

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 435 040**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/569** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.02.2004 E 04708764 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.08.2013 EP 1592971**

54 Título: **Procedimiento para la evaluación in vitro del estado de progresión de una infección por un virus del VIH en un individuo**

30 Prioridad:

**06.02.2003 EP 03290303**

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

**18.12.2013**

73 Titular/es:

**INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA  
RECHERCHE MEDICALE (INSERM) (50.0%)  
101, rue de Tolbiac  
75654 Paris Cédex 13, FR y  
ASSISTANCE PUBLIQUE, HOPITAUX DE PARIS  
(50.0%)**

72 Inventor/es:

**VIEILLARD, VINCENT y  
DEBRE, PATRICE**

74 Agente/Representante:

**CURELL AGUILÁ, Mireia**

**ES 2 435 040 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Procedimiento para la evaluación *in vitro* del estado de progresión de una infección por un virus del VIH en un individuo.

5

**Campo de la invención**

La presente invención se refiere al campo del diagnóstico *in vitro* del estado de progresión de una infección de un individuo con un virus que pertenece a la familia de los virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), así como con el tratamiento terapéutico de esta enfermedad infecciosa.

10

**Antecedentes de la invención**

La enfermedad del SIDA, que está provocada principalmente por la infección de individuos con un retrovirus del VIH, es actualmente la enfermedad más devastadora en todo el mundo, puesto que el número de individuos que están infectados hasta la fecha con los virus del VIH se estima en alrededor de 40 millones de individuos.

15

Durante sólo el año 2001, 5 millones de individuos se infectaron con el VIH, mientras que 3 millones de individuos han muerto al mismo tiempo. Desde el descubrimiento del agente etiológico principal del SIDA en 1983, a saber, el virus del VIH, se han realizado amplios esfuerzos a fin de comprender el mecanismo de acción de este virus y desarrollar procedimientos exactos para (i) diagnosticar de forma reproducible la infección, así como (ii) llevar a cabo un pronóstico de la progresión de la enfermedad en un paciente dado.

20

Con fines de vigilancia, los United States Centers for Disease Control (CDC) definen actualmente al SIDA en un adulto o adolescente de 13 años de edad o mayor como la presencia de una de las 25 condiciones indicadoras de SIDA, tales como KS, PCP o MAC diseminado. En niños menores de 13 años, la definición de SIDA es similar a aquella en adolescentes y adultos, excepto que se incluyen en la lista de afecciones que definen al SIDA (CDC, 1987b) a la neumonitis intersticial linfocítica y a infecciones bacterianas recurrentes. La definición de caso en adultos y adolescentes se amplió en 1993 para incluir la infección por VIH en un individuo con un recuento de células T CD4<sup>+</sup> menor que 200 células por milímetro cúbico (mm<sup>3</sup>) de sangre (CDC, 1992). La definición de vigilancia sustituyó a los criterios publicados en 1987 que se basaban en estados clínicos y signos de infección por VIH pero no en determinaciones de células T CD4<sup>+</sup> (CDC, 1987).

25

30

En la práctica clínica, la sintomatología y las medidas de la infección inmunitaria, principalmente niveles de linfocitos T CD4<sup>+</sup>, se usan para guiar el tratamiento de personas infectadas por el VIH.

35

El VIH infecta y mata a linfocitos T CD4<sup>+</sup> *in vitro*, aunque los científicos han desarrollado líneas de células T inmortalizadas a fin de propagar el VIH en el laboratorio (Popovic *et al.*, 1984; Zagury *et al.*, 1986; Garry, 1989; Clark *et al.*, 1991). Se han observado varios mecanismos de exterminio de células T CD4<sup>+</sup> en sistemas lentivíricos *in vitro*, y pueden explicar la pérdida progresiva de estas células en individuos infectados por VIH (revisado en Garry, 1989; Fauci, 1993a; Pantaleo *et al.*, 1993a). Estos mecanismos incluyen la destrucción de la membrana celular como yemas de VIH de la superficie (Leonard *et al.*, 1988) o la acumulación intracelular de ARN heterodispersos y ADN no integrado (Pauza *et al.*, 1990; Koga *et al.*, 1988). Las pruebas también sugieren que la formación de complejos intracelulares de CD4 y productos de la cubierta vírica puede dar como resultado el exterminio celular (Hoxie *et al.*, 1986).

40

45

Además de estos mecanismos directos del agotamiento de células T CD4<sup>+</sup>, los mecanismos indirectos pueden dar como resultado la muerte de células T CD4<sup>+</sup> no infectadas (revisado en Fauci, 1993a; Pantaleo *et al.*, 1993a). Las células no infectadas se fusionan a menudo con células infectadas, dando como resultado células gigantes denominadas sincitios, que se han asociado con el efecto citopático de VIH *in vitro* (Sodroski *et al.*, 1986; Lifson *et al.*, 1986). Las células no infectadas también pueden ser exterminadas cuando gp120 libre, la proteína de cubierta del VIH, se une a sus superficies, marcándolas para la destrucción por respuestas de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (Lyerly *et al.*, 1987). Otros fenómenos autoinmunitarios también pueden contribuir a la muerte de células T CD4<sup>+</sup>, ya que las proteínas de cubierta del VIH comparten cierto grado de homología con ciertas moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad tipo II (MHC-II) (Golding *et al.*, 1989; Koenig *et al.*, 1988).

50

55

Un número de investigadores ha sugerido que los superantígenos, ya sea que estén codificados por VIH o que deriven de agentes no relacionados, pueden disparar la estimulación masiva y expansión de células T CD4<sup>+</sup>, conduciendo finalmente al agotamiento o anergia de estas células (Janeway, 1991; Hugin *et al.*, 1991). La inducción inoportuna de una forma de muerte celular programada denominada apoptosis se ha propuesto como un mecanismo adicional para la pérdida de células T CD4<sup>+</sup> en infección por VIH (Ameisen y Capron, 1991; Terai *et al.*, 1991; Laurent-Crawford *et al.*, 1991). Informes recientes indican que la apoptosis se produce en mayor extensión en individuos infectados por VIH que en personas no infectadas, tanto en la sangre periférica como en los ganglios linfáticos (Finkel *et al.*, 1995; Pantaleo y Fauci, 1995b; Muro-Cacho *et al.*, 1995).

60

65

La Solicitud PCT n° WO 02/08287 describe receptores activadores de células NK y sus usos terapéuticos y de

diagnóstico. Este documento describe composiciones y procedimientos para el tratamiento y detección de una variedad de infecciones víricas, usando agentes complejos que comprenden las proteínas activadoras de células NK, NKp46 y NKp44, y sus fragmentos funcionales, enlazados a agentes terapéuticos o de formación de imágenes. Se afirma que el complejo descrito en el documento WO 02/08237 es dirigido hacia una célula defectuosa o enferma, como células infectadas por virus, incluyendo células infectadas con el virus de la inmunodeficiencia humana.

Chen *et al.* (2000, *Aids Research and Human Retroviruses*, Vol. 16 (18): 2037-2041) describen diversos péptidos derivados de la gp41 del VIH-1 y localizados en un región que comprende las regiones HR1 y HR2 de gp41, así como anticuerpos dirigidos a ellos. Según Chen *et al.* (2000), estos anticuerpos que son capaces de interactuar con el núcleo de la gp41 putativa activa en la fusión pueden ser útiles desvelando adicionalmente el mecanismo de la fusión de membrana inducida por VIH.

También se ha observado que VIH infecta precursores de células T CD4<sup>+</sup> en la médula ósea y en el timo, y daña el microentorno de estos órganos necesario para el sostenimiento y la maduración óptimos de células progenitoras (Schnittman *et al.*, 1990b; Stanley *et al.*, 1992). Estos hallazgos pueden ayudar a explicar la falta de regeneración del conjunto de células T CD4<sup>+</sup> en pacientes con SIDA (Fauci, 1993a).

Estudios recientes han demostrado una carga viral sustancial y una replicación viral activa tanto en la sangre periférica como en tejidos linfoides incluso tempranamente en infección por VIH (Fox *et al.*, 1989; Coombs *et al.*, 1989; Ho *et al.*, 1989; Michael *et al.*, 1992; Bagnarelli *et al.*, 1992; Pantaleo *et al.*, 1993b; Embretson *et al.*, 1993; Piatak *et al.*, 1993). Un grupo ha informado de que el 25 por ciento de células T CD4<sup>+</sup> en los ganglios linfáticos de individuos infectados por VIH poseen ADN del VIH tempranamente en el transcurso de la enfermedad (Embretson *et al.*, 1993). Otros datos sugieren que la infección por VIH es sostenida por un proceso dinámico que implica rondas continuas de nueva infección vírica y la destrucción y sustitución de alrededor de 1 millardo de células T CD4<sup>+</sup> por día (Wei *et al.*, 1995; Ho *et al.*, 1995).

Con respecto al pronóstico de la progresión de la enfermedad en pacientes con VIH, un primer procedimiento actual consiste en evaluar el incremento en el número de virus del VIH que están presentes en una sangre completa.

También se ha observado que el VIH infecta a precursores de células T CD4<sup>+</sup> en la médula ósea y el timo, y daña al microentorno de estos órganos necesario para el sostenimiento y maduración óptimos de células progenitoras (Schnittman *et al.*, 1990b; Stanley *et al.*, 1992). Estos hallazgos pueden ayudar a explicar la falta de regeneración del conjunto de células T CD4<sup>+</sup> en pacientes con SIDA (Fauci 1993a).

Estudios recientes han demostrado una carga viral sustancial y una replicación viral activa tanto en la sangre periférica como en tejidos linfoides incluso tempranamente en infección por VIH (Fox *et al.*, 1989; Coombs *et al.*, 1989; Ho *et al.*, 1989; Michael *et al.*, 1992; Bagnarelli *et al.*, 1992; Pantaleo *et al.*, 1993b; Embretson *et al.*, 1993; Piatak *et al.*, 1993). Un grupo ha informado de que el 25 por ciento de células T CD4<sup>+</sup> en los ganglios linfáticos de individuos infectados por VIH poseen ADN del VIH tempranamente en el transcurso de la enfermedad (Embretson *et al.*, 1993). Otros datos sugieren que la infección por VIH es sostenida por un proceso dinámico que implica rondas continuas de nueva infección vírica y la destrucción y sustitución de alrededor de 1 millardo de células T CD4<sup>+</sup> por día (Wei *et al.*, 1995; Ho *et al.*, 1995).

Con respecto al pronóstico de la progresión de la enfermedad en pacientes con VIH, un primer procedimiento actual consiste en evaluar el incremento en el número de virus del VIH que están presentes en una muestra de sangre completa recogida de un paciente, por ejemplo llevando a cabo inmunoensayos convencionales con anticuerpos dirigidos específicamente contra proteínas del VIH, y más específicamente contra la glucoproteína gp120 de la cápside del VIH.

Un segundo procedimiento actual para el pronóstico de la progresión de SIDA en un paciente consiste en medir el número de copias del genoma del VIH que se encuentra en una muestra de sangre completa recogida de ese paciente, por ejemplo llevando a cabo una amplificación mediante PCR cuantitativa de los ácidos nucleicos contenidos en dicha muestra, usando uno o varios cebadores de ácido nucleico que se hibridan específicamente con el ARN genómico del VIH.

Estos dos procedimientos anteriores son útiles, puesto que numerosos estudios han demostrado que las personas con niveles elevados de VIH en su torrente sanguíneo muy probablemente desarrollarán nuevos síntomas relacionados con SIDA o morirán frente a individuos con menores niveles del virus.

Un tercer procedimiento actual para el pronóstico de la progresión de SIDA en un paciente consiste en medir los niveles absolutos de células T CD4<sup>+</sup> en muestras de sangre completa procedentes de pacientes infectados (pacientes VIH<sup>+</sup>), por ejemplo llevando a cabo citometría de flujo de una muestra de sangre de ese paciente, usando un anticuerpo marcado dirigido al antígeno CD4.

Todos estos procedimientos de pronóstico anteriores se pueden usar de forma reproducible, pero también tienen sus

límites técnicos respectivos, en relación con, por ejemplo, su significancia biológica con respecto a la evolución de la enfermedad.

5 El uso de anticuerpos para evaluar el número de partículas virales del VIH presentes en una muestra biológica de un paciente implica inconvenientes debido a la especificidad de los anticuerpos que se usan, puesto que es bien sabido que las proteínas estructurales del VIH producidas por diferentes aislados del virus del VIH difieren significativamente en sus propiedades antigénicas, y de este modo se pueden generar falsos resultados negativos.

10 La medida del número de copias del genoma del VIH en una muestra biológica de un paciente es indicativa de hecho de que el provirus que se ha integrado en el genoma celular del individuo infectado ha entrado en ciclos de replicación activos, y que la enfermedad está en progresión activa. Sin embargo, esta técnica no refleja simultáneamente la respuesta inmunitaria del paciente frente a la progresión del virus.

15 La medida de los niveles de células T CD4<sup>+</sup> en un paciente también es indicativa de la progresión de la enfermedad, puesto que la patogénesis del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) se puede atribuir en gran medida a la disminución de linfocitos T que poseen el receptor CD4 (CD4<sup>+</sup>). El agotamiento progresivo de linfocitos T CD4<sup>+</sup> está asociado con un incremento de las complicaciones clínicas. Debido a esta asociación, la medida de los niveles de células T CD4<sup>+</sup> se usa para establecer puntos de decisión para monitorizar la relevancia de los tratamientos frente al SIDA. Los niveles de linfocitos T CD4<sup>+</sup> también se usan como indicadores de pronóstico en pacientes con  
20 enfermedad del virus de inmunodeficiencia humana (VIH).

25 Sin embargo, la medida de los niveles de células T CD4<sup>+</sup> en un paciente no refleja directamente el estado inmunológico del paciente, excepto con relación a la inmunodeficiencia resultante. De forma notable, la medida de los niveles de células T CD4<sup>+</sup> no da cuenta del estado de los posibles efectores biológicos que provocan o median el agotamiento de CD4<sup>+</sup> observado, y de este modo de los posibles efectores biológicos que pueden provocar esta inmunodeficiencia del paciente observada.

30 De hecho, también se puede mencionar que una predicción de la progresión de SIDA, en un paciente dado infectado con VIH, también se puede llevar a cabo mediante la detección de mutaciones que se producen en la secuencia de aminoácidos de correceptores conocidos para VIH que son expresados por las células del paciente, especialmente células CD4<sup>+</sup>, tales como el correceptor CCR5, puesto que se ha observado que las personas infectadas por VIH que poseen una mutación específica en una de sus dos copias que codifican el correceptor CCR5 pueden tener un curso de la enfermedad más lento que las personas con dos copias normales de este gen.

35 Sin embargo, existe la necesidad en la técnica de procedimientos adicionales que permitirán al experto en la materia determinar el estado de progresión de SIDA en pacientes que han sido infectados con un virus del VIH, para permitir un pronóstico más preciso de la evolución de la enfermedad, incluyendo la aparición de, o la evolución de, las numerosas enfermedades relacionadas con SIDA bien conocidas, y también para permitir una monitorización más precisa del tratamiento terapéutico que puede ser el más beneficioso para el paciente infectado con VIH, una vez  
40 tenido en cuenta el estado de progresión de la enfermedad de SIDA. Por ejemplo, existe la necesidad en la técnica de nuevos marcadores biológicos que sean indicativos de la progresión de SIDA, que deberían ser preferiblemente de relevancia biológica con respecto a la biología de la infección por VIH, tal como, por ejemplo, nuevos marcadores biológicos de relevancia con respecto al estado inmunológico del paciente ensayado.

45 De hecho, estos nuevos marcadores biológicos se pueden usar en combinación con uno o varios marcadores ya conocidos, tales como los citados anteriormente.

50 Además, todavía existe la necesidad en la técnica de nuevos compuestos terapéuticamente útiles para prevenir la aparición de SIDA en individuos al infectarse con un virus del VIH, o, más generalmente, para tratar pacientes infectados con un virus del VIH. Particularmente, en la definición de nuevas multiterapias anti-VIH o HAART ("terapia antirretroviral muy activa") existe la necesidad de incluir nuevos compuestos farmacéuticamente activos que se dirigirán específicamente contra otras moléculas diana distintas de la proteasa del VIH y de la retrotranscriptasa del VIH y que actuarán sobre dianas implicadas en distintas etapas de la enfermedad. De forma importante, existe la  
55 necesidad en la técnica de nuevos compuestos de interés farmacéutico que sean biológicamente activos en pacientes infectados por VIH en los que el VIH ha comenzado a replicarse activamente, especialmente en pacientes infectados por VIH que están próximos a sufrir una disminución en el número de sus células T CD4<sup>+</sup> y que de este modo son susceptibles a inmunodeficiencia, así como en pacientes infectados por VIH para los cuales ya ha comenzado el agotamiento de sus células T CD4<sup>+</sup>.

60 **Sumario de la invención**

La invención está limitada solamente por sus reivindicaciones. La invención describe un procedimiento para la evaluación *in vitro* del estado de progresión de la infección de un individuo con un virus del VIH, en el que dicho procedimiento comprende las etapas de:

65 (a) incubar dicha muestra biológica con un compuesto ligando que se une específicamente sobre la proteína

NKp44L de SEC ID N°1, o sobre su parte del dominio extracelular; y

- (b) medir la cantidad de dicho compuesto ligando que está unido a las células T CD4<sup>+</sup>, con lo que dicha cantidad medida de dicho compuesto ligando unido es indicativa del estado de progresión de la infección viral.

También se refiere a kits que están diseñados específicamente para implementar el procedimiento anterior.

La invención se refiere a procedimientos *in vitro* para el cribado de compuestos que son terapéuticamente activos en pacientes infectados por VIH.

Particularmente, la invención describe un procedimiento para el cribado *in vitro* de compuestos para prevenir o tratar una enfermedad relacionada con la infección de un individuo con un virus del VIH, en el que dicho procedimiento comprende las etapas de:

- (a) poner en contacto una primera población de células que consiste en células NK activadas humanas y una segunda población de células que consiste en células T CD4<sup>+</sup> que expresan la proteína NKp44L, en presencia de un compuesto terapéutico candidato a ensayar;
- (b) medir la citólisis de las células T CD4<sup>+</sup> por las células NK activadas;
- (c) comparar el valor de citólisis obtenido en la etapa (b) con el valor de citólisis obtenido cuando la etapa (a) se lleva a cabo en ausencia del compuesto candidato;
- (d) seleccionar los compuestos candidatos que inhiben o bloquean la citólisis de las células T CD4<sup>+</sup> mediada por NK.

También describe una composición farmacéutica para prevenir o tratar una enfermedad relacionada con la infección de un individuo con un virus de la familia del VIH, que comprende una cantidad eficaz de un compuesto ligando que se selecciona de entre el grupo que consiste en (i) un compuesto ligando que se une específicamente a la proteína NKp44L de SEC ID N°1, o a su parte del dominio extracelular, y (ii) un compuesto ligando que se une específicamente a la proteína NKp44 de SEC ID N°2, o a su parte del dominio extracelular, en combinación con al menos un excipiente fisiológicamente aceptable.

También se refiere a una composición farmacéutica para prevenir o tratar una enfermedad relacionada con la infección de un individuo con un virus de la familia del VIH, que comprende una cantidad eficaz de un polinucleótido antisentido que se hibrida específicamente con las moléculas de ARNm que codifican la proteína NKp44L de SEC ID N°1, en combinación con al menos un excipiente fisiológicamente aceptable.

También se refiere a procedimientos para tratar pacientes infectados con VIH que utilizan los compuestos terapéuticamente activos y de las composiciones farmacéuticas que se describen adicionalmente en la presente memoria descriptiva.

En otro aspecto, la presente invención describe un polipéptido que comprende la siguiente secuencia de aminoácidos:

$X_1X_2X_3X_4X_5X_6SWSNKSX_7X_8X_9X_{10}X_{11}$  (I),

en la que X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub>, X<sub>3</sub>, X<sub>5</sub>, X<sub>6</sub>, X<sub>7</sub>, X<sub>9</sub>, X<sub>10</sub>, y X<sub>11</sub> significan, independientemente entre sí, cualquier resto de aminoácido, X<sub>4</sub> significa cualquier resto de aminoácido excepto A y W, y en la que X<sub>8</sub> significa cualquier resto de aminoácido excepto E y S.

La invención también describe procedimientos *in vitro* para el cribado de compuestos para prevenir o tratar una enfermedad relacionada con la infección de un individuo con un virus del VIH, en los que dicho procedimiento comprende las etapas de:

- (i) incubar un compuesto candidato que se va a someter a prueba con un polipéptido como se describe anteriormente,
- (ii) evaluar la unión del compuesto candidato que se va a someter a prueba con un polipéptido como se describe anteriormente.

También describe una composición farmacéutica para prevenir o tratar una enfermedad relacionada con la infección de un individuo con un virus de la familia del VIH, que comprende una cantidad eficaz de un compuesto ligando que se une específicamente al polipéptido de fórmula (I), en combinación con al menos un excipiente fisiológicamente aceptable.

**Descripción de las figuras**

Figura 1. La expresión de NKp44L en células T CD4<sup>+</sup> de individuos infectados con el VIH está asociada con la etapa de la enfermedad.

5 1A) Expresión específica de NKp44L en células T CD4<sup>+</sup> en pacientes infectados con el VIH-1. Comparación entre grupos no infectados (control, símbolos en blanco) e infectados por el VIH (símbolos en negro). Las líneas horizontales marcan el valor medio. Abscisa: fenotipo de las células sanguíneas ensayadas: Ordenadas: porcentaje de las células ensayadas que son positivas para el marcador NKp44L.

10 1B) Correlación inversa de la expresión de NKp44L en células T CD4<sup>+</sup> con el recuento de células CD4 de sangre periférica en pacientes infectados con el VIH. Se muestra la correlación (r) y esta significancia estadística (P) obtenida usando el ensayo de correlación de rangos no paramétrico de Spearman. Abscisa: número de células T CD4<sup>+</sup> por mm<sup>3</sup> de muestra de sangre completa del paciente. Ordenada: porcentaje de las células CD4<sup>+</sup> ensayadas que son positivas para el marcador NKp44L.

15 1C) Correlación entre la expresión de NKp44L en células T CD4<sup>+</sup> y la carga viral. Se muestra la correlación (r) y esta significancia estadística (P) obtenida usando el ensayo de correlación de rangos no paramétrico de Spearman. Abscisa: valor de carga viral, según se expresa mediante el número de copias del genoma del VIH por ml de la muestra de sangre completa del paciente. Ordenada: porcentaje de las células CD4<sup>+</sup> ensayadas que son positivas para el marcador NKp44L.

20 1D) Sobreexpresión de NKp44L en células T CD4<sup>+</sup> de individuos infectados con el VIH tras la activación de PHA. Comparación entre 5 pacientes no infectados (control, símbolos en blanco) y 5 pacientes infectados con el VIH (símbolos en negro). NA: células no activadas; PHA: células activadas mediante PHA. Abscisa: NA = células no activadas; PHA = células activadas mediante PHA en, respectivamente, individuos del control e individuos infectados con el VIH. Ordenada: porcentaje de las células CD4<sup>+</sup> ensayadas que son positivas para el marcador NKp44L.

25 Figura 2. Expresión de NKp44 en células NK CD3-CD56<sup>+</sup> de pacientes infectados con el VIH.

La proporción de células NK que expresaron NKp44 fue significativamente mayor en los individuos infectados con el VIH, con menos de 500 células CD4<sup>+</sup>/mm<sup>3</sup>, que las células no infectadas (control).

30 Figura 3. Mayor sensibilidad a la lisis por NK de las células T CD4<sup>+</sup> que expresan NKp44L de pacientes infectados con el VIH.

35 3A) Se analizó la estirpe de NK NK92 para determinar la actividad citotóxica frente a dos células T CD4<sup>+</sup> purificadas que expresan (círculo) o no (cuadrado) NKp44L. La actividad citotóxica se bloqueó parcialmente tras el tratamiento con mAb anti-NKp44L (a44).

40 3B) Actividad citotóxica de dos células primarias NK autólogas (auto) activadas por IL-2 frente a células T CD4<sup>+</sup> purificadas que expresan (círculo) o no (cuadrado) NKp44L, y K562 (estrella), como control positivo para la actividad citotóxica.

45 3C) Actividad citotóxica de células primarias NK autólogas (auto) inactivadas frente a dos células T CD4<sup>+</sup> purificadas que expresan (círculo) o no (cuadrado) NKp44L, y K562 (estrella), como control positivo para la actividad citotóxica.

50 En las figuras 3A, 3B y 3C, los paneles izquierdo y derecho representan dos ensayos independientes, y muestran la reproducibilidad de los resultados.

Figura 4. Sobreexpresión de NKp44L tras el tratamiento de células T CD4<sup>+</sup> purificadas con el virus de la vacuna que expresa varias proteínas del VIH.

55 Se infectaron células T CD4<sup>+</sup> purificadas con 20 pfu/célula de varios virus de la vacuna recombinantes que expresan proteína del VIH. Dos días más tarde, las células se lavaron dos veces, y se tiñeron con mAb anti-NKp44L (línea gruesa gris), o con control de isotipo de IgM (línea delgada negra). Las células se analizaron mediante citometría de flujo. UI: células no infectadas, WT: células infectadas con virus de la vacuna de tipo salvaje. Gag, Pol, gp160, gp120, gp41, Tat, Nef: células infectadas con virus de la vacuna que expresa, respectivamente, Gag, Pol, gp160, gp120, gp41, Tat, o Nef. Para cada panel, se anotó el porcentaje de expresión de NKp44L. Abscisas: expresión de NKp44L, ordenadas: número de células.

60 Figura 5. Sobreexpresión de NKp44L tras el tratamiento de células T CD4<sup>+</sup> purificadas con proteína del VIH gp160 recombinante.

Se incubó un millón de células con 5 ug/ml de proteína de control (Ctl; círculo negro), o proteína gp160 recombinante (gp160A: triángulo negro); (gp160B: cuadrado negro) o sin proteína (UT: células no tratadas) durante 2 días en presencia de 10 U/ml de IL2.

5 5A) Las células se lavaron y tiñeron con mAb anti-NKp44L y mAb anti-CD4, o con controles de isotipo, y se analizaron mediante citometría de flujo. Para cada panel, se anotó el porcentaje de expresión de NKp44L en células T CD4+. Abscisa: expresión de CD4, ordenadas: expresión de NKp44L.

10 5B) La sensibilidad a la lisis mediante NK de las células T CD4+ incubadas con proteína del VIH gp160 recombinante se analizó en busca de la actividad citotóxica con células NK purificadas autólogas activadas. La actividad de lisis por NK se llevó a cabo a diferentes relaciones de efectoras/diana (E/T) (abscisa). Diamantes en blanco con líneas discontinuas: células no tratadas; círculos en negro: células tratadas con proteína de control; triángulos en negro: células tratadas con gp160-A; y cuadrados negros: células tratadas con gp160-B. Ordenadas: lisis mediante NK específica (%).

15 Figura 6. Un conjunto de péptidos de la proteína gp41 del VIH indujo tanto una mayor sensibilidad a la lisis por NK como una sobreexpresión de NKp44L.

20 Se trató un millón de células T CD4+ purificadas con 5 ug/ml de conjuntos de péptidos de la proteína gp41 del VIH (anotados de A a J), o de la proteína gp120 (gp120) como control. Cada conjunto de péptidos incluyó 10 péptidos, como se describe en la sección de Materiales y Métodos. Las células se incubaron dos días en presencia de 10 u/ml de IL2, y después se lavaron dos veces.

25 6A) La sensibilidad a la lisis por NK de las células T CD4+ incubadas con los diferentes conjuntos de péptidos se analizó en busca de la actividad citotóxica con células NK purificadas autólogas activadas. La actividad de lisis por NK se llevó a cabo a diferentes relaciones de efectoras/diana (E/T) (abscisa). Ordenadas: lisis por NK específica (%).

30 6B) Las células se tiñeron con mAb anti-NKp44L y mAb anti-CD4, o con controles de isotipo, y se analizaron mediante citometría de flujo. En este panel de figuras, los resultados sólo se realizaron para las células no tratadas (ninguna) o las células tratadas con conjuntos de péptidos de gp120 o de la gp41 (conjuntos C y J). Para cada panel, se anotó el porcentaje de expresión de NKp44L en células T CD4+. Para los otros conjuntos, se observó una baja expresión de NKp44L, que osciló desde 0,2 a 1,3%. Abscisa: expresión de NKp44L, ordenadas: expresión de CD4.

35 Figura 7. Análisis de cada péptido del conjunto C derivado de la proteína gp41 del VIH.

40 Se trató un millón de células T CD4+ purificadas con 5 ug/ml de péptidos del conjunto C (véase la figura 6) (anotados de C141 a C150), o, como controles, el péptido gp41-E162 o el péptido gp120-87. Las células se incubaron dos días en presencia de 10 u/ml de IL2, y después se lavaron dos veces.

45 7A) Los patrones de exterminio de células T CD4+ incubadas con los diferentes péptidos se ensayó para determinar su sensibilidad a NK. Los datos se muestran para una relación E/T de 40/1 con células efectoras NK purificadas autólogas activadas. Ordenadas: lisis por NK específicas (%).

7B) Las células se tiñeron con mAb anti-NKp44L y mAb anti-CD4, o con controles de isotipo, y se analizaron mediante citometría de flujo. Ordenadas: expresión de NKp44L.

50 Figura 8. Rol drástico del motivo NH2-SWSNKS-COOH expresado por la proteína del VIH gp41.

8A) Las secuencias del péptido gp41-C147 (tipo salvaje: WT) y dos péptidos de control diferentes incluyeron alguna modificación justamente dentro del motivo "SWSNKS" (control 1: Ctl1) o en toda la secuencia de 15-meros (control 2: Ctl2).

55 Se trató un millón de células T CD4+ purificadas con 1 ug/ml de péptido WT muy purificado o con ambos péptidos de control (Ctl1 y Ctl2). Las células se incubaron dos días en presencia de 10 u/ml de IL2, y después se lavaron dos veces.

60 8B) La sensibilidad a la lisis por NK de las células T CD4+ incubadas con los diferentes péptidos se analizó en busca de la actividad citotóxica con células NK purificadas autólogas activadas. La actividad de lisis por NK se llevó a cabo a diferentes relaciones de efectoras/diana (E/T) (abscisa). Diamantes en blanco con líneas discontinuas: células no tratadas; círculos en negro: células tratadas con péptido WT; cuadrados en negro: células tratadas con el péptido Ctl1, y triángulos en negro: células tratadas con el péptido Ctl2. Ordenadas: lisis por NK específica (%).

65 8C) Las células se tiñeron con mAb anti-NKp44L y mAb anti-CD4, o con controles de isotipo, y se analizaron

mediante citometría de flujo. Para cada panel, se anotó el porcentaje de expresión de NKp44L en células T CD4+. Abscisa: expresión de NKp44L, ordenadas: expresión de CD4.

Figura 9. Estudios cinéticos de la actividad de la lisis por NK y de la expresión de NKp44L tras la adición del péptido "SWSNKS activo".

Se trató un millón de células T CD4+ purificadas con 1 µg/ml de péptido de tipo salvaje (WT) muy purificado o con ambos péptidos de control (Ctl1 y Ctl2) durante varias veces, oscilando desde 0 hasta 2880 min. Tras la incubación, las células se lavaron dos veces y se analizaron entonces en busca de la actividad citotóxica con células NK purificadas autólogas activadas. La actividad de la lisis por NK se llevó a cabo a diferentes relaciones de efectoras/diana (E/T). 9A). La actividad citotóxica de NK se llevó a cabo tras el pretratamiento de la célula con 10 µg/ml de mAb anti-NKp44L (B). El análisis de citometría de flujo reveló la expresión en la superficie celular de NKp44L (A), y la expresión intracelular de NKp44L (B). Diamantes en blanco con líneas discontinuas: células no tratadas; círculos en negro: células tratadas con péptido WT; cuadrados en negro: células tratadas con el péptido Ctl1, y triángulos en negro: células tratadas con el péptido Ctl2; círculos en blanco con línea discontinua: células tratadas con el péptido WT tras el pretratamiento con mAb anti-NKp44L, y cuadrados en blanco con línea discontinua: células tratadas con el péptido Ctl1 tras el pretratamiento con mAb anti-NKp44L.

Figura 10. Expresión de NKp44L en la superficie celular de diferentes células humanas

Expresión de NKp44L de K562, Jurkat, y PBMC en reposo, sobre la superficie celular. Las células se incubaron con 1 µg/ml de mAb anti-NKp44L (línea gruesa gris) o con control de isotipo de IgM (línea delgada negra), y se analizaron mediante citometría de flujo. Abscisa: expresión de NKp44L, ordenadas: número de células.

#### Descripción detallada de la invención

Según la invención, se ha descubierto que una proteína específica, denominada NKp44L, es expresada por las células T CD4<sup>+</sup> de individuos infectados por VIH, mientras que esta proteína no es expresada por células T CD4<sup>+</sup> de individuos que no están infectados con el VIH. La proteína NKp44L no es expresada (i) en células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de pacientes infectados con el VIH que no expresan el antígeno CD3, (ii) en PBMC de pacientes infectados con el VIH que expresan el antígeno CD3 pero no el antígeno CD4, ni (iii) en PBMC de pacientes infectados con el VIH que expresan el antígeno CD8. Particularmente, el nivel de expresión de la proteína NKp44L está potenciado además en células T CD4<sup>+</sup> activadas, tales como células T CD4<sup>+</sup> activadas por PHA, de individuos infectados con el VIH.

Además, se ha demostrado según la invención que un mayor nivel de expresión de la proteína NKp44L está correlacionado con la disminución en el número de células T CD4<sup>+</sup> que se observa en pacientes infectados con el VIH, de este modo en pacientes que sufren una progresión de SIDA. En consecuencia, el nivel de expresión de la proteína NKp44L es indicativo del estado inmunológico de un paciente infectado con el VIH.

Adicionalmente, se ha descubierto según la invención que un incremento en la expresión de la proteína NKp44L está correlacionado con un aumento de la carga viral del VIH en los pacientes ensayados. De este modo, el nivel de expresión de la proteína NKp44L también es indicativo del estado de la actividad replicativa del virus VIH en los pacientes infectados.

En otro aspecto, también se ha descubierto según la invención que las células T CD4<sup>+</sup> de pacientes infectados con el VIH, y especialmente células T CD4<sup>+</sup> que expresan la proteína NKp44L, consisten en dianas específicas para su citólisis por células asesinas naturales (NK), particularmente células NK activadas, y especialmente células NK autólogas procedentes del mismo paciente.

De forma importante, se ha demostrado que las células NK de un individuo infectado por el VIH son activadas específicamente, mediante un mecanismo de disparo no dependiente del MHC, por las células T CD4<sup>+</sup> autólogas que expresan la proteína NKp44L.

En consecuencia, se ha determinado según la presente invención que la expresión de NKp44L por las células T CD4<sup>+</sup> de pacientes infectados con el VIH es de una relevancia biológica importante en el contexto de la progresión de la enfermedad del SIDA, y especialmente en relación con la evolución de la inmunodeficiencia que va paralela con la aparición de las diversas enfermedades relacionadas con SIDA.

En otras palabras, se ha encontrado según la invención una correlación estadísticamente significativa entre el nivel de expresión de la proteína NKp44L en la superficie membranaria de las células T CD4<sup>+</sup> recogidas de individuos infectados con el VIH y la progresión o estado de avance de la enfermedad infecciosa, especialmente en cuanto al desarrollo de la inmunodeficiencia del paciente provocada por el agotamiento progresivo de sus células T CD4<sup>+</sup>.

Se concluye a partir de los resultados experimentales obtenidos que se describen brevemente anteriormente que el nivel de expresión de la proteína NKp44L en las PBMC, y más específicamente el nivel de expresión de la proteína

NKp44L por las células T CD4<sup>+</sup> contenidas en la población de células PBMC, revela que consiste en un marcador biológico exacto del estado de progresión de la infección de un individuo con un virus del VIH. Además, el nivel de expresión de la proteína NKp44L consiste en un nuevo marcador biológico del estado de avance de la infección por VIH dotado con una significancia biológica muy elevada, puesto que se ha mostrado que NKp44L expresada por las células T CD4<sup>+</sup> dispara las células NK autólogas y activa estas células NK para la citólisis específica de las células T CD4<sup>+</sup>, mediante un reconocimiento no dependiente del MHC de las células T CD4<sup>+</sup> por las células NK activadas. En este contexto particular, la proteína NKp44L expresada por las células T CD4<sup>+</sup> del paciente infectado con el VIH activa a las células NK a través de la unión específica de la proteína NKp44L a su contraparte receptora específica que se expresa en la superficie membranaria de las células NK, a saber, la proteína receptora de NKp44 que ya se ha descrito por *Cantoni et al.* (1999) y por *Vitale et al.* (1998).

Además, la proteína NKp44L se ha aislado con anterioridad por otra entidad inventora, y esta proteína ya se ha demostrado que es expresada en diversos tipos de estirpes celulares tumorales. Todavía más, la NKp44L expresada por ciertas células tumorales ha demostrado ser un ligando que se une específicamente a la proteína receptora de NKp44 citada anteriormente, proteína receptora la cual es expresada por las células NK, incluyendo las células NK activadas. También se ha mostrado con anterioridad por esta entidad inventora que la proteína receptora de NKp44 que es expresada por las células NK activadas puede ser responsable de al menos parte de la citólisis de células tumorales efectuada por células NK activadas (información no publicada).

Tomados en conjunto, los resultados obtenidos han permitido llevar a cabo diversos procedimientos que hacen uso de la proteína NKp44L como un nuevo marcador biológicamente relevante de la progresión de la enfermedad para individuos ya diagnosticados por haber sido infectados por el VIH.

Además, se ha descubierto sorprendentemente que un polipéptido específico, derivado de la proteína gp41 del VIH, potencia notablemente la expresión de la proteína NKp44L en la superficie membranaria de las células T CD4<sup>+</sup>.

También se ha determinado según la presente invención que la lisis por las células NK de las células T CD4<sup>+</sup> de pacientes infectados con el VIH depende de ese polipéptido del VIH específico.

gp41 del VIH-1 está compuesta de tres dominios, un dominio extracelular (ectodominio), un dominio transmembranario y un dominio intracelular (endodominio). El ectodominio de gp41 contiene tres regiones funcionales principales, es decir, el péptido de fusión situado en el término N de gp41, seguido por dos repeticiones de 4-3 heptadas adyacentes a las partes N y C-terminales del ectodominio de gp41, designadas NHR (repetición de heptada N-terminal) y CHR (repetición de heptada C-terminal), respectivamente. Las repeticiones N- y C-terminales también se denominan como "HR1" y "HR2".

Ambas regiones NHR y CHR funcionan como estructuras esenciales requeridas para cambios conformacionales durante el proceso de fusión membranaria entre el VIH-1 y las células T CD4<sup>+</sup>.

Sorprendentemente, se ha descubierto que un péptido corto, derivado de la proteína gp41, que está situado entre las regiones HR1 y HR2 bien conocidas, induce la expresión superficial de NKp44L en células T CD4<sup>+</sup>.

En otras palabras, se ha identificado un péptido corto derivado de la proteína gp41 del VIH, que es responsable de la expresión de NKp44L en la superficie, y también de este modo de la lisis de las células T CD4<sup>+</sup> por las células NK endógenas.

Estos resultados obtenidos han permitido llevar a cabo procedimientos de cribado, que utilizan un péptido específico derivado de gp41 como una nueva diana para agentes terapéuticos, distinta de las regiones HR1 y HR2 bien conocidas.

De forma importante, también se ha demostrado que la proteína NKp44L es expresada en la superficie de células tumorales, y que esta expresión de NKp44L es inducida o potenciada por dicho péptido corto derivado de gp41.

De este modo, según la invención, dicho péptido corto derivado de gp41 se puede usar para expresar NKp44L en la superficie de células tumorales e inducir después su lisis específica por células NK.

En consecuencia, la invención se refiere a procedimientos terapéuticos, y a composiciones farmacéuticas, que comprenden un polipéptido como se menciona anteriormente, para preparar composiciones farmacéuticas contra el cáncer.

Los procedimientos de cribado y las composiciones relacionadas mencionadas anteriormente se describirán con detalle en la parte titulada "Otros procedimientos y composiciones según la invención".

#### **Procedimientos de diagnóstico *in vitro* de la invención**

Un primer objeto de la presente invención consiste en un procedimiento para la evaluación *in vitro* del estado de

progresión de la infección de un individuo con un virus del VIH, en el que dicho procedimiento comprende las etapas de

- 5 (a) incubar dicha muestra biológica con un compuesto ligando que se une específicamente sobre la proteína NKp44L de SEC ID N°1, o sobre su parte del dominio extracelular; en el que el ligando se selecciona de entre el grupo que consiste en (i) un anticuerpo dirigido a la proteína NKp44L de SEC ID N°1, o sobre su parte del dominio extracelular, y (ii) la proteína NKp44 de SEC ID N°2, o un polipéptido que comprende la parte del dominio extracelular de la misma; y
- 10 (b) medir la cantidad de dicho compuesto ligando que está unido a las células T CD4<sup>+</sup>, con lo que dicha cantidad medida de dicho compuesto ligando unido es indicativa del estado de progresión de la infección viral.

Como se usa en la presente memoria, un virus del "VIH" consiste en un virus VIH-1 o un virus VIH-2, y más particularmente cualquier cepa o aislado vírico de un virus VIH-1 o VIH-2.

15 Como se usa en la presente memoria, la "evaluación del estado de progresión" de la infección consiste en datos experimentales brutos indicativos del estado inmunológico del paciente ensayado infectado con el VIH, puesto que, como ya se ha mencionado anteriormente, existe una correlación estadísticamente relevante entre (A) la expresión de la proteína NKp44L en la superficie celular de las células T CD4<sup>+</sup> y (B) (i) la tasa de células T CD4<sup>+</sup> de dicho paciente o (ii) el nivel de actividad de citólisis por células NK frente a las células T CD4<sup>+</sup> de dicho paciente. De este modo, según la invención, cuanto más es expresada la proteína NKp44L por las células T CD4<sup>+</sup>, más habrá progresado la enfermedad del VIH en dicho paciente. De hecho, la sola medida del nivel de expresión de la proteína NKp44L puede no ser suficiente para un diagnóstico, o pronóstico, clínico exacto global del estado de la progresión de la enfermedad en el paciente ensayado. De este modo, la medida del nivel de expresión de la NKp44L se puede completar mediante, o combinar con, otros marcadores de diagnóstico o de pronóstico de la enfermedad, por ejemplo uno de los marcadores de la técnica anterior que se ha citado previamente en la presente memoria descriptiva.

30 Como se usa en la presente memoria, la "parte del dominio extracelular" de la proteína NKp44L de SEC ID N°1 consiste en un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos que comienza desde el aminoácido situado en la posición 928 y que termina en el aminoácido en la posición 1168 de la secuencia de aminoácidos SEC ID N°1.

35 Como se usa en la presente memoria, el "compuesto ligando" consiste en cualquier molécula, ya sea (i) una molécula de origen natural o producida naturalmente que se ha purificado de su entorno biológico o (ii) una molécula que se ha fabricado mediante síntesis biológica o química parcial (hemisíntesis) o (iii) una molécula que se ha preparado mediante síntesis biológica o química total. Dicho compuesto ligando se debe de unir específicamente (selectivamente) a la proteína NKp44L, lo que significa, en el contexto de la presente invención, que dicho compuesto ligando, cuando se incuba en una muestra biológica que contiene células humanas, se une exclusivamente a la NKp44L expresada por al menos algunas de estas células humanas, y de este modo, por el contrario, no se une de manera detectable a proteínas expresadas por estas células que son distintas de NKp44L o de la parte de la proteína NKp44L que está expuesta en la superficie membranaria de las células T CD4<sup>+</sup>. Todavía más preferentemente, la muestra biológica se selecciona de entre el grupo que consiste en (i) una muestra de sangre completa, (ii) una suspensión de células mononucleares y polimorfonucleares periféricas purificada a partir de una muestra de sangre completa, (iii) una suspensión de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) purificadas a partir de una muestra de sangre completa, (iv) una suspensión de células T purificada a partir de una muestra de sangre completa, y (v) una suspensión de células T CD4<sup>+</sup> purificada a partir de una muestra de sangre completa.

50 Como se usa en la presente memoria, la "cantidad" del compuesto ligando que está unido a las células T CD4<sup>+</sup> significa principalmente la relación o porcentaje de células T CD4<sup>+</sup> contenidas en la muestra biológica del ensayo que se unen a dicho compuesto ligando, o, en otras palabras, la relación de células T CD4<sup>+</sup> contenidas en la muestra biológica del ensayo que expresan la proteína NKp44L. En otra forma realización, para medir la "cantidad" de dicho compuesto ligando que está unido a las células T CD4<sup>+</sup>, también se tiene en cuenta la cantidad del compuesto ligando, por ejemplo el número de moléculas del compuesto ligando, que está unido a cada célula que expresa la proteína NKp44L. De forma ilustrativa, la "cantidad" de dicho compuesto ligando que está unido a las células T CD4<sup>+</sup> se puede expresar como la relación, preferiblemente en porcentaje, de las células T CD4<sup>+</sup> contenidas en la muestra de ensayo para la que la expresión de la proteína NKp44L en su superficie membranaria es detectable a través de la unión específica de dicho compuesto ligando sobre la proteína NKp44L expresada.

60 Debido a que se ha demostrado que existe una correlación entre el nivel de expresión de la proteína NKp44L por las células T CD4<sup>+</sup> de un paciente infectado por el VIH y el número de células T CD4<sup>+</sup> de dicho paciente, otro objeto de la presente invención consiste en un procedimiento para la determinación *in vitro* de la relación de células T CD4<sup>+</sup> presentes en una muestra biológica que contiene células sanguíneas recogida de un paciente infectado con un virus del VIH, en el que dicho procedimiento comprende las etapas de:

- 65 (a) incubar dicha muestra biológica con un compuesto ligando que se une específicamente sobre la proteína

NKp44L de SEC ID N°1, o sobre su parte del dominio extracelular, en el que el ligando se selecciona de entre el grupo que consiste en (i) un anticuerpo dirigido a la proteína NKp44L de SEC ID N°1, o sobre su parte del dominio extracelular, y (ii) la proteína NKp44 de SEC ID N°2, o un polipéptido que comprende la parte del dominio extracelular de la misma; y

5 (b) medir la cantidad de dicho compuesto ligando que está unido a las células T CD4<sup>+</sup>, con lo que dicha cantidad medida de dicho compuesto ligando unido es indicativa de la tasa de células T CD4<sup>+</sup> contenidas en dicha muestra biológica.

10 Como se usa en la presente memoria, la "tasa" de células T CD4<sup>+</sup> contenidas en la muestra biológica del ensayo consiste en el número de células T CD4<sup>+</sup> que se encuentran en el volumen inicial de sangre completa a partir de la que se ha preparado la muestra biológica del ensayo. Por ejemplo, la tasa de las células T CD4<sup>+</sup> se puede expresar como el número de células T CD4<sup>+</sup> por mm<sup>3</sup> de la muestra de sangre completa inicial que se usó para preparar dicha muestra biológica.

15 Según el procedimiento anterior, la tasa de las células T CD4<sup>+</sup> del paciente que se ensaya se puede determinar fácilmente por el experto en la materia, por ejemplo refiriéndose a una curva de control estándar en la que cada valor de la tasa de células T CD4<sup>+</sup> se representa gráficamente frente a los valores del nivel de expresión de NKp44L obtenidos de ensayos previos simultáneos, como se muestra en los ejemplos en la presente memoria. En esta forma de realización, el experto en la materia mide en primer lugar el nivel de expresión de NKp44L según el procedimiento anterior, y después determina, a partir de la curva de control estándar, la tasa de células T CD4<sup>+</sup> correspondiente. Por ejemplo, el experto en la materia puede usar, como curva estándar, aquella que se muestra en la figura 1B.

20 Puesto que, como ya se ha descrito anteriormente, la definición de caso de SIDA en adultos y adolescentes se ha ampliado para incluir la infección por VIH en un individuo con un recuento de células T CD4<sup>+</sup> menor que 200 células por mm<sup>3</sup>, y que existe una correlación estricta entre la tasa de células T CD4<sup>+</sup> en un individuo infectado por el VIH y el nivel de expresión de la proteína NKp44L por dichas células T CD4<sup>+</sup>, entonces se puede evaluar pertinentemente el estado de progresión de la enfermedad en un individuo infectado por el VIH midiendo dicho nivel de expresión de NKp44L, midiendo la cantidad del compuesto ligando definido anteriormente que está unido a las células T CD4<sup>+</sup> de dicho individuo, llevando a cabo el primer procedimiento descrito anteriormente. Por ejemplo, un paciente dado se incluirá como un caso de SIDA si el valor del nivel de expresión de la proteína NKp44L es superior al 20 por ciento de las células T CD4<sup>+</sup> de la muestra biológica del ensayo que expresan la proteína NKp44L, según se revela mediante la unión específica del compuesto ligando sobre la proteína NKp44L expresada, puesto que el valor de la cantidad del 20 por ciento se corresponde a menos de 200 células T CD4<sup>+</sup> por mm<sup>3</sup>, como se muestra en la figura 1B.

25 Debido a que se ha demostrado que existe una correlación entre el nivel de expresión de la proteína NKp44L por las células T CD4<sup>+</sup> de un paciente infectado con el VIH y la carga viral del VIH de dicho paciente, un objeto adicional de la invención consiste en un procedimiento para la determinación *in vitro* de la carga viral del VIH de una muestra biológica que contiene células sanguíneas recogida de un paciente infectado con un virus del VIH, en el que dicho procedimiento comprende las etapas de:

30 (a) incubar dicha muestra biológica con un compuesto ligando que se une específicamente sobre la proteína NKp44L de SEC ID N°1, o sobre su parte del dominio extracelular, en el que el ligando se selecciona de entre el grupo que consiste en (i) un anticuerpo dirigido a la proteína NKp44L de SEC ID N°1, o sobre su parte del dominio extracelular, y (ii) la proteína NKp44 de SEC ID N°2, o un polipéptido que comprende la parte del dominio extracelular de la misma; y

35 (b) medir la cantidad de dicho compuesto ligando que está unido a las células T CD4<sup>+</sup>, con lo que dicha cantidad medida de dicho compuesto ligando unido es indicativa de la carga viral del VIH de dicha muestra biológica.

40 Según el procedimiento anterior, la carga viral del VIH del paciente que se ensaya se puede determinar fácilmente por el experto en la materia, por ejemplo haciendo referencia a una curva de control estándar en la que cada valor de la carga viral del VIH se representa gráficamente frente a los valores del nivel de expresión de NKp44L obtenidos de ensayos previos o simultáneos, como se muestra en los ejemplos en la presente memoria. En esta forma de realización, el experto en la materia mide en primer lugar el nivel de expresión de NKp44L según el procedimiento anterior, y después determina, a partir de la curva de control estándar, la carga viral del VIH correspondiente. Por ejemplo, el experto en la materia puede usar, como curva estándar, aquella que se muestra en la figura 1C.

45 En una forma de realización preferida de uno cualquiera de los procedimientos descritos anteriormente, la muestra biológica se selecciona de entre el grupo que consiste en (i) una muestra de sangre completa, (ii) una suspensión de células mononucleares y polimorfonucleares periféricas purificada a partir de una muestra de sangre completa, (iii) una suspensión de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) purificadas a partir de una muestra de sangre completa, (iv) una suspensión de células T purificada a partir de una muestra de sangre completa, y (v) una suspensión de células T CD4<sup>+</sup> purificada a partir de una muestra de sangre completa, por ejemplo según el procedimiento enseñado en los ejemplos en la presente memoria.

En una primera forma de realización preferida del compuesto ligando usado en uno cualquiera de los procedimientos anteriores, dicho compuesto ligando consiste en un anticuerpo dirigido a la proteína NKp44L de SEC ID N°1, o en un anticuerpo dirigido a la parte del dominio extracelular de la misma. Según esta primera forma de realización preferida, dicho compuesto ligando consiste en un compuesto ligando producido mediante síntesis biológica parcial o completa, como se define previamente.

Dicho anticuerpo anti-NKp44L puede consistir en un anticuerpo policlonal que se puede obtener (i) administrando una cantidad inmunológicamente eficaz de la proteína NKp44L purificada a un animal, preferiblemente en combinación con un adyuvante de inmunidad, tal como el adyuvante completo de Freund, (ii) recoger entonces la sangre completa del animal inmunizado, y (iii) purificar los anticuerpos policlonales anti-NKp44L, tal como, por ejemplo, usando un sustrato de cromatografía de inmunoafinidad sobre el que se ha inmovilizado previamente la proteína NKp44L purificada. Estas técnicas para obtener anticuerpos policlonales purificados son bien conocidos por el experto en la materia.

Dicho anticuerpo anti-NKp44L puede consistir en un anticuerpo policlonal, en cuyo caso dicho anticuerpo anti-NKp44L se puede preparar a partir de hibridomas obtenidos tras la fusión de células B de animales inmunizados contra la proteína NKp44L purificada con células de mieloma, según la técnica bien conocida descrita por Kohler y Milstein en 1975.

Dicho anticuerpo anti-NKp44L también puede consistir en un anticuerpo que se ha producido mediante la técnica de trioma, o mediante la técnica de hibridoma de células B humanas descrita por Kozbor *et al.* en 1983.

Dicho anticuerpo anti-NKp44L también puede consistir en fragmentos de anticuerpos Fv monocatenarios (patente US n° 4.946.778; Martineau *et al.*, 1998), en fragmentos de anticuerpos obtenidos a través de librerías de presentación de fagos (Ridder *et al.*, 1995) o en anticuerpos humanizados (Reinmann *et al.*, 1997; Leger *et al.*, 1997).

Todavía más preferentemente, el anticuerpo anti-NKp44L consiste en un anticuerpo monoclonal que se obtiene mediante las siguientes etapas:

- (i) preparar un lote de proteína NKp44L recombinante purificada de SEC ID N°1;
- (ii) inmunizar ratones, por ejemplo ratones BALB/c, con una cantidad eficaz de la proteína NKp44L purificada proporcionada en la etapa (i), por ejemplo a través de tres inyecciones sucesivas de dicha proteína purificada, cada una espaciada por un período de tiempo de un mes;
- (iii) preparar estirpes celulares de hibridomas mediante fusión de las células B purificadas de los ratones inmunizados en la etapa (ii), por ejemplo usando el kit de clonación de hibridomas ClonaCell-HY según las instrucciones del fabricante (StemCell Technologies Inc., Vancouver, BC, Canadá);
- (iv) cultivar clones de las estirpes celulares de hibridoma preparadas en la etapa (iii) y seleccionar el clon o clones que segregan un anticuerpo monoclonal dirigido a la proteína NKp44L; y
- (v) purificar los anticuerpos monoclonales producidos mediante los clones de células de hibridoma que se han seleccionado en la etapa (iv).

Un clon de células de hibridoma más preferido que produce un anticuerpo monoclonal anti-NKp44L consiste en la estirpe celular de hibridoma NKp44L # 7.1. Los anticuerpos monoclonales anti-NKp44L se preparan preferiblemente tal como se enseña en los ejemplos.

Para preparar un lote de proteína NKp44L recombinante purificada de SEC ID N°1 en la etapa (i) del procedimiento anterior, el experto en la materia puede llevar a cabo un procedimiento que comprende las siguientes etapas:

- (i) transfectar un hospedante celular receptor, preferiblemente una estirpe celular de mamífero tal como células COS-7, con un vector de expresión en el que se ha insertado un ácido nucleico que codifica la proteína Nkp44L de SEC ID N°1, preferiblemente un ácido nucleico de SEC ID N°3, o un polipéptido que comprende su dominio extracelular, y en el que dicho ácido nucleico está enlazado operablemente a señales de expresión que comprenden al menos un promotor que es funcional en dicho hospedante celular receptor, de manera que el hospedante celular transfectado resultante produce realmente la proteína NKp44L, cuando se coloca en condiciones de cultivo apropiadas;
- (ii) cultivar el hospedante celular transfectado en un medio de cultivo apropiado, de manera que se produce la proteína NKp44L, o la parte extracelular de la misma;
- (iii) recoger la proteína NKp44L, o la parte extracelular de la misma, a partir del sobrenadante del cultivo celular o

a partir del lisado celular del hospedante celular transfectado cultivado;

- (iv) purificar la proteína NKp44L, o su parte extracelular, recogida en la etapa (iii), por ejemplo a través de un sustrato cromatográfico de inmunoafinidad sobre el cual se han inmovilizado previamente anticuerpos anti-NKp44L, o como alternativa proteínas NKp44 purificadas.

Un procedimiento preferido para preparar NKp44L purificada se muestra en los ejemplos en la presente memoria.

En una segunda forma de realización del compuesto ligando usado en uno cualquiera de los procedimientos anteriores, dicho compuesto ligando consiste en la proteína NKp44 purificada de SEC ID N°2, o un polipéptido que comprende la parte del dominio extracelular de la misma. Esta segunda forma de realización ilustra una forma de realización adicional en la que el compuesto ligando se produce mediante síntesis biológica completa.

Como se usa en la presente memoria, la parte del dominio extracelular de la proteína NKp44 está situada en la parte N-terminal de la proteína NKp44 de SEC ID N°2 y consiste en la secuencia de aminoácidos que comienza desde el resto de aminoácido en la posición 22 y termina en el resto de aminoácido en la posición 169 de SEC ID N°2.

Para producir la proteína NKp44, o la parte del dominio extracelular de la misma, en forma purificada, el experto en la materia se referirá ventajosamente a los procedimientos descritos por Cantoni *et al.* (1999). Por ejemplo, la proteína recombinante NKp44 se puede preparar en una forma purificada mediante las siguientes etapas:

- (i) transfectar un hospedante celular receptor, preferiblemente una estirpe celular de mamífero tal como células COS-7, con un vector de expresión en el que se ha insertado un ácido nucleico que codifica la proteína Nkp44 de SEC ID N°2, preferiblemente un ácido nucleico de SEC ID N°4, o un polipéptido que comprende el dominio extracelular de la misma, y en el que dicho ácido nucleico está enlazado operablemente a señales de expresión que comprenden al menos un promotor que es funcional en dicho hospedante celular receptor, de manera que el hospedante celular transfectado resultante produce realmente la proteína NKp44, cuando se coloca en condiciones de cultivo apropiadas;
- (ii) cultivar el hospedante celular transfectado en un medio de cultivo apropiado, de manera que se produce la proteína NKp44, o la parte extracelular de la misma;
- (iii) recoger la proteína NKp44, o la parte extracelular de la misma, a partir del sobrenadante del cultivo celular o a partir del lisado celular del hospedante celular transfectado cultivado;
- (iv) purificar la proteína NKp44, o la parte extracelular de la misma, recogida en la etapa (iii), por ejemplo mediante sustrato cromatográfico de inmunoafinidad sobre el que se han inmovilizado previamente anticuerpos anti-NKp44, o como alternativa proteínas NKp44L purificadas.

Para llevar a cabo la medida de la cantidad de dicho compuesto ligando que se ha unido a las células T CD4<sup>+</sup>, en la etapa (b) de uno cualquiera de los procedimientos descritos anteriormente, lo más preferido es que dicho compuesto ligando esté marcado con una molécula detectable, de manera que la medición consista en detectar una señal física producida por dicha molécula detectable, y en el que el valor de dicha señal física que se obtiene refleje la cantidad de dicho compuesto ligando que está unido a la proteína NKp44L expresada por las células T CD4<sup>+</sup> contenidas en la muestra biológica inicialmente recogida del paciente infectado por el VIH.

Según un primer aspecto preferido, dicha molécula detectable consiste en una molécula radioactiva, por ejemplo cuando el compuesto ligando está marcado él mismo radioactivamente, a través de técnicas convencionales, o también cuando el compuesto ligando también se une a una molécula detectable marcada radioactivamente.

Según este primer aspecto preferido, dicha molécula radioactiva se marca con un isótopo radioactivo seleccionado de entre el grupo que consiste en [<sup>32</sup>P], [<sup>3</sup>H] y [<sup>35</sup>S].

Según un segundo aspecto preferido, dicha molécula detectable consiste en una molécula fluorescente.

Según este segundo aspecto preferido, dicha molécula fluorescente se selecciona muy preferiblemente del grupo que consiste en proteína fluorescente verde (GFP) y la proteína fluorescente amarilla (YFP), que son ambas bien conocidas por el experto en la materia. Ilustrativamente, dicha molécula fluorescente consiste en la proteína FITC fluoroinformadora, y para el marcaje se puede usar para el kit de marcaje con FITC que está comercializado por Molecular Probes Inc. (U.S.A.).

Según un tercer aspecto preferido, dicha molécula detectable consiste en una molécula luminiscente.

Según esta tercera forma de realización preferida, dicha molécula luminiscente se selecciona muy preferiblemente del grupo que consiste en luciferasa.

Según un cuarto aspecto preferido, dicha molécula detectable consiste en un receptor que es reconocido de forma selectiva por una molécula ligando.

5 Según este cuarto aspecto preferido, dicha molécula detectable consiste en una biotina, muy preferiblemente en forma de un compuesto ligando biotinilado, en cuyo caso la molécula ligando correspondiente consiste en una molécula que contiene una avidina o una estreptavidina, estando dicha molécula ligando (i) marcada radioactivamente, (ii) es fluorescente, o (iii) es luminiscente, de manera que se puede producir la señal física que se detecta para medir el nivel de expresión de la proteína NKp44L por las células T CD4<sup>+</sup>.

10 En la etapa (b) de uno cualquiera de los procedimientos según la invención, la medición de la cantidad del compuesto ligando que está unido a la proteína NKp44L expresada por las células T CD4<sup>+</sup> contenidas en la muestra de ensayo se puede llevar a cabo usando una cualquiera de las diversas técnicas que permiten medir la unión de un compuesto, y especialmente de un compuesto detectable, sobre la superficie membranaria de las células, que ya están disponibles para el experto en la materia.

15 Todavía más preferentemente, la etapa (b) de uno cualquiera de los procedimientos anteriores se lleva a cabo realizando un análisis mediante citometría de flujo de la muestra biológica, usando diversos marcadores detectables, muy preferiblemente diversos marcadores fluorescentes, incluyendo el compuesto ligando detectable que se une específicamente a la proteína NKp44L.

20 En una forma de realización preferida, el análisis mediante citometría de flujo se lleva a cabo con al menos dos marcadores detectables, muy preferiblemente dos marcadores fluorescentes, respectivamente (i) el compuesto ligando detectable que se une específicamente sobre la proteína NKp44L, o sobre la parte del dominio extracelular de la misma, y (ii) un marcador detectable que se une específicamente sobre el antígeno CD4, muy preferiblemente un anticuerpo dirigido al antígeno CD4. Muy preferiblemente, (i) el compuesto ligando detectable se marca fluorescentemente para emitir una señal fluorescente a una primera longitud de onda dada con la excitación apropiada de la luz, y (ii) el marcador detectable que se une al antígeno CD4 se marca fluorescentemente para emitir una señal fluorescente a una segunda longitud de onda dada, distinta de la primera longitud de onda dada, con la excitación apropiada de la luz.

30 Cuando se usa la combinación de dos marcadores detectables anteriores, (i) el número total de células T CD4<sup>+</sup> contenidas en la muestra biológica del ensayo se determina contando, mediante análisis citométrico de flujo bicolor, el número de células que emiten luz a la segunda longitud de onda dada que corresponde al marcador marcado fluorescentemente que se une al antígeno CD4, y (ii) el número de células contenidas en la muestra biológica del ensayo que expresan la proteína NKp44L se determina contando, mediante análisis citométrico de flujo bicolor, el número de células que emiten luz a la primera longitud de onda dada que corresponde al compuesto ligando marcado fluorescentemente que se une específicamente a la proteína NKp44L, de manera que entonces se calcula la relación de células T CD4<sup>+</sup> procedentes de la muestra que expresan la proteína NKp44L.

40 En una primera forma de realización específica del procedimiento de medición anterior mediante análisis citométrico de flujo bicolor, la relación de células T CD4<sup>+</sup> que expresan la proteína NKp44L se determina mediante la detección simultánea de luz emisora a (i) la segunda longitud de onda dada que corresponde al marcador marcado fluorescentemente que se une al antígeno CD4, y a (ii) la primera longitud de onda dada que corresponde al compuesto marcado fluorescentemente que se une a la proteína NKp44L, de manera que entonces se calcula directamente la relación de células T CD4<sup>+</sup> procedentes de la muestra que expresan la proteína NKp44L.

50 En una segunda forma de realización preferida de uno cualquiera de los procedimientos de la presente invención, la etapa (b) de medida de la cantidad de dicho compuesto ligando que está unido a las células T CD4<sup>+</sup> consiste en numerar mediante microscopía, incluyendo microscopía confocal, las células contenidas en dicha muestra biológica sobre las cuales está unido dicho compuesto ligando. Según esta segunda forma de realización preferida, los reactivos para llevar a cabo las medidas son preferiblemente los mismos que aquellos que se describen anteriormente para llevar a cabo el análisis citométrico de flujo.

55 Otro objeto de la invención consiste en un kit para la evaluación *in vitro* del estado de progresión de la infección de un individuo con un virus del VIH, en el que dicho kit comprende:

(i) un compuesto ligando que se une específicamente a la proteína NKp44L de SEC ID N°1, o a la parte del dominio extracelular de la misma, en el que el ligando se selecciona de entre el grupo que consiste en (i) un anticuerpo dirigido a la proteína NKp44L de SEC ID N°1, o sobre la parte del dominio extracelular de la misma, y (ii) la proteína NKp44 de SEC ID N°2, o un polipéptido que comprende la parte del dominio extracelular de la misma;

(ii) una molécula marcadora que se une específicamente al antígeno CD4.

65 El kit como se define anteriormente también se puede usar para, respectivamente:

- (i) la determinación *in vitro* de la relación de células T CD4<sup>+</sup> presentes en una muestra biológica que contiene células sanguíneas recogidas de un paciente infectado con un virus del VIH; y para
- (ii) la determinación *in vitro* de la carga viral del VIH de una muestra biológica que contiene células sanguíneas recogidas de un paciente infectado con un virus del VIH.

En los kits de la invención anteriores, el compuesto ligando comprende las diversas formas de realización de dicho compuesto ligando que se han descrito previamente en la presente memoria descriptiva.

En los kits de la invención anteriores, la molécula marcadora que se une específicamente al antígeno CD4 engloba las diversas formas de realización de dicho compuesto de molécula marcadora que se han descrito previamente en la presente memoria descriptiva.

Todavía más preferentemente, tanto (i) el compuesto ligando como (ii) la molécula marcadora se marcan fluorescentemente de forma diferencial, como ya se ha descrito anteriormente.

Todavía más preferentemente, el compuesto ligando marcado consiste en un anticuerpo monoclonal marcado que se une específicamente a la proteína NKp44L de SEC ID N°1, o a la parte del dominio extracelular de la misma.

Todavía más preferentemente, la molécula del marcador marcado consiste en un anticuerpo monoclonal anti-CD4, tal como el disponible en la American Type Culture Collection con el número de acceso ATTC-CRL-8002.

Como se detallará a continuación, los resultados experimentales obtenidos según la presente invención se extienden al campo terapéutico para el tratamiento de una infección con un virus del VIH, y la presente invención también se refiere así a procedimientos para el cribado de compuestos terapéuticamente activos, a composiciones farmacéuticas, así como a procedimientos para tratar pacientes que están infectados con el VIH.

#### **Procedimientos de cribado, composiciones farmacéuticas y procedimientos de tratamiento de la invención.**

Se ha demostrado según la invención que la citólisis por células NK no dependiente del MHC contra las células T CD4<sup>+</sup> que expresa la proteína NKp44L es bloqueada cuando se evita la unión entre la proteína NKp44L expresada por las células T CD4<sup>+</sup> y la proteína receptora de NKp44 expresada por las células NK activadas.

Más específicamente, se muestra en los ejemplos que la citólisis por células NK no dependiente del MHC contra las células T CD4<sup>+</sup> que expresan la proteína NKp44L está bloqueada cuando se añade un anticuerpo monoclonal dirigido a la proteína NKp44L a una suspensión celular de sangre completa recogida de un paciente infectado con el VIH. Estos resultados experimentales obtenidos significan que la unión del anticuerpo monoclonal anterior a la proteína NKp44L que es expresada en la superficie membranaria de las células T CD4<sup>+</sup> evita el reconocimiento de las células T CD4<sup>+</sup> procedentes del paciente infectado con el VIH por las células NK, a través de la unión específica de la proteína receptora NKp44 a la proteína NKp44L, evitando así eficientemente la citólisis de las células T CD4<sup>+</sup> por dichas células NK que se produciría de otro modo, con lo que se desarrolla la inmunodeficiencia del paciente infectado con el VIH.

De este modo, se muestra según la invención que cualquier compuesto que actúa biológicamente evitando la unión específica de la proteína receptora NKp44 de células NK a la proteína NKp44L de células T CD4<sup>+</sup> es útil como agente terapéutico que inhibe o bloquea la citólisis de células T CD4<sup>+</sup> por las células NK en individuos infectados con un virus del VIH. Más específicamente, cualquier compuesto que evita la unión específica de la proteína receptora NKp44 de las células NK a la proteína NKp44L de células T CD4<sup>+</sup>, ya sea (i) mediante la unión específica a la proteína receptora NKp44 expresada por las células NK o (ii) mediante la unión específica a la proteína NKp44L expresada por las células T CD4<sup>+</sup> del paciente infectado con el VIH, es útil como agente terapéutico que inhibe o bloquea la citólisis de células T CD4<sup>+</sup> por las células NK en individuos infectados con un virus del VIH.

De este modo, según la invención, cualquiera de tal agente o compuesto terapéuticamente útil se puede cribar de forma eficaz por cualquier procedimiento en el que se detecte la unión o la ausencia de unión entre la proteína receptora NKp44 y la proteína NKp44L.

#### **Procedimientos de cribado de la invención.**

De este modo, otro objeto de la presente invención consiste en un procedimiento para el cribado *in vitro* de compuestos para evitar o tratar una enfermedad relacionada con la infección de un individuo con un virus del VIH, en el que dicho procedimiento comprende las etapas de:

- (a) incubar un compuesto candidato que se va a someter a prueba con un sistema de cribado en un disolvente líquido, en el que dicho sistema de cribado comprende:

- (i) una primera pareja que expone al disolvente una pluralidad de moléculas de la proteína NKp44L de SEC

ID N°1, o una pluralidad de moléculas de un polipéptido que comprende la parte del dominio extracelular de la misma;

- 5 (ii) una segunda pareja que expone al disolvente una pluralidad de moléculas de la proteína receptora NKp44 de SEC ID N°2, o una pluralidad de moléculas de un polipéptido que comprende la parte del dominio extracelular de la misma;

10 en el que (iii) la pluralidad de moléculas de la proteína NKp44L de SEC ID N°1, o la pluralidad de moléculas de un polipéptido que comprende la parte del dominio extracelular de la misma, por un lado, y (iv) la pluralidad de moléculas de la proteína receptora NKp44 de SEC ID N°2, o la pluralidad de moléculas de un polipéptido que comprende la parte del dominio extracelular de la misma, por otro lado, son capaces de unirse entre sí;

- 15 (b) cuantificar la unión de (iii) la pluralidad de moléculas de la proteína NKp44L de SEC ID N°1, o la pluralidad de moléculas de un polipéptido que comprende la parte del dominio extracelular de la misma a (iv) la pluralidad de moléculas de la proteína receptora NKp44 de SEC ID N°2, o la pluralidad de moléculas de un polipéptido que comprende la parte del dominio extracelular de la misma;

- 20 (c) comparar la unión que se cuantifica en la etapa (b) con la unión que se cuantifica cuando se lleva a cabo la etapa (a) en ausencia de dicho compuesto candidato;

- 25 (d) seleccionar de forma positiva el compuesto candidato como agente terapéutico cuando dicho compuesto candidato inhibe o bloquea la unión de (iii) la pluralidad de moléculas de la proteína NKp44L de SEC ID N°1, o la pluralidad de moléculas de un polipéptido que comprende la parte del dominio extracelular de la misma a (iv) la pluralidad de moléculas de la proteína receptora NKp44 de SEC ID N°2, o la pluralidad de moléculas de un polipéptido que comprende la parte del dominio extracelular de la misma.

30 En el sistema de cribado anterior, la disolución líquida, en el que dicha disolución líquida también se puede denominar como "disolvente", es preferiblemente una disolución acuosa, incluyendo una disolución acuosa salina, y en el que dicha disolución acuosa salina engloba cualquier medio apropiado para cultivar células, preferiblemente células de mamíferos, y muy preferiblemente células humanas.

35 En el sistema de cribado que se usa cuando se lleva a cabo el procedimiento de cribado anterior, las primera y segunda "parejas" se seleccionan independientemente del grupo que consiste en (i) una pluralidad de moléculas de la proteína NKp44L de SEC ID N°1, o una pluralidad de moléculas de un polipéptido que comprende la parte del dominio extracelular de la misma, o como alternativa, una pluralidad de moléculas de la proteína receptora NKp44 de SEC ID N°2, o una pluralidad de moléculas de un polipéptido que comprende la parte del dominio extracelular de la misma, o (ii) un material sustrato sobre el que está unida una pluralidad de moléculas de la proteína NKp44L de SEC ID N°1, o una pluralidad de moléculas de un polipéptido que comprende la parte del dominio extracelular de la misma, o como alternativa, una pluralidad de moléculas de la proteína receptora NKp44 de SEC ID N°2, o una pluralidad de moléculas de un polipéptido que comprende la parte del dominio extracelular de la misma, en el que dicho material de sustrato engloba células que expresan en su superficie membranaria, de manera expuesta al disolvente, una pluralidad de moléculas de la proteína NKp44L de SEC ID N°1, o una pluralidad de moléculas de un polipéptido que comprende la parte del dominio extracelular de la misma, o como alternativa, una pluralidad de moléculas de la proteína receptora NKp44 de SEC ID N°2, o una pluralidad de moléculas de un polipéptido que comprende la parte del dominio extracelular de la misma.

50 Los compuestos candidatos que se pueden cribar según el procedimiento de cribado anterior pueden ser de cualquier tipo, incluyendo, sin limitarse a, compuestos o moléculas naturales o sintéticos de origen biológico, tales como polipéptidos.

55 En una forma de realización particular del procedimiento de cribado, el compuesto candidato consiste en el producto de expresión de un inserto de ADN contenido en un vector fágico, tal como se describe por Parmley y Smith (1988). Específicamente, se usan librerías de péptidos al azar. Los insertos de ADN al azar codifican péptidos de una longitud de 8 a 20 aminoácidos (Oldenburg *et al.*, 1992; Valadon *et al.*, 1996; Lucas, 1994; Westerink, 1995; Felici *et al.*, 1991). Según esta realización particular, los fagos recombinantes que expresan un polipéptido que se une específicamente (i) a la proteína NKp44L de SEC ID N°1, o a la parte del dominio extracelular de la misma, o (ii) a la proteína receptora NKp44 de SEC ID N°2, o a la parte del dominio extracelular de la misma, es retenido como compuesto candidato para uso en el procedimiento de cribado anterior.

60 Los compuestos candidatos para uso en el procedimiento de cribado anterior también se pueden seleccionar mediante cualquier técnica de cromatografía de inmunoafinidad usando cualquier sustrato cromatográfico sobre el que se han inmovilizado previamente, según técnicas bien conocidas por el experto en la materia, (i) moléculas de la proteína NKp44L de SEC ID N°1, o de un polipéptido que comprende la parte del dominio extracelular de la misma, o (ii) moléculas de la proteína receptora NKp44 de SEC ID N°2, o de un polipéptido que comprende la parte del dominio extracelular de la misma.

En una primera forma de realización preferida del procedimiento de cribado anterior, el sistema de cribado usado en la etapa (a) incluye el uso de un biosensor óptico tal como el descrito por Edwards y Leatherbarrow (1997) o también por Szabo *et al.* (1995). Esta técnica permite la detección de interacciones entre moléculas en tiempo real, sin la necesidad de moléculas marcadas. Esta técnica se basa en el fenómeno de resonancia de plasmones de superficie (SPR). De forma breve, una primera molécula de la pareja proteica, ya sea (i) la proteína NKp44L de SEC ID N°1, o un polipéptido que comprende la parte del dominio extracelular de la misma, o (ii) moléculas de la proteína receptora NKp44 de SEC ID N°2, o un polipéptido que comprende la parte del dominio extracelular de la misma, se une a una superficie (tal como una matriz de carboximetil dextrano). Después, la segunda molécula de la pareja proteica, ya sea (iii) moléculas de la proteína receptora NKp44 de SEC ID N°2, o un polipéptido que comprende la parte del dominio extracelular de la misma, o (iv) la proteína NKp44L de SEC ID N°1, o un polipéptido que comprende la parte del dominio extracelular de la misma, se incuba con dicho sustrato, en presencia o en ausencia del compuesto candidato que se va a someter a prueba, y se detecta la unión, incluyendo el nivel de unión, o la ausencia de unión entre las moléculas de las primera y segunda parejas proteicas. Para este fin, se dirige un haz de luz hacia el lado del área superficial del sustrato que no contiene la muestra que se va a someter a prueba, y se refleja por dicha superficie del sustrato. El fenómeno de SPR provoca una disminución en la intensidad de la luz reflejada con una combinación específica de ángulo y longitud de onda. La unión de las moléculas de las primera y segunda parejas proteicas provoca un cambio en el índice de refracción en la superficie del sustrato, cambio el cual se detecta como un cambio en la señal de SPR.

Según la primera forma de realización preferida del procedimiento de cribado anterior, la “primera pareja” del sistema de cribado consiste en el sustrato sobre el que se inmoviliza la molécula de la primera pareja proteica, y la “segunda pareja” del sistema de cribado consiste en la propia molécula de la segunda pareja proteica.

En una segunda forma de realización preferida del procedimiento de cribado anterior, la “primera pareja” del sistema de cribado consiste en células, ventajosamente células de mamíferos, preferiblemente en células humanas, y muy preferiblemente células NK, que expresan en su superficie membranaria una pluralidad de moléculas de la proteína NKp44L de SEC ID N°1, o una pluralidad de moléculas de un polipéptido que comprende la parte del dominio extracelular de la misma, y la “segunda pareja” del sistema de cribado consiste en células, ventajosamente células de mamíferos, preferiblemente células humanas, y muy preferiblemente células T CD4+, que expresan en su superficie membranaria una pluralidad de moléculas de la proteína receptora NKp44 de SEC ID N°2, o una pluralidad de moléculas de un polipéptido que comprende la parte del dominio extracelular de la misma.

La presente invención también se refiere a un kit para el cribado *in vitro* de compuestos para prevenir o tratar una enfermedad relacionada con la infección de un individuo con un virus del VIH, en el que dicho kit comprende un sistema de cribado que comprende:

- (i) una primera pareja que expone al disolvente una pluralidad de moléculas de la proteína NKp44L de SEC ID N°1, o una pluralidad de moléculas de un polipéptido que comprende la parte del dominio extracelular de la misma,
- (ii) una segunda pareja que expone al disolvente una pluralidad de moléculas de la proteína receptora NKp44 de SEC ID N°2, o una pluralidad de moléculas de un polipéptido que comprende la parte del dominio extracelular de la misma;

en el que (iii) la pluralidad de moléculas de la proteína NKp44L de SEC ID N°1, o la pluralidad de moléculas de un polipéptido que comprende la parte del dominio extracelular de la misma, por un lado, y (iv) la pluralidad de moléculas de la proteína receptora NKp44 de SEC ID N°2, o la pluralidad de moléculas de un polipéptido que comprende la parte del dominio extracelular de la misma, por otro lado, son capaces de unirse entre sí.

En el kit de cribado anterior, las primera y segunda parejas son como se definen anteriormente para el primer procedimiento de cribado anterior.

La presente invención también se refiere a un procedimiento para el cribado *in vitro* de compuestos para prevenir o tratar una enfermedad relacionada con la infección de un individuo con un virus del VIH, en el que dicho procedimiento comprende las etapas de:

- (a) poner en contacto una primera población celular que consiste en células NK activadas humanas y una segunda población celular que consiste en células T CD4<sup>+</sup> humanas que expresan la proteína NKp44L, en presencia de un compuesto terapéutico candidato a ensayar;
- (b) medir la citólisis de las células T CD4+ por las células NK activadas;
- (c) comparar el valor de citólisis obtenido en la etapa (b) con el valor de citólisis obtenido cuando la etapa (a) se lleva a cabo en ausencia del compuesto candidato;

- (d) seleccionar los compuestos candidatos que inhiben o bloquean la citólisis de las células T CD4<sup>+</sup> mediada por NK.

5 El segundo procedimiento de cribado anterior, a pesar de que consiste en un procedimiento *in vitro*, tiene la ventaja técnica de reflejar directamente el potencial terapéutico del compuesto candidato al poner directamente en evidencia la actividad biológica de dicho compuesto candidato, con respecto a la prevención de la citólisis de células T CD4<sup>+</sup> por las células NK activadas.

10 Las células NK activadas pueden consistir en células de una estirpe de células NK, tal como la estirpe de células NK92 descrita por Gong *et al.* (1994), o pueden consistir en un cultivo primario de células NK purificadas humanas normales.

15 Las células T CD4<sup>+</sup> que expresan la proteína NKp44L pueden consistir en células T CD4<sup>+</sup>, eventualmente en forma de una estirpe celular, que se han transfectado con un vector que permite la expresión de la proteína NKp44L por dichas células, o pueden consistir en células T CD4<sup>+</sup> que se purificaron inicialmente a partir de una muestra de sangre de un paciente infectado con el VIH.

20 En una forma de realización específica del segundo procedimiento de cribado anterior, las células NK activadas y las células T CD4<sup>+</sup> son autólogas, por cuanto ambas proceden del mismo paciente infectado con el VIH.

25 Preferiblemente, la medida de la citólisis consiste en la técnica convencional en la que las células T CD4<sup>+</sup>, que son las células diana, se hacen inicialmente radioactivas con <sup>51</sup>Cr, y en la que el valor de citólisis consiste en el porcentaje de lisis celular, según se mide por la cantidad de <sup>51</sup>Cr que se libera en el medio de cultivo celular por las células T CD4<sup>+</sup> lisadas.

Muy preferiblemente, el valor de citólisis se obtiene evaluando la actividad citolítica de las células NK a relaciones crecientes de efectoras (células NK) a diana (célula T CD4<sup>+</sup>), por ejemplo relaciones de células efectoras:diana de 1:1 a 50:1.

30 Los compuestos candidatos que se pueden ensayar según el segundo procedimiento de cribado anterior son los mismos que aquellos que se pueden someter a ensayo según el primer procedimiento de cribado que se describió previamente en la presente memoria descriptiva.

### 35 **Composiciones farmacéuticas y procedimientos de tratamiento de la invención.**

La invención describe una composición farmacéutica para prevenir o tratar una enfermedad relacionada con la infección de un individuo con un virus de la familia del VIH, que comprende una cantidad eficaz de un compuesto ligando que se selecciona de entre el grupo que consiste en (i) un compuesto ligando que se une específicamente a la proteína NKp44L de SEC ID N°1, o a la parte del dominio extracelular de la misma, y (ii) un compuesto ligando que se une específicamente a la proteína NKp44 de SEC ID N°2, o a la parte del dominio extracelular de la misma, en combinación con al menos un excipiente fisiológicamente aceptable.

45 En una primera forma de realización preferida de la composición farmacéutica anterior, dicho compuesto ligando consiste en un anticuerpo dirigido a la proteína NKp44L de SEC ID N°1, o en un anticuerpo dirigido a la parte del dominio extracelular de la misma.

En una segunda forma de realización preferida de la composición farmacéutica anterior, dicho compuesto ligando consiste en la proteína NKp44 de SEC ID N°2, o un polipéptido que comprende el dominio extracelular de la misma.

50 En una tercera forma de realización preferida de la composición farmacéutica anterior, dicho compuesto ligando consiste en un anticuerpo dirigido a la proteína NKp44 de SEC ID N°2, o en un anticuerpo dirigido a la parte del dominio extracelular de la misma.

55 Por "excipiente o vehículo fisiológicamente aceptable" se hace referencia a carga sólida o líquida, diluyente o sustancia que se puede usar de forma segura en la administración sistémica o tópica. Dependiendo de la vía particular de administración, una variedad de vehículos farmacéuticamente aceptables bien conocidos en la técnica incluye cargas sólidas o líquidas, diluyentes, hidrótrofos, agentes tensioactivos, y sustancias encapsulantes. La cantidad de vehículo empleada juntamente con fragmentos F(ab).sub.2 proporciona una cantidad práctica de material por dosis unitaria de composición.

60 Los vehículos farmacéuticamente aceptables para la administración sistémica que se pueden incorporar en la composición de la invención incluyen azúcares, almidones, celulosa, aceites vegetales, tampones, polioles y ácido alginico. Los vehículos específicos farmacéuticamente aceptables se describen en los siguientes documentos, incorporados en su totalidad en la presente memoria como referencia: patente US n° 4.401.663, Buckwalter *et al.*, presentada el 30 de agosto de 1983; solicitud de patente europea n° 089710, LaHann *et al.*, publicada el 28 de septiembre de 1983; y solicitud de patente europea n° 0068592, Buckwalter *et al.*, publicada el 5 de enero de 1983.

65

Los vehículos preferidos para la administración parenteral incluyen propilenglicol, pirrolidona, oleato de etilo, etanol acuoso, y sus combinaciones.

5 Los vehículos representativos incluyen goma arábica, agar, alginatos, hidroxialquilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, carboximetilcelulosa, carboximetilcelulosa sódica, carrageenano, celulosa en polvo, goma guar, colesterol, gelatina, goma agar, goma arábica, goma de karaya, goma de ghatti, goma de algarrobilla, octoxinol 9, alcohol oleílico, pectina, poli(ácido acrílico) y sus homólogos, polietilenglicol, polialcohol vinílico, poliacrilamida, laurilsulfato de sodio, poli(óxido de etileno), polivinilpirrolidona, monoestearato de glicol, monoestearato de propilenglicol, goma de xantana, tragacanto, ésteres de sorbitán, alcohol estearílico, almidón y sus modificaciones.  
10 Los intervalos adecuados varían desde aproximadamente 0,5% hasta aproximadamente 1%.

Para formular una composición farmacéutica según la invención, el experto en la materia se referirá ventajosamente a la última edición de la European Pharmacopoeia o de la United States Pharmacopoeia.

15 Preferiblemente, el experto en la materia se referirá a la cuarta edición "2002" de la European Pharmacopoeia, o también a la edición USP 25-NF20 de la United States Pharmacopoeia.

20 La cantidad en peso del compuesto terapéuticamente activo que está contenida en cada dosis de la composición farmacéutica de la invención dependerá del peso molecular de dicho compuesto terapéuticamente activo, así como de la cantidad en peso que sea eficaz bloqueando la citólisis de las células T CD4+ por las células NK en un paciente infectado con el VIH.

25 Para determinar la cantidad apropiada del compuesto terapéuticamente activo, en una dosis de una composición farmacéutica de la invención, el experto en la materia determina en primer lugar la capacidad inhibidora *in vitro* de la citólisis de las células T CD4+ de diversas cantidades en peso o concentraciones de dicho compuesto terapéuticamente activo, por ejemplo llevando a cabo las mismas etapas (a) y (b) como en el segundo procedimiento de cribado de la invención que se ha descrito aquí previamente, y después retiene o selecciona la cantidad o concentración dada de dicho compuesto terapéuticamente activo que bloquea la citólisis. Después, el experto en la materia transpone dicha cantidad o concentración retenida o seleccionada a la situación humana *in vivo*, de manera  
30 que la concentración de dicho compuesto terapéuticamente activo en la sangre de un paciente al que se le ha administrado la composición farmacéutica de la invención sea idéntica a la concentración que bloquea la citólisis *in vitro*.

35 La presente invención también describe la utilización de un compuesto ligando que se selecciona de entre el grupo que consiste en (i) un compuesto ligando que se une específicamente a la proteína NKp44L de SEC ID N°1, o a la parte del dominio extracelular de la misma, y (ii) un compuesto ligando que se une específicamente a la proteína NKp44 de SEC ID N°2, o a la parte del dominio extracelular de la misma, para preparar una composición farmacéutica para prevenir o tratar una enfermedad relacionada con la infección de un individuo con un virus de la familia del VIH.

40 La presente invención también describe un procedimiento para prevenir o para tratar una enfermedad relacionada con la infección de un individuo con un virus de la familia del VIH, en el que dicho procedimiento comprende la etapa de administrar a un paciente que necesite de tal tratamiento una cantidad eficaz de un compuesto ligando que se selecciona de entre el grupo que consiste en (i) un compuesto ligando que se une específicamente a la proteína NKp44L de SEC ID N°1, o a la parte del dominio extracelular de la misma, y (ii) un compuesto ligando que se une específicamente a la proteína NKp44 de SEC ID N°2, o a la parte del dominio extracelular de la misma.  
45

Otro objeto de la invención consiste en una composición farmacéutica para prevenir o para tratar una enfermedad relacionada con la infección de un individuo con un virus de la familia del VIH, que comprende una cantidad eficaz de un polinucleótido antisentido que se hibrida específicamente con las moléculas de ARNm que codifican la proteína NKp44I de SEC ID N°1, en combinación con al menos un excipiente fisiológicamente aceptable.  
50

Preferiblemente, dicho polinucleótido antisentido se obtiene clonando, en la orientación antisentido, el fragmento de NKp44L de SEC ID N°3, partiendo de la posición 1 y terminando en la posición 902 de SEC ID N°3.  
55

De este modo, un polinucleótido antisentido preferido consiste en el ácido nucleico que es complementario al ácido nucleico que comienza en el nucleótido n°1 y que termina en el nucleótido n°902 de la secuencia nucleotídica SEC ID N°3.

60 Esta invención también se refiere al uso de un polinucleótido antisentido que se hibrida específicamente con las moléculas de ARNm que codifican la proteína NKp44I de SEC ID N°1, para preparar una composición farmacéutica para prevenir o tratar una enfermedad relacionada con la infección de un individuo con un virus de la familia del VIH.

65 Un objeto adicional de la invención consiste en un procedimiento para prevenir o para tratar una enfermedad relacionada con la infección de un individuo con un virus de la familia del VIH, en el que dicho procedimiento comprende la etapa de administrar a un paciente que necesite de tal tratamiento una cantidad eficaz de un

polinucleótido antisentido que se hibrida específicamente con las moléculas de ARNm que codifican la proteína NKp44L de SEC ID N°1.

#### Otras composiciones y procedimientos de cribado de la invención

5 Se ha descubierto sorprendentemente que un polipéptido específico, derivado de la proteína gp41 del VIH, potencia notablemente la expresión de la proteína NKp44L sobre la superficie de células T CD4<sup>+</sup> (ejemplo 6-8, más abajo).

10 También se ha determinado según la presente invención que la lisis de las células T CD4<sup>+</sup> procedentes de pacientes infectados con VIH por células NK está directamente relacionada con la unión de dicho polipéptido específico sobre las células T CD4<sup>+</sup>, con el aumento simultáneo de la expresión de NKp44L en su superficie celular.

La invención también describe a un polipéptido que comprende la siguiente secuencia de aminoácidos:

15  $X_1X_2X_3X_4X_5X_6SWSNKSX_7X_8X_9X_{10}X_{11}$  (I),

en la que  $X_1$ ,  $X_2$ ,  $X_3$ ,  $X_5$ ,  $X_6$ ,  $X_7$ ,  $X_9$ ,  $X_{10}$ , y  $X_{11}$  significan, independientemente entre sí, cualquier resto de aminoácido,  $X_4$  significa cualquier resto de aminoácido excepto A y W, y en la que  $X_8$  significa cualquier resto de aminoácido excepto E y S.

20 La invención comprende además polipéptidos que comprenden la siguiente secuencia de aminoácidos:

PWASNASWSNKSLDDIW (II).

25 Un polipéptido, como se define anteriormente, deriva preferiblemente de la proteína gp41, y posee al menos 39, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140 ó 150 aminoácidos consecutivos de la proteína gp41 del VIH-1, y comprende la secuencia de aminoácidos de fórmula (I) anterior.

30 El polipéptido de fórmula (I) se puede producir mediante técnicas de ADN recombinante, por ejemplo sobre la base de la secuencia de ADN de la proteína gp41 del VIH1, o mediante síntesis química usando técnicas de síntesis de péptidos estándares.

Preferiblemente, un polipéptido de fórmula (I) consiste en la siguiente secuencia de aminoácidos:  
35 PWASNASWSNKSLDDIW (II).

La inducción de la expresión de NKp44L en la superficie de células T CD4<sup>+</sup> inducida por el polipéptido de la secuencia de aminoácidos (II) se ilustra en los ejemplos 6-8 a continuación.

40 La elevada cinética de la inducción de la expresión de NKp44L en la superficie celular es compatible con la inducción de una translocación de una proteína intracelular NKp44L previamente sintetizada, desde el citoplasma hacia la superficie celular.

La invención también describe un primer procedimiento para el cribado *in vitro* de compuestos para prevenir o tratar una enfermedad relacionada con la infección de un individuo con un virus del VIH, que comprende las etapas de:

45 (i) incubar un compuesto candidato que se va a someter a prueba con un polipéptido de fórmula (I),

(ii) evaluar la unión del compuesto candidato que se va a someter a prueba con el polipéptido de fórmula (I).

50 La unión del compuesto candidato al polipéptido de fórmula (I) se puede llevar a cabo por el experto en la materia, por ejemplo usando un sistema de dos híbridos. Se pueden usar otros medios, conocidos por el experto en la materia, para los ensayos de unión, tales como el uso de técnicas de bio sensor (Edwards y Leatherbarrow (1997) o también por Szabo *et al.* (1995)), cromatografía de afinidad, o cribado de alto rendimiento (HTS), (Leblanc *et al* 2002).

55 Los compuestos candidatos, que se pueden cribar según el procedimiento de cribado anterior, pueden ser de cualquier tipo, incluyendo, pero sin limitarse a, compuestos o moléculas naturales o sintéticos de origen biológico, tales como polipéptidos.

60 Preferiblemente, la etapa (ii) consiste en someter a un ensayo de migración en gel a la mezcla obtenida al final de la etapa (i), y detectar los complejos formados entre el compuesto candidato y el polipéptido de fórmula (I).

El ensayo de migración en gel se puede llevar a cabo como es conocido por el experto en la materia.

65 La detección de los complejos formados entre el compuesto candidato y el polipéptido según la invención se puede observar fácilmente determinando la posición de la mancha (bandas proteicas) que corresponde a las proteínas

analizadas, ya que el peso molecular aparente de una proteína cambia si es parte de un complejo con otra proteína.

Por otro lado, las manchas (bandas proteicas) que corresponden a las proteínas presentadas al ensayo de migración en gel se pueden detectar mediante anticuerpos específicos, por ejemplo anticuerpos dirigidos específicamente contra un polipéptido de fórmula (I). Por otro lado, un polipéptido de fórmula (I) se puede etiquetar para una detección más fácil de la proteína/compuesto candidato en el gel. Por ejemplo, el polipéptido según la invención se puede fusionar a GST, HA, una cadena de poli-histidina, o a otras moléculas detectables, a fin de facilitar la identificación de las diferentes proteínas en el gel.

La invención describe además un segundo procedimiento para el cribado *in vitro* de compuestos para prevenir o tratar una enfermedad relacionada con la infección de un individuo con un virus del VIH, que comprende las etapas de:

a)

(i) poner en contacto un primer cultivo de células T CD4+ con un compuesto candidato, y virus del VIH;

(ii) poner en contacto un segundo cultivo de células T CD4+ con el virus del VIH, en ausencia de dicho compuesto candidato; y

b) detectar la presencia de NKp44L en la superficie de las células T CD4+ proveniente del cultivo (i) y (ii).

La detección de la presencia de NKp44L en la superficie de las células T CD4+ se puede llevar a cabo como se conoce por el experto en la materia, por ejemplo mediante análisis citofluorométrico como se describe en la parte Material y Métodos, que corresponde al ejemplo 6.

Preferiblemente, el procedimiento descrito anteriormente comprende una etapa (c) adicional que consiste en seleccionar positivamente el compuesto candidato como agente terapéutico cuando el nivel de expresión de NKp44L en la superficie de las células T CD4+ proveniente del cultivo (ii) es mayor que el nivel de expresión de NKp44L en la superficie de células T CD4+ proveniente del cultivo (i).

La comparación del nivel de expresión de NKp44L en la superficie de las células T CD4+ se puede evaluar contando el número de células T CD4+ que expresan NKp44L sobre su superficie, usando un clasificador celular activado por fluorescencia (FACS), como se describe en la sección correspondiente de Material y Métodos.

Alternativamente, la detección de la presencia de NKp44L en la superficie de las células T CD4+ se puede llevar a cabo indirectamente, midiendo la actividad de lisis de células T CD4+ por células NK, como se describe en la sección Material y Métodos, que corresponde al ejemplo 7.

Esta forma de realización particular de la etapa (b) del procedimiento de cribado anterior, a pesar de que consiste en un procedimiento *in vitro*, tiene la ventaja técnica de reflejar directamente el potencial terapéutico del compuesto candidato al poner directamente en evidencia la actividad biológica de dicho compuesto candidato, en cuanto a prevenir la citólisis de células T CD4+ por las células NK activadas.

Las células NK activadas pueden consistir en células de una estirpe de células NK, tal como la estirpe celular NK92 descrita por Gong *et al.* (1994), o pueden consistir en un cultivo primario de células NK purificadas humanas normales.

Las células T CD4<sup>+</sup> que expresan la proteína NKp44L pueden consistir en células T CD4<sup>+</sup>, eventualmente en forma de una estirpe celular, que se ha transfectado con un vector que permite la expresión por dichas células de la proteína NKp44L, o pueden consistir en células T CD4<sup>+</sup> que se purificaron inicialmente a partir de una muestra de sangre de un paciente infectado con el VIH.

En una realización específica del procedimiento de cribado anterior, las células NK activadas y las células T CD4<sup>+</sup> son autólogas por cuanto ambas proceden del mismo paciente infectado con el VIH.

Preferiblemente, la medición de la citólisis consiste en la técnica convencional en la que las células T CD4<sup>+</sup> que son las células diana, se hacen inicialmente radioactivas con <sup>51</sup>Cr, y en la que el valor de citólisis consiste en el porcentaje de lisis celular, según se mide por la cantidad de <sup>51</sup>Cr que es liberada en el medio de cultivo celular por las células T CD4<sup>+</sup> lisadas.

Todavía más preferentemente, el valor de citólisis se obtiene evaluando la actividad citolítica de las células NK a relaciones crecientes de células efectoras (células NK) a células diana (célula T CD4<sup>+</sup>), por ejemplo relaciones de células efectoras:diana de 1:1 a 50:1.

Los compuestos candidatos para uso en los procedimientos de cribado descritos anteriormente se pueden

seleccionar entre los compuestos candidatos que se unen a uno o varios polipéptidos de fórmula (I).

En consecuencia, la invención también describe un procedimiento para el cribado *in vitro* de compuestos para prevenir o tratar una enfermedad relacionada con la infección de un individuo con un virus del VIH, que comprende las etapas de:

(i) someter a un compuesto candidato al primer procedimiento de cribado anterior, y

(ii) someter a un compuesto candidato seleccionado positivamente en la etapa (i) al segundo procedimiento de cribado descrito inmediatamente antes.

La invención describe una composición farmacéutica para prevenir o tratar una enfermedad relacionada con la infección de un individuo con un virus de la familia del VIH, que comprende una cantidad eficaz de un compuesto ligando que se une específicamente al polipéptido de fórmula (I), en combinación con al menos un excipiente fisiológicamente aceptable.

Preferiblemente, los excipientes fisiológicamente aceptables usados para llevar a cabo la composición farmacéutica descrita anteriormente son los mismos que aquellos que se describen en la primera parte de la memoria descriptiva que se refiere a ligandos de NKp44L.

Para formular una composición farmacéutica según la presente invención, el experto en la materia se referirá ventajosamente a la última edición de la European Pharmacopoeia o de la United States Pharmacopoeia.

Para determinar la cantidad apropiada del compuesto terapéuticamente activo, en una dosis de una composición farmacéutica de la invención, el experto en la materia determina en primer lugar la actividad inhibidora *in vitro* de la citólisis de las células T CD4<sup>+</sup> de diversas cantidades en peso o concentraciones de dicho compuesto terapéuticamente activo, por ejemplo llevando a cabo el procedimiento de cribado de la invención que se ha descrito anteriormente, y después retiene o selecciona la cantidad o concentración dada de dicho compuesto terapéuticamente activo que bloquea la citólisis.

Después, el experto en la materia transpone dicha cantidad o concentración retenida o seleccionada a la situación humana *in vivo*, de manera que la concentración de dicho compuesto terapéuticamente activo en la sangre de un paciente al que se ha administrado la composición farmacéutica de la invención es idéntica a la concentración que bloquea la citólisis *in vitro*.

Preferiblemente, el compuesto ligando consiste en un anticuerpo dirigido al polipéptido según la invención.

Preferiblemente, el compuesto ligando, o la composición farmacéutica que lo contiene, se puede combinar con un compuesto que inhibe la fusión membránica entre VIH y células T CD4+. Tales compuestos son, por ejemplo, péptidos derivados de la región HR1 o HR2 de la proteína gp41, y más precisamente péptidos denominados T20, T21 o aquellos descritos en la solicitud de patente US 6.623.741.

La invención también describe la utilización de un compuesto ligando que se une específicamente al polipéptido de fórmula (I), para preparar una composición farmacéutica para prevenir o tratar una enfermedad relacionada con la infección de un individuo con un virus de la familia del VIH.

Adicionalmente, se ha demostrado que la proteína NKp44L es expresada sobre la superficie de células tumorales, tales como células Jurkat y células K562.

También se ha demostrado que un polipéptido de fórmula (I) induce la expresión en la superficie celular de NKp44L por células tumorales, que hace entonces a estas células tumorales tratadas con el polipéptido susceptibles a la lisis específica por las células NK.

En consecuencia, la invención describe procedimientos y composiciones farmacéuticas que comprenden un polipéptido de fórmula (I) para tratar cáncer.

La invención describe una composición farmacéutica para tratar un cáncer, que comprende una cantidad eficaz de un polipéptido de fórmula (I), en combinación con al menos un excipiente fisiológicamente aceptable.

Preferiblemente, los excipientes fisiológicamente aceptables usados para llevar a cabo la composición farmacéutica descrita anteriormente son los mismos que aquellos que se describen en la primera parte de la memoria descriptiva referida a los ligandos de NKp44L.

De forma similar, para formular una composición farmacéutica según la presente invención, el experto en la materia se referirá a la primera parte de la memoria descriptiva que se refiere a ligandos de NKp44L.

La invención también describe una composición farmacéutica para tratar cáncer, que comprende una cantidad eficaz de un polipéptido de fórmula (I) fusionado a células cancerosas diana, en combinación con al menos un excipiente fisiológicamente aceptable.

5 Preferiblemente, dicho compuesto, que selecciona células cancerosas, consiste en un anticuerpo dirigido a un antígeno específico del cáncer, tal como SCP-1, NY-ESO-1, o SSX-2 específico de cáncer de mama, SSX-2, NY-ESO-1, o MAGE-3 específico de melanoma, descrito en la patente US nº 6.338.947; o antígenos específicos para cánceres renales, tales como los descritos en la patente US nº 6.440.663; KH-1 y N3 específico de cáncer de colon, descrito en la patente US nº 6.238.668.

10

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos no limitativos de la misma.

## Ejemplos

### 15 A. Materiales y procedimientos de los ejemplos 1-5

#### A.1 Donantes infectados con el VIH-1.

20 Se obtuvieron muestras de sangre de 25 pacientes infectados con el VIH-1 a partir de donantes que dan su consentimiento en Hôpital Pitié-Salpêtrière. Los exámenes bioclínicos incluyen determinaciones habituales de la carga viral, recuentos de sangre total y de linfocitos T CD4<sup>+</sup>.

Como grupo de control, se obtuvieron muestras de sangre de 20 donantes no infectados mediante leucaféresis a partir del banco de sangre (Hôpital Pitié-Salpêtrière).

25

#### A.2 Análisis citofluorométrico

30 Se llevó a cabo un análisis FACS tricolor sobre PBMC recientemente recogida. La inmunoglobulina de isotipo emparejado sirvió como el control negativo (BD). Las células se incubaron 1 h a 4°C, con el cóctel apropiado de anticuerpos. mAb anti-CD3; anti-CD4; anti-CD8, anti-CD56, anti-NKp44, anti-NKp46 o anti-NKp44L. Los eritrocitos se lisaron usando la disolución de lisis de FACS (BD). Se analizó un mínimo de 20.000 leucocitos en un FACScan, como se describió previamente.

35 Para medir la expresión de los marcadores de activación de la superficie celular, las PBMC se tiñeron con anti-HLA-DR, anti-CD69, anti-CD25, o anti-CD71 (todos ellos de BD) conjugados con PE o con FITC, y se analizaron mediante FACS.

#### A.3 Purificación de células T CD4<sup>+</sup> que expresan NKp44L

40 Se llevó a cabo una clasificación de un subconjunto de células T CD4<sup>+</sup> usando el kit de enriquecimiento RosetteSepCD4<sup>+</sup> (StemCell). Las células T CD4<sup>+</sup> que expresan NKp44L se seleccionaron positivamente mediante una separación magnética de dos etapas, las células T CD4<sup>+</sup> se incubaron con 10 g/ml de anti-NKp44L durante 1 h a RT, seguido del tratamiento con Dynabeads revestidas con anti-IgM de ratón de cabra (Dyna), a una relación de perlas-células de 10:1, durante 30 min. a RT. La pureza de la fracción celular se determinó mediante análisis FACS.

45

#### A.4. Aislamiento de células NK primarias y ensayos de citotoxicidad por células NK

50 Se generaron estirpes de células NK a partir de PBMC, y después se purificaron usando el sistema de separación celular StemSep y el cóctel de anticuerpos de enriquecimiento de células NK (StemCell technologies). Se cultivaron células NK purificadas en medio MyeloCult H5100 (StemCell technologies) suplementado con 100 unidades de rhIL-2 (Boehringer). La pureza de estas preparaciones se evaluó mediante citometría de flujo tras teñir con mAbs anti-CD3 (BD), anti-CD56 (BD), anti-NKp44, y anti-NKp46.

55 La actividad citolítica se evaluó en un ensayo de liberación de <sup>51</sup>Cr durante 4 h como se describió anteriormente. De forma breve, las células diana se marcaron durante 2 h a 37°C con 100 µCi por 10<sup>6</sup> células de Na<sup>51</sup>Cr (Amersham), y se lavaron dos veces con medio de cultivo. Las células diana se distribuyeron entonces en placas de microtitulación de 96 pocillos de fondo redondo (4 x 10<sup>3</sup> células por pocillo), y se añadieron las células efectoras a varias relaciones E/T. Las placas se incubaron 4 h a 37°C. El sobrenadante se recogió entonces y se midió la liberación de <sup>51</sup>Cr en un contador gamma. En los experimentos en los que se incluyeron Abs, éstos se añadieron hasta una concentración final de 20 µg/ml. La liberación de <sup>51</sup>Cr específica relativa se calculó según procedimientos convencionales. Los valores para la liberación espontánea de <sup>51</sup>Cr, que se deducen en el cálculo, estaban entre 10 y 20% de la radioactividad incorporada total. Los resultados se presentan tras restar la lisis no específica obtenida con dianas de control. Cada punto representa el promedio de valores por triplicado. El intervalo de los triplicados estuvo siempre dentro del 5% de su media.

60

A.5 Análisis estadístico

Se llevaron a cabo análisis de correlación usando el análisis de correlación de rangos no paramétrico de Spearman. Todos los cálculos se llevaron a cabo usando el GraphPad Prism.

5

**B. Materiales y procedimientos de los ejemplos 6-10**B.1 Purificación de células T CD4+

10 Se llevó a cabo una clasificación de un subconjunto de células T CD4<sup>+</sup> usando el kit de enriquecimiento RosetteSepCD4<sup>+</sup> (StemCell). La pureza de la fracción celular se determinó mediante análisis FACS.

B.2 Análisis citofluorométrico

15 Se llevó a cabo un análisis FACS bicolor sobre células T CD4<sup>+</sup> purificadas. La inmunoglobulina de isotipo emparejado sirvió como el control negativo (BD). Las células se incubaron 1 h a 4°C, con el cóctel apropiado de anticuerpos. mAb anti-CD4 o anti-NKp44L. Se analizó un mínimo de 20.000 células T CD4<sup>+</sup> en un FACScan, como se describe previamente. La expresión intracelular de NKp44L se llevó a cabo como se describió previamente; de forma breve, las células se incubaron en tampón de PFA al 4% durante 20 min., después se lavaron y se tiñeron en presencia de tampón de 0,1% de saponina/PBS/1% de BSA a 4°C. Las células se analizaron entonces mediante FACS.

20

B.3 Aislamiento de células NK primarias y ensayos de citotoxicidad por las células NK.

25 Se generaron estirpes de células NK a partir de PBMC, y después se purificaron usando el sistema de separación celular StemSep y el cóctel de anticuerpos de enriquecimiento de células NK (StemCell technologies). Se cultivaron células NK purificadas en medio MyeloCult H5100 (StemCell technologies) suplementado con 100 unidades de rhIL-2 (Boehringer). La pureza de estas preparaciones se evaluó mediante citometría de flujo tras teñir con mAbs anti-CD3 (BD), anti-CD56 (BD), anti-NKp44, y anti-NKp46.

30

La actividad citolítica se evaluó en un ensayo de liberación de <sup>51</sup>Cr durante 4 h como se describió previamente. De forma breve, las células diana se marcaron durante 2 h a 37°C con 100 µCi por 10<sup>6</sup> células de Na<sup>51</sup>Cr (Amersham), y se lavaron dos veces con medio de cultivo. Las células diana se distribuyeron entonces en placas de microtitulación de 96 pocillos de fondo redondo (4 x 10<sup>3</sup> células por pocillo), y se añadieron las células efectoras a varias relaciones E/T. Las placas se incubaron 4 h a 37°C. El sobrenadante se recogió entonces y se midió la liberación de <sup>51</sup>Cr en un contador gamma. En los experimentos en los que se incluyeron Abs, estos se añadieron hasta una concentración final de 20 µg/ml. La liberación de <sup>51</sup>Cr específica relativa se calculó según como se describe previamente. Los valores para la liberación espontánea de <sup>51</sup>Cr, que se deducen en el cálculo, estaban entre 10 y 20% de la radioactividad incorporada total. Los resultados se presentan tras restar la lisis no específica obtenida con dianas de control. Cada punto representa el promedio de valores por triplicado. El intervalo de los triplicados estuvo siempre dentro del 5% de su media.

35

40

B.4 Expresión de la proteína del VIH-1 por el virus de la vacuna recombinante

45 Como células diana, se usaron células T CD4<sup>+</sup> purificadas infectadas con virus de la vacuna de tipo salvaje (WT) o con los diversos virus de la vacuna recombinantes, a una multiplicidad de infección de 20 PFU/célula. Los virus de la vacuna recombinantes para las proteínas HIV-1-LAI Gag, Pol, Env, Nef, Tat y Vif se proporcionaron por Transgène (Estrasburgo, Francia).

B.5 Péptidos y conjuntos de péptidos.

Los péptidos 15-meros sintéticos se adquirieron de Epytop (Nîmes, Francia), o se proporcionaron amablemente por la Agence Nationale de la Recherche sur le SIDA. Todos fueron más del 80% puros, según se muestra mediante los perfiles de HPLC. Los conjuntos de péptidos incluyeron alrededor de 10 péptidos diferentes, y cada péptido solapa al péptido continuo previo durante 11 restos.

55

**C. Resultados****Ejemplo 1: Vectores de NKp44L de longitud completa y antisentido, y producción de transfectantes estables.**

60

El vector de longitud completa (pEF6-NKp44L) se obtuvo subclonando secuencialmente en el vector pEF6 (Invitrogen) tres fragmentos solapantes de RT-PCR de NKp44L, previamente clonados en el vector PCR-zero-blunt (Invitrogen); fragmento A: 1 (numerado desde el sitio de traducción de ATG; nucleótidos 1-3) hasta 902; fragmento B: 813 hasta 2066; y fragmento C: 1983 hasta 3507 (que contiene el sitio de traducción de TGA de parada). La integridad de la secuencia de longitud completa se confirmó mediante secuenciación y ensayo de transcripción/traducción *in vitro* según las instrucciones del fabricante (kit STP3, Novagen).

65

El vector de ARN antisentido de NKp44L (pEF6-NKp44L-AS5) se obtuvo clonando el vector pEF6, fragmento A, descrito anteriormente, en la orientación antisentido. La orientación y la integridad de la secuencia se confirmaron mediante secuenciación. Se transfectaron de forma estable diez millones de células 721.221 con el vector pEF6-NKp44L-AS5 mediante electroporación (230 V, 250  $\mu$ F), y se seleccionaron en placas de 24 pocillos en presencia de 10  $\mu$ g/ml de blasticidina (Invitrogen). La expresión del constructo pEF6-NKp44L-AS5 en células 721.221 se confirmó mediante análisis de RT-PCR.

### Ejemplo 2: Preparación de anticuerpos monoclonales.

Los mAbs Anti-receptor de NKp44 (44/8, IgG1) y anti-NKp44L (7.1, 7.7 y 7.13) se produjeron en ratones BALB/c, inmunizados tres veces con NKp44-Ig, o con proteínas recombinantes NKp44L-(His)6Tag, respectivamente, usando el kit de clonación de hibridomas Clona-Cell-HY, según las instrucciones del fabricante (StemCell Technologies Inc.). Los anticuerpos se seleccionaron mediante ELISA basándose en la reactividad con las proteínas recombinantes, usando el reactivo de cribado de hibridomas anti-ratón-peroxidasa (Roche), así como análisis FACS. La proteína recombinante NKp44L-(His)6Tag se produjo en células COS-7. El vector de expresión de mamífero (pcDNA3/V5-HIS-tag; Invitrogen) codificó una cadena de seis restos de histidina que contenía un fragmento de NKp44L que codifica los 169 aminoácidos C-terminales, obtenido mediante el sistema de dos híbridos de levadura. La proteína NKp44L recombinante se purificó usando una columna de afinidad de níquel en condición nativa (sistema Xpress de purificación de proteínas, Invitrogen). Se obtuvieron varios mAbs anti-NKp44L: 7.1 (IgM), que es eficaz para la detección mediante análisis FACS, y 7.7 (IgM) y 7.13 (IgM) fueron capaces de inmunoprecipitación, inmunotransferencia e inmunotinción. mAb Anti-NKp44 (44/8) se purificó en una columna de proteína G Poros G20 AL en la High Pressure Perfusion Chromatography Station, como se describe anteriormente (Malik y Strominger, 1999), y los mAbs anti-NKp44L IgM se purificaron en una columna de proteína de unión a manano (MBP) (Pierce), tras la precipitación con sulfato de amonio (disolución saturada al 50%). La pureza de los mAbs purificados se confirmó en SDS PAGE.

### Ejemplo 3: La expresión de NKp44L en células T CD4<sup>+</sup> procedentes de individuos infectados con el VIH está asociada con la etapa de la enfermedad.

La figura 1A) muestra la expresión específica de NKp44L en células T CD4<sup>+</sup> en pacientes infectados con el VIH-1. Comparación entre grupos no infectados (control, símbolos blancos) e infectados con el VIH (símbolos en negro). Las líneas horizontales marcan el valor medio.

La figura 1B) muestra la correlación inversa de la expresión de NKp44L en células T CD4<sup>+</sup> con recuento de células CD4 de sangre periférica en pacientes infectados con el VIH. Se muestra la correlación (r) y esta significancia estadística (P) usando el ensayo de correlación de rangos no paramétrico.

La figura 1C) muestra la correlación entre la expresión de NKp44L en células T CD4<sup>+</sup> y la carga viral. Se muestra la correlación (r) y esta significancia estadística (P) obtenida usando el ensayo de correlación de rangos no paramétrico de Spearman.

La figura 1D) muestra la sobreexpresión de NKp44L en células T CD4<sup>+</sup> procedentes de individuos infectados con el VIH tras la activación con PHA. Comparación entre 5 pacientes no infectados (control, símbolos en blanco) y 5 pacientes infectados con el VIH (símbolos en negro). NA: células no activadas; PHA: células activadas con PHA.

### Ejemplo 4: Expresión de NKp44L en células NK CD3-CD56<sup>+</sup> procedentes de pacientes infectados con el VIH.

La proporción de células NK que expresó NKp44L fue significativamente mayor en los individuos infectados con el VIH, con menos de 500 células CD4<sup>+</sup>/mm<sup>3</sup>, que las células no infectadas (control).

### Ejemplo 5: Mayor sensibilidad a la lisis por células NK de las células T CD4<sup>+</sup> que expresan NKp44L procedentes de pacientes infectados con el VIH.

Se analizó la estirpe de células NK NK92 en busca de la actividad citotóxica frente a dos células T CD4<sup>+</sup> purificadas (figura 3A) que expresan (círculo) o no (cuadrado) NKp44L. La actividad citotóxica se bloqueó parcialmente tras el tratamiento con mAb anti-NKp44L (a44).

Actividad citotóxica de dos células primarias NK autólogas (auto) activadas por IL-2 frente a células T CD4<sup>+</sup> purificadas (figura 3B) que expresan (círculo) o no (cuadrado) NKp44L, y K562 (estrella), como control positivo para la actividad citotóxica.

Actividad citotóxica de células primarias NK autólogas (auto) inactivadas frente a dos células T CD4<sup>+</sup> purificadas (figura 3C) que expresan (círculo) o no (cuadrado) NKp44L, y K562 (estrella), como control positivo para la actividad citotóxica.

**Ejemplo 6: Efectos de varias proteínas víricas del VIH sobre la expresión de NKp44L**

Se examinó el efecto de la proteína viral del VIH sobre la expresión de NKp44L usando infección con el virus de la vacuna recombinante que expresa la proteína viral del VIH. Como se muestra en la figura 4, la expresión de NKp44L está notablemente potenciada en células T CD4+ infectadas con el virus de la vacuna que expresa las proteínas de cubierta del VIH gp160 (33,9%) o gp41 (35,6%). Por el contrario, ninguna otra de las proteínas del VIH ensayadas, como Gag, Pol, Tat, nef, vif, o gp120, influyeron sobre la expresión de la proteína NKp44L en la superficie celular. Además, se confirmó en un sistema no viral el papel de la proteína Env para potenciar la expresión de NKp44L. Se trataron células T CD4+ purificadas con proteína gp160 recombinante proporcionada de dos fuentes diferentes, y como se muestra en la figura 5A, estas proteínas recombinantes gp160 influyeron en la expresión de NKp44L. De hecho, 10,7% y 9,6% de las células T CD4+ expresaron NKp44L tras el tratamiento con la gp160-A y gp160-B, respectivamente. Por otro lado, no se observó ningún efecto con células no tratadas o con células incubadas con una proteína de control. En conjunto, estos resultados muestran que la proteína gp160 recombinante potencia notablemente la expresión de NKp44L en la superficie de células T CD4+.

**Ejemplo 7: gp160 induce la lisis de células T CD4+ por células NK.**

La comparación de la actividad de lisis por células NK de las células no tratadas, de las células tratadas con la proteína de control, o de las células tratadas con ambas proteínas gp160 recombinantes (figura 5B), muestra que la lisis de las células diana se incrementó en presencia de células T CD4+ cultivadas con la proteína gp160 recombinante. El uso de dos tipos diferentes de proteínas gp160 recombinantes indica que el procedimiento usado para inducir la sobreexpresión de NKp44L e incrementar la actividad de lisis por células NK no tuvo ninguna influencia en el resultado de los experimentos. Juntos, estos resultados indican que la proteína de cubierta (Env) del VIH gp41 fue necesaria para la sobreexpresión de NKp44L, correlacionada con un fuerte incremento de la actividad de la lisis por células NK.

**Ejemplo 8: Identificación del motivo peptídico de la proteína de Env gp41 implicado en el incremento de la actividad de lisis por células NK.**

Se ensayó el efecto del conjunto de péptidos que solapan preparados, como se describe en la sección de Materiales y Métodos, para incluir toda la proteína gp41. Se incubaron células T CD4+ con 5 µg de cada conjunto de péptidos y se ensayaron frente a células NK activadas. Como se muestra en la figura 6A, la lisis por células NK se incrementó en células incubadas con el conjunto de péptidos denominado gp41C, pero no con todo el otro conjunto de péptidos. Se ha ensayado la expresión de NKp44L en células T CD4+ purificadas tratadas con cada uno de los conjuntos de péptidos. Este receptor fue sólo detectable en células tratadas con el conjunto gp41C, y el porcentaje de células positivas fue 13,3%. En ningún caso se detectó NKp44L en las células incubadas con el otro conjunto de péptidos ensayado. Esto sugirió que uno o varios motivos peptídicos incluidos en el conjunto gp41C estaba directamente implicado en el aumento de la lisis por células NK vía la sobreexpresión de NKp44L. Entonces se realizaron experimentos repetidos con todos los péptidos incluidos en el conjunto gp41C. Como se muestra en la figura 7A, la actividad citotóxica de las células NK aumentó fuertemente en presencia de los péptidos gp41-C145, gp41-C146, y gp41-C147. Por el contrario, con los otros péptidos ensayados, la actividad de lisis de las células NK permaneció baja, próxima al valor inicial. Paralelamente, la expresión de NKp44L aumentó tras el pretratamiento de células T CD4+ con los péptidos gp41-C145, gp41-C146, y gp41-C147, variando el porcentaje de células positivas entre 22 y 16%, pero con ninguno de los otros péptidos (menos de 7% de células positivas) (figura 7B). Estos resultados indicaron que un péptido específico para la proteína de cubierta (Env) del VIH gp41 podría incrementar la actividad de lisis de las células NK. Un apoyo adicional a esta conclusión procede de que los péptidos continuos denominados gp41-C145, gp41-C146, y gp41-C147 incluyeron un motivo peptídico común NH<sub>2</sub>-SWSNKS-COOH. Este motivo específico para la proteína del VIH-1 gp41 se conservó fuertemente. Tras haber demostrado que algunos péptidos continuos de la gp41 son algunos mediadores importantes de la lisis por células NK, fue importante evaluar si el motivo peptídico NH<sub>2</sub>-SWSNKS-COOH estaba implicado directamente en la lisis de células T CD4+ por células NK. El experimento preliminar con este péptido de 6-meros no mostró ningún incremento de la expresión de NKp44L o actividad citotóxica de células NK en la superficie celular, sugiriendo que esta secuencia es demasiado pequeña o es atacada demasiado rápidamente por algunas peptidasas. Sin embargo, para ensayar esta hipótesis, se han construido (figura 8A) dos péptidos de 15-meros derivados de gp41-C146 (WT) que incluyeron cierta mutación dentro del motivo NH<sub>2</sub>-SWSNKS-COOH (Ct11) o en toda la secuencia de los 15-meros (Ct12). Como se muestra en la figura 8B, la actividad citotóxica de las células NK aumentó fuertemente en presencia del péptido WT. Por el contrario, con células no tratadas (ninguna) o las tratadas con ambos péptidos de control, se observó un patrón similar con respecto a la expresión de NKp44L en la superficie celular. De hecho, en células tratadas con el péptido WT, aproximadamente 17,4% de las células T CD4 expresaron este marcador. Por el contrario, el porcentaje de células NKp44L fue menor que 4% en células no tratadas o células tratadas por los péptidos de control. Estos resultados muestran que el motivo NH<sub>2</sub>-SWSNKS-COOH incluido en la proteína gp41 está fuertemente implicado en la lisis de células T CD4+ por las células NK.

El efecto del péptido gp41 depende del tiempo (figura 9). La actividad de lisis de las células NK comenzó después de 30 min. de incubación con el péptido WT, y se aproximó a un máximo cerca de los 4 días. Por otro lado, no se observó ningún efecto significativo tras el tratamiento con las células no tratadas o las células tratadas con los

péptidos de control. Además, el aumento de la actividad de lisis de las células NK está fuertemente inhibido tras el pretratamiento de las células con mAb anti-NKp44L, confirmando que la actividad de las células NK está directamente correlacionada con un incremento de la expresión de NKp44L en la superficie celular, en células tratadas con el péptido WT (figura 9C). Sin embargo, el estudio cinético de la expresión de NKp44L en la superficie celular reveló que este receptor se expresó rápidamente en la superficie celular; de hecho, después de 10 min. de tratamiento con el péptido WT, alrededor del 10% de las células T CD4+ expresaron esta proteína, y el máximo de expresión (aproximadamente 30%) se obtuvo 4 días después del tratamiento. La expresión muy rápida de NKp44L en la superficie celular sugirió una ausencia de nueva síntesis de NKp44L, y sugirió que esta proteína estaba presente dentro de las células T CD4+ cultivadas con IL2. Esta hipótesis se confirmó mediante una tinción intracelular de NKp44L. Como muestra la figura 9D, la expresión elevada de NKp44L fue detectable dentro de las células, y esto independientemente de la presencia de péptidos.

**Ejemplo 9: Expresión de NKp44L en la superficie celular de diferentes células humanas**

Como se muestra en la figura 10, se ha ensayado la expresión superficial de NKp44L en K562, Jurkat, y PBMC en reposo. Las células se incubaron con 1 µg/ml de mAb anti-NKp44L (línea gruesa gris) o con el control de isotipo de IgM (línea delgada negra), y se analizaron mediante citometría de flujo. Se muestra claramente que, al contrario que con PBMC, las células tumorales, como Jurkat, y las células K562 expresan NKp44L en su superficie.

**Referencias**

- Ameisen JC, Capron A. Cell dysfunction and depletion in AIDS: the programmed cell death hypothesis. *Immunol Today* 1991;12(4):102-5.
- Bagnarelli P, Menzo S, Valenza A, Manzin A, *et al.* Molecular profile of human immunodeficiency virus type 1 infection in symptomless patients and in patients with AIDS. *J Virol* 1992;66(12):7328-35.
- Cantoni C, Bottino C, Vitale M, Pessino A, Augugliaro R, Malaspina A, Parolini S, Moretta L, Moretta A, Biassoni R., 1999, NKp44, a triggering receptor involved in tumor cell lysis by activated human natural killer cells, is a novel member of the immunoglobulin superfamily, *J Exp Med* 1999 Mar 1;189(5):787-96
- CDC. 1993 revised classification system for HIV infection and expanded surveillance case definition for AIDS among adolescents and adults. *MMWR* 1992;41:1-19.
- CDC. Revision of the surveillance case definition of acquired immunodeficiency syndrome. *MMWR* 1987;36:3S-15S.
- Clark SJ, Saag MS, Decker WD, Campbell-Hill S, *et al.* High titers of cytopathic virus in plasma of patients with symptomatic primary HIV-1 infection. *N Engl J Med* 1991;324(14):954-60.
- Coombs RW, Collier AC, Allain JP, Nikora B, *et al.* Plasma viremia in human immunodeficiency virus infection. *N Engl J Med* 1989;321 (24):1626-31.
- Edwards y Leatherbarrow, 1997, *Analytical Biochemistry*, 246: 1-6.
- Embretson J, Zapancic M, Ribas JL, Burke A, *et al.* Massive covert infection of helper T lymphocytes and macrophages by HIV during the incubation period of AIDS. *Nature* 1993;362(6418):359-62.
- Fauci AS. Multifactorial nature of human immunodeficiency virus disease: implications for therapy. *Science* 1993a; 262(3136):1011-8.
- Felici F., 1991, *J Mol Biol*, 222: 301-310.
- Finkel TH, Tudor-Williams G, Banda NK, *et al.* Apoptosis occurs predominantly in bystander cells and not in productively infected cells of HIV- and SIV-infected lymph nodes. *Nature Medicine* 1995; 1(2):129-34.
- Fox CH, Kotler D, Tierney A, Wilson CS, Fauci AS. Detection of HIV-1 RNA in the lamina propria of patients with AIDS and gastrointestinal disease. *J Infect Dis* 1989; 159(3):467-71.
- Garry RF. Potential mechanisms for the cytopathic properties of HIV. *AIDS* 1989;3(11):683-94.
- Golding H, Shearer GM, Hillman K, Lucas P, *et al.* Common epitope in human immunodeficiency virus I (HIV) I-GP41 and HLA class II elicits immunosuppressive antibodies capable of contributing to immune dysfunction in HIV-infected individuals. *J Clin Invest* 1989; 83(4):1430-5.
- Gong *et al.*, 1994, *Leukemia*, vol. 8 (4):652-658.

- Ho DD, Moudgil T, Alam M. Quantitation of human immunodeficiency virus type 1 in the blood of infected persons. *N Engl J Med* 1989; 321 (24):1621-5.
- 5 • Ho DD, Neumann AU, Perelson AS, Chen W, *et al.* Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. *Nature* 1995; 373:123-6.
- Hoxie JA, Alpers JD, Rackowski JL, Huebner K, *et al.* Alterations in T4 (CD4) protein and mRNA synthesis in cells infected with HIV. *Science* 1986; 234(4780):1123-7.
- 10 • Hugin AW, Vacchio MS, Morse HC III. A virus-encoded superantigen in a retrovirus-induced immunodeficiency syndrome of mice. *Science* 1991; 252(5004):424-7.
- Janeway C. Immune recognition. MIs: makes little sense. *Nature* 1991; 349(6309):459-61.
- 15 • Koenig S, Earl P, Powell D, Pantaleo G, *et al.* Group-specific, major histocompatibility complex class-I restricted cytotoxic responses to human immunodeficiency virus I (HIV-1) envelope proteins by cloned peripheral blood T cells from an HIV-1 infected individual. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85(22):8638-42.
- 20 • Koga Y, Lindstrom E, Fenyo EM, Wigzell H, Mak TW. High levels of heterodisperse RNAs accumulate in T cells infected with human immunodeficiency virus and in normal thymocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85(12):4521-5.
- Kohler G. y Milstein C., 1975, *Nature*, 256: 495.
- 25 • Kozbor *et al.*, 1983, *Hybridoma*, 2(1): 7-16.
- Laurent-Crawford AG, Krust B, Muller S, Riviere Y, *et al.* The cytopathic effect of HIV is associated with apoptosis. *Virology* 1991; 185(2):829-39.
- 30 • Leblanc V, Delaunay V, Claude Lelong J, Gas F, Mathis G, Grassi J, mayo E. 2002 . *Anal Biochem.* 15 de septiembre de 2002; 308(2):247-54.)
- Leger OJ *et al.*, 1997, *Hum Antibodies*, 8(1): 3-16.
- 35 • Leonard R, Zagury D, Desportes I, Bernard J, *et al.* Cytopathic effect of human immunodeficiency virus in T4 cells is linked to the last stage of virus infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85(10):3570-4.
- Lifson JD, Reyes GR, McGrath MS, Stein BS, Engleman EG. AIDS retrovirus induced cytopathology: giant cell formation and involvement of CD4 antigen. *Science* 1986; 232(4754):1123-7.
- 40 • Lucas A.H., 1994, *En: Development and Clinical Uses of Haemophilus b Conjugate.*
- Lyerly HK, Matthews TJ, Langlois AJ, Bolognesi DP, Weinhold KJ. Human T-cell lymphotropic virus IIIB glycoprotein (gp120) bound to CD4 determinants on normal lymphocytes and expressed by infected cells serves as target for immune attack. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84(13):4601-5.
- 45 • Martineau P., Jones P., Winter G., 1998, *J Mol Biol*, 280(1): 117-127.
- 50 • Michael NL, Vahey M, Burke DS, Redfield RR. Viral ADN and mRNA correlate with the stage of human immunodeficiency virus (HIV) type 1 infection in humans: evidence for viral replication in all stages of HIV disease. *J Virol* 1992; 66(1):310-6.
- Muro-Cacho CA, Pantaleo G, Fauci AS. Analysis of apoptosis in lymph nodes of HIV-infected persons. Intensity of apoptosis correlates with the general state of activation of the lymphoid tissue and not with stage of disease or viral burden. *J Immunol* 1995; 154(10):5555-66.
- 55 • Oldenburg K.R. *et al.*, 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85(8): 2444-2448.
- 60 • Pantaleo G, Fauci AS. Apoptosis in HIV infection. *Nature Medicine* 1995b; 1 (2):118-20.
- Pantaleo G, Graziosi C, Demarest JF, Butini L, *et al.* HIV infection is active and progressive in lymphoid tissue during the clinically latent stage of disease. *Nature* 1993b; 362(6418):355-8.
- 65 • Pantaleo G, Graziosi C, Fauci AS. The immunopathogenesis of human immunodeficiency virus infection. *N Engl J Med* 1993a; 328(5):327-35.

- Parmley y Smith, 1988, Gene, 73: 305-318.
- 5 • Pauza CD, Galindo JE, Richman DD. Reinfection results in accumulation of unintegrated viral ADN in cytopathic and persistent human immunodeficiency virus type 1 infection of CEM cells. J Exp Med 1990; 172(4):1035-42.
- Piatak M Jr, Saag MS, Yang LC, Clark SJ, *et al.* High levels of HIV-1 in plasma during all stages of infection determined by competitive PCR. Science 1993; 259(5102):1749-54.
- 10 • Popovic M, Sarngadharan MG, Read E, Gallo RC. Detection, isolation and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS. Science 1984; 224(4648):497-500.
- Reinmann KA *et al.*, 1997, AIDS Res Hum Retroviruses, 13(11): 933-943.
- 15 • Ridder R., Scmitz R., Legay F., Gram H., 1995, Biotechnology (N Y), 13(3): 255-260.
- Schnittman SM, Denning SM, Greenhouse JJ, Justement JS, *et al.* Evidence for susceptibility of intrathymic T-cell precursors and their progeny carrying T-cell antigen receptor phenotypes TCR alpha beta + and TCR gamma delta + to human immunodeficiency virus infection: a mechanism for CD4+ (T4) lymphocyte depletion. Proc Natl Acad Sci USA 1990b; 87(19):7727-31.
- 20 • Sodroski J, Goh WC, Rosen C, Campbell K, Haseltine WA. Role of the HTLV-III/LAV envelope in syncytium formation and cytopathicity. Nature 1986; 322(6078):470-4.
- 25 • Stanley SK, Kessler SW, Justement JS, Schnittman SM, *et al.* CD34+ bone marrow cells are infected with HIV in a subset of seropositive individuals. J Immunol 1992; 149(2):689-97.
- Szabo *et al.*, 1995, Curr. Opinion Struct. Biol., 5(5): 699-705.
- 30 • Terai C, Kornbluth RS, Pauza CD, Richman DD, Carson DA. Apoptosis as a mechanism of cell death in cultured T lymphoblasts acutely infected with HIV-1. J Clin Invest 1991; 87(5):1710-5.
- Valadon P. *et al.*, 1996, J Mol Biol, 261: 11-22.
- 35 • Vitale M, Bottino C, Sivori S, Sanseverino L, Castriconi R, Marcenaro E, Augugliaro R, Moretta L, Moretta A., 1998, NKp44, a novel triggering surface molecule specifically expressed by activated natural killer cells, is involved in non-major histocompatibility complex-restricted tumor cell lysis, J Exp Med 15 de junio de 1998; 187(12):2065-72
- 40 • Wei X, Ghosh SK, Taylor ME, Johnson VA, *et al.* Viral dynamics in human immunodeficiency virus type 1 infection. Nature 1995; 373:117-22.
- Westerink M.A.J., 1995, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92: 4021-4025.
- 45 • Zagury D, Bernard J, Leonard R, Cheymier R, *et al.* Long-term cultures of HTLV-III infected T cells: a model of cytopathology of T-cell depletion in AIDS. Science 1986; 231(4740):850-3.

**Listado de secuencias**

- 50 <110> Institut National de la Santé et de la Recherche M
- <120> Procedimiento para la evaluación *in vitro* del estado de progresión de una infección por un virus del VIH en un individuo
- 55 <130> P852-EP-INSERM
- <140>
- <141>
- 60 <160>4
- <170> PatentIn Ver. 2.1
- <210> 1
- <211> 1168
- 65 <212> PRT
- <213> Homo sapiens

ES 2 435 040 T3

<400> 1

Met Ser Ile Val Ile Pro Leu Gly Val Asp Thr Ala Glu Thr Ser Tyr  
 1 5 10 15

Leu Glu Met Ala Ala Gly Ser Glu Pro Glu Ser Val Glu Ala Ser Pro  
 20 25 30

Val Val Val Glu Lys Ser Asn Ser Tyr Pro His Gln Leu Tyr Thr Ser  
 35 40 45

Ser Ser His His Ser His Ser Tyr Ile Gly Leu Pro Tyr Ala Asp His  
 50 55 60

Asn Tyr Gly Ala Arg Pro Pro Pro Thr Pro Pro Ala Ser Pro Pro Pro  
 65 70 75 80

Ser Val Leu Ile Ser Lys Asn Glu Val Gly Ile Phe Thr Thr Pro Asn  
 85 90 95

Phe Asp Glu Thr Ser Ser Ala Thr Thr Ile Ser Thr Ser Glu Asp Gly  
 100 105 110

Ser Tyr Gly Thr Asp Val Thr Arg Cys Ile Cys Gly Phe Thr His Asp  
 115 120 125

Asp Gly Tyr Met Ile Cys Cys Asp Lys Cys Ser Val Trp Gln His Ile  
 130 135 140

Asp Cys Met Gly Ile Asp Arg Gln His Ile Pro Asp Thr Tyr Leu Cys  
 145 150 155 160

Glu Arg Cys Gln Pro Arg Asn Leu Asp Lys Glu Arg Ala Val Leu Leu  
 165 170 175

Gln Arg Arg Lys Arg Glu Asn Met Ser Asp Gly Asp Thr Ser Ala Thr  
 180 185 190

Glu Ser Gly Asp Glu Val Pro Val Glu Leu Tyr Thr Ala Phe Gln His  
 195 200 205

ES 2 435 040 T3

Thr Pro Thr Ser Ile Thr Leu Thr Ala Ser Arg Val Ser Lys Val Asn  
 210 215 220

Asp Lys Arg Arg Lys Lys Ser Gly Glu Lys Glu Gln His Ile Ser Lys  
 225 230 235 240

Cys Lys Lys Ala Phe Arg Glu Gly Ser Arg Lys Ser Ser Arg Val Lys  
 245 250 255

Gly Ser Ala Pro Glu Ile Asp Pro Ser Ser Asp Gly Ser Asn Phe Gly  
 260 265 270

Trp Glu Thr Lys Ile Lys Ala Trp Met Asp Arg Tyr Glu Glu Ala Asn  
 275 280 285

Asn Asn Gln Tyr Ser Glu Gly Val Gln Arg Glu Ala Gln Arg Ile Ala  
 290 295 300

Leu Arg Leu Gly Asn Gly Asn Asp Lys Lys Glu Met Asn Lys Ser Asp  
 305 310 315 320

Leu Asn Thr Asn Asn Leu Leu Phe Lys Pro Pro Val Glu Ser His Ile  
 325 330 335

Gln Lys Asn Lys Lys Ile Leu Lys Ser Ala Lys Asp Leu Pro Pro Asp  
 340 345 350

Ala Leu Ile Ile Glu Tyr Arg Gly Lys Phe Met Leu Arg Glu Gln Phe  
 355 360 365

Glu Ala Asn Gly Tyr Phe Phe Lys Arg Pro Tyr Pro Phe Val Leu Phe  
 370 375 380

Tyr Ser Lys Phe His Gly Leu Glu Met Cys Val Asp Ala Arg Thr Phe  
 385 390 395 400

Gly Asn Glu Ala Arg Phe Ile Arg Arg Ser Cys Thr Pro Asn Ala Glu  
 405 410 415

Val Arg His Glu Ile Gln Asp Gly Thr Ile His Leu Tyr Ile Tyr Ser  
 420 425 430

Ile His Ser Ile Pro Lys Gly Thr Glu Ile Thr Ile Ala Phe Asp Phe  
 435 440 445

Asp Tyr Gly Asn Cys Lys Tyr Lys Val Asp Cys Ala Cys Leu Lys Glu  
 450 455 460

Asn Pro Glu Cys Pro Val Leu Lys Arg Ser Ser Glu Ser Met Glu Asn  
 465 470 475 480

Ile Asn Ser Gly Tyr Glu Thr Arg Arg Lys Lys Gly Lys Lys Asp Glu  
 485 490 495

Asp Ile Ser Lys Glu Lys Asp Thr Gln Asn Gln Asn Ile Thr Leu Asp  
 500 505 510

Cys Glu Gly Ala Thr Asn Lys Met Lys Ser Pro Glu Thr Lys Gln Arg  
 515 520 525

Lys Leu Ser Pro Leu Arg Leu Ser Val Ser Asn Asn Gln Glu Pro Asp



ES 2 435 040 T3

Pro Asp Leu Thr Thr Pro Leu Lys Lys Arg Arg Phe Tyr Gln Leu Leu  
865 870 875 880

Asp Ser Val Tyr Ser Glu Thr Ser Thr Pro Thr Pro Ser Pro Tyr Ala  
885 890 895

Thr Pro Thr His Thr Asp Ile Thr Pro Met Asp Pro Ser Phe Ala Thr  
900 905 910

Pro Pro Arg Ile Lys Ser Asp Asp Glu Thr Cys Arg Asn Gly Tyr Lys  
915 920 925

Pro Ile Tyr Ser Pro Val Thr Pro Val Thr Pro Gly Thr Pro Gly Asn  
930 935 940

Thr Met His Phe Glu Asn Ile Ser Ser Pro Glu Ser Ser Pro Glu Ile  
945 950 955 960

Lys Arg Arg Thr Tyr Ser Gln Glu Gly Tyr Asp Arg Ser Ser Thr Met  
965 970 975

Leu Thr Leu Gly Pro Phe Arg Asn Ser Asn Leu Thr Glu Leu Gly Leu  
980 985 990

Gln Glu Ile Lys Thr Ile Gly Tyr Thr Ser Pro Arg Ser Arg Thr Glu  
995 1000 1005

Val Asn Arg Gln Cys Pro Gly Glu Lys Glu Pro Val Ser Asp Leu Gln  
1010 1015 1020

Leu Gly Leu Asp Ala Val Glu Pro Thr Ala Leu His Lys Thr Leu Glu  
1025 1030 1035 1040

Thr Pro Ala His Asp Arg Ala Glu Pro Asn Ser Gln Leu Asp Ser Thr  
1045 1050 1055

His Ser Gly Arg Gly Thr Met Tyr Ser Ser Trp Val Lys Ser Pro Asp  
1060 1065 1070

Arg Thr Gly Val Asn Phe Ser Val Asn Ser Asn Leu Arg Asp Leu Thr  
1075 1080 1085

Pro Ser His Gln Leu Glu Val Gly Gly Gly Phe Arg Ile Ser Glu Ser  
1090 1095 1100

Lys Cys Leu Met Gln Asp Asp Thr Arg Gly Met Phe Met Glu Thr Thr  
1105 1110 1115 1120

Val Phe Cys Thr Ser Glu Asp Gly Leu Val Ser Gly Phe Gly Arg Thr  
1125 1130 1135

Val Asn Asp Asn Leu Ile Asp Gly Asn Cys Thr Pro Gln Asn Pro Pro  
1140 1145 1150

Gln Lys Lys Lys Ser Pro Val Gly Asn Phe Val Gly Ser Asn Val Val  
1155 1160 1165

<210> 2  
<211> 262

ES 2 435 040 T3

<212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 2

Met Ala Trp Arg Ala Leu His His Trp Leu Leu Leu Leu Leu Phe Pro  
 1 5 10 15  
 Gly Ser Gln Ala Gln Ser Lys Ala Gln Val Leu Gln Ser Val Ala Gly  
 20 25 30  
 Gln Thr Leu Thr Val Arg Cys Gln Tyr Pro Pro Thr Gly Ser Leu Tyr  
 35 40 45  
 Glu Lys Lys Gly Trp Cys Lys Glu Ala Ser Ala Leu Val Cys Ile Arg  
 50 55 60  
 Leu Val Thr Ser Ser Lys Pro Arg Thr Met Ala Trp Thr Ser Arg Phe  
 65 70 75 80  
 Thr Ile Trp Asp Asp Pro Asp Ala Gly Phe Phe Thr Val Thr Met Thr  
 85 90 95  
 Asp Leu Arg Glu Glu Asp Ser Gly His Tyr Trp Cys Arg Ile Tyr Arg  
 100 105 110  
 Pro Ser Asp Asn Ser Val Ser Lys Ser Val Arg Phe Tyr Leu Val Val  
 115 120 125  
 Ser Pro Ala Ser Ala Ser Thr Gln Thr Pro Trp Thr Pro Arg Asp Leu  
 130 135 140  
 Val Ser Ser Gln Thr Gln Thr Gln Ser Cys Val Pro Pro Thr Ala Gly  
 145 150 155 160  
 Ala Arg Gln Ala Pro Glu Ser Pro Ser Thr Ile Pro Val Pro Ser Gln  
 165 170 175  
 Pro Gln Asn Ser Thr Leu Arg Pro Gly Pro Ala Ala Pro Ile Ala Leu  
 180 185 190  
 Val Pro Val Phe Cys Gly Leu Leu Val Ala Lys Ser Leu Val Leu Ser  
 195 200 205  
 Ala Leu Leu Val Trp Trp Gly Asp Ile Trp Trp Lys Thr Val Met Glu  
 210 215 220  
 Leu Arg Ser Leu Asp Thr Gln Lys Ala Thr Cys His Leu Gln Gln Val  
 225 230 235 240  
 Thr Asp Leu Pro Trp Thr Ser Val Ser Ser Pro Val Glu Arg Glu Ile  
 245 250 255  
 Leu Tyr His Thr Val Ala  
 260

5

<210> 3  
 <211> 3507  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

10

ES 2 435 040 T3

<400> 3

atgagcatag tgatccatt gggggttgat acagcagaga cgtcatactt ggaaatggct 60  
gcaggttcag aaccagaatc cgtagaagct agccctgtgg tagttgagaa atccaacagt 120  
tatccccacc agttatatac cagcagctca catcattcac acagttacat tggtttgccc 180  
tatgcccagacc ataattatgg tgctcgtcct cctccgacac ctccggcttc cctcctcca 240  
tcagtoctta ttagcaaaaa tgaagtaggc atatttacca ctctaattt tgatgaaact 300  
tccagtgcta ctacaatcag cacatctgag gatggaagtt atgggtactga tgaaccagg 360  
tgcataatgtg gttttacaca tgatgatgga tacatgatct gttgtgacaa atgcagcgtt 420  
tggcaacata ttgactgcat ggggattgat aggcagcata ttctgatac atatctatgt 480  
gaacgttgtc agcctaggaa tttggataaa gagagggcag tgctactaca acgcccggaaa 540  
agggaaaata tgtcagatgg tgataccagt gcaactgaga gtggtgatga gggtcctgtg 600  
gaattatata ctgcatttca gcatactcca acatcaatta ctttaactgc tccaagagt 660  
tccaaagtta atgataaaaag aaggaaaaaa agcggggaga aagaacaaca ctttcaaaa 720  
tgtaaaaagg catttcgtga aggatctagg aagtcacaa gagttaaggg ttcagctcca 780  
gagattgatc ctcatctga tggttcaaat tttggatggg agacaaagat caaagcatgg 840  
atggatcgat atgaagaagc aaataacaac cagtatagtg aggggtgttca gggggaggca 900  
caaagaatag ctctgagatt aggcaatgga aatgacaaaa aagagatgaa taaatccgat 960  
ttgaatacca acaatttgcct ctccaacct cctgtagaga gccatataca aaagaataag 1020  
aaaattctta aatctgcaaa agatttgcct cctgatgcac ttatcattga atacagaggg 1080  
aagtttatgc tgagagaaca gtttgaagca aatgggtatt tctttaaaag accataacct 1140  
tttgtgttat tctactctaa atttcatggg ctagaaatgt gtgttgatgc aaggactttt 1200  
gggaatgagg ctocattcat cagggcgtct tgtcaccca atgcagaggt gaggcatgaa 1260  
attcaagatg gaaccataca tctttatatt tattctatac acagtattcc aaagggaaact 1320  
gaaattacta ttgcctttga ttttgactat ggaaattgta agtacaaggt ggactgtgca 1380  
tgctcaaaag aaaaaccaga gtgcctgtt ctaaaacgta gttctgaatc catggaaaat 1440  
atcaatagtg gttatgagac cagacggaaa aaaggaaaaa aagacgaaga ttttcaaaa 1500  
gaaaaagata cacaaaatca gaatattact ttggattgtg aaggagcgcac caacaaaatg 1560  
aagagcccag aaactaaaca aagaaagcct tctccactga gactatcagt atcaataat 1620  
caggaaccag atttttattga tgatatagaa gaaaaaactc ctattagtaa tgaagtagaa 1680  
atggaatcag aggagcagat tgcagaaagg aaaaggaaga tgacaagaga agaaagaaaa 1740  
atggaagcaa ttttgcaagc ttttgccaga cttgaaaaaa gagagaaaag aagagaacaa 1800  
gctttggaaa ggatcagcac agccaaaact gaagttaaaa ctgaatgtaa agatacacag 1860  
attgtcagtg atgctgaagt tattcaggaa caagcaaaag aagaaaatgc tagcaagcca 1920  
accctgccca aagtaaatag aactaaacag agaaaaagtt tttctcggag taggactcac 1980  
attggacagc agcgtcggag acacagaact gtcagcatgt gttcagatat ccagccatct 2040  
tctcctgata tagaagttac ttcacaacaa aatgatattg aaaatactgt acttacaata 2100  
gaaccagaaa ctgaaactgc actagcagaa ataattactg aaactgaagt tccagcactt 2160  
aataaatgtc ctaccaagta ccccaaaaaca aagaagcact tggttaatga atggttaaat 2220  
gagaagaatg agaagacagg aaaaccttca gatggccttt cagaaaggcc tctacgcata 2280  
actacagatc ctgaagtgtt agctacacaa ctcaattctt taccaggtct cacttacagc 2340  
cccctgtat actccactcc taagcattat attagattta cttcaccatt cctttcagaa 2400  
aaaaggagaa gaaaagaacc tactgaaaac atttctgggt catgcaagaa gcgatggttg 2460  
aaacaagctc tggagaaga aaattcagca attttacata gatttaatte accctgtcaa 2520  
gaaagatcca gaagtctgac agtcaatggt gaaaataaaa gtcactact attaaatgac 2580  
agctgttccc ttcagattt aactacacca ctaaaaaac gaagatttta tcagttgcta 2640  
gattcggttt actcagaaac ctccacacct actccttccc cgtatgctac accaactcac 2700  
accgatatta ctctatgga cccatctttt gccacgcctc cacggataaa atcagatgat 2760  
gaaacttgta gaaatggtta taaaccata tattcaccag ttaccccagt aactcctggg 2820  
acaccaggaa ataccatgca ctttgagaat atttcttccc cagaaagttc tccagaaata 2880  
aagagacgca cttatagtca agagggatat gacagatctt caacctggt aacattgggg 2940  
ccttttagaa attctaattt aactgaactg ggtctgcaag aaataaagac tattggttat 3000  
acgagcccta ggagtaggac tgaagtcaac aggcagtgtc ctggagaaaa ggaacctgtg 3060  
tcagacctc agctaggact cgatgcagtt gagccaactg cctacataa aacctggaa 3120  
acgcctgcac atgacagggc tgagcccac agccaactgg actcgactca ctctggacgg 3180  
ggcacaatgt attcttctcgg ggtaaagagc cctgacagaa caggagttaa cttctcagtg 3240  
aactccaact tgagggacct gacacctcag catcagttgg aggttggagg aggttccga 3300

ES 2 435 040 T3

ataagtgagt caaagtgcct gatgcaggat gatactagag gcatgtttat ggaaacaact 3360  
 gtgttttgta cttccgaaga tgggcttgta tctggtttcg gacggactgt taatgacaat 3420  
 ttgatcgacg ggaattgcac accccagaat ccaccacaaa agaaaaagag tccagttggc 3480  
 aactttgtgg gaagcaatgt agtatag 3507

<210> 4

<211> 787

5 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 4

atggcctggc gagccctaca ccactggcta ctgctgctgc tgttcccagg ctctcaggca 60  
 caatccaagg ctcaggtact tcaaagtgtg gcagggcaga cgctaaccgt gagatgccag 120  
 taccgcccc cgggcagtct ctacgagaag aaaggctggg gtaaggaggc ttcagcactt 180  
 gtgtgcatca ggtagtcac cagctccaag ccaggacga tggcttggac ctctcgattc 240  
 acaatctggg acgaccctga tgctggcttc ttcactgtca ccatgactga tctaagagag 300  
 gaagactcag gacattactg gtgtagaatc taccgccctt ctgacaactc tgtctctaag 360  
 tccgtcagat tctatctggg ggtatctcca gcctctgcct ccacacagac cccctggact 420  
 ccccgcgacc tggctctctc acagaccag acccagagct gtgtgcctcc cactgcagga 480  
 gccagacaag cccctgagtc tccatctacc atccctgtcc cttctcagcc acagaactcc 540  
 acgctccgcc ctggccctgc agccccatt gccctgggtg ctgtgttctg tggactctc 600  
 gtagccaaga gcctggtgct gtcagccctg ctctgtctggg ggggggacat atggtggaaa 660  
 accgtgatgg agctcaggag cctggatacc caaaaagcca cctgccacct tcaacaggtc 720  
 acggaccttc cctggacctc agtttcctca cctgtagaga gagaaatatt atatcacact 780  
 gttgcaa 787

## REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la evaluación *in vitro* del estado de progresión de la infección de un individuo con un virus del VIH, en el que dicho procedimiento comprende las etapas de:
- 5 (a) incubar una muestra biológica con un compuesto ligando seleccionado de entre el grupo que consiste en (i) un anticuerpo dirigido a la proteína NKp44L de SEC ID N° 1, o sobre la parte del dominio extracelular de la misma, y (ii) la proteína NKp44 de SEC ID N° 2, o un polipéptido que comprende la parte del dominio extracelular de la misma; y
- 10 (b) medir la cantidad de dicho compuesto ligando que está unido a las células T CD4<sup>+</sup>, siendo dicha cantidad medida de dicho compuesto ligando unido indicativa del estado de progresión de la infección viral.
2. Procedimiento *in vitro* según la reivindicación 1, en el que dicha muestra biológica contiene células sanguíneas recogidas de un paciente infectado con un virus del VIH, y en el que dicha cantidad medida de dicho compuesto ligando unido es indicativa de la tasa de células T CD4<sup>+</sup> contenidas en dicha muestra biológica.
- 15 3. Procedimiento *in vitro* según la reivindicación 1, en el que dicha muestra biológica contiene células sanguíneas recogidas de un paciente infectado con un virus del VIH, y dicha cantidad medida de dicho compuesto ligando unido es indicativa de la carga viral del VIH de dicha muestra biológica.
- 20 4. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicha muestra biológica se selecciona de entre el grupo que consiste en (i) una muestra de sangre completa, (ii) una suspensión de células mononucleares y polimorfonucleares periféricas purificada a partir de una muestra de sangre completa, (iii) una suspensión de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) purificada a partir de una muestra de sangre completa, (iv) una suspensión de células T purificada a partir de una muestra de sangre completa, y (v) una suspensión de células T CD4<sup>+</sup> purificada a partir de una muestra de sangre completa.
- 25 5. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicho compuesto ligando está marcado con una molécula detectable.
- 30 6. Procedimiento según la reivindicación 5, en el que dicha molécula detectable se selecciona de entre el grupo que consiste en (i) una molécula radioactiva, (ii) una molécula fluorescente, (iii) una molécula luminiscente, y (iv) una molécula receptora que es reconocida selectivamente por una molécula ligando.
- 35 7. Procedimiento según la reivindicación 6, en el que dicha molécula radioactiva está marcada con un isótopo radioactivo seleccionado de entre el grupo que consiste en [<sup>32</sup>P], [<sup>3</sup>H] y [<sup>35</sup>S].
- 40 8. Procedimiento según la reivindicación 6, en el que dicha molécula fluorescente se selecciona de entre el grupo que consiste en una proteína fluorescente verde o una proteína fluorescente amarilla.
9. Procedimiento según la reivindicación 6, en el que dicha molécula luminiscente consiste en la luciferasa.
10. Procedimiento según la reivindicación 6, en el que dicha molécula receptora consiste en una molécula que contiene avidina o una estreptavidina.
- 45 11. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que la etapa (b) de medición de la cantidad de dicho compuesto ligando que está unido a las células T CD4<sup>+</sup> consiste en un análisis citofluorométrico de dicha muestra biológica que se ha incubado con dicho compuesto ligando en la etapa (a) de dicho procedimiento.
- 50 12. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que la etapa (b) de medición de la cantidad de dicho compuesto ligando que está unido a las células T CD4<sup>+</sup> consiste en numerar mediante microscopía, incluyendo la microscopía confocal, las células contenidas en dicha muestra biológica sobre las que está unido dicho compuesto ligando.
- 55 13. Kit para la evaluación *in vitro* del estado de progresión de la infección de un individuo con un virus del VIH, en el que dicho kit comprende:
- 60 (i) un compuesto ligando seleccionado de entre el grupo que consiste en (i) un anticuerpo dirigido a la proteína NKp44L de SEC ID N° 1, o a la parte del dominio extracelular de la misma, y (ii) la proteína NKp44 de SEC ID N°2, o un polipéptido que comprende la parte del dominio extracelular de la misma; y
- (ii) una molécula marcadora que se une específicamente al antígeno CD4.
14. Kit según la reivindicación 13, en el que tanto (i) el compuesto ligando como (ii) la molécula marcadora se marcan fluorescentemente de manera diferencial.
- 65

15. Kit según cualquiera de las reivindicaciones 13 o 14, en el que el compuesto ligando consiste en un anticuerpo monoclonal marcado que se une específicamente a la proteína NKp44L de SEC ID N°1, o a la parte del dominio extracelular de la misma.

5 16. Kit según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 15, en el que la molécula marcadora marcada consiste en un anticuerpo monoclonal anti-CD4.

10 17. Procedimiento para el cribado *in vitro* de compuestos para tratar un individuo infectado con un virus del VIH, en el que dicho procedimiento comprende las etapas de:

(a) incubar un compuesto candidato que se va a someter a prueba con un sistema de cribado en un disolvente líquido, en el que dicho sistema de cribado comprende:

15 (i) una primera pareja que expone al disolvente una pluralidad de moléculas de la proteína NKp44L de SEC ID N°1, o una pluralidad de moléculas de un polipéptido que comprende la parte del dominio extracelular de la misma; y

20 (ii) una segunda pareja que expone al disolvente una pluralidad de moléculas de la proteína receptora NKp44 de SEC ID N°2, o una pluralidad de moléculas de un polipéptido que comprende la parte del dominio extracelular de la misma;

25 en el que (iii) la pluralidad de moléculas de la proteína NKp44L de SEC ID N°1, o la pluralidad de moléculas de un polipéptido que comprende la parte del dominio extracelular de la misma, por un lado, y (iv) la pluralidad de moléculas de la proteína receptora NKp44 de SEC ID N°2, o la pluralidad de moléculas de un polipéptido que comprende la parte del dominio extracelular de la misma, por otro lado, pueden unirse entre sí;

30 (b) cuantificar la unión de (iii) la pluralidad de moléculas de la proteína NKp44L de SEC ID N°1, o la pluralidad de moléculas de un polipéptido que comprende la parte del dominio extracelular de la misma a (iv) la pluralidad de moléculas de la proteína receptora NKp44 de SEC ID N°2, o la pluralidad de moléculas de un polipéptido que comprende la parte del dominio extracelular de la misma;

35 (c) comparar la unión que se cuantifica en la etapa (b) con la unión que se cuantifica cuando se lleva a cabo la etapa (a) en ausencia de dicho compuesto candidato;

40 (d) seleccionar de manera positiva el compuesto candidato como agente terapéutico cuando dicho compuesto candidato inhibe o bloquea la unión de (iii) la pluralidad de moléculas de la proteína NKp44L de SEC ID N°1, o la pluralidad de moléculas de un polipéptido que comprende la parte del dominio extracelular de la misma a (iv) la pluralidad de moléculas de la proteína receptora NKp44 de SEC ID N°2, o la pluralidad de moléculas de un polipéptido que comprende la parte del dominio extracelular de la misma.

45 18. Kit para el cribado *in vitro* de compuestos para tratar un individuo infectado con un virus del VIH, en el que dicho kit comprende un sistema de cribado que comprende:

(i) una primera pareja que expone al disolvente una pluralidad de moléculas de la proteína NKp44L de SEC ID N°1, o una pluralidad de moléculas de un polipéptido que comprende la parte del dominio extracelular de la misma;

50 (ii) una segunda pareja que expone al disolvente una pluralidad de moléculas de la proteína receptora NKp44 de SEC ID N°2, o una pluralidad de moléculas de un polipéptido que comprende la parte del dominio extracelular de la misma; en el que

55 (iii) la pluralidad de moléculas de la proteína NKp44L de SEC ID N°1, o la pluralidad de moléculas de un polipéptido que comprende la parte del dominio extracelular de la misma, por un lado, y (iv) la pluralidad de moléculas de la proteína receptora NKp44 de SEC ID N°2, o la pluralidad de moléculas de un polipéptido que comprende la parte del dominio extracelular de la misma, por otro lado, pueden unirse entre sí.

60 19. Procedimiento para el cribado *in vitro* de compuestos para tratar un individuo infectado con un virus del VIH, en el que dicho procedimiento comprende las etapas de:

(a) poner en contacto una primera población de células que consiste en células NK activadas humanas y una segunda población de células que consiste en células T CD4<sup>+</sup> que expresan la proteína NKp44L, en presencia de un compuesto terapéutico candidato que se va a someter a prueba;

65 (b) medir la citólisis de las células T CD4<sup>+</sup> por las células NK activadas;

(c) comparar el valor de citólisis obtenido en la etapa (b) con el valor de citólisis obtenido cuando la etapa (a) se lleva a cabo en ausencia del compuesto candidato; seleccionar los compuestos candidatos que inhiben o bloquean la citólisis de las células T CD4<sup>+</sup> mediada por NK.

5 20. Procedimiento según la reivindicación 19, en el que las células NK activadas pueden consistir en células de una estirpe de células NK, o pueden consistir en un cultivo primario de células NK purificadas humanas normales.

10 21. Procedimiento según la reivindicación 19, en el que las células T CD4<sup>+</sup> que expresan la proteína NKp44L consisten en células T CD4<sup>+</sup>, eventualmente en forma de una estirpe celular, que se han transfectado con un vector que permite la expresión por dichas células de la proteína NKp44L, o consisten en células T CD4<sup>+</sup> que se purificaron inicialmente de una muestra de sangre de un paciente infectado con el VIH.

15 22. Procedimiento según la reivindicación 19, en el que las células NK activadas y las células T CD4<sup>+</sup> son autólogas y proceden ambas del mismo paciente infectado con el VIH.

20 23. Composición farmacéutica para tratar un individuo infectado con un virus de la familia del VIH, que comprende una cantidad eficaz de un compuesto que se selecciona de entre el grupo que consiste en (i) un anticuerpo dirigido a la proteína NKp44L de SEC ID N° 1, o a la parte del dominio extracelular de la misma, y (ii) un polinucleótido antisentido que se hibrida específicamente con las moléculas de ARNm que codifican la proteína NKp44L de SEC ID N° 1, en combinación con al menos un excipiente fisiológicamente aceptable.

25 24. Composición farmacéutica según la reivindicación 23, en la que dicho polinucleótido antisentido consiste en el ácido nucleico que es complementario al ácido nucleico que parte en el nucleótido n° 1 y que termina en el nucleótido n° 902 de la secuencia nucleotídica SEC ID N° 3.

30 25. Utilización de un compuesto que se selecciona de entre el grupo que consiste en (i) un anticuerpo dirigido a la proteína NKp44L de SEC ID N° 1, o a la parte del dominio extracelular de la misma, y (ii) un polinucleótido antisentido que se hibrida específicamente con las moléculas de ARNm que codifican la proteína NKp44L de SEC ID N° 1, para preparar una composición farmacéutica para tratar un individuo infectado con un virus de la familia del VIH.

35 26. Utilización según la reivindicación 25, en la que dicho polinucleótido antisentido consiste en el ácido nucleico que es complementario al ácido nucleico que parte en el nucleótido n°1 y que termina en el nucleótido n°902 de la secuencia nucleotídica SEC ID N°3.

27. Polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos siguiente:

PWASNASWSNKSLDDIW

40 28. Procedimiento para el cribado *in vitro* de compuestos para tratar la infección de un individuo con un virus del VIH, en el que dicho procedimiento comprende las etapas de:

45 (i) incubar un compuesto candidato que se va a someter a prueba con un polipéptido según la reivindicación 27,

(ii) someter a ensayo la unión del compuesto candidato que se va a someter a prueba con un polipéptido según la reivindicación 27.

50 29. Procedimiento según la reivindicación 28, en el que la etapa (ii) consiste en someter a un ensayo de migración en gel a la mezcla obtenida al final de la etapa (i), y detectar los complejos formados entre el compuesto candidato y un polipéptido según la reivindicación 27.

55 30. Procedimiento para el cribado *in vitro* de compuestos para tratar un individuo infectado con un virus del VIH, en el que dicho procedimiento comprende las etapas de:

a)

(i) poner en contacto un primer cultivo de células T CD4<sup>+</sup> con un compuesto candidato, y virus del VIH;

60 (ii) poner en contacto un segundo cultivo de células T CD4<sup>+</sup> con el virus del VIH, en ausencia de dicho compuesto candidato; y

b) detectar la presencia de NKp44L en la superficie de las células T CD4<sup>+</sup> proveniente del cultivo (i) y (ii).

65 31. Procedimiento según la reivindicación 30, que comprende una etapa adicional (c) que consiste en seleccionar positivamente el compuesto candidato como un agente terapéutico cuando el nivel de expresión de NKp44L en la

superficie de las células T CD4<sup>+</sup> proveniente del cultivo (ii) es mayor que el nivel de expresión de NKp44L en la superficie de las células T CD4<sup>+</sup> proveniente del cultivo (i).

5 32. Procedimiento para el cribado *in vitro* de compuestos para tratar un individuo infectado con un virus del VIH, en el que dicho procedimiento comprende las etapas de:

(i) someter un compuesto candidato a un procedimiento de cribado según cualquiera de las reivindicaciones 28 y 29, y

10 (ii) someter un compuesto candidato seleccionado positivamente en la etapa (i) al procedimiento de cribado según cualquiera de las reivindicaciones 30 y 31.

15 33. Composición farmacéutica para tratar un individuo infectado con un virus de la familia del VIH, que comprende una cantidad eficaz de un anticuerpo dirigido al polipéptido según la reivindicación 27.

34. Utilización de un anticuerpo dirigido al polipéptido según la reivindicación 27, para preparar una composición farmacéutica para prevenir o tratar la infección de un individuo con un virus de la familia del VIH.

20 35. Composición farmacéutica para tratar un individuo infectado con un virus de la familia del VIH, que comprende una cantidad eficaz de un polipéptido según la reivindicación 27, en combinación con al menos un excipiente fisiológicamente aceptable.



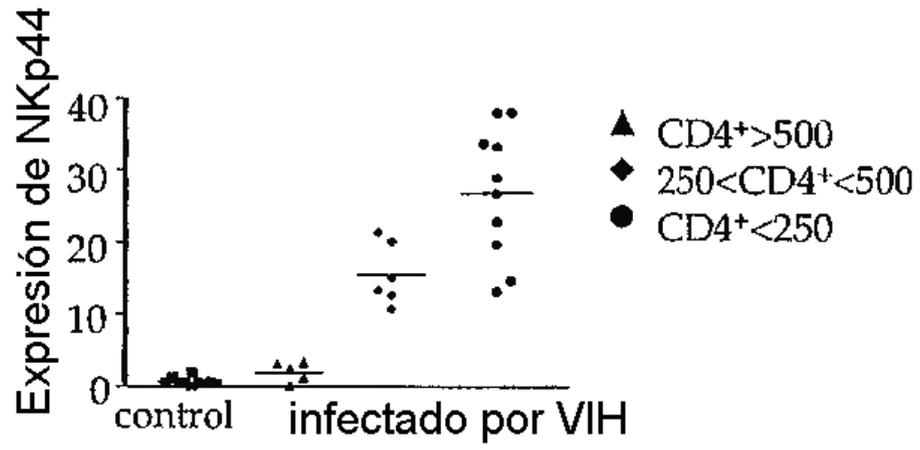


Figura 2

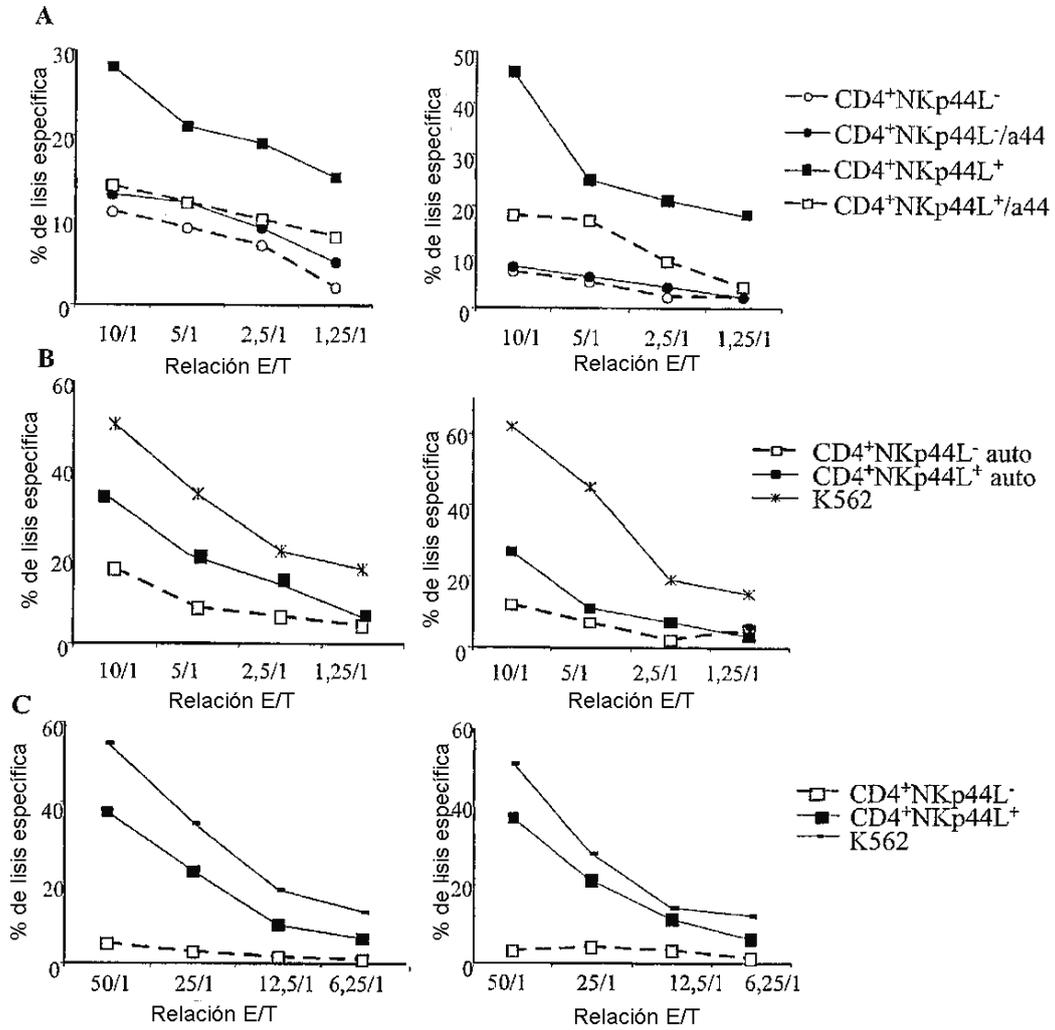
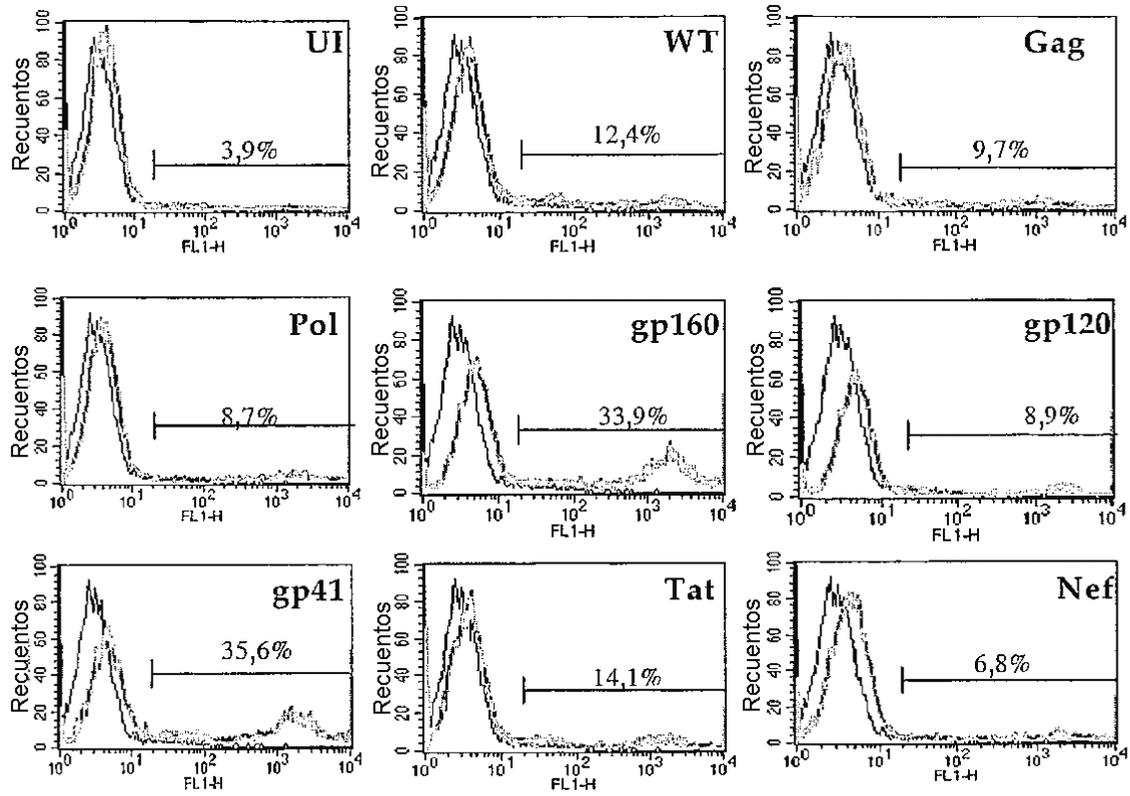


Figura 3



Expresión de NKp44L

Figura 4

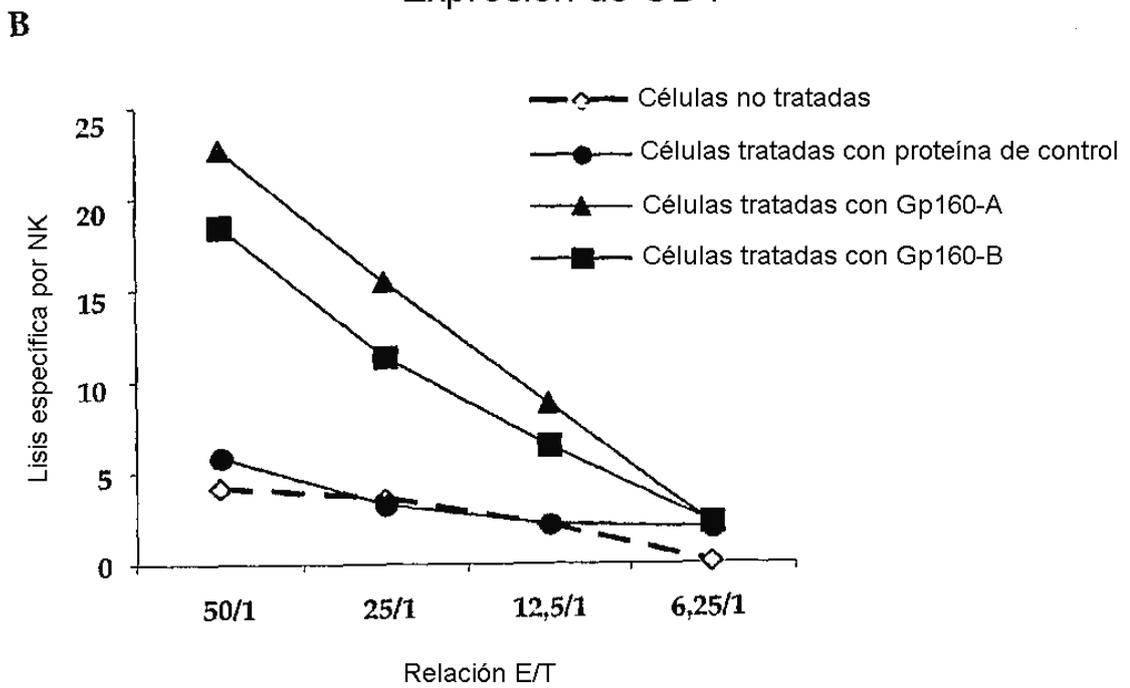
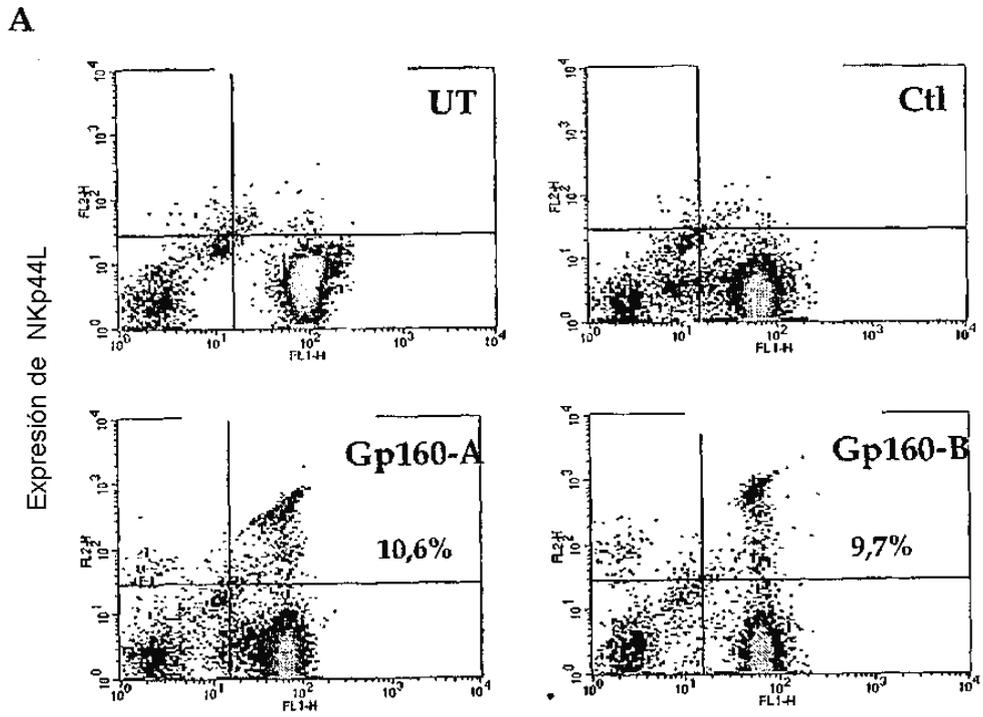
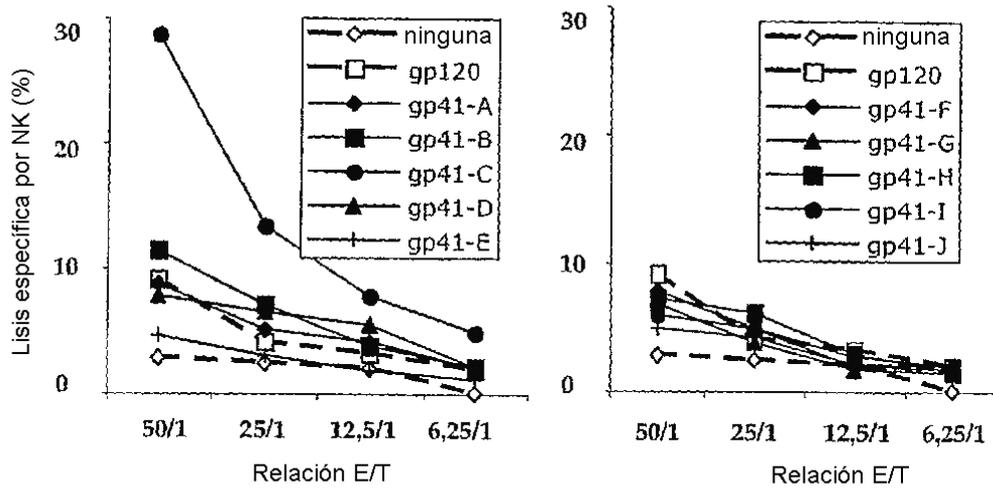


Figura 5

A



B

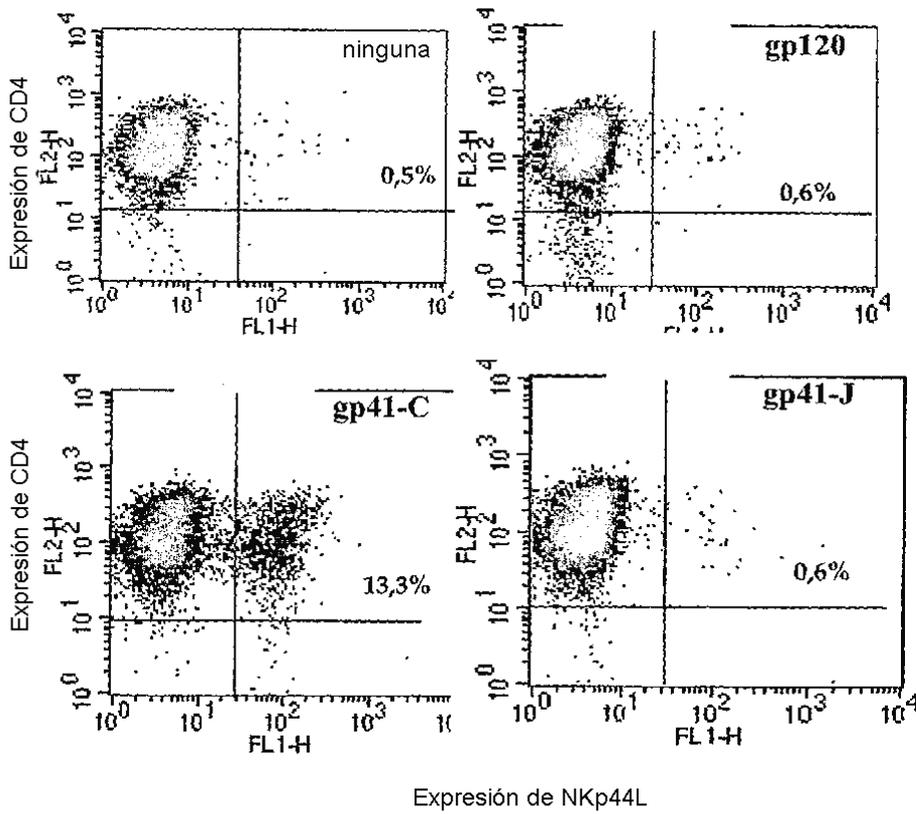


Figura 6

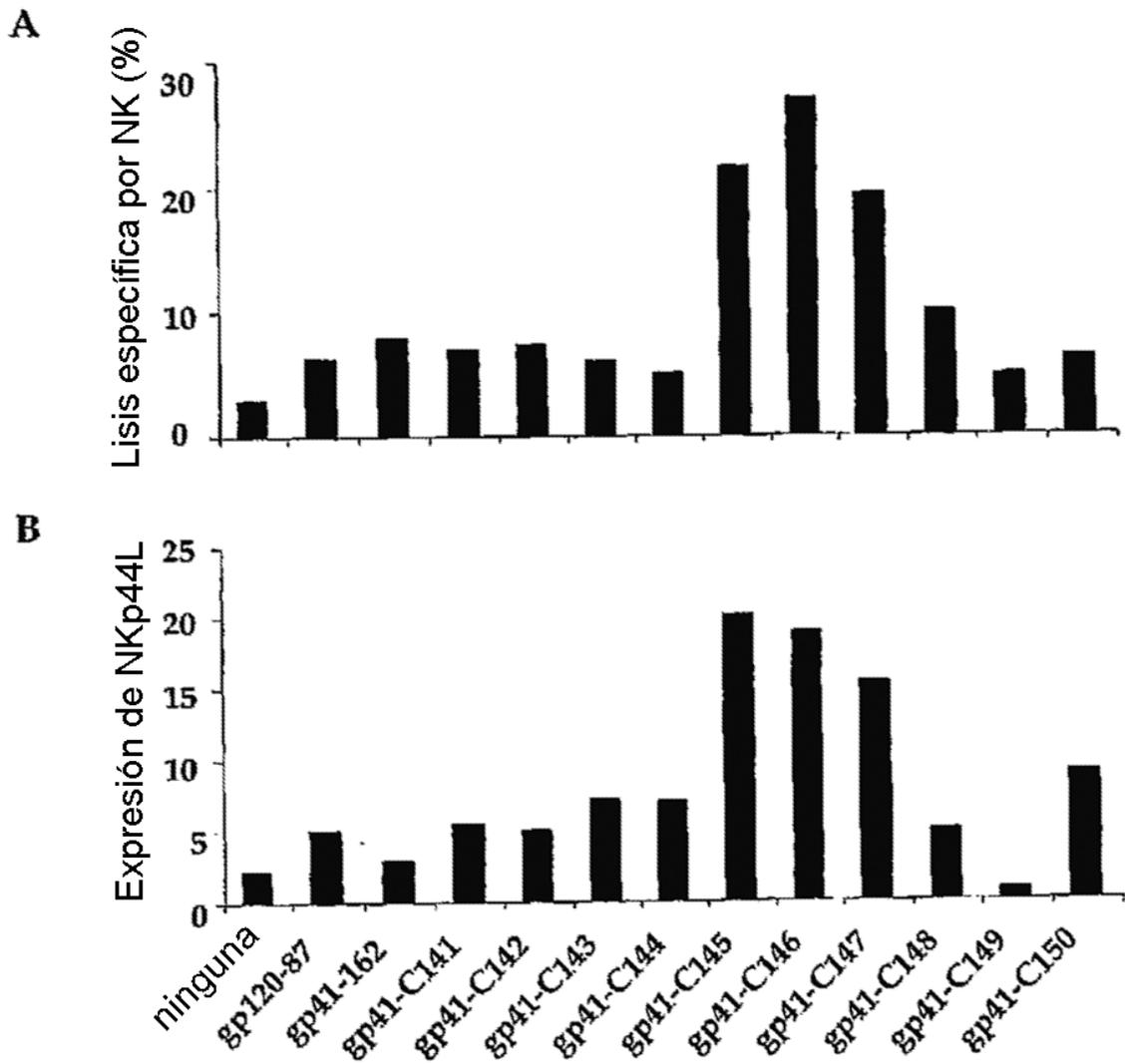


Figura 7

**A**  
 WT : NH<sub>2</sub>-PWASNA-SWSNKS-LDDIW-COOH  
 ctl1 : NH<sub>2</sub>-PWASNA-TWTQRT-LDDIW-COOH  
 ctl2 : NH<sub>2</sub>-PWGTQG-TWTQRT-IEELW-COOH

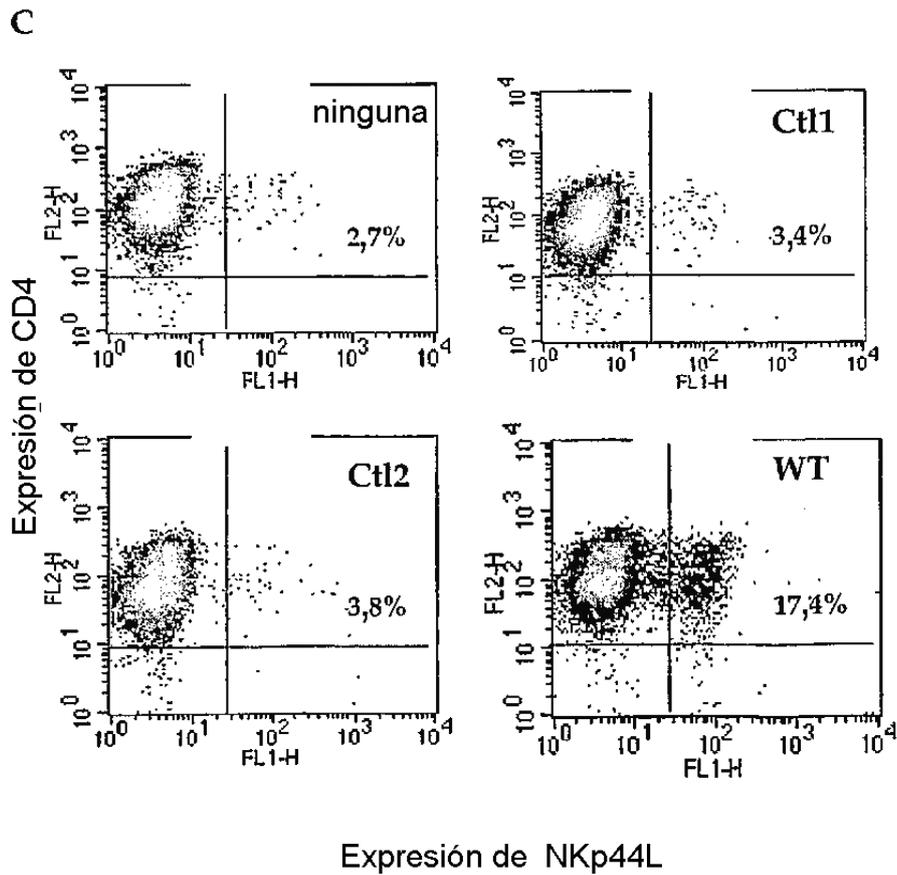
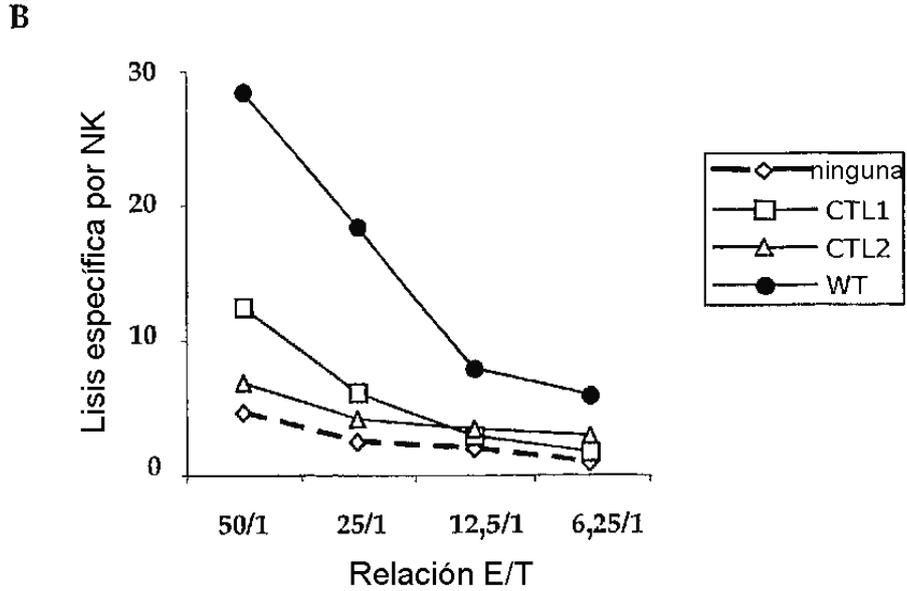


Figura 8

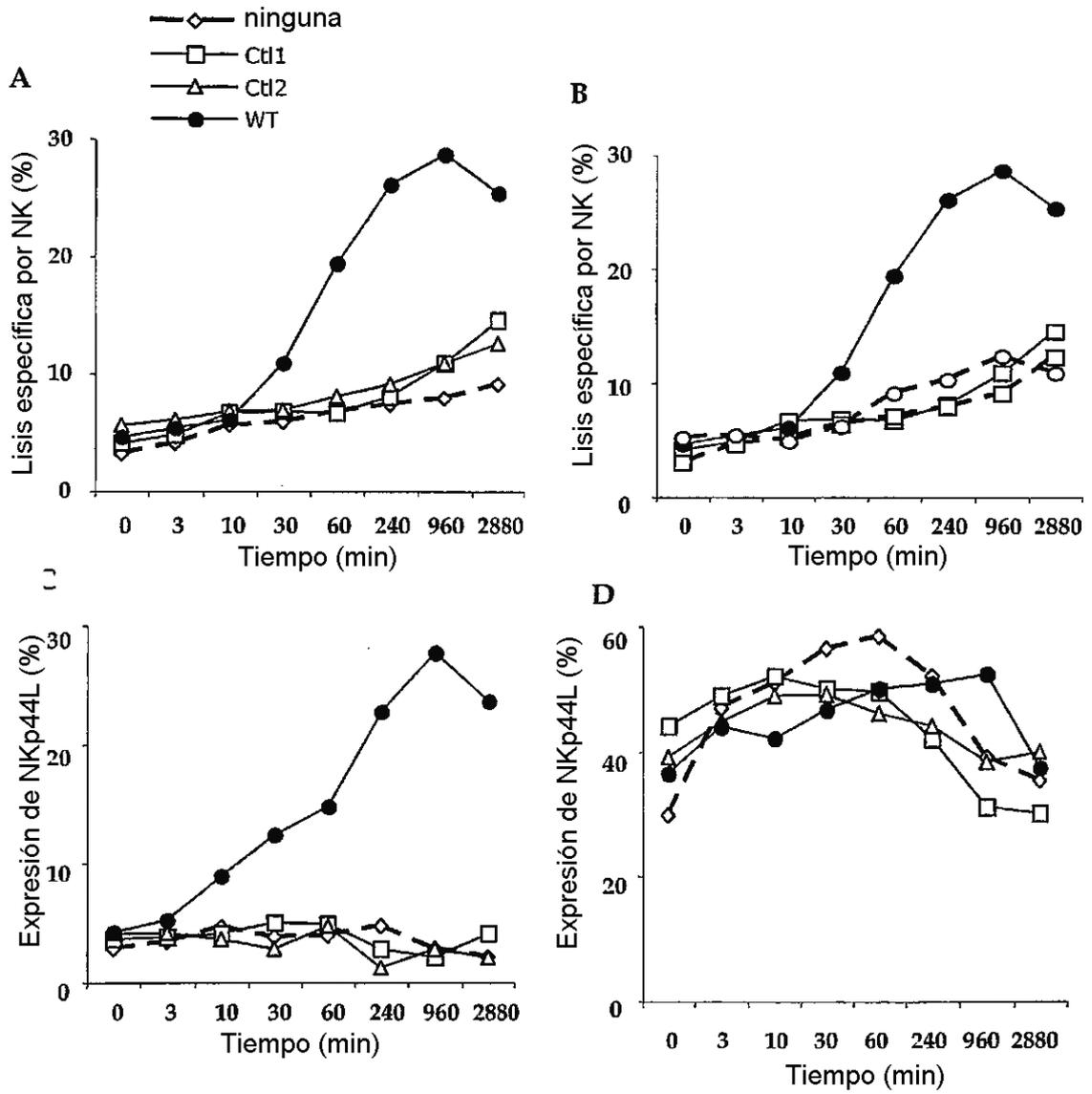


Figura 9

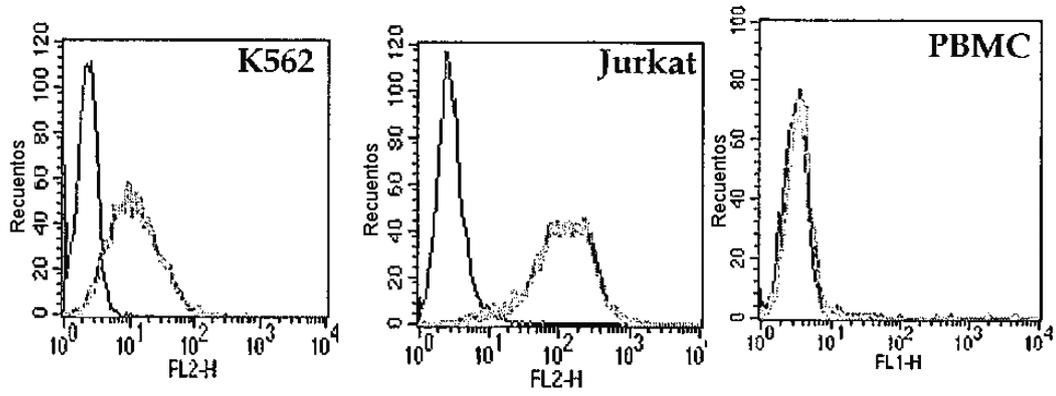


Figura 10