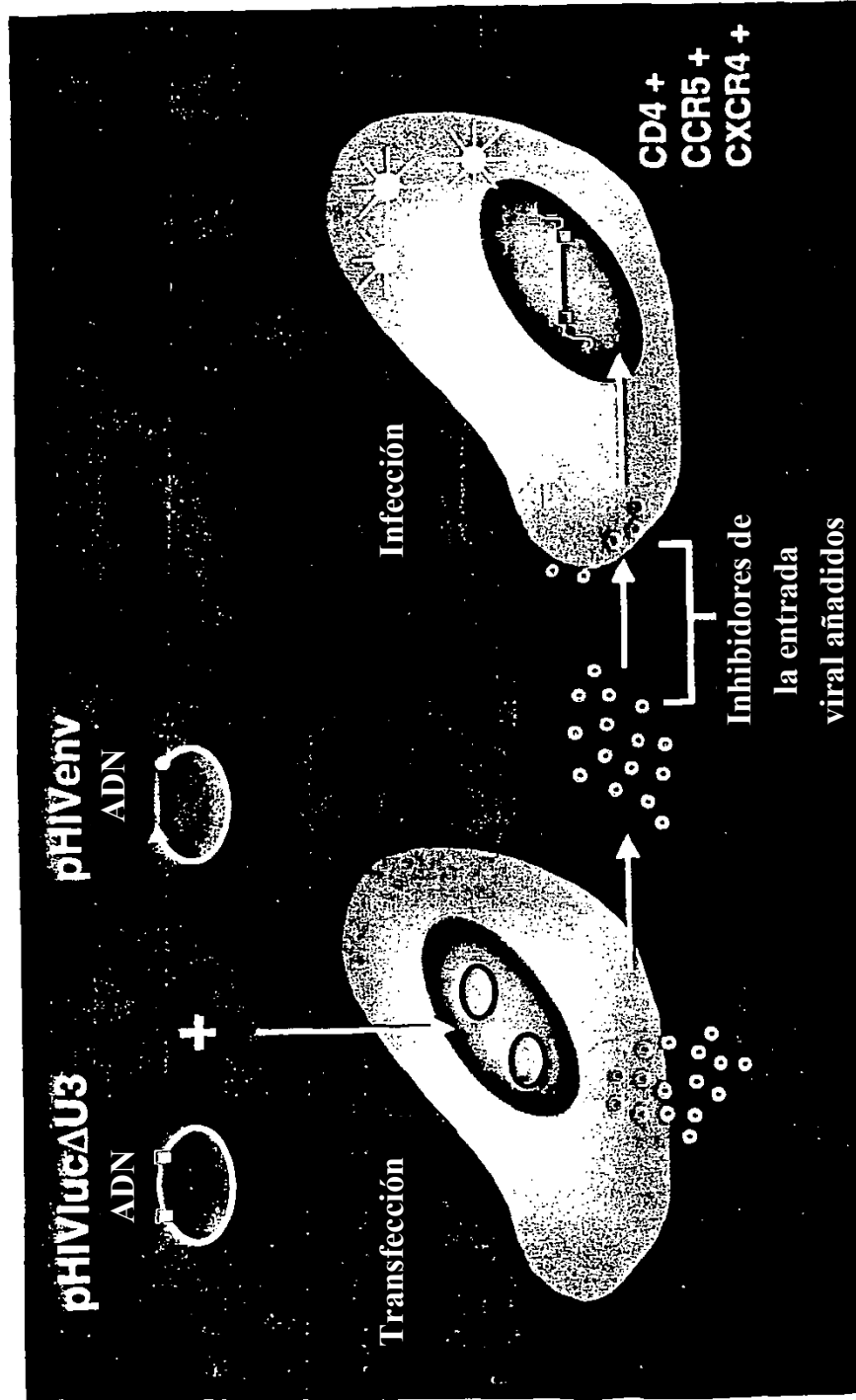


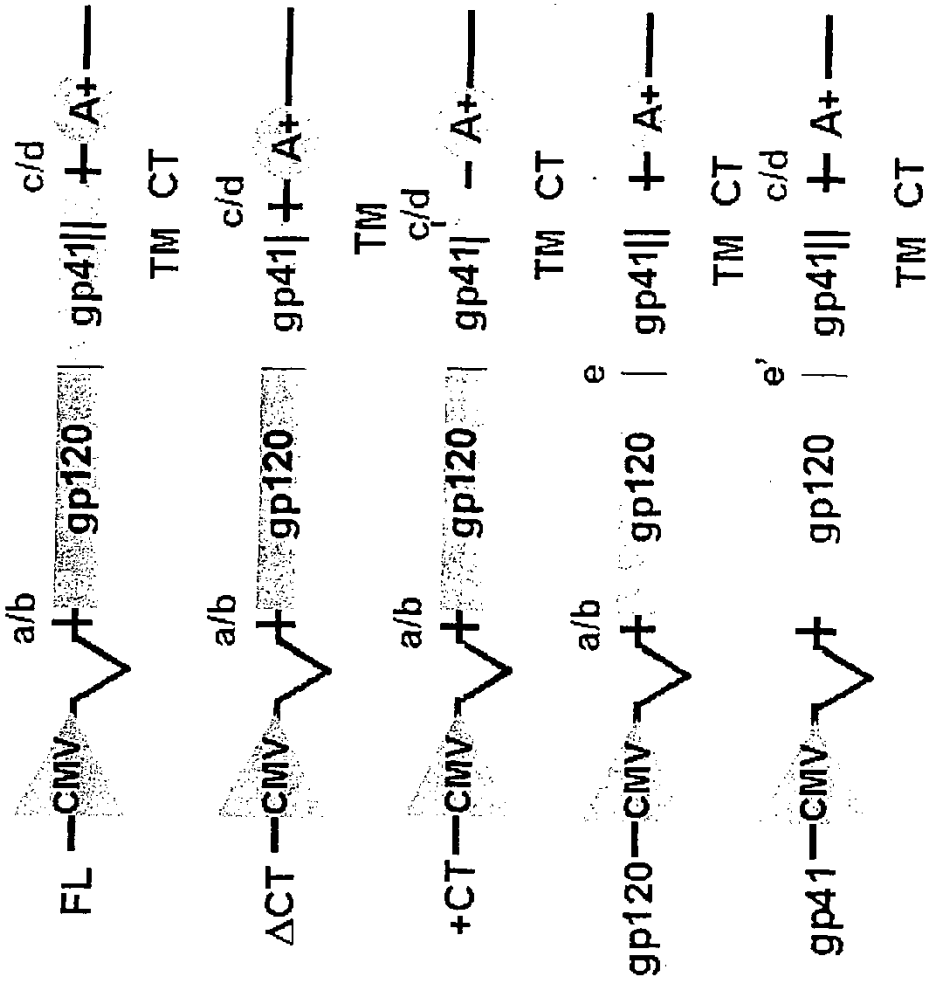
FIGURA 1B

Ensayo PhenoSense de entrada del VIH en la célula



Vectores de expresión de la envoltura del VIH

FIGURA 2



**FIGURA 3A**

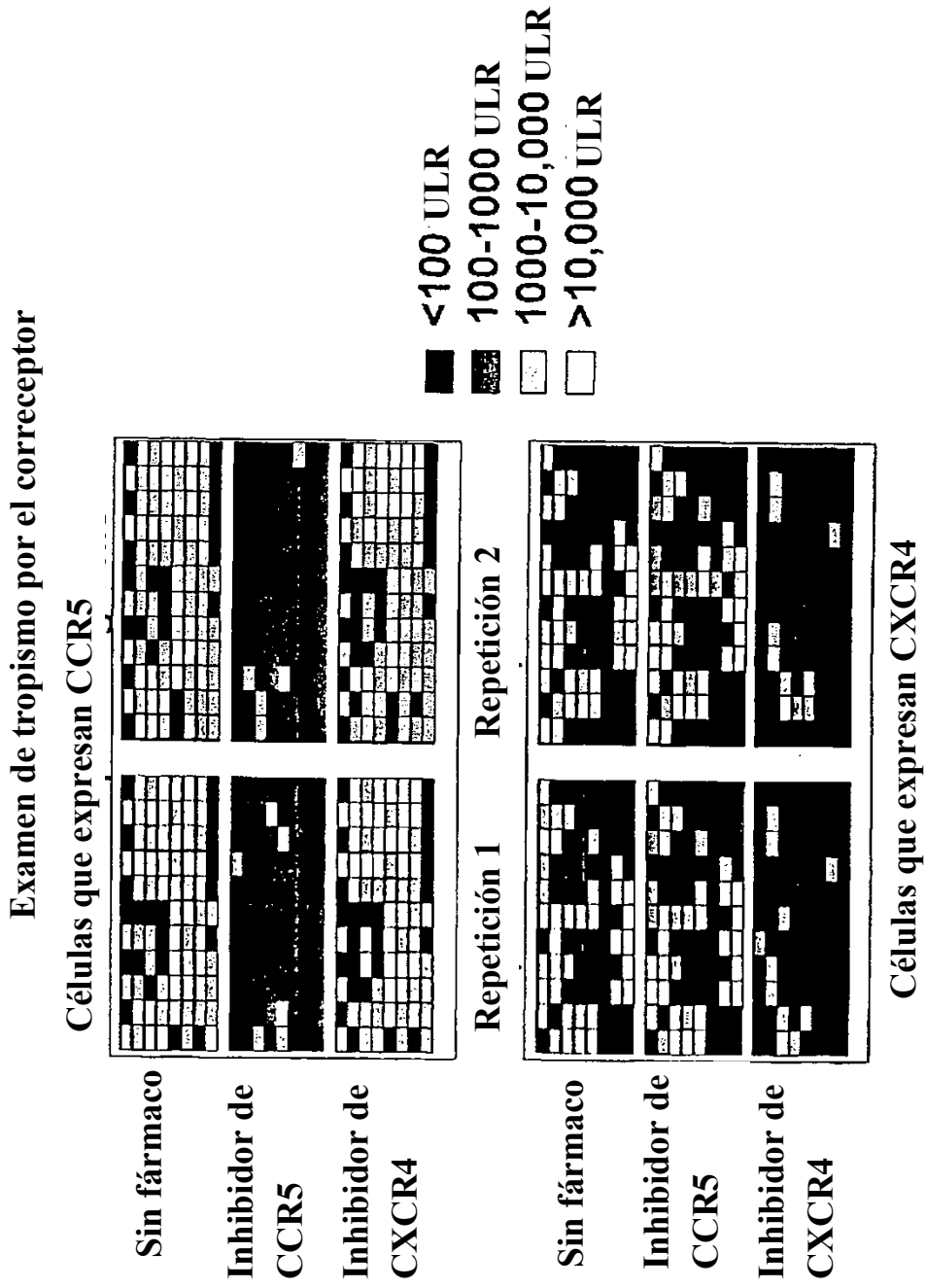


FIGURA 3B

Interpretación del ensayo de tropismo por el correceptor

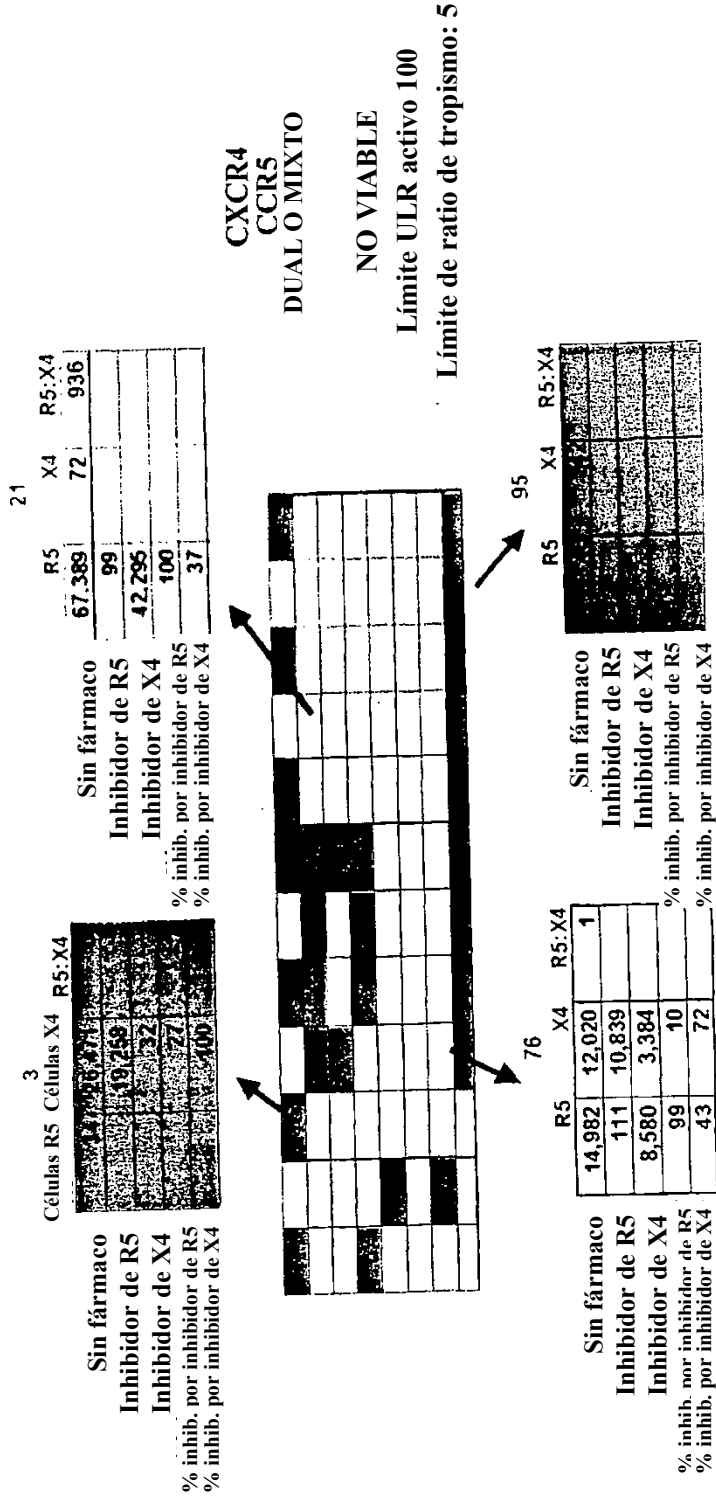


FIGURA 4A

Sensibilidad a los inhibidores de entrada: Inhibidor de fusión

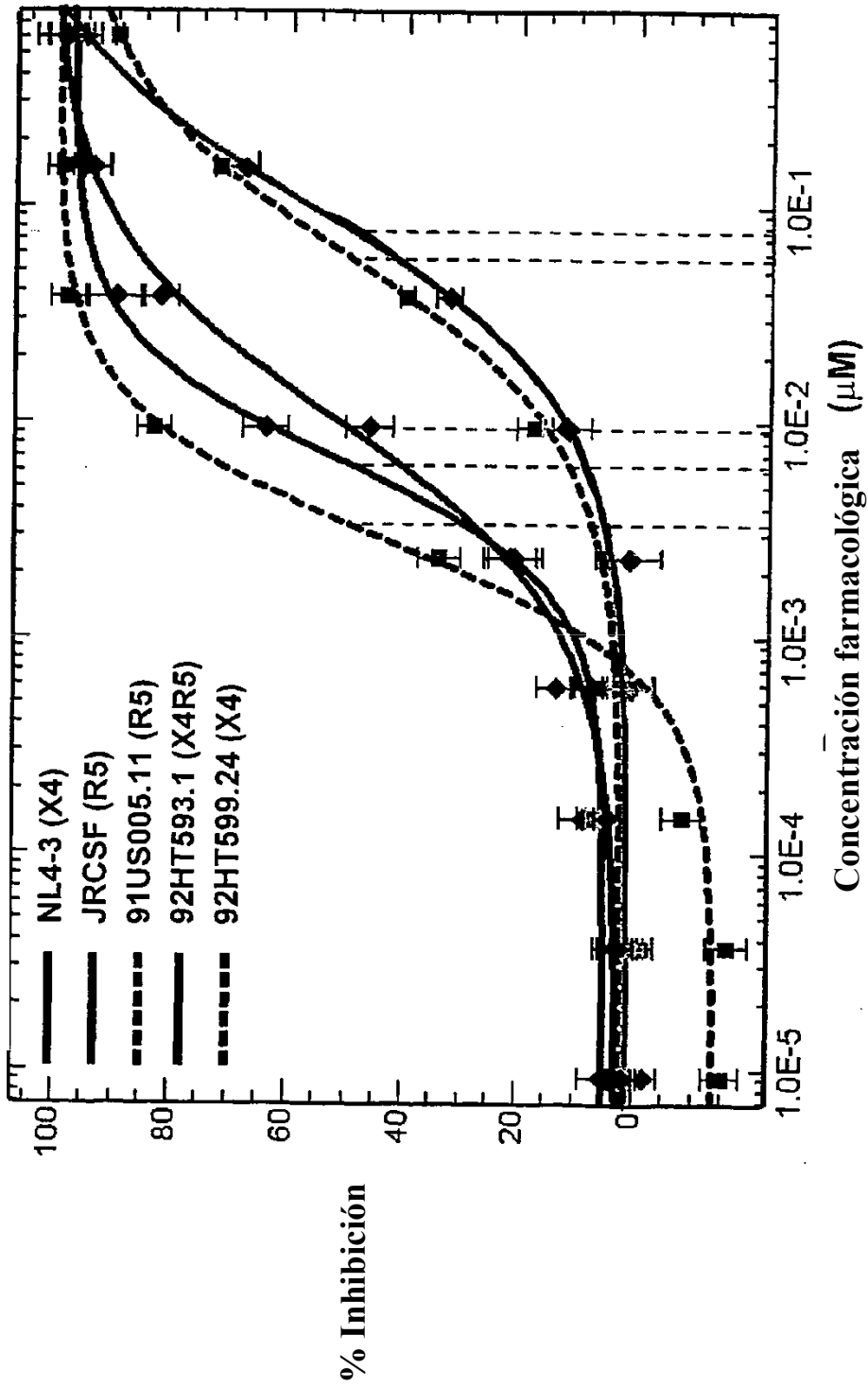
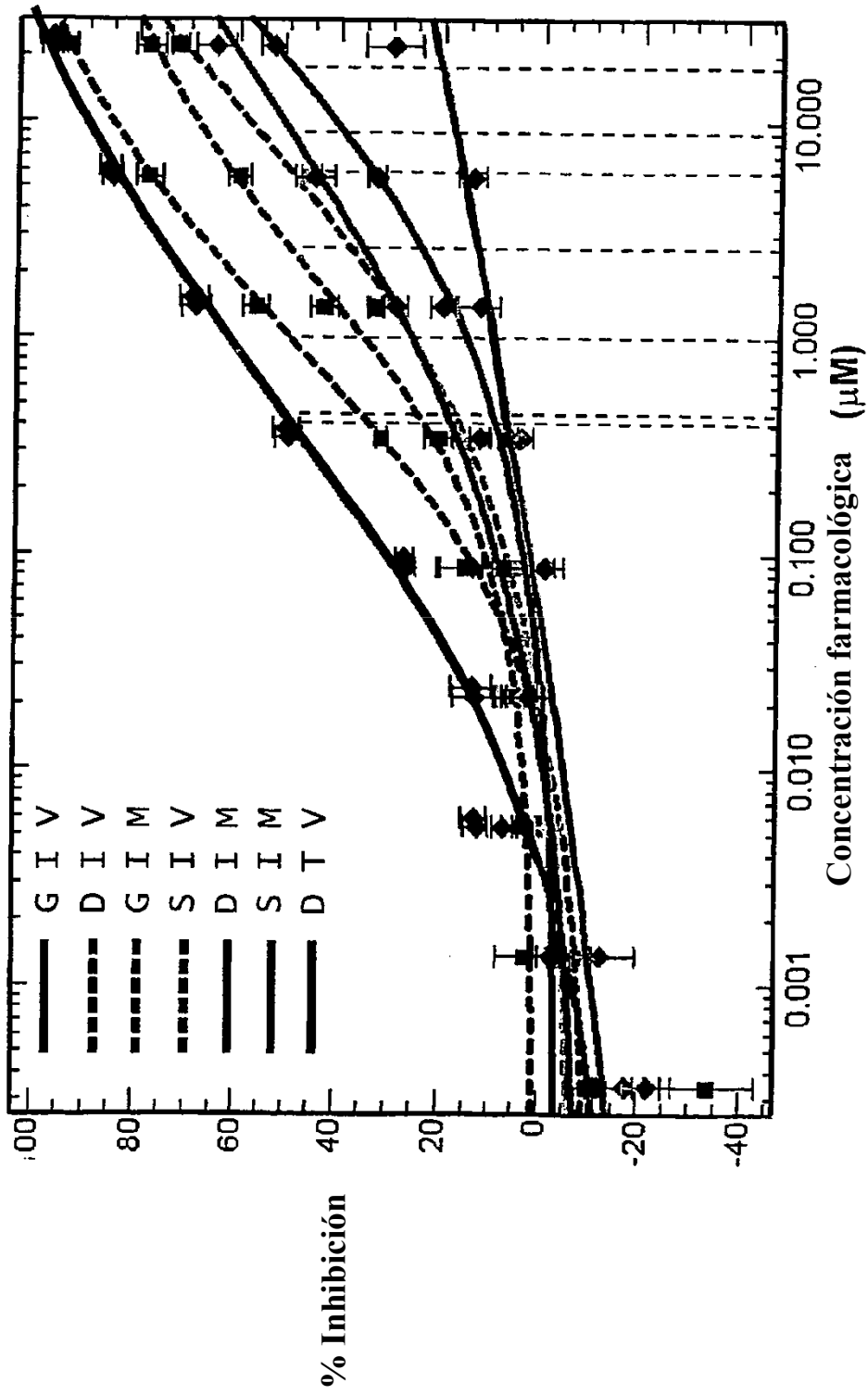


FIGURA 4B

Sensibilidad reducida: Inhibidor de fusión



**FIGURA 5A** Sensibilidad a los inhibidores de entrada: Inhibidor de CCR5

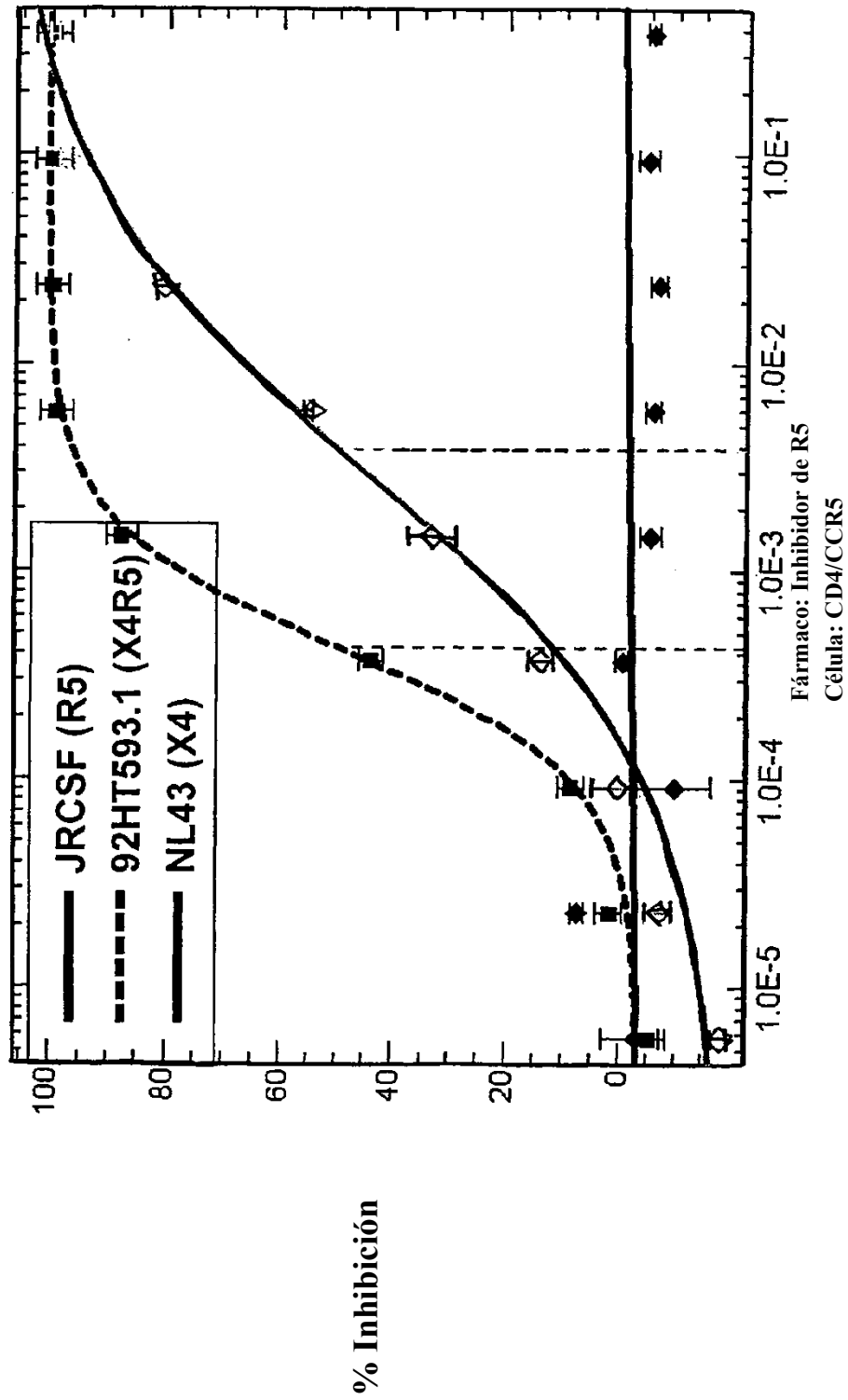




FIGURA 5B

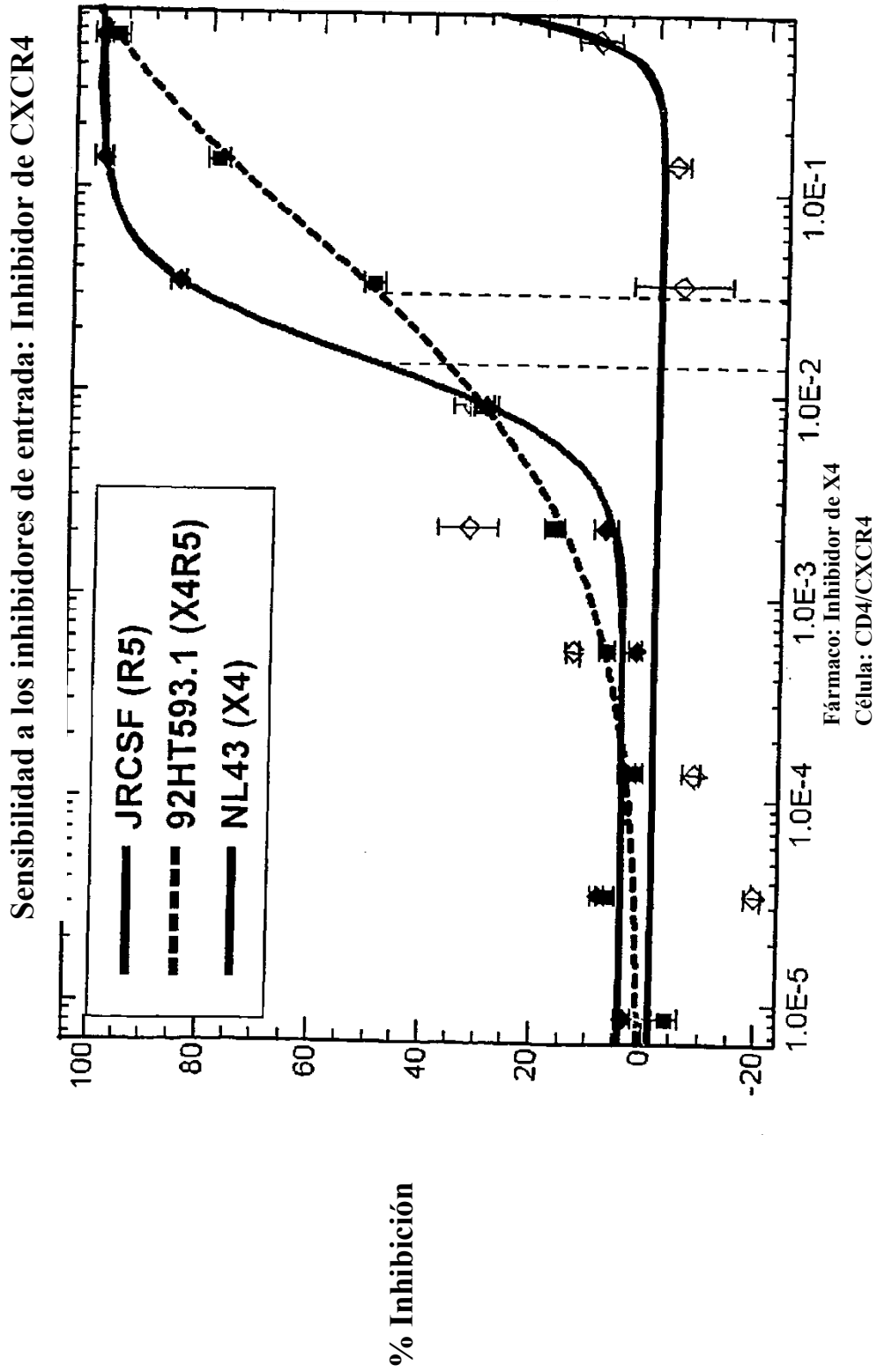
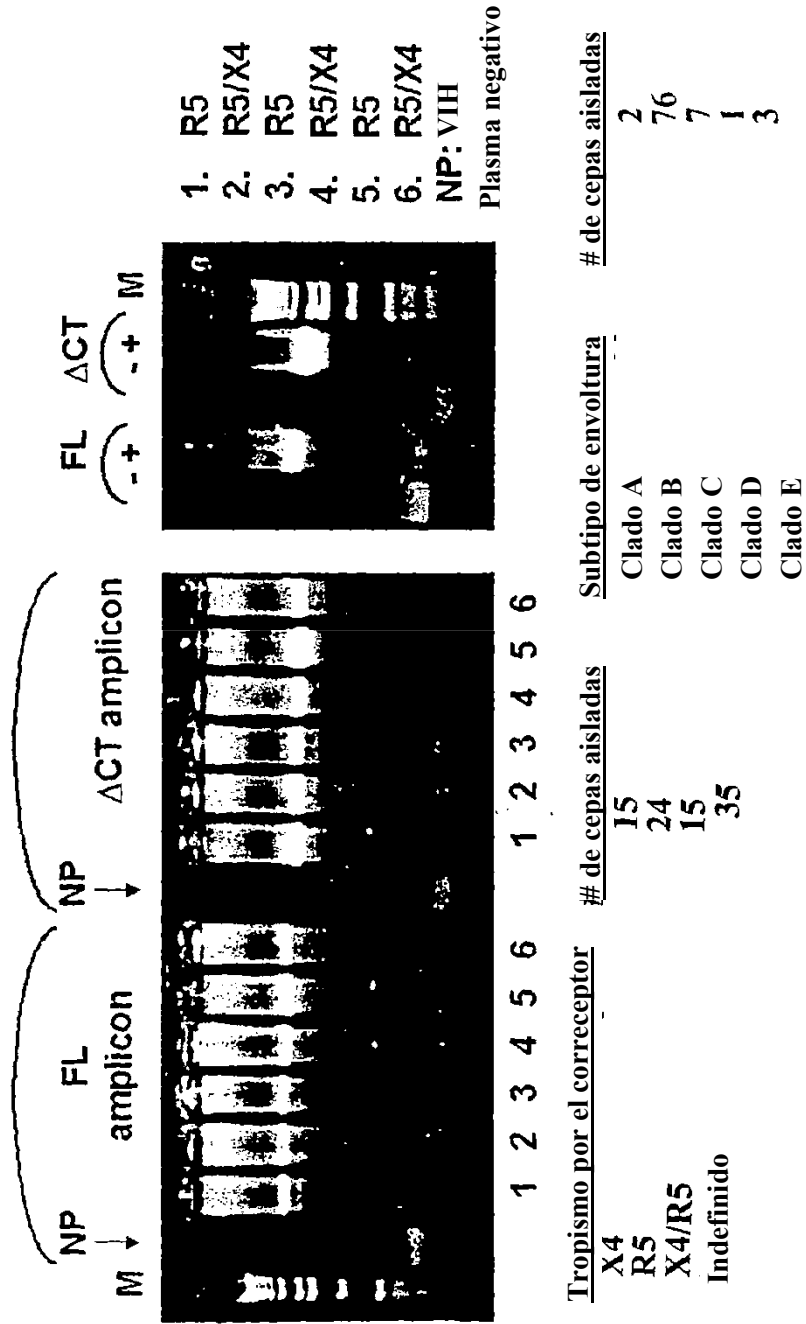


FIGURA 6

Amplificación de la secuencia de la envoltura



**FIGURA 7** Expresión de receptores y correceptores de las células diana

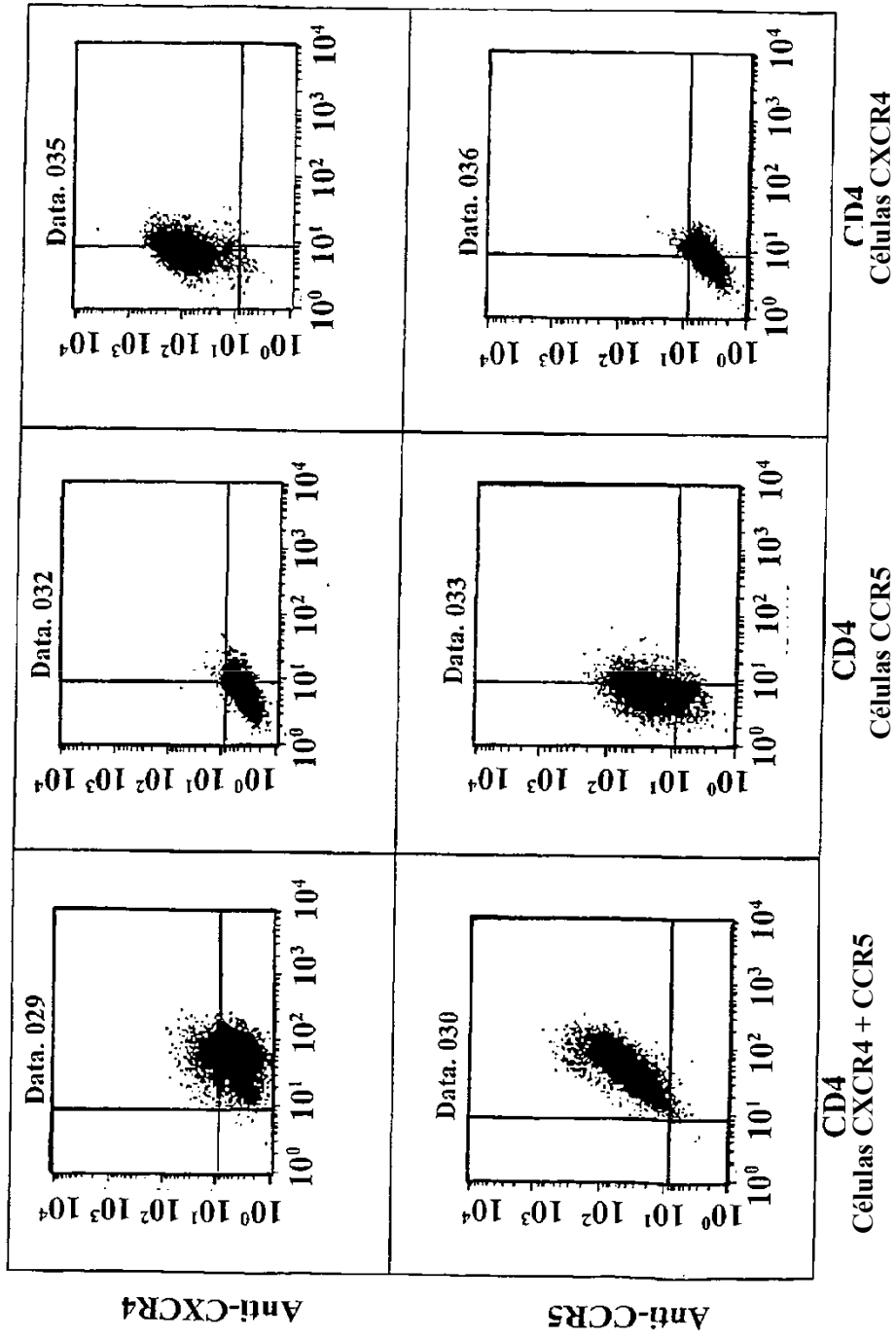
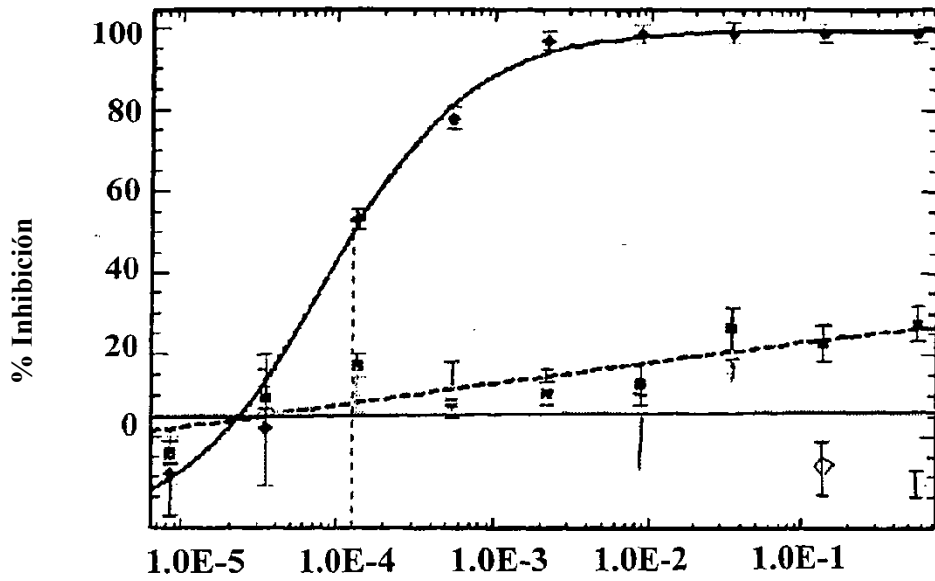
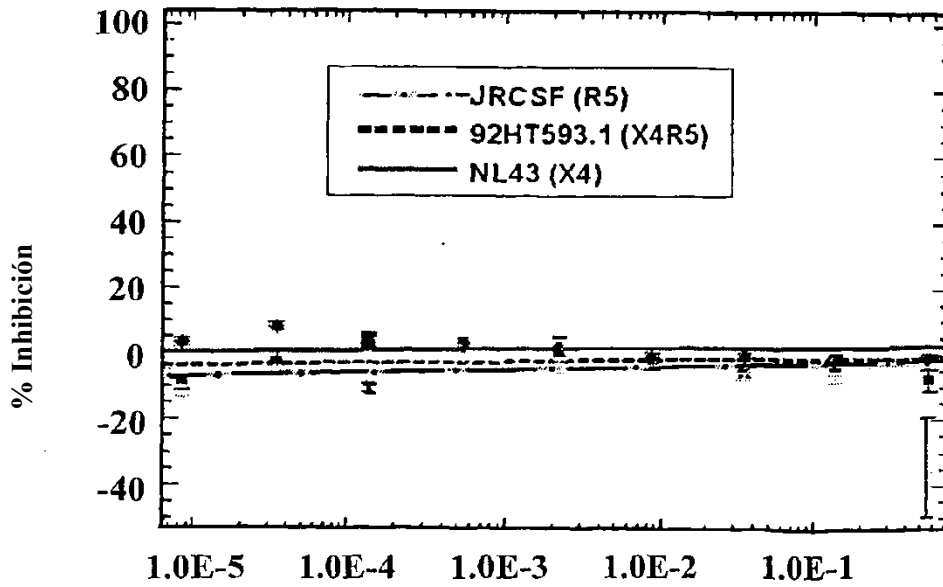


FIGURA 8A



Fármaco: Inhibidor de X4  
 Correceptor: X4, R5



Fármaco: Inhibidor de X4  
 Correceptor: R5

FIGURA 8B

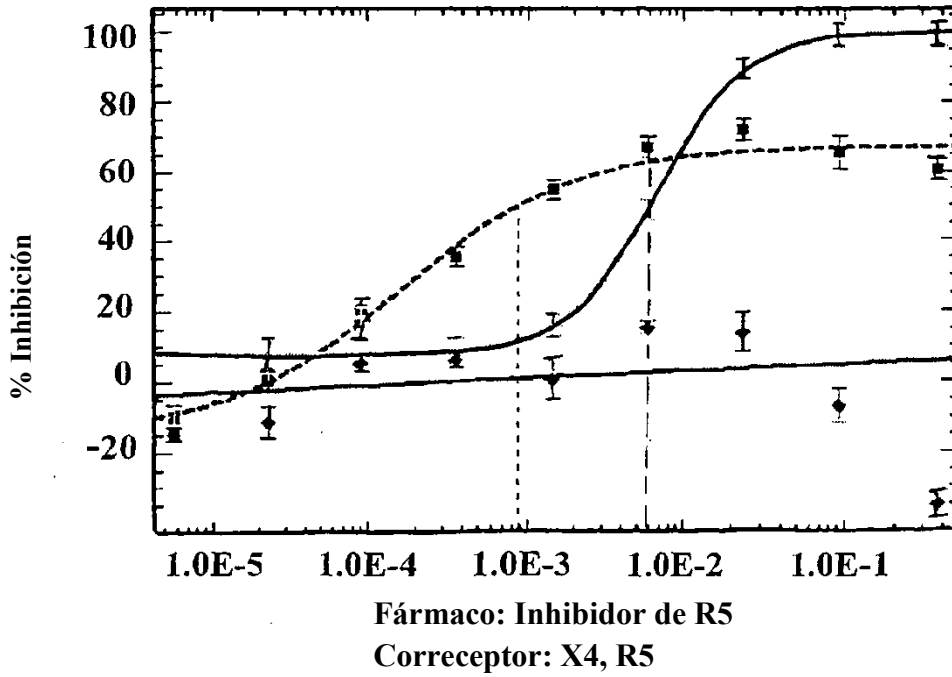
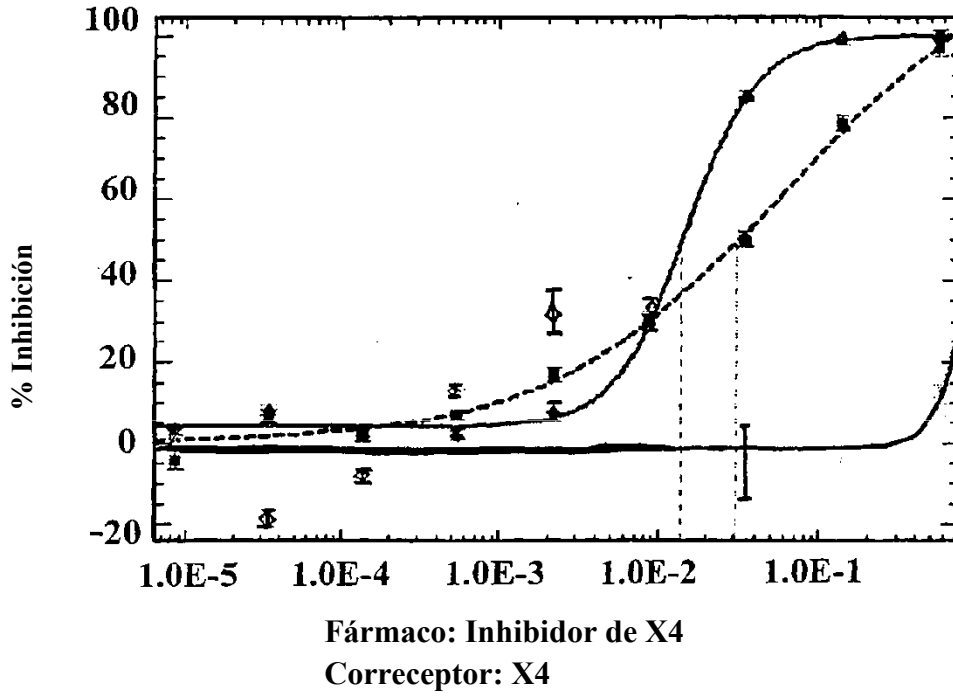
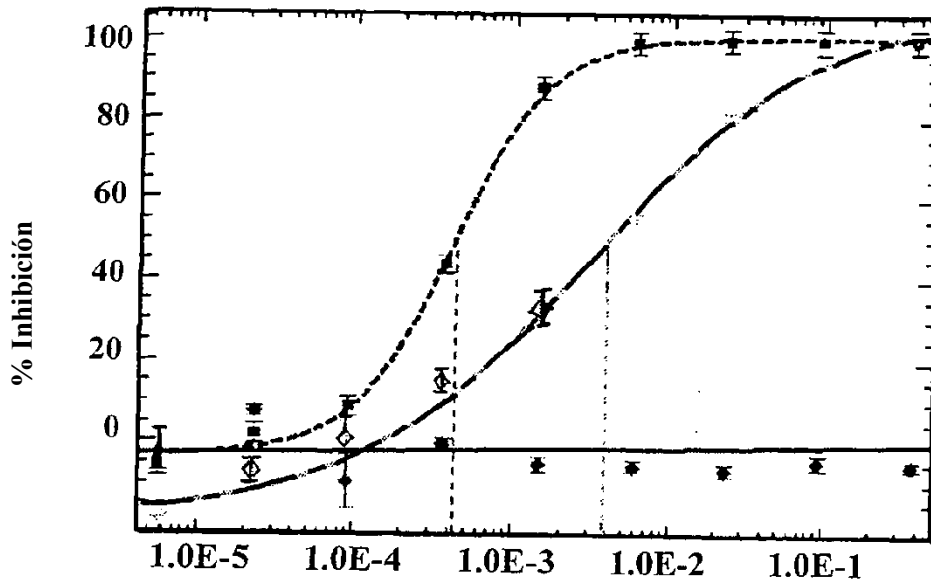
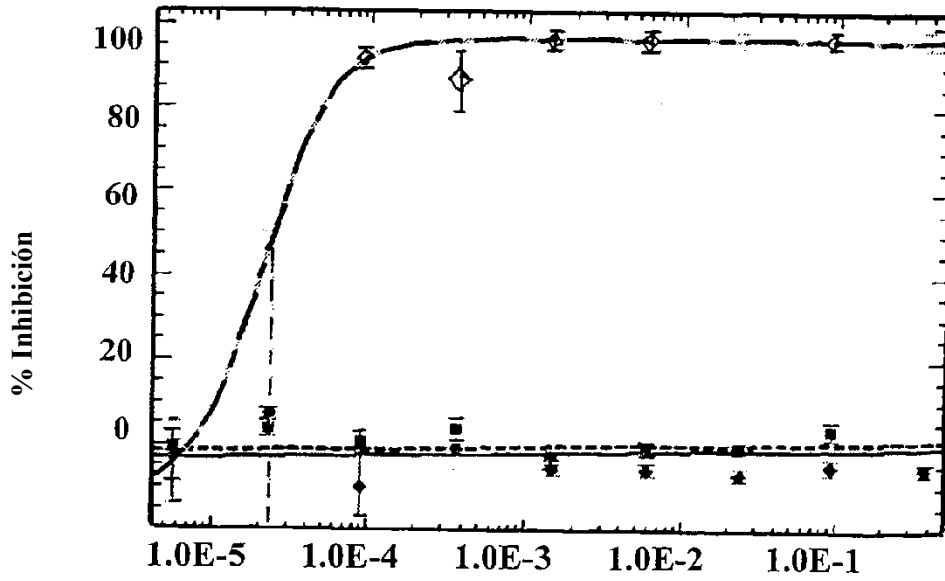


FIGURA 8C



Fármaco: Inhibidor de R5  
 Correceptor: R5



Fármaco: Inhibidor de R5  
 Correceptor: X4

FIGURA 9

