(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 633 990**

(51) Int. CI.:

C12Q 1/70 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.02.2003 E 14166270 (0)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.05.2017 EP 2808404**

(54) Título: **Evaluación del uso de receptor/correceptor viral**

(30) Prioridad:

15.02.2002 US 77027

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
26.09.2017

(73) Titular/es:

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

(72) Inventor/es:

PETROPOULOS, CHRISTOS J.;
WHITCOMB, JEANETTE M.;
HUANG, WEI y
WRIN, MARY T.

(74) Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

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

Evaluación del uso de receptor/correceptor viral

Antecedentes de la invención

La entrada de virus es una nueva diana atractiva para el tratamiento antiviral, y aproximadamente 10 fármacos que están diseñados para bloquear la unión del virus o fusión de la membrana están siendo evaluados actualmente en estudios clínicos o preclínicos (Richman, 1998; PhRMA, 1999; Stephenson, 1999). Los virus animales con envoltura se unen y entran en la célula hospedadora a través de la interacción de proteínas virales en la membrana del virión (proteínas de envoltura) y proteínas de la superficie celular (receptores de virus). La clarividencia y el enlace de receptores es mediado por la proteína de envoltura de superficie.

Sumario de la invención

Por consiguiente, es un objetivo de la presente divulgación proporcionar un ensayo fenotípico sensible y rápido para medir la susceptibilidad de un virus a inhibidores de la entrada del virus. Otro objetivo de la presente divulgación es proporcionar un sistema de vector retroviral que produzca partículas de virus que contengan proteínas de envoltura vírica derivadas de varias fuentes y la identificación de líneas celulares que expresan receptores víricos y toleran la replicación vírica.

Otro objetivo de la presente divulgación es proporcionar un vector de expresión para la envoltura vírica que sea capaz de aceptar segmentos derivados de pacientes que codifican genes de la envoltura.

Otro objetivo de la presente invención es proporcionar un vector bioseguro que represente la mayoría del genoma vírico del VIH-1 (HIV-1, en inglés), pero porte un gen indicador de luciferasa en lugar de la región de envoltura.

Otro objetivo de la presente divulgación es el ensayo fenotípico que reduce la probabilidad de formar VIH-1 infeccioso recombinante, proporcionando un vector de expresión vírica que porte una deleción en una región reguladora transcripcional (la copia 3' de U3) del genoma del VIH-1.

Otro objetivo de la presente divulgación es proporcionar un ensayo capaz de identificar y determinar el tropismo por el receptor/correceptor, que identifica de manera rápida y precisa los pacientes infectados con cepas de un virus trópico.

Estos y otros objetivos pueden lograrse mediante un método para determinar si un virus tiene una susceptibilidad alterada a un compuesto, comprendiendo dicho método: (a) poner en contacto una célula hospedadora con el compuesto, donde la célula hospedadora comprende un ácido nucleico derivado de virus y un gen indicador, la actividad del gen indicador está afectada por la actividad del ácido nucleico derivado de virus de manera que un cambio en la actividad del ácido nucleico derivado de virus da como resultado un cambio en la actividad del gen indicador, y el compuesto se dirige directa o indirectamente al ácido nucleico derivado de virus o una proteína que codifica, y (b) detectar la actividad del gen indicador, donde una diferencia en la actividad del gen indicador en la célula hospedadora en contacto con el compuesto en relación con la actividad en ausencia del compuesto, indica que el virus presenta una susceptibilidad alterada al compuesto.

En un aspecto de la divulgación, una primera célula comprende un ácido nucleico derivado de virus que codifica una proteína vírica y un vector de expresión vírica que carece del ácido nucleico que codifica la proteína vírica y que comprende un ácido nucleico indicador que produce una señal detectable, de manera que la primera célula produce una partícula vírica que comprende la proteína vírica codificada por el ácido nucleico derivado de virus. La primera célula puede ponerse en contacto con una segunda célula, por ejemplo, una célula hospedadora, en presencia del compuesto, donde la segunda célula expresa un receptor de superficie celular al que se une la partícula vírica. En una realización, la presente divulgación proporciona un método para identificar si un compuesto inhibe la entrada de un virus en una célula que comprende: (a) obtener ácido nucleico que codifica una proteína de envoltura vírica de un paciente infectado por el virus; (b) cotransfectar en una primera célula (i) el ácido nucleico de la etapa (a), y (ii) un vector de expresión vírica que carece de un ácido nucleico que codifica una proteína de envoltura, y que comprende un ácido nucleico indicador que produce una señal detectable, de manera que la primera célula produce partículas víricas que comprenden la proteína de envoltura codificada por el ácido nucleico obtenido del paciente; (c) poner en contacto las partículas víricas producidas en la etapa (b) con una segunda célula en presencia del compuesto, donde la segunda célula expresa un receptor de la superficie celular al que se une el virus; (d) medir la cantidad de señal producida por la segunda célula para determinar la infectabilidad de las partículas víricas; y (e) comparar la cantidad de señal medida en la etapa (d) con la cantidad de señal producida en ausencia del compuesto, donde una cantidad reducida de señal medida en presencia del compuesto indica que el compuesto inhibe la entrada del virus en la segunda célula.

En otro aspecto, una primera célula comprende un ácido nucleico derivado de virus que codifica una proteína vírica y un vector de expresión vírica que carece del ácido nucleico que codifica la proteína vírica, de manera que la primera

célula produce una partícula vírica que comprende la proteína vírica codificada por el ácido nucleico derivado de virus. La primera célula puede ponerse en contacto con una segunda célula, por ejemplo, una célula hospedadora, en presencia del compuesto, donde la segunda célula expresa un receptor de superficie celular al que se une la partícula vírica. Además, la segunda célula comprende un ácido nucleico indicador que produce una señal detectable. En una realización, el ácido nucleico indicador se integra en el ácido nucleico de la segunda célula.

En una realización, la presente divulgación proporciona un método para detectar en un paciente infectado por un virus el desarrollo de una respuesta de anticuerpos capaz de bloquear la infección que comprende: (a) poner en contacto una célula hospedadora con una preparación de anticuerpos del paciente, donde la célula hospedadora comprende un ácido nucleico que codifica una proteína vírica del paciente y un ácido nucleico indicador que produce una señal detectable; (b) medir la cantidad de señal detectable producida por la célula hospedadora; y (c) comparar la cantidad de señal medida en la etapa (b) con la cantidad de señal producida en ausencia de la preparación de anticuerpos, donde una cantidad reducida de señal medida en presencia de la preparación de anticuerpo indica que el paciente ha desarrollado una respuesta de anticuerpos a la proteína vírica capaz de bloquear la infección.

En otra realización, la presente divulgación proporciona un método para detectar en un paciente infectado por un virus el desarrollo de una respuesta de anticuerpos capaz de bloquear la infección que comprende: (a) transfectar en una primera célula (i) un ácido nucleico que codifica una proteína vírica del paciente, y (ii) un vector de expresión vírica que carece de un ácido nucleico que codifica la proteína vírica, y que comprende un ácido nucleico indicador que produce una señal detectable, de tal manera que la primera célula produce partículas víricas que comprenden la proteína vírica codificada por el ácido nucleico obtenido del paciente; (b) poner en contacto las partículas víricas producidas en el paso (a) con una preparación de anticuerpos del paciente; (c) poner en contacto las partículas víricas y la preparación de anticuerpos del paso (b) con una segunda célula, donde la segunda célula expresa un receptor de la superficie celular al que se une el virus; (d) medir la cantidad de señal detectable producida por la segunda célula para determinar la infectabilidad de las partículas víricas; y (e) comparar la cantidad de señal medida en la etapa (d) con la cantidad de señal producida en ausencia de la preparación de anticuerpos, donde una cantidad reducida de señal medida en presencia de la preparación de anticuerpos indica que el paciente ha desarrollado una respuesta de anticuerpos a la proteína vírica capaz de bloquear la infección.

En otra realización, la presente divulgación proporciona un método para detectar en un paciente infectado por un virus el desarrollo de una respuesta de anticuerpos capaz de bloquear la infección que comprende: (a) transfectar en una primera célula (i) un ácido nucleico que codifica una proteína vírica del paciente, y (ii) un vector de expresión vírica que carece de un ácido nucleico que codifica la proteína vírica, de manera que la primera célula produce partículas víricas que comprenden la proteína vírica codificada por el ácido nucleico obtenido del paciente; (b) poner en contacto las partículas víricas producidas en la etapa (a) con una preparación de anticuerpos del paciente; (c) poner en contacto las partículas víricas y preparación de anticuerpos de la etapa (b) con una segunda célula, donde la segunda célula expresa un receptor de la superficie celular al que se une el virus y donde la segunda célula comprende un ácido nucleico indicador que produce una señal detectable; (d) medir la cantidad de señal producida por la segunda célula para determinar la infectabilidad de las partículas víricas; y (e) comparar la cantidad de señal medida enla etapa (d) con la cantidad de señal producida en ausencia de la preparación de anticuerpo, donde una cantidad reducida de señal medida en presencia de la preparación de anticuerpo indica que el paciente ha desarrollado una respuesta de anticuerpos a la proteína vírica capaz de bloquear la infección.

En una realización, la proteína vírica es una proteína de envoltura. En otra realización, la proteína vírica es una proteína de la cápside.

En otra realización, la presente divulgación proporciona un método para detectar en un paciente infectado por un virus el desarrollo de una respuesta de anticuerpos capaz de bloquear la infección que comprende: (a) incubar una primera célula que comprende (i) un ácido nucleico que codifica una proteína vírica del paciente, y (ii) un vector de expresión vírica que carece de un ácido nucleico que codifica la proteína vírica, y que comprende un ácido nucleico indicador que produce una señal detectable, de manera que la primera célula produce partículas víricas que comprenden la proteína vírica codificada por el ácido nucleico obtenido del paciente; (b) poner en contacto las partículas víricas producidas en la etapa (a) con una preparación de anticuerpos del paciente; (c) poner en contacto las partículas víricas y preparación de anticuerpos de la etapa (b) con una segunda célula, donde la segunda célula expresa un receptor de la superficie celular al que se une el virus; (d) medir la cantidad de la señal detectable producida por la segunda célula para determinar la infectabilidad de las partículas víricas; y (e) comparar la cantidad de señal medida en la etapa (d) con la cantidad de señal producida en ausencia de la preparación de anticuerpos, donde una cantidad reducida de señal medida en presencia de la preparación de anticuerpos indica que el paciente ha desarrollado una respuesta de anticuerpos a la proteína vírica capaz de bloquear la infección. En una realización, el ácido nucleico de (i) es parte del vector de expresión vírica de (ii). En una realización, el ácido nucleico de (i) se integra en el genoma de la primera célula. En otra realización, el vector vírico de (ii) se integra en el genoma de la primera célula. En otra realización, el ácido nucleico de (i) y el vector vírico de (ii) se integran en el genoma de la primera célula. En una realización, la proteína vírica es una proteína de la cápside. En otra realización, la proteína vírica es una proteína de envoltura.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1A: Estructura de vectores de expresión de envoltura y expresión vírica
El vector de expresión de la envoltura del VIH (pHIVenv) se modifica para aceptar secuencias de la envoltura que han sido amplificadas a partir de muestras de plasma del paciente. Las designaciones a/b y c/d, hacen referencia a sitios de endonucleasa de restricción situados en los extremos 5' y 3' de la poliproteína de envoltura de VIH-1 (gp160). El vector de expresión de VIH (pHIVlucΔU3) codifica todas las proteínas del VIH excepto la poliproteína de envoltura. Una parte del gen de envoltura ha sido eliminada para acomodar un casete génico indicador, en este caso, "luciferasa de luciérnaga" que se usa para controlar la capacidad del virus de replicar en presencia o ausencia de fármacos antivirales. La región U3 en el extremo 3' ha sido parcialmente eliminada para evitar la transcripción desde LTR en el extremo 5' en células infectadas. El virus producido en este sistema si limita a una sola ronda de replicación.
Figura 1B: Ensayo de entrada basado en células
Se llevaron a cabo ensayos de susceptibilidad a fármacos, tropismo por correceptores y neutralización de virus cotransfectando una célula hospedadora con pHIVenv y pHIVlucΔU3. La célula hospedadora produce partículas de VIH que son pseudotipadas con secuencias de envoltura de VIH derivadas de la muestra del paciente o virus de prueba. Las partículas del virus se recogen (-48 h) tras la transfección y se usan para infectar las células diana que expresan receptores de VIH (por ejemplo, CD4) y correceptores (por ejemplo, CXCR4, CCR5). Tras la infección (-72 h) las células diana se lisan y se mide la actividad de la luciferasa. El VIH debe completar una ronda de replicación para infectar con éxito la célula hospedadora diana y producir actividad de luciferasa. Si el virus no es capaz de entrar en la célula diana, la actividad de la luciferasa es reducida. Este sistema puede usarse para evaluar la susceptibilidad a inhibidores de entrada, tropismo por receptor y correceptor y neutralización del virus.
Figura 2: Vectores de expresión de envoltura del VIH
Las secuencias de envoltura de VIH se amplifican a partir de muestras de paciente y se insertan en vectores de expresión usando los sitios de endonucleasa de restricción (5' a/b y 3'c/d). La transcripción de la envoltura se impulsa por el promotor génico temprano inmediato de citomegalovirus humano (CMV). El ARN con envoltura se poliadenila usando una secuencia de señal de poliadenilación (A+) del virus del simio 40 (SV40). Se diseña un intrón situado entre el promotor del CMV y las secuencias de envoltura del VIH para aumentar los niveles de ARNm con envoltura en las células transfectadas. FL expresa las proteína de envoltura de longitud completa (gp120, gp41); ΔCT expresa las proteínas de envoltura (gp120, gp21) que carecen del dominio de cola citoplasmática C-terminal de gp41; +CT expresa proteína de envoltura (gp120, gp41) que contienen un dominio de cola citoplasmática de gp41 predefinido constante; gp120 expresa proteínas gp120 derivadas del paciente junto con una gyp41 predefinida constante; gp 41 expresa una gyp120 predefinida constante junto con proteínas gp41 derivadas del paciente.
Figura 3A: Ensayo de exploración de tropismo por el correceptor
En esta figura, el ensayo se lleva a cabo usando dos líneas celulares. Una línea celular expresa CD4 y CCR5 (seis paneles superiores). La otra línea celular expresa CD4 y CXCR4 (seis paneles inferiores). El ensayo se lleva a cabo infectando células con un alto número de reservorios de virus recombinante derivado de células transfectadas con vectores pHIVlucΔU3 y pHIVenv. El ejemplo mostrado representa el análisis de 96 virus dispuestos en una placa de 96 pocillos las infecciones se llevan a cabo en ausencia de fármaco (sin fármaco), o en presencia de un fármaco que inhibe de manera preferente los virus R5-trópicos (inhibidor de CCR) y X4-trópicos (inhibidor de CXCR4). El tropismo por el correceptor se evalúa comparando la cantidad de actividad de luciferasa producida en cada tipo celular, tanto en presencia como en ausencia de fármaco (véase la Figura 3B para la interpretación de resultados de ensayo).
Figura 3B: Determinación del tropismo por el correceptor
En esta figura, se interpretan los resultados del ensayo comparando la capacidad de cada virus de muestra de infectar (producir actividad de luciferasa) células que expresan CD4/CCR5 (células R5) o células que expresan CD4/CXCR4 (células X4). También se evalúa la capacidad de un inhibidor de CCR5 o CXCR4 para bloquear específicamente la infección (inhibir la actividad de luciferasa). Los virus X4-trópicos (paneles verdes) infectan células X4 pero no células R5. La infección de células X4 se bloquea por el inhibidor de CXCR4. Los virus R5-trópicos (paneles azules) infectan células R5 pero no células X4. La infección de células R5 se bloquea por el inhibidor de CCR5. Las mezclas X4/R5 o de tropismo dual (paneles amarillos) infectan células X4 y R5. La infección de células R5 se bloquea por el inhibidor de CCR5 y la infección de células X4 se bloquea por el inhibidor de CXCR4. Los virus no viables (paneles rojos) no replican ni en células X4 ni en células R5.
Figura 4A: Medición de susceptibilidad al inhibidor de entrada para inhibidor de fusión
En esta figura, se demuestra la susceptibilidad al inhibidor de fusión T-20. Las células que expresan CD4, CCR5 y CXCR4 se infectaron en ausencia de T-24 y con una amplia gama de concentraciones de T-20 (escala log10 eje x). Se determinó el porcentaje de inhibición de replicación vírica (eje y) comparando la cantidad de luciferasa producida en células infectadas en presencia de T-20 con la cantidad de luciferasa producida en ausencia de T-20. Se sometieron a ensayo virus de tropismo dual, R5-trópicos y X4-trópicos. Se cuantificó la susceptibilidad al fármaco determinando la concentración de T-20 necesaria para inhibir el 50 % de la replicación vírica (CI50, mostrado como líneas discontinuas verticales). Los virus con valores de CI50 más bajos son más susceptibles a T-20 que los virus con valores de CI50 más altos. NL4-3: cepa X4-trópica bien caracterizada JRCSF; cepa R5-trópica bien caracterizada 91US005.11: aislado R5-trópico obtenido del NIH AIDS Research and Reference Reagent Program (ARRRP) 92HT593.1: aislado de tropismo dual (X4R5) obtenido del NIH

ARRRP.92HT599.24:aislado X4-trópico obtenido del NIH ARRRP.

Figura 4B: Medición de la susceptibilidad al inhibidor de entrada con mutaciones de resistencia al fármaco

En esta figura, se demuestra la susceptibilidad reducida al inhibidor de fusión T-20 conferida por las mutaciones de resistencia al fármaco específicas en la proteína de envoltura gp41. Se infectaron células que expresan CD4, CCR5 y CXCR4 en ausencia de T-20 y con una amplia gama de concentraciones de T-20 (escala log10 eje x). El porcentaje de inhibición de replicación vírica (eje y) se determinó comparando la cantidad de luciferasa producida en células infectadas en presencia de T-20 con la cantidad de luciferasa producida en ausencia de T-20. Se sometieron a ensayo virus isogénicos que contenían una o dos mutaciones específicas en la proteína de envoltura transmembrana gp41 (destacado en rojo en la leyenda de la figura). La susceptibilidad al fármaco se cuantificó determinando la concentración de T-20 necesaria para inhibir el 50 % de la replicación vírica (CI50, mostrado como líneas discontinuas verticales). Los virus con valores de CI50 más bajos son más susceptibles a T-20 que los virus con valores de CI50 más altos.

Sin mutación (secuencia de tipo silvestre): GIV

Mutaciones sencillas: GIV, DIM, SIV

Mutaciones dobles: DIM, SIM, DTV

Figura 5A: Medición de susceptibilidad al inhibidor de entrada para inhibidor de CCR5

En esta figura, se demuestra la susceptibilidad a un inhibidor de CCR5 (compuesto de merck). Se infectaron células que expresan CD4 y CCR5 (células R5) en ausencia del inhibidor de CCR5 y con una amplia gama de concentraciones de inhibidor de CCR5 (escala log10 eje x). Se determinó el porcentaje de inhibición de replicación vírica (eje y) comparando la cantidad de luciferasa producida en células infectadas en presencia de inhibidor de CCR5 con la cantidad de luciferasa producida en ausencia de inhibidor de CCR5. Se sometieron a ensayo virus de tropismo dual, R5-trópicos y X4-trópicos. Se cuantificó la susceptibilidad al fármaco determinando la concentración de inhibidor de CCR5 necesaria para inhibir el 50 % de la replicación vírica (CI50, mostrado como líneas discontinuas verticales). Los virus con valores de CI50 más bajos son más susceptibles al inhibidor de CCRF que los virus con valores de CI50 más altos. El virus X4-trópico no infectó las células R5. NL4-3: cepa X4-trópica bien caracterizada

JRCSF: cepa R5-trópica bien caracterizada 92HT593.1: Aislado de tropismo dual (X4R5) obtenido del NIH ARRRP.

Figura 5B: Medición de susceptibilidad al inhibidor de entrada para inhibidor de CXCR4

En esta figura, se demuestra la susceptibilidad a un inhibidor de CXCR4 (AMD3100). Se infectaron células que expresan CD4 y CXCR4 (células X4) en ausencia del inhibidor de CXCR4 y con una amplia gama de concentraciones de inhibidor de CXCR4 (escala log10 eje x). El porcentaje de inhibición de replicación vírica (eje y) se determinó comparando la cantidad de luciferasa producida en células infectadas en presencia de inhibidor de CXCR4 con la cantidad de luciferasa producida en ausencia de inhibidor de CXCR4. Se sometieron a ensayo virus de tropismo dual, R5-trópicos y X4-trópicos. Se cuantificó la susceptibilidad al fármaco determinando la concentración de CXCR4 necesaria para inhibir el 50 % de la replicación vírica (CI50, mostrado como líneas discontinuas verticales). Los virus con valores de CI50 más bajos son más susceptibles al inhibidor de CCR5 que los virus con valores de CI50 más altos. El virus R5-trópico no infectó las células X4.

NL4-3: cepa X4-trópica bien caracterizada

JRCSF: cepa R5-trópica bien caracterizada

92HT593.1: Aislado de tropismo dual (X4R5) obtenido del NIH ARRRP.

Figura 6: Amplificación de la secuencia de envoltura

Esta figura demuestra que se generan los amplicones correspondientes a la secuencia de envoltura de longitud completa o secuencia de envoltura eliminada de la cola citoplasmática. El número de vía corresponde al tropismo por el correceptor mostrado al lado de cada número a la derecha de los geles.

Figura 7: Expresión de correceptor y receptor de la célula diana

Se muestran diagramas de dispersión que indican los resultados de ensayos de clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) utilizando anticuerpos contra CCR5 o CXCR4 (mostrado en el eje Y). Las líneas celulares expresan los correceptores enumerados bajo los gráficos y se muestra la fluorescencia de CD4 a lo largo del eje X. El anticuerpo antiCXCR4 se une más fuertemente con las células que expresan el correceptor correspondiente, CXCR-4.

Figura 8: Inhibición por antagonistas de correceptor

Se muestra la inhibición de X4 y R5 tras la administración de antagonistas de correceptores.

Figura 9: Péptidos inhibidores de fusión

Se muestra la secuencia de aminoácidos y mapa del inhibidor de CXCR4 para un péptido que es un inhibidor de fusión entre una membrana vírica y una membrana celular.

Figura 10: Neutralización de infectabilidad vírica

Se incubaron virus con diluciones 1/5 en serie de anticuerpo (plasma) y se usaron para infectar células diana U-87/CD4/CCR5/CXCR4. Se sometieron a ensayo muestras de virus en serie (columnas) frente a muestras de anticuerpos en serie (filas) usando un formato de matriz. Los valores de neutralización representan la dilución de plasma (anticuerpo) exigida para inhibir la infectabilidad del virus en un 50 % (CI50). Cuanto más alto es el número, mayor es la dilución, lo que refleja títulos más altos de neutralización de los anticuerpos. Se representan las fechas de recolección de muestras como dd/mm/aa. La actividad neutralizante de cada muestra de plasma también se sometió a ensayo frente a dos virus de referencia: NL4-3 (cepa de laboratorio X4), JRCSF (aislado primario R5).

La presente invención en sus características concretas puede ser más evidente a partir de la siguiente descripción detallada considerada en relación con las figuras y ejemplos adjuntos. La siguiente descripción analiza los significados y métodos para llevar a cabo la presente invención que pertenece a un ensayo fenotípico relacionado con la identificación y evaluación de inhibidores de la entrada vírica, incluyendo por ejemplo, y no como limitación de la presente invención, VIH-1 e inhibidores de la entrada vírica de VIH-1.

Descripción detallada de la invención

Esta divulgación proporciona un método para determinar si un virus presenta una susceptibilidad alterada a un compuesto, comprendiendo dicho método: (a) poner en contacto una célula hospedadora con el compuesto, donde la célula hospedadora comprende un ácido nucleico derivado de virus y un gen indicador, la actividad del gen indicador está afectada por la actividad del ácido nucleico derivado de virus de manera que un cambio en la actividad del ácido nucleico derivado de virus da como resultado un cambio en la actividad del gen indicador, y el compuesto se dirige directa o indirectamente al ácido nucleico derivado de virus o una proteína que codifica, y (b) detectar la actividad del gen indicador, donde una diferencia en la actividad del gen indicador en la célula hospedadora en contacto con el compuesto en relación con la actividad en ausencia del compuesto, indica que el virus presenta una susceptibilidad alterada al compuesto.

En una realización, la divulgación proporciona un método para identificar si un compuesto inhibe la entrada de un virus en una célula que comprende: (a) obtener ácido nucleico que codifica una proteína de envoltura vírica de un paciente infectado por el virus; (b) cotransfectar en una primera célula (i) el ácido nucleico de la etapa (a), y (ii) un vector de expresión vírica que carece de un ácido nucleico que codifica una proteína de envoltura, y que comprende un ácido nucleico indicador que produce una señal detectable, de manera que la primera célula produce partículas víricas que comprenden la proteína de envoltura codificada por el ácido nucleico obtenido del paciente; (c) poner en contacto las partículas víricas producidas en la etapa (b) con una segunda célula en presencia del compuesto, donde la segunda célula expresa un receptor de la superficie celular al que se une el virus; (d) medir la cantidad de señal producida por la segunda célula para determinar la infectabilidad de las partículas víricas; y (e) comparar la cantidad de señal medida en la etapa (d) con la cantidad de señal producida en ausencia del compuesto, donde una cantidad reducida de señal medida en presencia del compuesto indica que el compuesto inhibe la entrada del virus en la segunda célula.

En otra realización, la divulgación proporciona un método para identificar si un compuesto inhibe la entrada de un virus en una célula que comprende: (a) obtener ácido nucleico que codifica una proteína de envoltura vírica de un paciente infectado por el virus; (b) cotransfectar en una primera célula (i) el ácido nucleico de la etapa (a), y (ii) un vector de expresión vírica que carece de un ácido nucleico que codifica la proteína de envoltura, de tal manera que la primera célula produce partículas víricas que comprenden la proteína de envoltura codificada por el ácido nucleico obtenido del paciente; (c) poner en contacto las partículas víricas producidas en la etapa (b) con una segunda célula en presencia del compuesto, donde la segunda célula expresa un receptor de la superficie celular al que el virus y donde la segunda célula comprende un ácido nucleico indicador que produce una señal detectable se une; (d) medir la cantidad de señal producida por la segunda célula para determinar la infectabilidad de las partículas víricas; y (e) comparar la cantidad de señal medida en el paso (d) con la cantidad de señal producida en ausencia del compuesto, donde una cantidad reducida de señal medida en presencia del compuesto indica que el compuesto inhibe la entrada del virus en la segunda célula.

En otra realización, el ácido nucleico indicador comprende un gen indicador. En otra realización de la presente invención, el gen indicador es un gen de luciferasa.

En una realización, el receptor de la superficie celular es CD4. En una realización, el receptor de la superficie celular es un receptor de quimiocinas. En una realización, el receptor de la superficie celular es CXCR4 o CCR5.

En una realización, el paciente está infectado con el virus VIH-1, un virus de hepatitis (como el virus VHB o VHC), o cualquier otro virus. En una realización, el ácido nucleico de la etapa (a) comprende ADN que codifica gp120 y gp4L. En una realización, el vector de expresión vírica comprende ácido nucleico de VIH. En una realización, el vector de expresión vírica comprende un gen gag-pol de VIH. En una realización, el vector de expresión vírica comprende ADN que codifica vif, vpr, tat, rev, vpu, y nef.

En una realización, la primera célula es una célula de mamífero. En una realización, la célula de mamífero es una célula humana. En una realización, la célula humana es una célula de riñón de embriones humanos. En una realización, la célula del riñón de embrión humano es una célula 293.

En una realización, la segunda célula es un linfocito T humano. En una realización, la segunda célula es una línea celular de leucemia de linfocito T humano. En una realización, la segunda célula es una célula mononuclear de sangre periférica. En una realización, la segunda célula es una célula de astroglioma. En una realización, la célula de astroglioma es una célula U87. En una realización, la segunda célula es una célula de osteosarcoma humana. En una realización, la célula de osteosarcoma humana es una célula HT4.

En una realización, el compuesto se une al receptor de la superficie celular. En una realización, el compuesto es un ligando del receptor de la superficie celular. En una realización, el compuesto comprende un anticuerpo. En una realización, el compuesto inhibe la fusión de la membrana. En una realización, el compuesto es un péptido, un peptidomimético, una molécula orgánica o un compuesto sintético. En una realización, el compuesto se une a la proteína de envoltura vírica.

La presente divulgación proporciona un método para hacer una composición que comprende mezclar el compuesto seleccionado mediante el método de detección (método para identificar un compuesto) descrito en el presente documento con un vehículo. En una realización, el vehículo es solución salina, polietilenglicol, una solución amortiguadora, un almidón o un solvente orgánico.

La presente divulgación proporciona un método para identificar un receptor de la superficie celular que es enlazado por un virus con la infección de una célula por el virus que comprende: (a) obtener partículas víricas que comprenden (i) un ácido nucleico viral y (ii) un ácido nucleico indicador que produce una señal detectable; (b) poner en contacto una célula que expresa un receptor de la superficie celular con las partículas víricas del paso (a); y (c) medir la cantidad de señal detectable producida dentro de la célula, donde la producción de la señal indica que el receptor de la superficie celular expresado por la célula es enlazado por el virus, identificando así el receptor de la superficie celular como enlazado al virus con la infección de la célula.

La presente divulgación proporciona también un método para identificar si un anticuerpo inhibe la entrada de un virus en una célula que comprende: (a) obtener ácido nucleico que codifica una proteína de envoltura vírica de un paciente infectado por el virus; (b) cotransfectar en una primera célula (i) el ácido nucleico de la etapa (a), y (ii) un vector de expresión vírica que carece de un ácido nucleico que codifica una proteína de envoltura, y que comprende un ácido nucleico indicador que produce una señal detectable, de tal manera que la primera célula produce partículas víricas que comprenden la proteína de envoltura codificada por el ácido nucleico obtenido del paciente; (c) poner en contacto las partículas víricas producidas en la etapa (b) con una segunda célula en presencia del anticuerpo, donde la segunda célula expresa un receptor de la superficie celular al que el virus se une; (d) medir la cantidad de señal producida por la segunda célula para determinar la infectabilidad de las partículas víricas; y (e) comparar la cantidad de señal medida en la etapa (d) con la cantidad de señal producida en ausencia del compuesto, donde una cantidad reducida de señal medida en presencia del anticuerpo indica que el anticuerpo inhibe la entrada del virus en la segunda célula.

La presente divulgación proporciona un método para determinar la susceptibilidad de un virus a un compuesto que inhibe la entrada del virus en la célula que comprende: (a) obtener ácido nucleico que codifica una proteína de envoltura vírica de un paciente infectado por el virus; (b) cotransfectar en una primera célula (i) el ácido nucleico de la etapa (a), y (ii) un vector de expresión vírica que carece de un ácido nucleico que codifica una proteína de envoltura, y que comprende un ácido nucleico indicador que produce una señal detectable, de manera que la primera célula produce partículas víricas que comprenden la proteína de envoltura codificada por el ácido nucleico obtenido del paciente; (c) poner en contacto las partículas víricas producidas en la etapa (b) con una segunda célula en presencia del compuesto, donde la segunda célula expresa un receptor de la superficie celular al que se une el virus; (d) medir la cantidad de señal producida por la segunda célula para determinar la infectabilidad de las partículas víricas; y (e) comparar la cantidad de señal medida en la etapa (d) con la cantidad de señal producida en ausencia del compuesto, donde una cantidad reducida de señal medida en presencia del compuesto indica que el virus es susceptible al compuesto.

La presente divulgación proporciona un método para determinar si un virus presenta una resistencia aumentada a un compuesto que inhibe la entrada del virus en una célula en comparación con un virus de referencia, comprendiendo dicho método: (a) determinar la susceptibilidad de un virus a un compuesto, por ejemplo, según el método descrito anteriormente, en un primer momento; (b) determinar la susceptibilidad del virus al compuesto en un segundo momento posterior, y (c) comparar las susceptibilidades determinadas en las etapas (a) y (b), donde una disminución en la susceptibilidad del segundo momento posterior indica una resistencia aumentada del virus al compuesto.

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

En una realización, el virus obtenido en la etapa (b) es el virus de la etapa (a) cultivado en presencia del compuesto hasta que se desarrolla resistencia.

En una realización, el virus obtenido en la etapa (b) ese aísla a partir de un paciente que ha sido sometido a tratamiento con el compuesto.

En una realización preferida, la presente divulgación proporciona un medio y un método para medir de manera precisa y reproducible la susceptibilidad de VIH-1 a inhibidores de la entrada de virus.

En otra realización preferida, la presente divulgación también proporciona un medio y un método para medir de manera precisa y reproducible el tropismo por el correceptor de VIH-1.

En una realización preferida, la divulgación proporciona un medio y un método para medir de manera precisa y reproducible la neutralización mediada por anticuerpos de VIH-1.

En una realización preferida, la presente divulgación proporciona además un medio y un método para descubrir, optimizar y caracterizar fármacos nuevos o novedosos que se dirigen a diversas etapas definidas o aún por definir en el proceso de entrada y unión del virus.

En una realización preferida, la presente divulgación proporciona además un medio y un método para descubrir, optimizar y caracterizar vacunas del VIH-1 (bien preventivas o terapéuticas) que se dirigen a diversas etapas definidas y aún por definir en el proceso de entrada y unión del virus.

En una realización preferida, la presente divulgación proporciona un medio y un método para identificar mutaciones/sustituciones de aminoácidos en las proteínas de envoltura del VIH-1 (gp41TM y gp120SU) que alteran la susceptibilidad a inhibidores de entrada del virus.

En una realización preferida, la presente divulgación proporciona un medio y un método para cuantificar el efecto que tienen las mutaciones específicas en la envoltura del VIH-1 sobre la susceptibilidad al inhibidor de la entrada de virus.

En una realización preferida, la presente divulgación proporciona además un medio y un método para determinar las mutaciones/sustituciones de aminoácidos de envoltura del VIH-1 que se observan de manera frecuente, bien solas o en combinación, en virus que presentan una susceptibilidad alterada a los inhibidores de entrada de virus.

En una realización preferida, la presente divulgación proporciona un medio y un método para identificar mutaciones/sustituciones de aminoácidos en las proteínas de envoltura del VIH-1 (gp41TM y gp120SU) que alteran el tropismo por el correceptor o receptor.

En una realización preferida, la presente divulgación proporciona un medio y un método para cuantificar el efecto que tienen las mutaciones específicas en la envoltura del VIH-1 sobre el tropismo por el receptor o correceptor.

En una realización preferida, la presente divulgación proporciona además un medio y un método para identificar las mutaciones/sustituciones de aminoácidos de envoltura del VIH-1 que se observan de manera frecuente, bien solas o en combinación, en virus que presentan tropismo por el correceptor CXCR4 o CCR5.

En una realización preferida, la presente divulgación proporciona un medio y un método para identificar mutaciones/sustituciones de aminoácidos en las proteínas de envoltura del VIH-1 (gp41TM y gp120SU) que alteran la neutralización medida por anticuerpos.

En una realización preferida, la presente divulgación proporciona un medio y un método para cuantificar el efecto que tienen mutaciones específicas en la envoltura de VIH-1 sobre la neutralización mediada por anticuerpos.

En una realización preferida, la presente divulgación proporciona además un medio y un método para identificar las mutaciones/sustituciones de aminoácidos de la envoltura de VIH-1 que se observan frecuentemente, bien solas o en combinación, en virus que presentan neutralización de virus mediada por anticuerpos.

En una realización preferida, la presente divulgación proporciona además un medio y un método para identificar los anticuerpos que se observan frecuentemente en virus de muestras de pacientes que son capaces de neutralizar el VIH-1.

En una realización preferida, la presente divulgación proporciona además un medio y un método para la identificación de virus que necesitan la unión a CD4 para la infección.

En una realización preferida, la presente divulgación proporciona además un medio y un método para la identificación de virus que no exigen la unión a CD4 para la infección.

En una realización preferida, la presente divulgación proporciona también un medio y un método para la identificación de la incidencia de muestras de pacientes que presentan infección independiente de CD4.

En una realización preferida, la presente divulgación proporciona además un medio y un método para la identificación de virus que necesitan la unión a CD8 para la infección.

En una realización preferida, la presente divulgación proporciona también un medio y un método para la identificación de la incidencia de virus de pacientes que presentan infección dependiente de CD8.

En una realización preferida, la presente divulgación proporciona además un medio y un método para la identificación de virus que requieren el enlace al receptor de quimiocina CXCR4, el enlace al receptor de quimiocina CCR5, o el enlace a CXCR4 o CCR5 (tropismo dual) para la infección.

En una realización preferida, la presente divulgación proporciona además un medio y un método para identificar la incidencia de virus que exigen la unión al receptor de quimiocina CXCR4, la unión al receptor de quimiocina CCR5, o la unión a CXCR4 o CCR5 (tropismo dual) para la infección.

En una realización preferida, la presente divulgación proporciona además un medio y un método para identificar las mutaciones/sustituciones de aminoácidos de envoltura del VIH-1 que se observan de manera frecuente, bien solas o en combinación, en virus que presentan (a) susceptibilidad alterada a los inhibidores de la entrada de virus, (b) tropismo por el correceptor CXCR4 o CCR5, y (c) neutralización de virus mediada por anticuerpos.

En una realización preferida, la presente divulgación proporciona un medio y un método para usar la susceptibilidad a inhibidores de entrada de virus para controlar el tratamiento del VIH-1.

En una realización preferida, la presente divulgación proporciona además un medio y un método para usar la susceptibilidad a inhibidores de entrada de virus para controlar el tratamiento de pacientes en los que fracase el tratamiento con fármacos antirretrovirales.

En una realización preferida, la presente divulgación proporciona además un medio y métodos para usar la susceptibilidad a inhibidores de entrada de virus para controlar el tratamiento de pacientes infectados recientemente con VIH-1.

En una realización preferida, la presente divulgación proporciona un medio y un método para usar el tropismo por los correceptores de VIH-1 para controlar el tratamiento del VIH-1 o para controlar el tratamiento de pacientes en los que fracasa el tratamiento con fármacos antirretrovirales.

En una realización preferida, la presente divulgación proporciona además un medio y un método para usar el tropismo por los correceptores de VIH-1 para controlar el tratamiento de pacientes infectados recientemente con VIH-1.

En una realización preferida, la presente divulgación proporciona además un medio y un método para medir la neutralización mediada por anticuerpos del VIH-1 para controlar la respuesta inicial de anticuerpos protectores tras la vacunación.

En una realización preferida, la presente divulgación proporciona además un medio y un método para medir la neutralización mediada por anticuerpos de VHC-1 para controlar la respuesta inicial de anticuerpos terapéuticos tras la vacunación.

En una realización preferida, la presente divulgación proporciona además un medio y un método para medir la neutralización mediada por anticuerpos del VIH-1 con el paso del tiempo para controlar la durabilidad de una respuesta de anticuerpos protectores tras la vacunación.

En una realización preferida, la presente divulgación proporciona además un medio y un método para medir la neutralización mediada por anticuerpos de VIH-1 para desarrollar y optimizar programas de inducción-refuerzo (*prime-boost*) de vacunación que maximicen la potencia y durabilidad de la vacunación.

Por ejemplo, en el caso del VIH-1, la proteína SU (gp120-SU) está sólidamente asociada a la proteína de envoltura transmembrana (gp41-TM) que ancla el complejo a la membrana del virus. Las proteínas de envoltura gp120 y gp41 se derivan mediante escisión de gp160, el producto del precursor no escindido del gen de envoltura. El enlace de VIH-1 a su receptor celular (CD4) y correceptor (CCR5 o CXCR4) promueve cambios conformacionales en la proteína TM resultando en la fusión de la membrana celular y vírica y la entrada del núcleo del virus en el citoplasma (*Retroviruses*, 1997). Aunque los nuevos inhibidores de entrada de VIH se dirigen a proteínas de envoltura vírica (gp120/gp41) o proteínas del hospedador (CD4, CCR5, CXCR4), la mayoría de mutaciones asociadas a la resistencia en VIH-1 se espera que estén localizadas en el gen de envoltura vírica; por ejemplo, una manera probable en la que los virus pueden evolucionar es cambiar la utilización de correceptor. Los bloqueadores de entrada constituyen una clase novedosa de fármacos antirretrovirales, y el potencial de amplia actividad frente a las variantes de VIH-1 resistentes a múltiples fármacos actuales es alto. Entre la clase de bloqueadores de entrada viral potenciales se encuentran los inhibidores de fusión, antagonistas de receptor/correceptor y vacunas.

No obstante, es probable que los inhibidores de la entrada del virus generen virus resistentes a fármacos (a través de mutación del gen de envoltura), complicando así el tratamiento del paciente de forma similar a lo observado con

el tratamiento de inhibidor de proteasa (PRI) e inhibidor de transcriptasa inversa (RTI) para el VIH. De hecho, la aprobación por parte de la FDA de cualquier nuevo fármaco que bloquea la entrada vírica exigirá la evaluación de datos de resistencia. La necesidad de un ensayo de diagnóstico que mida la susceptibilidad a bloqueadores de entrada ha sido documentada en el caso del inhibidor de fusión T-20. Se han descrito virus que presentan susceptibilidad reducida a T-20 tras su paso *in vitro* en presencia del fármaco. En este momento, no existen ensayos fenotípicos disponibles convenientes que sean capaces de medir la susceptibilidad a fármacos que bloquean la entrada del virus. Por tanto, los médicos se enfrentarán pronto al reto de personalizar la terapia en ausencia de los instrumentos necesarios para abordar la susceptibilidad a fármacos. Por lo tanto, resultaría extremadamente valioso un ensayo fiable que mida de manera precisa la susceptibilidad a fármacos que inhiben la entrada viral de pacientes infectados.

Por ejemplo, las estimaciones recientes de la Organización Mundial de la Salud indican que en todo el mundo hay más de 33 millones de personas infectadas por el VIH-1, el agente causante de la pandemia del SIDA. Casi un millón de personas están infectadas en los Estados Unidos y 300.000 están recibiendo actualmente terapia antiviral (CDC, 1999; OMS 1999). Combatir el SIDA se ha convertido en el objetivo común de un esfuerzo sin precedentes de las agencias gubernamentales, laboratorios académicos, y la industria farmacéutica/de biotecnología. La FDA ha aprobado catorce fármacos antivíricos para el tratamiento de la infección de VIH-1 (Carpenter *et al.,* 2000) y más de 20 fármacos adicionales se están evaluando en ensayos clínicos en la actualidad (PHRMA, 1999). Los fármacos aprobados inhiben la replicación de VIH-1 interfiriendo con las actividades enzimáticas de proteasa (PR) o transcriptasa inversa (RT). Los inhibidores de PR (PRI) bloquean la formación adecuada de proteínas virales que son necesarias para la infección y replicación de virus, mientras que los inhibidores de RT (RTI) bloquean al virus para que no copie su material genético. Debido a la potencia subóptima, los RTI y PRI actuales se usan muy a menudo en combinación para erradicar la replicación vírica (Carpenter *et al.,* 2000).

Por tanto, lo que se desea es proporcionar un ensayo vírico seguro, rápido y preciso capaz de evaluar: la actividad de inhibidores de unión y entrada del virus (incluyendo los inhibidores de correceptores, receptores y de fusión); el tropismo vírico por el receptor/correceptor para facilitar el diseño y tratamiento de fármacos inhibidores de la entrada del virus; los cambios en la susceptibilidad a fármacos de virus de pacientes a inhibidores de unión y entrada; y la actividad de neutralización del virus generada en respuesta a la vacunación usando antígenos de proteína de envoltura vírica.

Los métodos de la presente invención pueden usarse para cualquier enfermedad vírica que pueda responder a un inhibidor de la entrada del virus y donde existe una preocupación respecto a la susceptibilidad al fármaco antivírico y resistencia a un inhibidor de entrada del virus incluyendo, por ejemplo, sin carácter limitativo, otros lentivirus (por ejemplo, VIH-2), otros retrovirus (por ejemplo, HTLV-1 y 2), hepadnavirus (por ejemplo, virus de la hepatitis B humana), flavivirus (por ejemplo, virus de la hepatitis C humana) y herpesvirus (por ejemplo, citomegalovirus humano).

Los bloqueadores de entrada constituyen una clase novedosa de fármacos antirretrovirales, y el potencial de amplia actividad frente a las variantes de VIH-1 resistentes a múltiples fármacos actuales es alto. Entre la clase de bloqueadores de entrada del virus potenciales se encuentran los inhibidores de fusión, antagonistas de receptor/correceptor y vacunas.

Inhibidores de fusión

Los compuestos diseñados para inhibir de manera competitiva el cambio conformacional de TM, denominados inhibidores de fusión, son posibles inhibidores de replicación de VIH-1. Aunque se ha demostrado su actividad en sistemas de cultivos celulares y en pacientes infectados por VIH-1 (Wild *et al*., 1992; Judice *et al.,* 1997; Kilby *et al.,* 1998), no se ha aprobado ningún inhibidor de fusión para el tratamiento de la infección por VIH-1 en Estados Unidos. Los fármacos dentro de esta clase, como T-20 y T-1249 (Trimeris Inc., USA), son el objeto de investigaciones clínicas avanzadas.

Antagonistas de receptores/correceptores

Además de los inhibidores de fusión, que actúan después de que el VIH-1 haya interactuado con sus receptores, se están realizando esfuerzos para desarrollar fármacos que eviten que el VIH-1 interactúe con CD4 o cualquiera de sus dos correceptores principales. La capacidad de dichos reactivos de inhibir la infección de VIH-1 se ha demostrado en sistemas de cultivo celular y modelos animales. Se han identificado compuestos de partida que se dirigen a gp120, CD4, el correceptor CCR5 usado por los virus macrofago-trópicos (R5), o el correceptor CXCR4 usado por los virus trópicos de células T (X4) (Allaway *et al.,* 1993; Reimann *et al.,* 1995; Baba *et al.,* 1999; Bridger *et al.,* 1999).

Actualmente, no hay antagonistas de correceptores aprobados para el tratamiento de infección de VIH-1 en los Estados Unidos. Los fármacos dentro de estas clases, como PRO 542 (Progenics Inc., EE.UU.), 5a8 (Tanox, EE.UU.), TAK-779 (Takeda Inc., Japón), y AMD-3100 (Anormed Inc., Canadá), son el objeto de investigaciones clínicas en etapa temprana o preclínicas. Por lo tanto, un ensayo capaz de identificar y determinar el tropismo por el

receptor/ correceptor, que identifique de manera rápida y precisa los pacientes que están infectados con cepas de un virus trópico (por ejemplo, VIH-1), facilitaría el diseño de fármacos inhibidores de la entrada viral y el tratamiento.

Vacunas

Las vacunas han demostrado ser también una estrategia eficaz en la lucha contra las infecciones de virus patógenos en seres humanos, y existen diversas vacunas candidatas a evitar la infección del VIH-1 en desarrollo clínico. Las proteínas de envoltura gp120 y gp41 son las candidatas más obvias en la intensa búsqueda de vacuna del VIH-1, y muchas de las 11 vacunas candidatas en evaluación clínica se basan en la envoltura (PhRMA, 1999). Se piensa generalmente que una vacuna de envoltura eficaz puede provocar la generación de anticuerpos neutralizantes que bloquean la infección del virus (Mascola *et al.,* 2000). Por lo tanto, se necesita urgentemente un ensayo de alto rendimiento sensible que mida de manera fiable la eficacia de dichos anticuerpos neutralizantes y no requiera un cultivo prolongado de virus. Dicho ensayo podría ayudar de manera significativa a la búsqueda de una vacuna del SIDA eficaz. Esto es especialmente cierto, teniendo en cuenta que los ensayos clínicos de etapas avanzadas abarcan grandes poblaciones de pacientes que se cuentan por miles. Puesto que los anticuerpos neutralizantes deberían evitar la infección con éxito de células diana, un ensayo del receptor de la envoltura sería beneficioso para actuar como ensayo de neutralización del virus.

Desafortunadamente, la mayoría de estas combinaciones de fármacos son eficaces solo un tiempo limitado en gran parte debido a la aparición de virus resistentes a fármacos. La falta de funciones de revisión inherentes a la RT y ARN polimerasa II, unido a la replicación de alto nivel propensa a errores permite a los virus como VIH-1 mutar fácilmente (Coffin, 1995). La elevada frecuencia de mutación contribuye a la capacidad de VIH-1 de evadir la terapia de fármacos a largo plazo con éxito, lo que resulta en el rebote de la carga viral. Se han descrito mutaciones asociadas a la resistencia para todos los 14 fármacos aprobados así como muchos compuestos de investigación (Schinazi *et al.,* 1999). Por lo tanto, las variantes de VIH-1 resistentes a múltiples fármacos presentan un problema creciente en la atención de pacientes infectados. Para lograr un beneficio clínico a largo plazo, es deseable seleccionar aquellos fármacos que supriman al máximo la replicación vírica y evitar los fármacos a los que un virus del paciente sea resistente (DHHs, 2000). Las soluciones a largo plazo pueden contar con las pruebas de resistencia a fármacos que pueden controlar a los médicos en la selección de los fármacos más efectivos frente al virus del paciente. La necesidad de realizar ensayos sobre la resistencia se ha afirmado en directrices recientes de los DHH (DHH, 2000), recomendando que se usen de manera rutinaria ensayos de resistencia cuando se traten pacientes infectados de VIH-1. Los ensayos de susceptibilidad también pueden ayudar en el desarrollo de nuevos fármacos que se dirijan a virus resistentes. Un comité asesor del FDA reciente (noviembre 1999) recomendó que se usaran ensayos de resistencia en el desarrollo de nuevos fármacos antivirales para VIH-1.

Se han aplicado diversas estrategias a la evaluación de la susceptibilidad de fármacos antivíricos. Los ensayos genotípicos analizan mutaciones en la secuencia de nucleótidos subyacente, o genotipo, e intentan correlacionar estas mutaciones con resistencia a fármacos (Rodriguez-Rosado *et al.,* 1999; Schinazi *et al.,* 1999). Sin embargo, la relación entre genotipo y fenotipo es compleja y no se interpreta fácilmente, y los resultados de estos ensayos no son cuantitativos. El uso de datos de susceptibilidad al fármaco genotípicos exige una interpretación bien por expertos (Baxter *et al.,* 1999) o bien por algoritmos informáticos y no son siempre predictivos del resultado del tratamiento (Piketty *et al*., 1999).

Los ensayos de susceptibilidad al fármaco fenotípicos miden y cuantifican directamente la capacidad de los virus de replicarse en presencia del fármaco. Cada ensayo fenotípico exigía un cultivo del virus prolongado y, por tanto, era lento, intenso en términos de trabajo, y no se automatizaba fácilmente para alto rendimiento (Japour *et al.,* 1993). Como resultado, estos ensayos fenotípicos tempranos se consideraron poco prácticos para la atención de pacientes. El desarrollo de ensayos de virus recombinantes (Shi y Mellors, 1997; Hertogs *et al.,* 1998) simplificó los ensayos fenotípicos y aumentó el rendimiento. Sin embargo, una gran desventaja de estos ensayos es un tiempo total requerido largo de 4-8 semanas. Más recientemente, se han desarrollado ensayos de virus recombinantes y otros que son capaces de medir la susceptibilidad al fármaco durante una sola ronda de replicación (Zennou *et al*., 1998; Petropoulos *et al.,* 2000), resultando en una drástica reducción en el tiempo total necesario a 8-10 días. Los pacientes en los que fracasa la terapia antirretrovírica pueden beneficiarse de los ensayos fenotípicos. Dichos ensayos son instrumentos atractivos para la atención de pacientes porque proporcionan una medida rápida y directa de susceptibilidad al fármaco.

El ensayo de la presente invención puede usarse con otras infecciones víricas que surgen de infecciones debidas a otros virus dentro de estas familias, así como infecciones víricas que surgen de virus en otras familias de virus. Además, el ensayo de resistencia y susceptibilidad al fármaco de la presente invención es útil para identificar compuestos para tratar enfermedades víricas para las que actualmente no hay una terapia disponible.

La estructura, el ciclo de vida y los elementos genéticos de los virus que podrían someterse a ensayo en el ensayo de resistencia y susceptibilidad al fármaco de la presente invención resultarán conocidos por los expertos en la técnica. Para la práctica de la presente invención es útil, por ejemplo, comprender el ciclo de vida de un retrovirus, así como los genes de virus necesarios para la infectabilidad y el rescate de retrovirus. Las células infectadas por

retrovirus liberan un virus de la membrana que contiene un genoma de ARN diploide. El virus, cubierto con una glicoproteína de envoltura (que sirve para determinar el margen de infectabilidad del huésped), se une a un receptor celular en la membrana plasmática de la célula a infectar. Tras el enlace del receptor, el virus penetra y pierde el recubrimiento a medida que pasa a través del citoplasma de la célula hospedadora. Bien en su camino al núcleo o en el núcleo, las moléculas de transcriptasa inversa residentes en el núcleo viral (*core*) impulsan la síntesis del provirus de ADN de doble cadena, una síntesis que es preparada por el enlace de una molécula de ARNt al ARN viral genómico. El provirus de ADN de doble cadena se integra a continuación en el genoma de la célula hospedadora, donde puede actuar como un patrón transcripcional para proteínas víricas que codifican ARNm y ARN genómico del virión, que se empaquetará en partículas del núcleo viral. En su salida de la célula infectada, las partículas del núcleo (*core*) se mueven a través del citoplasma, se unen al interior de la membrana plasmática de la célula recién infectada, y brotan, llevando con ellas tractos de membrana que contienen producto génico de la glicoproteína de envoltura codificada de manera vírica. Este ciclo de infección - transcripción inversa, transcripción, traducción, ensamblaje del virión, y brote - se repite una y otra vez a medida que se extiende la infección.

El ARN vírico y, como resultado, el ADN provírico codifican diversos elementos que actúan en cis que son vitales para la finalización con éxito del ciclo de vida del virus. El ARN del virión porta el promotor del virus en su extremo 3'. Las acrobacias replicativas sitúan el promotor del virus en el extremo 5' del genoma provírico a medida que se transcribe el genoma de manera inversa. Justo en la LTR retrovírica de 3' al 5' yace el sitio de empaquetamiento del virus. El ciclo de vida del retrovirus exige la presencia de factores de transacción codificados de manera vírica. La ADN polimerasa (pol)-transcriptasa inversa dependiente de ARN vírico también está contenida en el núcleo del virus y es vital para el ciclo de vida del virus en el que es responsable de la conversión del ARN genómico al ADN provírico intermedio integrado. La glicoproteína de envoltura vírica, env, es necesaria para la unión del virus a la célula no infectada y para la propagación del virus. También hay factores activadores en trans de la transcripción, llamados transactivadores que pueden servir para modular el nivel de transcripción del provirus parental integrado. Normalmente, los virus aptos para la replicación (no defectuosos) son autónomos ya que codifican todos estos factores que actúan en trans. Sus homólogos defectuosos no son autónomos.

En el caso de un virus de ADN, como un hepadnavirus, comprender el ciclo de vida y genes de los virus necesarios para la infección es útil para la práctica de la presente invención. El proceso de entrada del HBV no se ha definido de manera adecuada. La replicación del VHB utiliza un patrón intermedio de ARN. En la célula infectada, el primer paso en la replicación es la conversión del ADN circular relajado asimétrico (ADNcr) en ADN circular cerrado de manera covalente (ADNccc). Este proceso, que ocurre dentro del núcleo de las células del hígado infectadas, implica la finalización de la síntesis de la cadena positiva de ADN y el enlace de los extremos de ADN. En el segundo paso, el ADNccc se transcribe mediante la ARN polimerasa del huésped para generar un patrón de ARN de 3,5 kB (pregenoma). El pregenoma forma un complejo con proteína en el núcleo del virus. El tercer paso implica la síntesis de la primera cadena de ADN en sentido negativo copiando el ARN pregenómico usando la transcriptasa inversa de proteína P codificada de manera vírica. La proteína P también actúa como cebador de ADN de cadena negativa. Finalmente, la síntesis de la segunda cadena de ADN en sentido positivo se produce copiando la primera cadena de ADN, usando la actividad de la ADN polimerasa de la proteína P y un oligómero de ARN vírico como cebador. El pregenoma también transcribe ARNm para las proteínas del núcleo estructural principales.

Diseño y métodos

(1) Construcción de un vector de expresión para una proteína de envoltura vírica que es capaz de aceptar segmentos derivados del paciente que codifican la proteína de la envoltura

En una realización, se construyó un vector de expresión de la envoltura capaz de expresar proteínas de envoltura de VIH-1 en células transfectadas. Se han descrito vectores de expresión similares, incluyendo un plásmido (pAmphoEnv) construido para expresar la proteína de envoltura del virus anfotrópico de la leucemia murina (A-MLV, por sus siglas en inglés) descrito en la patente de Estados Unidos n.º 5.837.464 y (Petropoulos *et al.,* 2000). El vector pAmphoEnv usa el promotor génico temprano inmediato de citomegalovirus humano (CMV) y la secuencia de señal de poliadenilación de SV40 para producir ARNm de la envoltura de A-MLV en células transfectadas. El plásmido pAmphoEnv se modifica eliminando el gen de envoltura del A-MLV e introduciendo sitios de escisión de enzima de restricción que puedan permitir la inserción de fragmentos de la envoltura vírica derivados de varios aislados, como VIH-1. En el caso de VIH-1, el marco de lectura abierto de la envoltura abarca aproximadamente 2.600 nucleótidos y codifica la poliproteína de envoltura, gp160. La poliproteína gp160 se escinde mediante una proteasa similar a la furina celular para producir dos subunidades, gp41 y gp120. Los vectores de expresión de la envoltura de VIH-1 pueden construirse en etapas de la siguiente manera:

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

Las secuencias de ácido nucleico de la envoltura de A-MLV pueden eliminarse del vector pAmphoEn mediante la digestión con enzimas de restricción. El vector digerido puede recircularse mediante unión a un poliligador oligonucleótido dúplex que contiene cuatro sitios de restricción internos únicos (a, b, c, d) para la inserción de secuencias de envoltura. La reacción de unión puede usarse para transformar Escherichia Coli y los clones

moleculares que contienen la secuencia de poliligador correcta pueden identificarse y confirmarse mediante mapeo de restricción y secuenciación del ADN, respectivamente. La introducción de sitios de clonación múltiple únicos en el vector puede facilitar la inserción de secuencias de envoltura de VIH-1. Los sitios de restricción en el poliligador pueden elegirse basándose en su ocurrencia infrecuente en las secuencias de envoltura de VIH-1 (base de datos LANL HIV-1, www.lanl.gov). Este vector puede denominarse pCX. La funcionalidad del vector PCX puede demostrarse insertando un gen indicador o ácido nucleico indicador, como luciferasa de luciérnaga, en el sitio de clonación múltiple de pCX y midiendo una señal de la actividad del ácido nucleico indicador o gen indicador en células transfectadas. Según su uso en el presente documento, "ácido nucleico indicador" hace referencia a un ácido nucleico que codifica una proteína, estructura de ARN o ADN que bien directamente o bien a través de una reacción da lugar a una señal perceptible o que se puede medir, por ejemplo, color o luz de una longitud de onda medible, o la generación de una estructura de ADN o ARN específica usada como indicador que podría amplificarse usando uno de varios ensayos de amplificación cuantitativos.

(b) Inserción de secuencias de envoltura vírica en el vector de expresión de envoltura pCX

Mediante el uso de cebadores mutagénicos para la amplificación por PCR, se generan fragmentos de la envoltura vírica que contienen dos sitios de restricción únicos (a, b y c, d, respectivamente) adyacentes a los codones de iniciación y terminación de, por ejemplo, el marco de lectura abierto de la envoltura del VIH-1. La introducción de dos sitios de restricción únicos en cada extremo del marco de lectura abierto de la envoltura puede mejorar la posibilidad de clonar fragmentos de la envoltura de VIH-1 que alberguen sitios de restricción internos para cualquiera de las enzimas encontradas en el sitio de clonación múltiple del vector pCX.

En el caso de VIH-1, los dos clones moleculares bien caracterizados del VIH-1 con diferencias conocidas en los genes de envoltura, NL4-3 (cepa de laboratorio, trópico de linfocitos T, inductora de sincitio) y JR-CDF (un aislado primario, macrófago-trópico no inductor de sincitio) pueden usarse como patrón para la amplificación por PCR. Los productos de amplificación de 2.600 nucleótidos pueden digerirse con dos enzimas de restricción (escindiendo cada enzima en un extremo del fragmento; por ejemplo, a y c o b y d) e insertarse posteriormente en el vector pCX mediante unión y transformación de Escherichia coli. Los clones moleculares que contienen las secuencias de envoltura apropiada pueden identificarse mediante mapeo de restricción y confirmarse por secuenciación de ADN. Los plásmidos resultantes, pHIVenv (NL4-3) y pHIVenv (JR-CSF), pueden usarse para expresar proteínas de envoltura de VIH-1 en células transfectadas (Figura 1A). La funcionalidad de los vectores de expresión de envoltura, como los vectores pHIVenv, pueden demostrarse midiendo la síntesis de la envoltura vírica en células transfectadas (Western Blot), y por su capacidad de pseudotipar vectores de retrovirus defectuosos de envoltura. Se han demostrado reservorios de virus de alto título usando la línea celular 293 de riñón embrionaria humana (Petropoulos *et al.,* 2000), sin embargo, la presente invención no se limita a aquellas líneas celulares. Otras líneas celulares adecuadas usadas como una primera célula para la transfección de ácido nucleico obtenido del paciente que codifica una proteína de envoltura vírica incluyen, a modo de ejemplo y no como limitación de la presente invención, 5.25; HOX; U87; MT2; PM1; CEM; etc. La línea celular se modificará mediante ingeniería de manera óptima para expresar uno o más correceptores.

(c) Modificar el vector pCX para mejorar la eficiencia de clonación de secuencias de envoltura vírica

Para mejorar la eficiencia de clonación de fragmentos de la envoltura vírica, el vector de expresión PCX puede modificarse insertando un casete génico que elimina bacterias (por ejemplo, control de gen b de muerte celular (ccdB) o un miembro de la familia de genes asesinos hok**)** bajo control del promotor lac de Escherichia coli en sitios de clonación múltiple (Gerdes *et al.,* 1990; Bernard y Couturier, 1992; Bernard *et al.,* 1993). Este vector modificado se denomina pCXccdB. La transcripción del gen asesino ccdB se reprime en las cepas bacterianas que expresan el represor 1aci, como JM109. Puede usarse ésta o una cepa equivalente para propagar plásmidos que porten el gen asesino ccdB que están bajo el control del promotor lac. Por el contrario, en este sistema las cepas bacterianas que no sobreexpresan el represor laciq, como DH5á y Top10, no pueden mantener plásmidos que expresan el gen ccdB. Los transformantes pueden morir debido a la actividad de ccdB. Las células DH5a y Top10 pueden comprarse de diversos vendedores (Life Technologies o Invitrogen). Usando este método de la clonación selectiva, el vector de expresión parental se propaga en una cepa bacteriana 1aciq. El vector se digiere con dos enzimas de restricción que eliminan ambas el casete génico de ccdB, y, en el caso de VIH-1, son compatibles con la inserción de secuencias de envoltura del VIH-1 (a, b, c, d). Tras la unión del vector y fragmentos de envoltura, se transforma una cepa de bacteria que carece de laciq. Una vez transformados, pueden cultivarse los plásmidos que contienen bacterias en los que los insertos de envoltura vírica han reemplazado al gen asesino ccdB. Los plásmidos que contienen bacterias que retienen o reconstituyen el gen asesino ccdB no pueden sobrevivir. De este modo, la población de bacterias transformadas se enriquece por los plásmidos que contienen insertos de envoltura vírica, pero falta en el vector parental que contiene el gen ccdB. La construcción del vector pCXccdB no es esencial para el éxito de la fase I de este proyecto, pero se espera que mejore de manera significativa la eficiencia de clonación de secuencias de envoltura de VIH-1 derivada de muestras de pacientes; por tanto, la probabilidad de mantener la heterogeneidad de secuencias virales puede mejorarse. La estructura del vector pCXccdB puede confirmarse por mapeo de restricción y secuenciación de ADN.

(d) Insertar secuencias de envoltura vírica en el vector de expresión de pCXccdB

La funcionalidad del vector pCXccdB puede evaluarse preparando reacciones de enlace que contengan secuencias de envoltura vírica y ADN del vector pCXccdB digerido de manera incompleta. Tras la transformación bacteriana, puede prepararse plásmido de ADN a partir de clones bacterianos individuales y analizarse mediante digestión de restricción para detectar la presencia de fragmentos de la envoltura vírica y la ausencia de secuencias de ccdB. La viabilidad de este método se somete a ensayo mediante amplificación de la región de envoltura de un total de 13 clones de VIH-1 disponibles (pCRII-91US005.11, pCRII-91006.10, pCRII-92US657.1, pCRII-92US711.14, pCRII91US7124, pCRII-92US714.1, pcRII-91HT652.11, pCRII-92BR020.4, pCRII-91HT651.1A, pCRII-92HT593.1, pCRII-92HT594.10, pCRII92HT596.4, pCRII-92HT599.24), que se pueden obtener a través del AIDS Research Reagent Reference Program (ARRRP), Rockville, Maryland. Cada fragmento puede insertarse en pCXccdB y la estructura de los vectores de expresión pHIVenv resultantes puede confirmarse mediante mapeo de restricción y/o secuenciación de ADN. La funcionalidad de cada vector pHIVenv puede demostrarse mediante medición de la síntesis de proteína de envoltura de VIH-1 en células transfectadas (Western Blot), y por su capacidad de pseudotipar vectores de retrovirus de envoltura deficiente.

(2) Construcción de un vector de expresión vírica bioseguro que comprende ácido nucleico indicador en lugar de la codificación la proteína de envoltura

Se construye un vector vírico bioseguro para evaluar los inhibidores de la entrada del virus según medios y métodos similares descritos en la patente de Estados Unidos n.º 5.837.464 y Petropoulos et al., 2000 usados para evaluar los inhibidores de PR y RT. El vector de expresión vírica puede cotransfectarse en células junto con los vectores de expresión de envoltura (descritos anteriormente) para producir reservorios de virus de alto título. Dichos reservorios de virus pueden evaluarse para definir la susceptibilidad a inhibidores de entrada del virus, incluyendo fármacos antivíricos y anticuerpos neutralizantes. En el caso del VIH-1, el vector de expresión vírica puede generarse a partir de NL4-3, un clon molecular infeccioso bien caracterizado de VIH-1. La repetición terminal larga (LTR) en 5' que controla la expresión génica del virus puede modificarse de manera que la transcripción de los genes víricos en las células transfectadas se impulse por el promotor temprano inmediato CMV (Naviaux *et al.,* 1996). La mayoría del gen de envoltura puede eliminarse, pero los elementos de control importantes como el elemento de respuesta rev (RRE, en inglés) y regiones codificantes de proteínas accesorias (rev, tat) se conservan. En lugar de las secuencias de envoltura eliminadas, se inserta un ácido nucleico indicador, como un casete génico indicador de luciferasa de luciérnaga que está bajo el control de secuencias potenciadoras de promotor de CMV (**Figuras 1B y 3**). La infección del virus puede controlarse por medición de la actividad de luciferasa en células infectadas. Es posible, aunque poco probable, que la recombinación interplasmídica entre el vector del retrovirus y, por ejemplo, las secuencias de pHIVenv en células transfectadas pueda llevar a la generación de VIH-1 infeccioso. En un esfuerzo por generar un vector bioseguro, puede hacerse una introducción de diversas alteraciones genéticas en el genoma del VIH. Por ejemplo, puede lograrse la eliminación de la mayor parte del gen de envoltura, mientras se conserva la secuencia de control importante, RRE, y también la eliminación de las secuencias potenciadoras de la transcripción en la región U3 de la LTR 3' del vector **(Figura 2)**. Durante la replicación del genoma del retrovirus, la región U3 situada en el extremo 3' del genoma del virus actúa como el patrón para la región U3 de la LTR 5' del provirus en células infectadas. Dichos provirus carecen del elemento promotor fuerte en la región U3 de la LTR 5' y por tanto no son capaces de producir ARN retrovírico en células infectadas. Esta estrategia de autoinactivación (SIN, en inglés) se ha usado con éxito para diversos sistemas de vector retrovírico, incluyendo VIH-1 (Hwang *et al.,* 1997; Miyoshi *et al,* 1998). En el ensayo de la presente divulgación, la expresión del gen víricol no es necesaria en las células infectadas porque la infección de virus se mide mediante una señal detectable producida por el ácido nucleico indicador, como la producción de actividad de luciferasa, impulsada por su propio promotor independiente (**Figura 1B**). La deleción de secuencias de envoltura y la región potenciadora de transcripción (U3) puede lograrse mediante procedimientos de clonación molecular estándares, y cada deleción puede verificarse mediante análisis de la secuencia de ADN.

La funcionalidad de este vector, por ejemplo en el caso de VIH-1, designado pHIVlucΔU3, puede demostrarse mediante cotransfección de células 293 con el vector pHIVenv descrito anteriormente. La transcomplementación eficiente de proteínas víricas producidas por ambos vectores en las células transfectadas puede llevar a la producción de partículas víricas. Las partículas de virus pueden recogerse a partir de sobrenadantes de cultivo y analizarse mediante transferencia de Western. Los títulos de virus pueden cuantificarse mediante aplicaciones rutinarias de ELISA para p24, PCR cuantitativa o ensayos TaqMan.

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

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

Pueden evaluarse diferentes líneas celulares de mamíferos que se han descrito previamente y son conocidas por apoyar la infección de un virus particular. Según se ha analizado en el presente documento para una realización relacionada con VIH-1, el ensayo se puede llevar a cabo (a) cotransfectando una primera célula con pHIVenv y pHIVlucΔU3, (b) recogiendo el virus tras la transfección, (c) usando este virus para infectar una segunda célula,

tanto en presencia como en ausencia de inhibidores de entrada de virus, y (d) midiendo la producción de luciferasa en células infectadas.

La Tabla 1 enumera ejemplos representativos de dichas líneas celulares evaluadas para detectar la infección de VIH-1, incluyendo la línea celular y su receptor/correceptor asociado. Pueden obtenerse diversas de estas líneas celulares de depósitos celulares públicos.

Las partículas víricas recogidas de cultivos de células 293 transfectadas pueden usarse para infectar varias líneas celulares diferentes. En el caso de VIH-1, el vector pHIVlucΔU3 contiene deleciones en el gen de envoltura y el potenciador-promotor U3 descrito anteriormente, por tanto, la infección de una línea celular permisiva con partículas de virus producidas por este vector se limita a una sola ronda de replicación. Esto incluye (a) la unión y entrada del virus, mediada por las proteínas de envoltura vírica, producidas en trans mediante el vector pHIVenv tal como se ha descrito, (b) la conversión de ARN vírico de una sola cadena en ADN de doble cadena por RT, y (c) la integración de ADN vírico en el genoma de la célula hospedadora (formación de provirus). La transcripción activa de genes víricos por ARN polimerasa II que se produce normalmente en células infectadas tras la integración provírica puede limitarse mediante deleción de secuencias potenciadoras-promotoras víricas esenciales en el vector pHIVlucΔU3. Sin embargo, esta restricción no puede interferir con la expresión del gen de luciferasa en células infectadas ya que este gen se impulsa independientemente de la expresión génica del virus usando un promotor de CMV interno (**Figura 1B**). La cantidad de actividad de luciferasa producida tras la infección puede usarse como una medida de la infectabilidad del virus.

La unión de VIH-1 y entrada en las células hospedadoras requiere la interacción con un receptor primario (CD4) y uno de varios correceptores, en la mayoría de casos CCR5 o CXCR4. Se pueden examinar líneas celulares que son conocidas por expresar diversas combinaciones de CD4, CCR5 y CXCR4. Específicamente, se evalúan las líneas celulares enumeradas en la Tabla 1 que expresan (a) CD4 más CCRS, (b) CD4 más CXCR4, y (c) CD4 más CCR5 más CXCR4. Las líneas celulares que expresan solo el receptor CD4, o bien solo el correceptor CCR5 o CXCR4, pueden servir de controles útiles y pueden usarse para evaluar aislados de VIH-1 que no requieren la unión de CD4 o que usan correceptores distintos de CCR5 y CXCR4. El criterio principal para decidir la idoneidad de una línea celular puede ser la infectabilidad medida por la producción de luciferasa (104-106 unidades relativas de luz). Además, se pueden evaluar las líneas celulares basándose en tasas de crecimiento, viabilidad, estabilidad y otros parámetros según se considere necesario. Se pueden seleccionar líneas celulares que sean fáciles de mantener y por ejemplo, que produzcan grandes cantidades de actividad de luciferasa tras la infección, que puedan ser infectadas por diferentes tropismos por el receptor de la envoltura, por ejemplo, CD4/CXCR4 y CD4/CCR5. Existen disponibles en depósitos públicos, como el ARRRP, líneas celulares adicionales bien caracterizadas que soportan, por ejemplo, la replicación de VIH y expresan el receptor y correceptores de VIH-1 (por ejemplo, CEM-NKr- CCR5; categoría de liberación a).

Además, las líneas celulares pueden mejorarse usando procedimientos convencionales, promoviendo la infección mediante la adición de polibreno a células (Porter *et al.*, 1998). Por ejemplo, en el caso del VIH, se pueden identificar otras líneas celulares posibles para su uso en la presente invención mediante infección con cepas de laboratorio de VIH-1 y comparando los títulos de infectabilidad del virus recombinante con aquellos obtenidos con VIH-1 infeccioso, o mediante la transfección de células directamente con los plásmidos de expresión vírica descritos en el presente documento, y consiguiendo la producción de virus. La acumulación de tránscritos del virus puede comprobarse usando un ensayo cuantitativo de RT-PCR. Pueden identificarse líneas celulares adecuadas para otros virus de manera similar.

La presente invención puede optimizar las condiciones de ensayo y permitir la realización de ensayos de alto rendimiento de las muestras de pacientes usando la automatización. Los métodos de preparación de muestras pueden optimizarse para capturar de manera eficaz el ARN de envoltura y genómico del virus. Las condiciones de RT-PCR pueden optimizarse para permitir la amplificación de secuencias de envoltura vírica derivadas de pacientes, como secuencias de envoltura de VIH-1 (-2.600 pares de bases) a baja carga vírica (-500 copias por ml).

(4) Demostración de la utilidad del ensayo

La utilidad del ensayo de la presente divulgación queda demostrada por los resultados logrados a partir de: (1) ensayo de la inhibición dependiente de la dosis de la entrada del virus en presencia de inhibidores bien caracterizados; y el (2) ensayo de la inhibición dependiente de la dosis de infección en presencia de anticuerpos neutralizantes de VIH-1 bien caracterizados.

Se evaluaron las siguientes aplicaciones del ensayo de entrada de virus de la presente divulgación:

i) detección de la inhibición de replicación de VIH-1 por inhibidores de unión y entrada del virus (incluyendo inhibidores de receptor, correceptor y de fusión).
ii) medición de cambios en la susceptibilidad a inhibidores de unión y entrada de VIH-1; y
iii) detección de actividad de neutralización de anticuerpos generados en respuesta a las vacunas dirigidas contra proteínas de envoltura de VIH-1.

En una realización preferido, el ensayo puede llevarse a cabo (a) cotransfectando una primera célula con vectores pHIVenv y pHIVlucΔU3, (b) recogiendo virus tras aproximadamente 48 h después de la transfección, (c) usando este virus para infectar una segunda célula, tanto en presencia como ausencia de inhibidores de entrada de virus y (d) midiendo la producción de luciferasa aproximadamente 48-72 h tras la infección. La inhibición dependiente de la dosis de la replicación de VIH-1 puede evaluarse frente a una amplia gama de concentraciones de inhibidor de entrada de virus usando un formato de 96 pocillos. La gama de concentración apropiada puede determinarse empíricamente para cada inhibidor. Los datos pueden representarse como el porcentaje de inhibición de actividad de luciferasa frente a concentración del fármaco (log10). Los análisis de datos pueden llevarse a cabo usando software informático. Se usan curvas de inhibición para determinar las concentraciones inhibitorias al 50 % (CI50) para fármacos o anticuerpos específicos **(Figura 6)**.

Se evalúan proteínas de envoltura derivadas de varios aislados de VIH-1 bien caracterizados usando vectores pHIVenv construidos tal como se ha descrito anteriormente. Para definir el tropismo por el correceptor de la envoltura, en el caso de VIH-1, se evalúa la infección usando células que expresan CD4 más CXCR4 y CD4 más CCR5 tal como se ha descrito anteriormente. Puede usarse una amplia variedad de compuestos que se sabe que inhiben la entrada de VIH-1 (Tabla 2), incluyendo agentes no específicos tales como polianiones sulfonados (sulfato de dextrano y heparina) con el ensayo de la presente divulgación. También son adecuadas para su uso en la presente divulgación las quimiocinas tales como Rantes y SDF-1, los ligandos naturales para los receptores de quimiocinas CCR5 y CXCR4, respectivamente (véase Alkhatib *et al.,* 1996; Bleul *et al.,* 1996). Además, se usaron inhibidores de entrada de virus tales como T-20 y T1249 (Trimeris, Inc.), PRO 52 (Progenics), 5a8 (Tanox) para evaluar la utilidad del ensayo de la presente divulgación. La toxicidad del fármaco en células diana se evalúa usando ensayos de citotoxicidad o viabilidad estándares (por ejemplo, exclusión del colorante, MTS, ATP).

Se han descrito mutantes de VIH-1 que presentan susceptibilidad reducida al inhibidor de fusión T20 (Rimsky *et al.,* 1998) y los determinantes genéticos (mutaciones) que permiten que estos virus se repliquen en presencia de fármaco dentro de la proteína de envoltura (gp41-TM). Para demostrar que el ensayo de la presente divulgación es capaz de medir cambios en la susceptibilidad al fármaco (es decir, resistencia), (a) se generan vectores pHIVenv que portan estos genes de envoltura mutantes, (b) se cotransfectan las primeras células usando estos vectores y el vector pHIVlucΔU3, (c) se recogen los virus portadores de estas proteínas de envoltura mutantes, y (d) se someten a ensayo los virus para determinar la infectabilidad en presencia de T20. Se evalúa la susceptibilidad al fármaco reducida deT20 comparando la CI50 de virus que portan las proteínas de envoltura mutantes y aquellos que carecen de las mutaciones de resistencia al fármaco definidas. Los virus portadores de proteínas de envoltura con mutaciones de resistencia al fármaco pueden presentar valores de CI50 más altos que los virus portadores de proteínas de envoltura que carecen de mutaciones de resistencia al fármaco, es decir, la inhibición puede requerir una concentración de fármaco más alta (equivalente a los datos presentados en la **Figura 8**). Pueden introducirse mutaciones de resistencia a fármacos en los vectores de expresión de envoltura (pHIVenv) usando técnicas de mutagénesis dirigida estándares según los protocolos estándares (Petropoulos *et al.,* 2000; Ziermann *et al.,* 2000).

Es ampliamente aceptado que las vacunas eficaces que protegen de la infección por VIH-1 deben provocar una respuesta inmunitaria humoral fuerte caracterizada por anticuerpos neutralizadores generalmente de reacción cruzada. Por lo tanto, el suero de sujetos vacunados se evalúa de manera rutinaria para detectar la presencia de anticuerpos neutralizantes de alto título dirigidos contra el inmunógeno. De manera más reciente, el uso del modelo de macaco de virus quimérico (SHIV) de virus de inmunodeficiencia del simio (SIV)/VIH-1, Mascola y sus colaboradores demostraron que la transferencia pasiva de dichos anticuerpos neutralizantes llevaba a una carga vírica reducida tras exposición a la mucosa (Mascola *et al.,* 2000). El ensayo de la presente invención puede usarse para determinar de manera fiable y rápida la actividad de neutralización del virus de anticuerpos generada en respuesta a las vacunas dirigidas a antígenos de envoltura, como antígenos de la envoltura de VIH-1. Por ejemplo, el ensayo puede (a) generar vectores pHIVenv que expresan varias proteínas de envoltura bien caracterizadas, (b) cotransfectar una primera célula usando estos vectores y el vector pHIVlucΔU3, (c) recolectar virus e incubar con diluciones en serie de preparaciones de anticuerpos o suero de vacuna (d) someter a ensayo estos virus para detectar la infectabilidad en una segunda célula. Los análisis de datos y determinaciones de CI50 pueden llevarse a cabo tal como se ha descrito previamente y en la bibliografía. En el caso de VIH-1, pueden seleccionarse virus para representar diferentes contextos genéticos de VIH-1 (por ejemplo, variante A, B, C, D, E, F), tropismos por el correceptor y células diferentes (macrófago/CCR5, célula T/CXCR4), y diferentes propiedades de la envoltura (aislado primario o crecimiento adaptado de laboratorio, inductor o no de sincitio) (Tabla 2). Puede resultar beneficioso preparar reservorios de un título definido de cada virus para optimizar la sensibilidad y reproducibilidad del ensayo usando un aporte de virus de aproximadamente 20-100 TCID50/pocillo y realizando ajustes según sea necesario. Las preparaciones de anticuerpos pueden seleccionarse basándose en propiedades de neutralización previamente documentadas, bien funcionales, como su capacidad de neutralizar aislados primarios, o físicas, como su capacidad de unirse a epítopos de gp120 o gp41 específicos (Tabla 2). El rendimiento del ensayo puede evaluarse con la actividad de estos reactivos de anticuerpo bien caracterizados en ensayos de neutralización de virus convencionales tal como se describe en la bibliografía científica. Puede usarse suero de un grupo ampliamente representativo de sujetos infectados por el VIH-1 para establecer el intervalo apropiado de diluciones de suero que puede maximizar la sensibilidad del ensayo, minimizando al mismo tiempo la citotoxicidad. Puede evaluarse la citotoxicidad usando ensayos de viabilidad o citotoxicidad estándares (por ejemplo, exclusión del colorante, MTS, ATP).

Los siguientes ejemplos se presentan para ilustrar y explicar en mayor medida la presente invención y no deben considerarse limitativos en ningún sentido.

Ejemplo 1: medición de la susceptibilidad fenotípica del fármaco para inhibidores de entrada de VIH-1

El presente ejemplo proporciona un medio y un método para medir de manera reproducible y precisa la susceptibilidad a inhibidores de la unión y entrada de VIH-1 (anteriormente referido de manera colectiva como entrada). Basándose en este ejemplo, el medio y un método para medir la susceptibilidad a inhibidores de entrada de VIH-1 pueden adaptarse a otros virus, incluyendo, sin carácter limitativo, otros lentivirus (por ejemplo, VIH-2), otros retrovirus (por ejemplo, HTLV-1 y 2), hepadnavirus (por ejemplo, virus de la hepatitis B humana), flavivirus (por ejemplo, virus de la hepatits C humana) y herpesvirus (por ejemplo, citomegalovirus humano). Este ejemplo proporciona además un medio y un método para medir alteraciones (aumentos o disminuciones) en la susceptibilidad a inhibidores de entrada.

Las mediciones de la susceptibilidad al inhibidor de entrada se llevan a cabo usando adaptaciones de los medios y métodos para ensayos de resistencia y susceptibilidad de fármacos fenotípicos descritos en la patente de Estados Unidos n.º 5.837.464 (Publicación Internacional número WO 97/27319).

Se diseña un vector, un ejemplo del vector de expresión de la envoltura, (pHIVenv) para expresar la poliproteína de envoltura (gp160) codificada por las secuencias de envoltura de VIH derivadas de pacientes **(Figura 1)**. Gp160 se escinde posteriormente mediante una proteasa celular para generar las subunidades de superficie (gp120SU) y transmembrana (gp41TM) que comprenden la proteína de envoltura en la superficie de partículas del virus VIH-1. Se diseña un segundo vector, un ejemplo del vector de expresión vírica (pHIVluc o pHIVlucΔU3) para expresar ARN virales genómicos y subgenómicos y todas las proteínas del VIH excepto la poliproteína de envoltura **(Figuras 1A y 1B).**

En esta aplicación, el segmento o segmentos derivados de pacientes corresponden a la región codificante (-2.5 KB) de la poliproteína de envoltura del VIH-1 (gp160) y representan (a) secuencias de envoltura amplificadas mediante el método de reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR) usando ARN vírico aislado de virus derivado de sujetos infectados con VIH, o (b) secuencias de envoltura derivadas de clones moleculares de VIH-1 que contienen mutaciones específicas introducidas por mutagénesis dirigida de un clon molecular parental (normalmente NL4-3).

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

Se usó oligo-dT para la transcripción inversa de ARN vírico en ADNc de primera cadena. Se usaron cebadores de la PCR de envoltura, cebador directo Xho/Pin y cebador inverso Mlu/Xba **(Tabla 3)** para amplificar segmentos derivados de pacientes. Estos cebadores se diseñan para amplificar el gen de envoltura de ⍰2,5 kB que codifica la poliproteína de envoltura gp160, mientras se introducen sitios de reconocimiento Xho I y Pin Al en el extremo 5' del producto de amplificación por PCR, y los sitios Mlu I y Xba I en el extremo 3' del producto de amplificación por PCR.

Los segmentos derivados de pacientes (producto de amplificación de secuencia de envoltura de 2,5 kB) se insertaron en vectores de expresión de envoltura de VIH-1 usando métodos de digestión con endonucleasa de restricción, enlace de ADN y transformación bacteriana como los descritos en la patente de Estados Unidos n.º 5.837.464 (Publicación Internacional nº WO 97/27319), con adaptaciones menores. El producto de amplificación de -2,5 kB se digirió con Xho I o Pin Al en el extremo 5' y Mlu I o Xba I en el extremo 3'. Los productos de digestión resultantes se ligaron, usando ADN ligasa, en los sitios 5' Xho I/Pin Al y 3' Mlu I/Xba I de vectores de expresión pCXAS o pCXAT modificados. Se ha descrito la construcción de los vectores pCXAS y pCXAT (en la Patente de Estados Unidos número 5.937.464 (Publicación Internacional nº WO 97/27319)). Los vectores pCXAS y pCXAT modificados contienen un sitio de restricción Pin Al además de los sitios de restricción Xho I, Mlul y Xba I que existen en pCXAS y pCXAT. Se introdujo el sitio Pin Al entre los sitios Xho I y Mlu I mediante mutagénesis dirigida, de manera que se situaran cuatro sitios de 5' a 3' en el siguiente orden: Xho I, Pin AI, Mlu I y Xba I. En una realización preferido, fueron digeridos productos de amplificación de 2,5 kB con Pin Al y Mlu I y se unieron en el sitio 5' Pin Al y el sitio 3' Mlu I del vector de expresión pCXAS modificado. Se usaron productos de reacción de enlace para

transformar E. coli. Tras un periodo de incubación de 24-36 h a 30-37 ºC, se purificó el ADN plasmídico del vector de expresión de cultivos de E. coli. Para asegurar que las preparaciones de vector de expresión representan adecuadamente las cuasiespecies de VIH presentes en el suero de un paciente dado, se reunieron muchos (>100) transformantes de E. coli independientes y se usaron para las preparaciones de ADN plasmídico de pHIVenv. Los vectores que se ensamblan de este modo para los fines de expresar proteínas de envoltura derivadas de virus de pacientes se denominan de manera colectiva pHIVenv **(Figuras 1 y 3).**

Se diseñan los vectores de expresión de VIH genómico pHIVluc y pHIVlucΔU3 para transcribir ARN genómico de VIH y ARN subgenómicos y para expresar todas las proteínas de VIH excepto la poliproteína de envoltura **(Figura 1B).** En estos vectores, se ha eliminado una parte del gen de envoltura para acomodar un casete génico indicador funcional, en este caso, "luciferasa de luciérnaga" que se usa para controlar la capacidad del virus de replicar en presencia o ausencia de fármacos antivíricos. En pHIVlucΔU3, se ha eliminado una parte de la región 3' de U3 para evitar la transcripción de ARN virales de la LTR 5' en células infectadas.

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

Se llevó a cabo un ensayo de susceptibilidad al fármaco usando pHIVenv y pHIVluc o pHIVlucΔU3. Se produjeron partículas de VIH pseudotipadas que contenían proteínas de envoltura codificadas por el segmento derivado del paciente mediante transfección de una célula hospedadora empaquetadora (HEK 293) con vector de ADN del ensayo de resistencia. Se recogieron partículas de virus (⍰48 h) tras la transfección y se usaron para infectar células diana (HT4/CCR5/CXCR4, o U-87/CD4/CXCR4, o U-87/CD4/CCR5) que expresen receptores (es decir, CD4) y correceptores (es decir, CXCR4, CCR5) de VIH. Tras la infección (⍰72 h) las células diana son lisadas y se mide la actividad de la luciferasa. El VIH debe completar un ronda de replicación para infectar con éxito la célula hospedadora diana y producir actividad de luciferasa. La cantidad de actividad de luciferasa detectada en las células infectadas se usa como medida directa de "infectabilidad" **(Figura 1 y 2).** Si por cualquier razón (por ejemplo, falta del receptor o correceptor apropiado, actividad de fármaco inhibidor, enlace de anticuerpo neutralizante), el virus es incapaz de entrar en la célula diana, la actividad de luciferasa disminuye. La susceptibilidad al fármaco se evalúa comparando la infectabilidad en ausencia de fármaco con la infectabilidad en presencia de fármaco. La susceptibilidad al fármaco relativa puede cuantificarse comparando la susceptibilidad del virus de "ensayo" con la susceptibilidad de un virus de referencia bien caracterizado (tipo silvestre) derivado de un clon molecular de VIH-1, por ejemplo NL4-3 o HXB2.

Las células hospedadoras empaquetadoras se cultivaron en platos de 10 cm de diámetro y se transfectaron un día tras el cultivo en placas con pHIVenv y pHIVluc o pHIVlucΔU3. Se llevaron a cabo las transfecciones usando un procedimiento de coprecipitación de calcio-fosfato. El medio de cultivo celular que contiene el precipitado de ADN se sustituyó por medio fresco, de una a 24 horas, tras la transfección. El medio de cultivo celular que contiene partículas víricas se recogió normalmente 2 días después de la transfección y se pasó por un filtro de 0,45 mm. Antes de la infección, se colocaron las células diana en placas en el medio de cultivo celular. Se añadieron normalmente fármacos inhibidores de entrada a células diana en el momento de la infección (en ocasiones, un día antes de la infección). Normalmente, tres días después de la infección se sometieron a ensayo células diana para detectar la actividad de luciferasa usando un reactivo Steady-Glo (Promega) y un luminómetro.

En una realización, se demostró la susceptibilidad a un fármaco inhibidor de fusión (T-20, también denominado DP178; Trimeros, Research Triangle Park, NC) **(Figura 6).** Las células diana (HT4/CCR5/CXCR4) que expresan CD4, CCR5 y CXCR4 se infectaron en ausencia de T-20 y con una amplia gama de concentraciones de T-20 (escala $\log_{10}$ eje x). El porcentaje de inhibición de replicación vírica (eje y) se determinó comparando la cantidad de luciferasa producida en células infectadas en presencia de T-20 con la cantidad de luciferasa producida en ausencia de T-20. Se sometieron a ensayo virus R5-trópicos (JRCSF, 9IUS005.11), X4-trópicos (NL4-3, 92HT599.24) y con tropismo dual (92HT593.1). La susceptibilidad al fármaco se cuantifica determinando la concentración de T-20 necesaria para inhibir la replicación vírica en un 50 % (CI_{50}, mostrado como líneas discontinuas verticales en la **Figura 6).** Los virus con valores de CI_{50} más bajos son más susceptibles a T-20 que los virus con valores de CI_{50} más altos.

En otras realizaciones, puede medirse la susceptibilidad a una amplia variedad de inhibidores de entrada. Estos inhibidores incluyen, sin carácter limitativo, los fármacos y compuestos enumerados en la Tabla 4 (tabla de fármacos anti VIH).

En una segunda realización, se demuestra la susceptibilidad a un inhibidor de CCR5 que pertenece a la clase de compuestos de 4-(piperidin-1-il) butano (Dom, C.P. *et al.,* (2001), Finke, P.E. *et al.,* (2001); Merck, West Point, PA). Se infectaron células diana (U87/CD4/CCR5) que expresan CD4 y CCR5 (células R5) en ausencia del inhibidor de CCR5 y con una amplia gama de concentraciones de inhibidor de CCR5 (escala $\log_{10}$ eje x). El porcentaje de

inhibición de replicación vírica (eje y) se determinó comparando la cantidad de luciferasa producida en células infectadas en presencia de inhibidor de CCR5 con la cantidad de luciferasa producida en ausencia de inhibidor de CCR5. Se sometieron a ensayo virus de tropismo dual (92HT593.1) R5-trópicos (JRCSF) y X4-trópicos (NL4-3). La susceptibilidad al fármaco se cuantificó determinando la concentración de inhibidor de CCR5 necesaria para la replicación vírica en un 50 % (CI_{50}, mostrado como líneas discontinuas verticales en la Figura 8). Los virus con valores de CI_{50} más bajos son más susceptibles al inhibidor de CCR5 que los virus con valores de CI50 más altos. El virus X4-trópico no infectó las células diana U-87/CD4/CCR5.

En un tercer modo de realización, se demostró la susceptibilidad a un inhibidor de CXCR4 (AMD3100; AnorMED). Se infectaron células diana (U87/CD4/CXCR4) que expresan CD4 y CXCR4 en ausencia del inhibidor de CXCR4 y con una amplia gama de concentraciones de inhibidor de CXCR4 (escala log_{10} eje x). Se determinó el porcentaje de inhibición de replicación vírica (eje y) comparando la cantidad de luciferasa producida en células infectadas en presencia de inhibidor de CXCR4 con la cantidad de luciferasa producida en ausencia de inhibidor de CXCR4. Se sometieron a ensayo virus de tropismo dual (92HT593.1) R5-trópicos (JRCSF) y X4-trópicos (NL4-3). La susceptibilidad al fármaco se cuantifica determinando la concentración de inhibidor de CXCR4 necesaria para inhibir la replicación vírica en un 50 % (CI_{50}, mostrado como líneas discontinuas verticales en la Figura 9). Los virus con valores de CI_{50} más bajos son más susceptibles al inhibidor de CCR5 que los virus con valores de CI_{50} más altos. El virus R5-trópico no infectó las células diana U-87/CD4/CXCR4.

Se puede medir la susceptibilidad a un inhibidor de CD4 (por ejemplo, anticuerpo monoclonal murino 5A8; Tanox, Houston, TX). Las células diana (por ejemplo, HT4/CCR5/CXCR4, U-87/CD4/CXCR4, o U-87/CD4/CCR5) que expresan CD4 y uno o ambos correceptores pueden infectarse en ausencia del fármaco inhibidor de CD4 y con una amplia gama de concentraciones de fármaco inhibidor de CD4 (escala log_{10} eje x). El porcentaje de inhibición de replicación vírica (eje y) puede determinarse comparando la cantidad de luciferasa producida en células infectadas en presencia de inhibidor de CD4 con la cantidad de luciferasa producida en ausencia de inhibidor de CD4. Pueden someterse a ensayo virus R5-trópicos (por ejemplo, JRCSF), X4-trópicos (por ejemplo, NL4-3) y de tropismo dual (por ejemplo, 92HT593.1). Puede cuantificarse la susceptibilidad al fármaco determinando la concentración de inhibidor de CD4 necesaria para inhibir la replicación vírica en un 50 % (CI_{50}). Los virus con valores de CI_{50} más bajos son más susceptibles al inhibidor de CD4 que los virus con valores de CI_{50} más altos.

Ejemplo 2: descubrimiento, optimización y caracterización de inhibidores nuevos y novedosos de la entrada de virus

En una realización, el ensayo de entrada de virus puede usarse para identificar nuevos compuestos/entidades químicas que inhiben la entrada de virus. Las células diana (por ejemplo, HT4/CCR5/CXCR4, U-87/CD4/CXCR4, o U-37/CD4/CCR5) que expresan CD4 y uno o ambos correceptores pueden infectarse en presencia de elementos individuales de grandes bibliotecas químicas (detección de alto rendimiento, HTS en inglés). La capacidad de un compuesto de inhibir la replicación vírica (un "hit") puede determinarse comparando la cantidad de luciferasa producida en células diana infectadas en presencia de un compuesto específico con la cantidad de luciferasa producida en ausencia del compuesto.

En otra realización, puede usarse el ensayo de entrada de virus para optimizar la actividad antiviral de compuestos de partida identificados mediante HTS. Los derivados químicos modificados de compuestos de partida pueden someterse a ensayo para identificar derivados específicos que tengan actividad inhibidora de entrada de virus mejorada. Las células diana (por ejemplo, HT4/CCR5/CXCR4, U-87/CD4/CXCR4, o U-87/CD4/CCR5) que expresan CD4 y uno o ambos correceptores pueden infectarse en ausencia del inhibidor candidato y con una amplia gama de concentraciones de inhibidor candidato (escala log_{10} eje x). El porcentaje de inhibición de replicación vírica (eje y) puede determinarse comparando la cantidad de luciferasa producida en células infectadas en presencia de inhibidor candidato con la cantidad de luciferasa producida en ausencia del inhibidor candidato. Puede cuantificarse la susceptibilidad al fármaco determinando la concentración de inhibidor candidato necesaria para inhibir la replicación vírica en un 50% (CI_{50}). Los compuestos derivatizados con valores de CI_{50} más bajos son inhibidores más potentes de la entrada de virus (tienen una mayor actividad antiviral) que los derivados con valores de CI_{50} más altos.

En otra realización más, puede usarse el ensayo de entrada de virus para caracterizar el mecanismo de acción de nuevos fármacos inhibidores de entrada de virus candidatos, y la actividad antiviral frente a un espectro de virus puede diferir en susceptibilidad. Las células diana (por ejemplo, HT4/CCR5/CXCR4, U87/CD4/CXCR4, o U-87/CD4/CCR5) que expresan CD4 y uno o ambos correceptores pueden infectarse en ausencia del nuevo fármaco inhibidor de entrada candidato y con una amplia gama de concentraciones de fármaco inhibidor de entrada (escala log_{10} eje x). El porcentaje de inhibición de la replicación vírica (eje y) puede determinarse comparando la cantidad de luciferasa producida en células infectadas en presencia de nuevo inhibidor de entrada con la cantidad de luciferasa producida en ausencia de nuevo inhibidor de entrada. Pueden someterse a ensayo virus R5-trópicos (por ejemplo, JRCSF), X4-trópicos (por ejemplo, NL4-3) y de tropismo dual (por ejemplo, 92HT593.1). Puede cuantificarse la susceptibilidad al fármaco determinando la concentración de inhibidor de CD4 necesaria para inhibir la replicación vírica en un 50 % (CI_{50}).

Para determinar si el nuevo inhibidor de entrada actúa bloqueando los correceptores CCR5 o CXCR4, se someten a

ensayo los virus R5-trópicos frente al nuevo inhibidor en células U-87/CD4/CCR5 y los virus X4-trópicos se someten a ensayo frente al nuevo inhibidor usando células U-87/CD4/CXCR4. La inhibición de infección de virus R5 es indicativa de antagonismo del correceptor CCR5 y al contrario, la inhibición de infección del virus X4 es indicativa de antagonismo del correceptor CXCR4. La inhibición de infección de virus R5 y X4 puede ser indicativa de antagonismo de CD4 o la inhibición de fusión de la membrana.

Para caracterizar la actividad de un nuevo inhibidor frente a virus que presentan resistencia, o presentan susceptibilidad reducida, a otros inhibidores de entrada de virus de la misma clase, o diferente clase, los paneles seleccionados de virus resistentes al fármaco pueden someterse a ensayo en el ensayo de entrada de virus usando el nuevo fármaco inhibidor de entrada. El panel puede incluir virus con diferentes niveles de susceptibilidad a inhibidores de CCR5, inhibidores de CXCR4, inhibidores de CD4 e inhibidores de fusión de la membrana. El panel puede incluir virus con una o más mutaciones específicas que se asocian a resistencia/susceptibilidad reducida a uno o más inhibidores de entrada.

Ejemplo 3: identificación de sustituciones/mutaciones de aminoácidos de envoltura que alteran la susceptibilidad a inhibidores de entrada de virus

Este ejemplo proporciona un medio y un método para identificar mutaciones en la envoltura de VIH-1 que confieren una resistencia/susceptibilidad reducida a inhibidores de entrada de virus. Este ejemplo proporciona también un medio y un método para cuantificar el grado de susceptibilidad reducida a inhibidores de entrada conferido por las mutaciones de envoltura específicas.

Las secuencias de envoltura derivadas de muestras de pacientes, o clones individuales derivados de muestras de pacientes, o secuencias de envoltura modificadas mediante mutagénesis dirigida para contener mutaciones específicas, se someten a ensayo de entrada para cuantificar la susceptibilidad al fármaco basándose en un estándar de referencia bien caracterizado (por ejemplo, NL4-3, HXB2).

En una realización, se evalúa la susceptibilidad a muestras de paciente longitudinales (virus recogidos del mismo paciente en diferentes momentos temporales). Por ejemplo, la susceptibilidad a inhibidores de entrada se mide antes de iniciar la terapia, antes o después de cambios en el tratamiento de fármacos, o antes o después de cambios en marcadores virológicos (número de copias de ARN), inmunológicos (linfocitos T CD4), o clínicos (infección oportunista) del avance de la enfermedad.

Análisis genotípico de muestras de VIH de pacientes

Las secuencias de envoltura que representan conjuntos de muestras de pacientes, o clones derivados de conjuntos de pacientes, pueden analizarse por cualquier método de secuenciación de ADN disponible comúnmente. En una realización, se determinan secuencias de muestra de VIH del paciente usando purificación de ARN vírico, RT/PCR y análisis de secuenciación del terminador de cadena dideoxinucleótido y electroforesis capilar en gel (Applied Biosystems, Foster City, CA). Las secuencias de envoltura de conjuntos de virus de pacientes o clones se comparan a secuencias de referencia, otras muestras de pacientes, o a una muestra obtenida del mismo paciente antes de la iniciación de la terapia, si está disponible. Se examina el genotipo para detectar secuencias que sean diferentes de la secuencia de referencia o secuencia antes del tratamiento y se correlaciona con diferencias en la susceptibilidad a inhibidor de entrada.

Susceptibilidad a inhibidor de entrada de mutantes dirigidos

Los cambios genotípicos que se correlacionan con cambios en la salud se evalúan construyendo vectores de expresión de envoltura (pHIVenv) que contienen la mutación específica en un contexto genético definido y susceptible a fármacos (por ejemplo, cepa de referencia NL4-3). Las mutaciones pueden incorporarse solas y/o en combinación con otras mutaciones que se piense que modulan la susceptibilidad al inhibidor de entrada. Se introducen mutaciones de la envoltura en vectores pHIVenv usando cualquiera de los métodos comúnmente disponibles para la mutagénesis dirigida. En una realización de la presente invención, se usa el método de PCR de megacebador para mutagénesis dirigida (Sarkar, G. y Summer, S.S., 1990). Se somete a ensayo un vector pHIVenv que contiene una mutación de envoltura específica o grupo de mutaciones usando el ensayo de entrada de virus descrito en el Ejemplo 1. La susceptibilidad al fármaco del virus que contiene mutaciones de la envoltura se compara con la susceptibilidad al fármaco de un virus susceptible al fármaco definido genéticamente que carece de las mutaciones específicas bajo evaluación. Los cambios observados en la susceptibilidad al inhibidor de entrada se atribuyen a las mutaciones específicas introducidas en el vector pHIVenv.

En una realización, se demuestra la susceptibilidad reducida al inhibidor de fusión T-20 conferida por mutaciones en la resistencia al fármaco específicas en la proteína de envoltura gp41 (Figura 7)**.** Se infectan células que expresan CD4, CCR5 y CXCR4 en ausencia de T-20 y con una amplia gama de concentraciones de T-20 (escala log10 eje x). El porcentaje de inhibición de replicación vírica (eje y) se determinó comparando la cantidad de luciferasa producida en células infectadas en presencia de T-20 con la cantidad de luciferasa producida en ausencia de T-20. Se sometieron a ensayo los virus isogénicos que contienen una o dos mutaciones específicas en la proteína de

envoltura transmembrana gp41 (destacado en rojo en la leyenda de la figura; Rimsky et al., J. Virol. 72: 986-993). Se cuantifica la susceptibilidad al fármaco determinando la concentración de T-20 necesaria para inhibir la replicación vírica en un 50 % (CI50, mostrado en líneas discontinuas verticales). Los virus con valores de CI50 más bajos son más susceptibles a T-20 que virus con valores CI50 más altos.

En una realización, se introdujeron mutaciones de resistencia al fármaco en virus X4-trópicos (NL4-3) y R5-trópicos (JRCSF) bien caracterizados. Se midió la susceptibilidad a T-20 usando el ensayo de entrada de virus (Figura 7). Se determinó el nivel de cambio (en inglés, *fold change* o FC) en la susceptibilidad a T-20 para cada virus dividiendo la CI50 del virus de prueba por la CI50 de la cepa HXB2 del VIH-1. La sensibilidad a T-20 de virus mutantes similares se ha presentado en la bibliografía científica (Rimsky *et al.,*). En este modo de realización, los virus con una mutación dentro del motivo GIV de gp41 (DIV, GIM, SIV) eran menos susceptibles a T20 que los virus de tipo silvestre (GIV). Los virus con dos mutaciones en el motivo GIV (DIM, SIM, DTV) eran menos susceptibles a T20 que los virus con una o ninguna mutación en el motivo GIV.

En otra realización, las mutaciones que pueden conferir susceptibilidad reducida (o aumentada) al inhibidor de entrada se identifican mediante secuenciación de los genes de envoltura de los virus resistentes y sensibles. Las secuencias de aminoácidos deducidas de los virus resistentes y sensibles se comparan para identificar mutaciones candidatas de resistencia al fármaco. La capacidad de una mutación específica de conferir susceptibilidad al fármaco alterada se confirma o desmiente introduciendo la mutación en un virus sensible al fármaco y midiendo la susceptibilidad del virus mutante en el ensayo de entrada de virus. En el ejemplo representado aquí, un tramo corto de secuencias de aminoácidos en la primera repetición heptad (HR-1) de la proteína de envoltura transmembrana gp41 del VIH-1 se alinea para virus que presentan diferentes susceptibilidades a T-20. Los aminoácidos destacados representan mutaciones conocidas para conferir susceptibilidad reducida a T-20.

Pueden usarse análisis fenotípicos y genotípicos similares para identificar secuencias de aminoácidos de envoltura que (a) alteran/influencian la susceptibilidad a inhibidores de CCR5 o CXCR4, (b) especificar tropismo a X4, R5 y dual, y (c) producir anticuerpos neutralizantes.

En una realización, se demuestra la susceptibilidad reducida a inhibidores de correceptor (CCR5, CXCR4) conferida por mutaciones/secuencias de aminoácidos de envoltura específicas.

En otra realización, se demuestra la susceptibilidad reducida a inhibidores de correceptor (CD4) conferida por mutaciones/secuencias de aminoácidos de envoltura específicas.

Ejemplo 4: determinación de tropismo por receptor y correceptor de VIH-1

Este ejemplo proporciona un medio y un método para determinar el tropismo por el correceptor de VIH-1. Este ejemplo proporciona también un medio y un método para determinar el tropismo por el receptor de VIH-1.

En una realización, se identifican virus que usan el correceptor CCR5. En una realización relacionada, se identifican virus que usan el correceptor CXCR4. En otra realización relacionada, se identifican virus que usan CCR5 y CXCR4. En otra realización relacionada, se identifican virus que usan correceptores distintos a CCR5 y CXCR4.

En otra realización, se identifican virus que usan el receptor CD4. En otra realización relacionada, se identifican virus que usan CD8. En otra realización relacionada, se identifican virus que no requieren CD4 o CD8 para infectar células.

En esta realización, el ensayo se lleva a cabo usando dos líneas celulares. Una línea celular expresa CD4 más CCR5 (U87/CD4/CCR5), también denominadas células R5 en la presente solicitud. La otra línea celular expresa CD4 y CXCR4 (U87/CD4/CXCR4), también denominadas células X4 en la presente solicitud. El ensayo de entrada de virus se lleva a cabo infectando cultivos celulares individuales con reservorios de virus recombinantes derivados de células transfectadas con vectores pHIVenv y pHIV luc o pHIVlucΔU3. Los vectores pHIVenv contienen secuencias derivadas de virus de pacientes y expresan proteínas de envoltura de VIH-1 (gp120SU, gp41TM). En este modo de realización, se evalúan virus en el uso de células diana R5 y X4 cultivadas en placas de 96 pocillos **(Figura 3A).** Normalmente, las células R5 y X4 se colocan en placas un día antes de la infección. Se lleva a cabo la infección con cada reservorio de virus en ausencia de fármaco (sin fármaco), en presencia de concentraciones inhibidoras de un fármaco que inhibe preferiblemente virus R5-trópicos (inhibidor de CCR, por ejemplo, un compuesto de piperidin1il butano), y en presencia de concentraciones inhibidoras de un fármaco que inhibe preferentemente virus X4-trópicos (inhibidor de CXCR4, por ejemplo, AMD3100). El tropismo por el correceptor se evalúa comparando la cantidad de actividad de luciferasa producida en cada tipo celular, tanto en presencia como en ausencia de fármaco. En este modo de realización, los resultados del ensayo se interpretan comparando la capacidad de cada virus de infectar preferentemente (producir actividad de luciferasa) células R5 o células X4, o ambas células R5 y X4 si el virus presenta tropismo dual. Se evalúa también la capacidad del inhibidor de CCR5 o CXCR4 de bloquear específicamente la infección (inhibir actividad de luciferasa) **(Figura 3B)**. En este modo de realización, los virus X4-trópicos infectan células X4 pero no células R5 y la infección de células X4 es bloqueada por el inhibidor de CXCR4 (AMD3100). En este modo de realización, los virus R5-trópicos infectan células R5 pero

no células X4 y la infección de células R5 es bloqueada por el inhibidor de CCR5 (compuesto de piperidin-1il butano). En este modo de realización, los virus de tropismo dual, o mezclas de virus X4-trópicos y R5-trópicos infectan tanto células X4 como R5 y la infección de células R5 es bloqueada por el inhibidor de CCR5 y la infección de células X4 es bloqueada por el inhibidor de CXCR4. En este modo de realización, los virus no viables no replican ni en células X4 ni R5 (no se produce actividad de luciferasa).

En otra realización, el ensayo se lleva a cabo usando tres o más líneas celulares. Una línea celular expresa CD4 más CCR5 (U87/CD4/CCR5), también denominadas células R5 en esta solicitud. La otra línea celular expresa CD4 y CXCR4 (U87/CD4/CXCR4), también denominadas células X4 en esta solicitud. Líneas celulares adicionales expresan CD4 más otros correceptores de VIH-1 candidatos, incluyendo, sin carácter limitativo, BONZO, BOB, etc. Véase Tabla 1. Estas líneas celulares adicionales expresan otros correceptores candidatos, pero no expresan CCR5 o CXCR4. El ensayo de entrada de virus se lleva a cabo infectando cultivos celulares individuales con reservorios de virus recombinantes derivados de células transfectadas con vectores pHIVenv y pHIV luc o pHIVlucΔU3. Los vectores pHIVenv contienen secuencias derivadas de virus de pacientes y expresan proteínas de envoltura de VIH-1 (gp120SU, gp41TM). En este modo de realización, se evalúan virus usando células cultivadas en placas de 96 pocillos. La infección con cada reservorio de virus se lleva a cabo en células R5, células X4 y las líneas celulares que expresan CD4 más los correceptores candidatos. El tropismo por el correceptor se evalúa comparando la cantidad de actividad de luciferasa producida en cada tipo celular. En esta realización, los resultados del ensayo se interpretan comparando la capacidad de cada virus de infectar preferentemente (producir actividad de luciferasa) células R5 o células X4, o la línea celular que expresa el correceptor candidato. En esta realización, los virus X4-trópicos infectan las células X4 pero no las células R5. En esta realización, los virus R5-trópicos infectan las células R5 pero no las células X4. En esta realización, los virus de tropismo dual o una mezcla de virus X4-trópicos y R5-trópicos infectan tanto células X4 como células R5. En esta realización, la infección de líneas celulares que expresan correceptores candidatos alternativos (ni CCR5 ni CXCR4) se atribuye al tropismo por el correceptor alternativo. En esta realización, los virus no viables no se replican ni en células X4 ni R5.

En otra realización, el ensayo se lleva a cabo usando cuatro líneas celulares. Una línea celular expresa CD4 más CCR5 (U87/CD4/CCR5), también denominadas células R5 en la presente solicitud. Una segunda línea celular diferente expresa CD4 y CXCR4 (U87/CD4/CXCR4), también denominadas células X4 en esta solicitud. Una tercera línea celular expresa CD8 más CCR5 (U87/CD8/CCR5), también denominadas células CD8/R5 en la presente solicitud. Una cuarta línea celular expresa CD8 y CXCR4 (U87/CD8/CXCR4), también denominadas células CD8/X4 en la presente solicitud. El ensayo de entrada de virus se lleva a cabo infectando cultivos celulares individuales con reservorios de virus recombinantes derivados de células transfectadas con vectores pHIVenv y pHIV luc o pHIVlucΔU3. Los vectores pHIVenv contienen secuencias derivadas de virus de pacientes y expresan proteínas de envoltura de VIH-1 (gp120SU, gp41TM). En esta realización, se evalúan virus usando células cultivadas en placas de 96 pocillos. La infección con cada reservorio de virus se lleva a cabo en células R5, células X4, células CD8/R5 y células CD8/X4. El tropismo por el correceptor se evalúa comparando la cantidad de actividad de luciferasa producida en cada tipo celular. En este modo de realización, los resultados del ensayo se interpretan comparando la capacidad de cada virus de infectar preferentemente (producir actividad de luciferasa) células R5, células X4, células CD8/R5 o células CD8/X4. En esta realización, los virus CD4-trópicos infectan las células X4 y/o células R5. En esta realización, los virus CD8-trópicos infectan las células CD8/R5 y/o células CD8/X4. En esta realización, los virus de tropismo dual (uso del receptor CD4 y CD8) infectan células X4 y/o células R5 más células CD8/X4 y/o CD8/R5. En esta realización, la infección de líneas celulares que expresan CD8 pero no CD4 se atribuye al tropismo por el receptor CD8. En esta realización, los virus no viables no se replican ni en células X4 ni R5.

En otra realización relacionada, el ensayo se lleva a cabo usando dos líneas celulares. Una línea celular expresa CD4 más CCR5 y CXCR4 (HT4/CCR5/CXCR4). Una segunda línea celular expresa CD8 más CCR5 y CXCR4 (HOS/CD8/CCR5/CXCR4). El ensayo de entrada de virus se lleva a cabo infectando cultivos celulares individuales con reservorios de virus recombinantes derivados de células transfectadas con vectores pHIVenv y pHIV luc o pHIVlucΔU3. Los vectores pHIVenv contienen secuencias derivadas de virus de pacientes y expresan proteínas de envoltura de VIH-1 (gp120SU, gp41TM). En esta realización, se evalúan virus usando células cultivadas en placas de 96 pocillos. La infección con cada reservorio de virus se lleva a cabo en células HT4/CCR5/CXCR4 y células HOS/CD8/CCR5/CXCR4. El tropismo por el correceptor se evalúa comparando la cantidad de actividad de luciferasa producida en cada tipo celular. En esta realización, los resultados de este ensayo se interpretan comparando la capacidad de cada virus de infectar preferentemente (producir actividad de luciferasa) células RT4/CCR5/CXCR4 o células HOS/CD8/CCR5/CXCR4. En esta realización, los virus CD4-trópicos infectan células HT4/CCR5/CXCR4, pero no células HOS/CD8/CCR5/CXCR4. En esta realización, los virus CD8-trópicos infectan células HOS/CD8/CCR5/CXCR4, pero no células HT$/CCR5/CXCR4. En esta realización, los virus con tropismo dual (uso del receptor CD4 y CD8) infectan tanto células HT4/CCR5/CXCR4 como células HOS/CD8/CCR5/CXCR. En esta realización, la infección de las líneas celulares que expresan CD8 pero no CD4 se atribuye a tropismo por el receptor CD8. En esta realización, los virus no viables no se replican ni en células X4 ni R5.

En otra realización, el ensayo se lleva a cabo usando dos líneas celulares. Una línea celular expresa CD4 más CCR5 y CXCR4 (HT4/CCR5/CXCR4). Una segunda línea celular expresa CCR5 y CXCR4 pero no CD4 o CD8 (HOS/CCR5/CXCR4). El ensayo de entrada de virus se lleva a cabo infectando cultivos celulares individuales con reservorios de virus recombinantes derivados de células transfectadas con vectores pHIVenv y pHIV luc o

pHIVlucΔU3. Los vectores pHIVenv contienen secuencias derivadas de virus de pacientes y expresan proteínas de envoltura de VIH-1 (gp120SU, gp41TM). En esta realización, se evalúan virus usando células cultivadas en placas de 96 pocillos. La infección con cada reservorio de virus se lleva a cabo en células HT4/CCR5/CXCR4 y células HOS/CCR5/CXCR4. La infección independiente de CD4 y CD8 se evalúa comparando la cantidad de actividad de luciferasa producida en cada tipo celular. En esta realización, los resultados del ensayo se interpretan comparando la capacidad de cada virus de infectar preferentemente (producir actividad de luciferasa) células HT4/CCR5/CXCR4 o células HOS/CCR5/CXCR4. En esta realización, los virus dependientes de CD4 infectan células HT4/CCR5/CXCR4, pero no células HOS/CCR5/CXCR4. En este modo de realización, los virusindependientes de CD4 infectan tanto células HOS/CCR5/CXCR4 como células HT4/CCR5/CXCR4. En esta realización, la infección de líneas celulares que carecen de expresión de CD4 se atribuye a infección independiente de CD4. En esta realización, los virus no viables no se replican ni en células X4 ni R5.

Ejemplo 5: identificación de mutaciones/sustituciones de aminoácidos de la envoltura de VIH-1 que alteran el tropismo por el receptor y correceptor

Este ejemplo proporciona un medio y un método para identificar secuencias de aminoácido de la envoltura del VIH1 que especifican, o alteran, el tropismo por el correcptor (X4 frente a R5 frente a X4/R5 dual). Este ejemplo proporciona también un medio y un método para identificar secuencias de aminoácido de la envoltura de VIH-1 que especifican el uso de correceptor distinto a CXCR4 o CCR5. El ejemplo proporciona también un medio y un método para identificar secuencias de la envoltura de VIH-1 que especificas, o tropismo por el receptor (CD4 frente a CD8).

Las secuencias de envoltura derivadas de muestras de pacientes, o clones individuales derivados de muestras de pacientes, o secuencias de envoltura modificadas mediante mutagénesis dirigida para contener mutaciones específicas, se someten a ensayo de entrada para determinar el tropismo por el correceptor tal como se describe en el **Ejemplo 4.**

En una realización, se evalúa el tropismo por el correceptor de muestras de paciente longitudinales (virus recogidos del mismo paciente en diferentes momentos temporales). Por ejemplo, el tropismo por el correceptor se evalúa antes de iniciar la terapia, antes o después de cambios en el tratamiento con el fármaco, o antes o después de cambios en marcadores virológicos (número de copias de ARN), inmunológicos (linfocitos T CD4), o clínicos (infección oportunista) del avance de la enfermedad.

En otra realización, se evalúa el tropismo por el correceptor para muestras recogidas de un gran número de pacientes diferentes. En otra realización, se evalúa el tropismo por el correceptor para muestras recogidas de un gran número de pacientes que representan poblaciones de pacientes y virus diferentes. Dichas poblaciones de pacientes pueden incluir, sin carácter limitativo, pacientes infectados recientemente, pacientes infectados de manera crónica, pacientes con enfermedad avanzada y pacientes que están sometidos a terapia antirretroviral o inmunoterapia. Dichas poblaciones de virus pueden incluir, sin carácter limitativo, virus con distintas características genéticas (variante A, B, C, D, E, F, G), virus susceptibles a fármacos antirretrovíricos, virus con resistencia/susceptibilidad reducida a fármacos antirretrovíricos.

Análisis genotípico de muestras de VIH de pacientes

Las secuencias de envoltura que representan conjuntos de muestras de pacientes, o clones derivados de conjuntos de pacientes, pueden analizarse por cualquier método de secuenciación de ADN disponible comúnmente. En una realización, se determinan secuencias de muestras de VIH de pacientes usando purificación de ARN vírico, RT/PCR y análisis de secuenciación del terminador de cadena dideoxinucleótido y electroforesis capilar en gel (Applied Biosystems, Foster City, CA). Las secuencias de envoltura de conjuntos de virus de pacientes o clones se comparan a secuencias de referencia, otras muestras de pacientes, o a una muestra obtenida del mismo paciente antes de iniciar la terapia, si se dispone de ella. Se examina el genotipo para detectar secuencias que sean diferentes de las de referencia o secuencias de antes del tratamiento y se correlaciona con diferencias en la susceptibilidad al inhibidor de entrada.

Tropismo por el correceptor y receptor de virus caracterizados genéticamente

Las secuencias de aminoácidos de la envoltura que correlacionan el tropismo por el correceptor se evalúan construyendo vectores de expresión de la envoltura (pHIVenv) que contienen una mutación específica en un contexto genético definido (por ejemplo, NL4-3 para tropismo X4, JRCSF para tropismo R5). Las mutaciones pueden incorporarse solas y/o en combinación con otras mutaciones de las que se piense que modulan el uso de correceptor. Se introducen mutaciones de la envoltura en vectores pHIVenv usando cualquiera de los métodos comúnmente disponibles para la mutagénesis dirigida. En una realización, se usa el método de PCR de megacebador para mutagénesis dirigida (Sarkar, G. y Summer, S.S., 1990). Se somete a ensayo un vector pHIVenv que contiene una mutación de envoltura específica o grupo de mutaciones usando el ensayo de entrada de virus descrito en el Ejemplo 1. El tropismo por el correceptor del virus que contiene mutaciones en la envoltura se compara al tropismo por el correceptor de un virus definido genéticamente que carece de las mutaciones específicas bajo evaluación. La capacidad de una mutación específica de conferir tropismo por el correceptor alterado se

confirma o desmiente introduciendo la mutación en un virus de referencia bien caracterizado y evaluando el tropismo por el correceptor del virus mutante en el ensayo de entrada de virus como se ha descrito en el **Ejemplo 4.** Los cambios observados en el tropismo por el correceptor se atribuyen a las mutaciones específicas introducidas en el vector pHIVenv.

En una realización, los determinantes genéticos del tropismo R5 se identifican evaluando secuencias de aminoácidos con el bucle V3 de la proteína de envoltura de superficie gp120. Las secuencias de aminoácidos bajo evaluación se identifican comparando las secuencias de aminoácidos de un gran número de virus X4-trópicos y R5-trópicos. Se seleccionan diferencias consistentes entre los virus R5 y X4 para su evaluación. Se construyen virus isogénicos basados en un clon parental de X4 bien caracterizado (por ejemplo, NL4-3, HXB2) que contiene mutaciones "R5 candidatas" específicas en el bucle V3 de la proteína de envoltura gp120 mediante mutagénesis dirigida y se someten a ensayo para evaluar el tropismo por el correceptor tal como se describe en el Ejemplo 4. Se infectan células que expresan CD4 más CCR5 (por ejemplo, U-87/CD4/CCR5) o CD4 más CXCR4 (U-87/CD4/CXCR4) en ausencia de un inhibidor de R5 (compuesto piperidin-1il butano) y de X4 (AMD3100) y en presencia de concentraciones inhibidoras de R5 y concentraciones de fármaco de X4. Las sustituciones de aminoácido que cambian el virus X4-trópico a un virus R5-trópico se caracterizan como determinantes genéticos de tropismo R5.

En una realización relacionada, los determinantes genéticos del tropismo X4 se identifican evaluando secuencias de aminoácidos con el bucle V3 de la proteína de envoltura de superficie gp120. Las secuencias de aminoácidos bajo evaluación se identifican comparando las secuencias de aminoácidos de un gran número de virus X4-trópicos y R5-trópicos. Se seleccionan diferencias consistentes entre los virus R5 y X4 para su evaluación. Se construyen virus isogénicos basados en un clon parental de R5 bien caracterizado (por ejemplo, JRCSF) que contienen mutaciones "X4 candidatas" específicas en el bucle V3 de la proteína de envoltura gp120 mediante mutagénesis dirigida y se someten a ensayo para evaluar el tropismo por el correceptor tal como se describe en el **Ejemplo 4.** Se infectan células que expresan CD4 más CCR5 (por ejemplo, U-87/CD4/CCR5) o CD4 más CXCR4 (U-87/CD4/CXCR4) en ausencia de un inhibidor de R5 (compuesto piperidin-1il butano) y de X4 (AMD3100) y en presencia de concentraciones inhibidoras de R5 y concentraciones de fármaco de X4. Las sustituciones de aminoácido que cambian el virus X4-trópico a un virus R5-trópico se caracterizan como determinantes genéticos de tropismo R5.

En una realización relacionada, los determinantes genéticos del tropismo X4 o R5 se identifican evaluando secuencias de aminoácidos en la proteína de envoltura de superficie gp120 completa.

En una realización relacionada, los determinantes genéticos del tropismo X4 o R5 se identifican evaluando secuencias de aminoácidos en la proteína de envoltura transmembrana gp41.

En una realización relacionada, los determinantes genéticos que especifican el uso de correceptores diferentes a CCR5 y CXCR4 se identifican evaluando secuencias de aminoácidos en el bucle V3 de la proteína de envoltura de superficie gp120. Las secuencias de aminoácidos bajo evaluación se identifican comparando las secuencias de aminoácidos de virus que son capaces de replicar en células que no expresan CXCR4 o CCR5, pero sí expresan otros correceptores candidatos. Se seleccionan diferencias consistentes en secuencias de aminoácidos entre estos virus que no son X4, ni R5 y los virus X4 y R5 para su evaluación. Los virus isogénicos basados en un clon parental de R5 (por ejemplo, JRCSF) o X4 (por ejemplo, NL4-3) bien caracterizado que contiene mutaciones que "no son candidatas de X4, ni R5" específicas en el bucle V3 de la proteína de envoltura gp120 se construyen mediante mutagénesis dirigida y se someten a ensayo para el tropismo por el correceptor como se ha descrito en el **Ejemplo 4**. Las células que expresan CD4 más CCR5 (por ejemplo, U-87/CD4/CCR5), CD4 más CXCR4 (U87/CD4/CXCR4), y CD4 más otros correceptores candidatos (U87/CD4/X) se infectan en ausencia de un inhibidor de R5 (compuesto de piperidin-1il butano) y X4 (AMD3100) y en presencia de concentraciones inhibidoras de R5 y concentraciones de fármaco de X4. Las sustituciones de aminoácidos que confieren tropismo por un correceptor no X4 y no R5 se caracterizan como determinantes genéticos de tropismo por el correceptor específico.

En una realización relacionada, los determinantes genéticos del tropismo por otros correceptores se identifican evaluando secuencias de aminoácidos en la proteína de envoltura de superficie gp120 completa.

En una realización relacionada, los determinantes genéticos de tropismo por otros correceptores se identifican evaluando secuencias de aminoácido en la proteína de envoltura transmembrana gp41.

En otra realización, los determinantes genéticos que especifican el uso de CD8 (además de, o en lugar de CD4) como un receptor para VIH-1 se identifican evaluando secuencias de aminoácido en el bucle V3 de la proteína de envoltura de superficie gp120. Las secuencias de aminoácidos bajo evaluación se identifican comparando las secuencias de aminoácidos de virus que son capaces de replicar en células que no expresan CD4, pero sí expresan CD8. Se seleccionan diferencias consistentes en secuencias de aminoácidos entre estos virus CD4-trópicos y CD8-trópicos para su evaluación. Los virus isogénicos basados en un clon parental CD4-trópico (por ejemplo, NL4-3, JRCSF) bien caracterizado que contienen mutaciones "CD8 candidatas" específicas en el bucle V3 de la proteína de envoltura gp120 se construyen mediante mutagénesis dirigida y se someten a ensayo para el tropismo por el receptor CD8 como se ha descrito en el **Ejemplo 4**. Se infectan células que expresan CD4 más CCR5 (por ejemplo,

U-87/CD4/CCR5), CD4 más CXCR4 (U-87/CD4/CXCR4), CD8 más CCR5 (por ejemplo, U-87/CD8/CCR5), CD8 más CXCR4 (U87/CD8/CXCR4). Las sustituciones de aminoácido que permiten la replicación en células que expresan CD8 pero no CD4 se caracterizan como determinantes genéticos del tropismo CD8.

En una realización relacionada, los determinantes genéticos del tropismo CD8 se identifican evaluando secuencias de aminoácidos en la proteína de envoltura de superficie gp120 completa.

En una realización relacionada, los determinantes genéticos del tropismo CD8 se identifican evaluando secuencias de aminoácidos en la proteína de envoltura transmembrana gp41.

Ejemplo 6: medición de neutralización de anticuerpos de VIH-1

Este ejemplo proporciona un medio y un método para evaluar la neutralización mediada por anticuerpo de VIH-1, también denominada neutralización del virus en esta solicitud. Este ejemplo también proporciona un medio y un método para evaluar la actividad de neutralización del virus de anticuerpos en pacientes infectados con VIH-1. Este ejemplo también proporciona un medio y un método para evaluar la actividad neutralizante de virus de anticuerpos en sujetos o animales vacunados con vacunas terapéuticas y vacunas candidatas. Este ejemplo también proporciona un medio y un método para evaluar la actividad neutralizante de virus de anticuerpos en sujetos o animales vacunados con vacunas protectoras (profilácticas o preventivas) y vacunas candidatas. Este ejemplo también proporciona un medio y un método para evaluar la actividad neutralizante de virus o preparaciones de anticuerpos monoclonales o policlonales específicos.

Las secuencias de envoltura derivadas de muestras de pacientes, o clones individuales derivados de muestras de pacientes, o secuencias de envoltura modificadas mediante mutagénesis dirigida para contener mutaciones específicas, se someten a ensayo de entrada para evaluar la neutralización mediada por anticuerpo.

En una realización, se evalúa la neutralización mediada por anticuerpo en muestras de paciente longitudinales (virus recogidos del mismo paciente en diferentes momentos temporales). Por ejemplo, se evalúa la neutralización de virus antes de la vacunación, durante el curso de la vacunación, y en momentos temporales graduales tras la terminación del programa de vacunación. En una realización relacionada, el suero de animales que incluye, sin carácter limitativo, ratones, ratas, conejos, cerdos y ganado, se evalúa antes de la inoculación con vacunas candidatas, durante un programa de inoculación repetida, y en momentos temporales graduales tras la terminación del programa de inoculación. En una realización, se evalúa la neutralización del virus para vacunas preventivas y vacunas candidatas. En otra realización, se evalúa la neutralización del virus para vacunas terapéuticas.

En otra realización, se evalúa la neutralización de virus para muestras recogidas de un gran número de pacientes diferentes. En otra realización, se evalúa la neutralización de virus para muestras recogidas de un gran número de pacientes que representan poblaciones de pacientes diferentes y poblaciones de virus diferentes. Las "poblaciones de pacientes" pueden incluir, sin carácter limitativo, pacientes infectados recientemente, pacientes infectados de manera crónica, pacientes con la enfermedad del SIDA/VIH avanzada, pacientes con un avance de la enfermedad rápido, pacientes con un avance de la enfermedad lento (normalmente denominados pacientes sin progresión a largo plazo), pacientes que se están sometiendo a terapia antirretroviral o inmunoterapia (por ejemplo, interleucina-2 u otras citocinas), sujetos vacunados y no vacunados. Las "poblaciones de virus" pueden incluir, sin carácter limitativo, virus con diferentes características genéticas y orígenes geográficos (variante A, B, C, D, E, F, G), virus susceptibles a fármacos antirretrovíricos, virus con resistencia/susceptibilidad reducida a fármacos antirretrovíricos, aislados primarios, aislados adaptados para su cultivo en cultivo celular (a menudo denominados virus adaptados de laboratorio), virus inductores de sincitio (SI), virus no inductores de sincitio (NSI), virus macrófago-trópicos (M), virus trópicos de células T (T) y virus con tropismo dual (M y T).

Caracterización de anticuerpo de paciente (anticuerpo de paciente vs. panel de virus estándar)

En esta realización, el ensayo se lleva a cabo usando una línea celular diana que expresa el receptor CD4 de VIH-1 más los correceptores CCR5 y CXCR4 de VIH-1 (HT4/CCR5/CXCR4). Dicha línea celular es capaz de evaluar la actividad neutralizante de anticuerpos para los virus R5-trópicos y X4-trópicos. En una realización relacionada, el ensayo se lleva a cabo usando dos líneas celulares diana. Una línea celular expresa CD4 más CCR5 (U-87/CD4/CCR5) y se usa para someter a ensayo virus R5-trópicos. Otra línea celular expresa CD4 más CXCR4 (U-87/CD4/CXCR4) y se usa para evaluar virus X4-trópicos. El ensayo de entrada de virus se lleva a cabo infectando cultivos de células diana individuales con reservorios de virus recombinantes derivados de células hospedadoras empaquetadoras transfectadas con vectores pHIVenv y pHIVluc o pHIVlucΔU3. En esta realización, los vectores pHIVenv contienen secuencias de envoltura de virus específicos bien caracterizados y expresan las proteínas de envoltura de VIH-1 (gp120SU, gp41TM). Dichos virus representan un "panel de virus patrón" (véase aenteriormente la descripción de la población de virus). Algunos, pero no todos, los ejemplos de virus razonables que pueden constituir un panel patrónr se enumeran en la Tabla 4. Se usa un panel de virus patrón para comparar la actividad de anticuerpo neutralizante de suero obtenido de muchos pacientes diferentes y/o animales (véase la descripción anteriormente de población de paciente). En esta realización, se evalúan virus usando células diana cultivadas en placas de 96 pocillos. Normalmente, las células diana se colocan en placas a 5.000 células por pocillo para

HT4/CCR5/CXCR4 o 10.000 células por pocillo para U-87/CD4/CCR5 y U-87/CD4/CXCR4 un día antes de la infección. Antes de la infección de células diana, se preincuba cada reservorio de virus con el suero o la preparación de anticuerpo (normalmente 1 h) que se está evaluando. El suero o preparaciones de anticuerpos se someten a ensayo no diluidas y en diluciones gradualmente mayores (normalmente 4 o 5 diluciones 1:10 en serie). La infección de células diana con cada reservorio de virus se lleva a cabo también en ausencia de anticuerpo (sin anticuerpo). La neutralización de virus se evalúa comparando la cantidad de actividad de luciferasa producida en células diana, tanto en presencia como en ausencia de anticuerpo. En esta realización, los resultados del ensayo se interpretan comparando la capacidad de cada anticuerpo para bloquear preferentemente la infección de células diana (reducir o eliminar la actividad de luciferasa). La actividad de neutralización de virus se cuantifica observando la mayor dilución de anticuerpo (más diluido) que es capaz de bloquear la infección de células diana (por ejemplo, la dilución más alta que es capaz de reducir la actividad de luciferasa producida en ausencia de anticuerpo en un 50 %).

Caracterización de VIH-1 de paciente (virus de paciente frente a panel de anticuerpo patrón)

En esta realización, el ensayo se lleva a cabo usando una línea celular diana que expresa el receptor CD4 de VIH-1 más los correceptores CCR5 y CXCR4 de VIH-1 (HT4/CCR5/CXCR4). Dicha línea celular es capaz de evaluar la actividad nuetralizante de anticuerpos para virus R5-trópicos y X4-trópicos. En una realización relacionada, el ensayo se lleva a cabo usando dos líneas celulares diana. Una línea celular expresa CD4 más CCR5 (U-87/CD4/CCR5) y se usa para someter a ensayo virus R5-trópicos. Otra línea celular expresa CD4 más CXCR4 (U-87/CD4/CXCR4) y se usa para evaluar virus X4-trópicos. El ensayo de entrada de virus se lleva a cabo infectando cultivos de células diana individuales con reservorios de virus recombinantes derivados de células huésped empaquetadoras transfectadas con vectores pHIVenv y pHIVluc o pHIVlucΔU3. En este modo de realización, los vectores pHIVenv contienen secuencias de envoltura derivadas de virus de pacientes y expresan proteína de envoltura de VIH-1 (gp120SU, gp41TM). En este modo de realización, virus de diferentes poblaciones de pacientes (véase anteriormente la descripción de la población de pacientes), y/o diferentes poblaciones de virus (véase la descripción anterior de población de virus) se usan para construir vectores pHIVenv. Se evalúa el VIH pseudotipado derivado de vectores pHIVenv en el ensayo de entrada de virus para determinar si son susceptibles a neutralización mediante un panel de preparaciones de anticuerpos bien caracterizados específicos. Dichos anticuerpos representan un "panel de anticuerpos patrón". Algunos, pero no todos, los ejemplos de anticuerpos razonables que pueden constituir un panel patrón se enumeran en la Tabla 4. En este modo de realización, se evalúa la neutralización de virus usando células diana cultivadas en placas de 96 pocillos. Normalmente, las células diana se colocan en placas a 5.000 células por pocillo para HT4/CCR5/CXCR4 o 10.000 células por pocillo para U-87/CD4/CCR5 y U-87/CD4/CXCR4 un día antes de la infección. Antes de la infección, cada reservorio de virus derivado de paciente se incuba con cada una de las preparaciones de anticuerpo (normalmente durante 1 h) en el panel de anticuerpo patrón. El suero o las preparaciones de anticuerpos se someten a ensayo no diluidas y en diversas diluciones (normalmente 4 o 5 diluciones 1:10 en serie). La infección de células diana con cada reservorio de virus se lleva a cabo también en ausencia de fármaco (sin fármaco). La neutralización de virus se evalúa comparando la cantidad de actividad de luciferasa producida en células diana, tanto en presencia como en ausencia de anticuerpo. En este modo de realización, los resultados del ensayo se interpretan comparando la capacidad de cada anticuerpo para bloquear preferentemente la infección de células diana (reducir o eliminar la actividad de luciferasa). Se cuantifica la actividad de neutralización de virus observando la mayor dilución de anticuerpo (más diluido) que es capaz de bloquear la infección de células diana (por ejemplo, la dilución más alta que es capaz de reducir la actividad de luciferasa producida en ausencia de anticuerpo en un 50 %).

Caracterización de VIH-1 de paciente (virus de paciente frente a anticuerpo de paciente)

Este ejemplo proporciona un método para detectar en un paciente la evolución de una respuesta de anticuerpo neutralizante y de cepas virales que evitan la respuesta neutralizante. En este modo de realización, el ensayo se lleva a cabo usando una línea celular diana que expresa el receptor CD4 de VIH-1 más los correceptores CCR5 y CXCR4 de VIH-1 (U87/CD4/CCR5/CXCR4 o HT4/CCR5/CXCR4). Dicha línea celular es capaz de evaluar la actividad neutralizante de anticuerpos para los virus R5-trópicos y X4-trópicos. En una realización relacionada, el ensayo se lleva a cabo usando dos líneas celulares diana. Una línea celular expresa CD4 más CCR5 (U-87/CD4/CCR5) y se usa para someter a ensayo virus R5-trópicos. Otra línea celular expresa CD4 más CXCR4 (LT-87/CD4/CXCR4) y se usa para evaluar virus X4-trópicos. El ensayo de entrada de virus se lleva a cabo infectando cultivos de células diana individuales con reservorios de virus recombinantes derivados de células hospedadoras empaquetadoras transfectadas con vectores pHIVenv y pHIVΔ o pHIVΔ DU3 . En esta realización, los vectores pHIVenv contienen secuencias de envoltura derivadas de virus de pacientes y expresan las proteínas de envoltura de VIH-1 (gp120SU, gp41TM). En esta realización, se usan poblaciones de virus diferentes para construir vectores pHIVenc. Las poblaciones de virus diferentes se derivan de muestras de plasma en serie (es decir, longitudinales) (es decir, virus recogidos del mismo paciente en diferentes momentos temporales). Se evalúa VIH pseudotipado derivado de vectores pHIVenv en el ensayo de entrada de virus para determinar si son susceptibles a neutralización mediante un panel de anticuerpos que se derivan de muestras de plasma en serie del paciente. Por tanto, en esta realización, el mismo paciente es la fuente tanto de las poblaciones de virus como de los anticuerpos. En esta realización, se evalúan virus usando células diana cultivadas en placas de 96 pocillos, por ejemplo. Normalmente, las células diana se colocan en placas a 10.0000 células por pocillo para las líneas celulares U-87/CD4/CCR5/CXCR4, U-87/CD4/CCR5 y U-87/CD4/CXCR4 o a 5.000 células por pocillo para la línea celular

HT4/CCR5/CXCR4. Las células diana se colocan en placas el día de la infección. Antes de la infección de células diana, se preincuba cada reservorio de virus con el suero o la preparación de anticuerpo (normalmente 1 h) que se está evaluando. El suero o las preparaciones de anticuerpo se someten a ensayo sin diluir y en diluciones gradualmente mayores (normalmente de cuatro a cinco diluciones 1:5 o 1:10 en serie). La infección de células diana con cada reservorio de virus se lleva a cabo también en ausencia de anticuerpo (sin anticuerpo). La neutralización de virus se evalúa comparando la cantidad de actividad de luciferasa producida en células diana, tanto en presencia como en ausencia de anticuerpo. En esta realización, los resultados del ensayo se determinan comparando la capacidad de anticuerpos derivados del paciente en diferentes momentos temporales para bloquear preferentemente la infección de células diana (reducir o eliminar la actividad de luciferasa) de los virus pseudotipados derivados del paciente en diferentes momentos temporales. La actividad de neutralización de virus se cuantifica observando la mayor dilución de anticuerpo (más diluido) que es capaz de bloquear la infección de células diana (por ejemplo, la dilución más alta que es capaz de reducir la actividad de luciferasa producida en ausencia de anticuerpo en un 50 %). Por tanto, este modo de realización permite someter a ensayo en un paciente la coevolución con el tiempo de cepas de VIH inmunológicamente diferentes y la respuesta de anticuerpo neutralizante.

Este método se usó en un grupo de 14 pacientes sin tratamiento previo con infección de VIH primaria. Se tomaron muestras de plasma de cada paciente a intervalos de 2-4 meses (el seguimiento medio fue de 18 meses, con un intervalo de 6-39 meses). Se incubaron virus con diluciones 1:5 en serie de anticuerpos y se usaron para infectar células diana que expresaban CD4 más los correceptores CCR5 y CXCR4. Se descubrió que 12 de los 14 pacientes generaron fuertes respuestas de anticuerpos neutralizantes al virus. Se proporcionan los datos de un paciente representativo en la Figura 10. Sin embargo, cada virus secuencial escapó de manera consistente y rápida de la respuesta de anticuerpo neutralizante concurrente. Los títulos de neutralización máxima (media dilución 1:1497, intervalo 1:339-1:4627) se desarrollaron varios meses después de la aparición de un virus y la respuesta permaneció elevada muchos meses, hasta años, después. Los títulos de anticuerpo neutralizante fueron generalmente mayores para virus tempranos que para virus tardíos del mismo paciente. Las respuestas de neutralización a un virus primario R5 heterólogo (JR-CSF) fueron débiles y tardías. Las respuestas a una cepa de laboratorio X4 (NL4-3) aumentaron con el tiempo, pero variaron en intensidad entre pacientes. La magnitud de respuesta de anticuerpo neutralizante a virus autólogo no se correlacionó con ARN de VIH plasmático medio o la duración de infección VIH. Por tanto, la tasa de escape de neutralización vírica es notable e indica que el anticuerpo neutralizante puede ejercer un nivel previamente inapreciable de presión selectiva sobre la evolución del virus. Estos datos conllevan importantes implicaciones para la historia natural y el desarrollo de vacunas.

Ejemplo 7: identificación de secuencias de aminoácido de la envoltura del VIH-1 que provoquen, alteren o eviten respuestas de anticuerpo neutralizantes

Este ejemplo proporciona un medio y un método para identificar secuencias de aminoácido de la envoltura de VIH-1 que provocan/fomentan, o alteran, o evitan la neutralización mediada por anticuerpos de la infección de VIH-1 (también denominado neutralización de virus en la presente solicitud).

Las secuencias de envoltura derivadas de muestras de pacientes, o clones individuales derivados de muestras de pacientes, o secuencias de envoltura modificadas mediante mutagénesis dirigida para contener mutaciones específicas, se someten a ensayo de entrada para determinar el tropismo por el correceptor tal como se describe en el **Ejemplo 6.**

En una realización, se evalúa la neutralización mediada por anticuerpo en muestras de paciente longitudinales (virus recogidos del mismo paciente en diferentes momentos temporales). Por ejemplo, se evalúa la neutralización de virus antes de la vacunación, durante el programa de vacunación, y en momentos temporales graduales tras la terminación del programa de vacunación. En una realización, se evalúa la neutralización del virus para vacunas preventivas. En otra realización, se evalúa la neutralización del virus para vacunas terapéuticas.

En otra realización, se evalúa la neutralización de virus para muestras recogidas de un gran número de pacientes diferentes. En otra realización, se evalúa la neutralización de virus para muestras recogidas de un gran número de pacientes que representan poblaciones de pacientes y virus diferentes. Dichas poblaciones de pacientes pueden incluir, sin carácter limitativo, pacientes recientemente infectados, pacientes infectados de manera crónica, pacientes con enfermedad avanzada, pacientes que se están sometiendo a terapia antirretroviral o inmunoterapia, sujetos vacunados y no vacunados. Dichas poblaciones de virus pueden incluir, sin carácter limitativo, virus con distintas características genéticas (variante A, B, C, D, E, F, G), virus susceptibles a fármacos antirretrovíricos, virus con resistencia/susceptibilidad reducida a fármacos antirretrovíricos, aislados primarios o aislados adaptados para su cultivo en cultivo celular (a menudo denominados virus adaptados de laboratorio), virus inductores de sincitio (SI) o virus no inductores de sincitio (NSI), virus macrófago-trópicos (M), virus trópicos de células T (T) y virus con tropismo dual (M y T).

Análisis genotípico de muestras de VIH de pacientes

Las secuencias de envoltura que representan conjuntos de muestras de pacientes, o clones derivados de conjuntos de pacientes, pueden analizarse mediante cualquier método de secuenciación de ADN disponible comúnmente. En

una realización, se determinan secuencias de muestra de VIH del paciente usando purificación de ARN vírico, RT/PCR y análisis de secuenciación del terminador de cadena dideoxinucleótido y electroforesis capilar en gel (Applied Biosystems, Foster City, CA). Las secuencias de envoltura de conjuntos de virus de pacientes o clones se comparan a secuencias de referencia, otras muestras de pacientes, o a una muestra obtenida del mismo paciente antes de la iniciación de la terapia, si está disponible. Se examina el genotipo para detectar secuencias que sean diferentes de las de referencia o secuencias de antes del tratamiento y se correlaciona con diferencias en la susceptibilidad a inhibidor de entrada.

Neutralización mediada por anticuerpo de virus genéticamente caracterizados

Las secuencias de aminoácidos de la envoltura que se correlacionan con la neutralización de virus se evalúan construyendo vectores de expresión de la envoltura (pHIVenv) que contienen una mutación específica en un contexto genético definido (por ejemplo, NL4-3 para tropismo X4, JRCSF para tropismo R5). Las mutaciones pueden incorporarse solas y/o en combinación con otras mutaciones que se piense que modulan la neutralización de virus. Se introducen mutaciones de la envoltura en vectores pHIVenv usando cualquiera de los métodos comúnmente disponibles para la mutagénesis dirigida. En una realización, se usa el método de PCR de megacebador para mutagénesis dirigida (Sarkar, G. y Summer, S.S., 1990). Se somete a ensayo un vector pHIVenv que contiene una mutación de envoltura específica o grupo de mutaciones usando el ensayo de entrada de virus descrito en el **Ejemplo 6**. Pueden seleccionarse preparaciones de anticuerpo específicas (es decir, preparaciones de anticuerpos monoclonales o policlonales bien caracterizados), suero de pacientes infectados con VIH, o suero de sujetos vacunados para comparar la actividad neutralizante. La neutralización de anticuerpos del virus que contiene mutaciones en la envoltura se compara con la neutralización de anticuerpo de un virus definido genéticamente que carece de las mutaciones específicas bajo evaluación. La capacidad de una mutación específica para conferir, alterar o evitar la neutralización de anticuerpo se confirma o desmiente introduciendo la mutación en el virus de referencia bien caracterizado y evaluando la neutralización mediada por anticuerpos del virus mutante en el ensayo de entrada de virus descrito en el **Ejemplo 6**. Los cambios observados en la neutralización del virus se atribuyen a las mutaciones específicas introducidas en el vector pHIVenv.

En una realización, los determinantes genéticos de la neutralización de virus se identifican evaluando secuencias de aminoácidos en el bucle V3 de la proteína de envoltura de superficie gp120. Las secuencias de aminoácidos bajo evaluación se identifican comparando las secuencias de aminoácidos de un gran número de virus que pueden, o no pueden neutralizarse mediante diversas preparaciones de anticuerpos bien caracterizados, suero de pacientes o suero de sujetos vacunados. Se seleccionaron diferencias consistentes en secuencias de aminoácidos del bucle V3 entre virus que pueden, o no pueden neutralizarse para su evaluación. Los virus isogénicos basados en un clon parental bien caracterizado (por ejemplo, NL4-3, HXB2, JRCSF) que contiene mutaciones "de neutralización de virus candidatas" en el bucle V3 de la proteína de envoltura gp120 se construyen mediante mutagénesis dirigida y se someten a ensayo para evaluar la neutralización mediada por anticuerpos tal como se ha descrito en el **Ejemplo 6**. Se infectan células que expresan CD4 más CCR5 (por ejemplo, U-87/CD4/CCR5),CD4 más CXCR4 (U-87/CD4/CXCR4), o CD4 más CCR5 y CXCR4 (HT4/CCR5/CXCR4). Las sustituciones de aminoácidos que cambian, provocan, alteran o evitan la neutralización de anticuerpos se consideran importantes para la neutralización de virus.

En una realización relacionada, los determinantes genéticos de neutralización de virus se identifican evaluando secuencias de aminoácidos en la proteína de envoltura de superficie gp120 completa.

En una realización relacionada, los determinantes genéticos de neutralización de virus se identifican evaluando secuencias de aminoácidos en la proteína de envoltura transmembrana gp41.

Ejemplo 8: medición de susceptibilidad a inhibidores de la entrada de virus para controlar las decisiones sobre tratamientos

Este ejemplo proporciona un medio y un método para usar la susceptibilidad a inhibidores de entrada de virus para controlar el tratamiento del VIH-1. Este ejemplo proporciona además un medio y un método para usar la susceptibilidad al inhibidor de entrada de virus para controlar el tratamiento de pacientes que han recibido un tratamiento antirretroviral previo con un inhibidor de entrada de virus. La presente divulgación proporciona además un medio y un método para usar la susceptibilidad al inhibidor de entrada de virus para controlar el tratamiento de pacientes que no han recibido un tratamiento previo con un inhibidor de entrada de virus.

En una realización, se usa la susceptibilidad de virus del paciente a inhibidores de la entrada de virus para controlar el tratamiento de pacientes en los que fracasan regímenes antirretrovíricos que incluyen uno o más inhibidores de entrada de virus. El fracaso del tratamiento (también denominado fracaso virológico) se define generalmente como tratamiento antivírico parcialmente supresor que resulta en niveles detectables de virus, que se mide normalmente en el plasma de pacientes). La guía puede incluir, sin carácter limitativo, (a) clarificación de opciones de tratamiento de fármacos disponibles, (b) selección de regímenes de tratamiento más activos, (c) clarificación de la etiología de carga vírica creciente en pacientes tratados (es decir, pobre adherencia, resistencia al fármaco), y (d) reducción en el uso de fármacos potencialmente tóxicos e inactivos. En este modo de realización, los vectores del ensayo de

resistencia se derivan de muestras de virus de pacientes y se someten a ensayo para evaluar la susceptibilidad a diversos inhibidores de entrada de virus usando el ensayo de entrada de virus fenotípico. Los inhibidores de entrada de virus pueden incluir, sin carácter limitativo, inhibidores de fusión (por ejemplo, T-20, T-1249), antagonistas de correceptores (AMD3100, AMD8664, TAK779, PR0542, y compuestos peperidin-1il butano) y antagonistas de CD4 (MAb 5A8). Las decisiones de tratamiento apropiadas se basan en los resultados del ensayo de entrada de virus **(por ejemplo, véase Figura 4B)** y resultados de ensayos de laboratorio relevantes adicionales e información clínica.

En otra realización, se usa la susceptibilidad de virus del paciente a inhibidores de la entrada de virus para controlar el tratamiento de pacientes que no han sido tratados previamente con regímenes antirretrovirales que incluyen uno o más inhibidores de entrada de virus. La guía debe incluir, sin carácter limitativo, (a) clarificación de opciones de tratamiento de fármacos disponibles, (b) selección de regímenes de tratamiento más activos, (c) clarificación de la susceptibilidad de referencia a inhibidores de entrada de virus, y (d) reducción en el uso de fármacos potencialmente tóxicos e inactivos. Determinar la susceptibilidad de referencia de inhibidores de entrada de virus en pacientes que no han recibido tratamiento es importante por dos razones. Primero, la susceptibilidad natural de los virus a inhibidores de entrada puede variar ampliamente. **(por ejemplo, véase Figura 4A)**. Segundo, el uso aumentado de inhibidores de entrada de virus resultará indudablemente en la generación de variantes resistentes al fármaco que pueden transmitirse a sujetos infectados recientemente. En este modo de realización, los vectores de ensayo de resistencia se derivan de muestras de virus de pacientes y se someten a ensayo de susceptibilidad a diversos inhibidores de entrada de virus usando el ensayo de entrada de virus fenotípico. Los inhibidores de entrada de virus pueden incluir, sin carácter limitativo, inhibidores de fusión (por ejemplo, T-20, T-1249), antagonistas de correceptores (AMD3100, AMD8664, TAK779, PR0542, y compuestos peperidin-1il butano) y antagonistas de CD4 (MAb 5A8). Las decisiones de tratamiento adecuadas se basan en los resultados del ensayo de entrada de virus y resultados de ensayos de laboratorio relevantes adicionales e información clínica.

Ejemplo 9: medición de tropismo por el correceptor de VIH-1 para controlar las decisiones de tratamiento

Este ejemplo proporciona un medio y un método para usar el tropismo por el correceptor de VIH-1 (CCR5, CXCR4) para controlar el tratamiento del VIH-1. Este ejemplo proporciona también un medio y un método para usar el tropismo por el correceptor de VIH-1 para controlar el tratamiento de pacientes en los que fracasa el tratamiento de fármacos antirretrovirales. La presente divulgación proporciona además un medio y métodos para usar el tropismo por el correceptor de VIH-1 para controlar el tratamiento de pacientes infectados recientemente con VIH-1.

Este ejemplo proporciona un medio y un método para usar el tropismo por el correceptor de virus VIH-1 para controlar el tratamiento del VIH-1. Este ejemplo proporciona además un medio y un método para usar el tropismo por el correceptor de VIH-1 para controlar el tratamiento de pacientes que han recibido un tratamiento antirretroviral previo con un inhibidor de entrada de virus. Esta divulgación proporciona además el medio y un método para usar el tropismo por el correceptor de VIH-1 para controlar el tratamiento de pacientes que no han recibido un tratamiento previo con un inhibidor de entrada de virus.

En una realización, el tropismo por el correceptor de un virus de paciente se usa para controlar el tratamiento de un paciente en el que fracasan los regímenes de antirretrovíricos que incluyen uno o más antagonistas de correceptores. El fracaso del tratamiento (también denominado fracaso virológico) se define generalmente como tratamiento antivírico parcialmente supresor que resulta en niveles detectables de virus, que se mide normalmente en el plasma de pacientes). La guía puede incluir, sin carácter limitativo, (a) clarificación de la etiología de carga viral creciente en pacientes tratados (es decir, pobre adherencia, resistencia al fármaco, cambio en el tropismo por el correceptor), (b) clarificación de opciones de tratamiento de fármacos disponibles, (c) selección de regímenes de tratamiento más activos, y (d) reducción en el uso de fármacos potencialmente tóxicos e inactivos. El control de tropismo por el correceptor en pacientes que reciben tratamiento con antagonistas de CCR5 tiene importancia clínica, ya que la presión del fármaco puede resultar en un cambio a tropismo por el correceptor CXCR4. Los virus X4 (tropismo por el correceptor CXCR4) se asocian a un pronóstico más desfavorable comparado a los virus R5 (tropismo por el correceptor CCR5). En esta realización, los vectores del ensayo de resistencia se derivan de muestras de virus de pacientes y se someten a ensayo para evaluar la susceptibilidad a diversos antagonistas del correceptor usando el ensayo de entrada de virus fenotípico. Los antagonistas del correceptor pueden incluir, sin carácter limitativo, AMD3100, AMD8664, TAK779, PR0542, y compuestos de peperidin-lil butano. Las decisiones de tratamiento adecuadas se basan en los resultados del ensayo de entrada de virus (por ejemplo, **véase Figura 4B**) y resultados de ensayos de laboratorio relevantes adicionales e información clínica.

En otra realización, se usa el tropismo por el correceptor de un virus de paciente para controlar el tratamiento de pacientes que no han sido tratados previamente con regímenes antirretrovíricos que incluyen uno o más antagonistas de correceptores. La guía puede incluir, sin carácter limitativo, (a) clarificación del tropismo por el correceptor de referencia, (b) clarificación de opciones de tratamiento de fármacos disponibles, (c) selección de regímenes de tratamiento más activos, (d) reducción en el uso de fármacos inactivos y potencialmente tóxicos. Determinar el tropismo por el correceptor de referencia tiene una importancia clínica significativa. El tratamiento con el antagonista del correceptor adecuado (tropismo R5 vs. X4), o antagonistas (tropismo dual o tropismo mixto) es probable que resulte en una respuesta más potente y duradera. En este modo de realización, los vectores de ensayo de resistencia se derivan de muestras de virus de pacientes y se someten a ensayo para evaluar la susceptibilidad a

diversos inhibidores de entrada de virus usando el ensayo de entrada de virus fenotípico. Los antagonistas de correceptores pueden incluir, sin carácter limitativo, AMD3100, AMD8664, TAK779, PR0542, y compuestos de peperidin-lil butano. Las decisiones de tratamiento adecuadas se basan en los resultados del ensayo de entrada de virus y resultados de ensayos de laboratorio relevantes adicionales e información clínica.

TABLA 1

CÉLULAS

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

TABLA 2

VIRUS Y REACTIVOS REPRESENTATIVOS

89.6, SF2	R5-X4/SI	ARRRP[B]
92BR014, 92US076	R5-X4/SI/B	ARRRP
JR-CSF, 91US005	R5/NSI/B	ARRRP
91US054	SI/B	ARRRP
NL43, MN, ELI	X4 /B	ARRRP
92HT599	X4	ARRRP (INTERNO)
92UG031	R5/NSI/A	ARRRP (INTERNO)
92TH014, 92TH026	R5/NSI/B	ARRRP (INTERNO)
92BR025, 93MW959	R5/SI/C	ARRRP (INTERNO)
92UG035	R5/NSI/D	ARRRP (INTERNO)
92TH022, 92TH023	R5/NSI/E	ARRRP (INTERNO)
93BR020	R5-X4/SI/F	ARRRP (INTERNO)
Mabs 2F5, 1577	gp41 TM	ARRRP
Mabs IG1b12, 2G12, 48D	gp120 SU	ARRRP
suero de neutralización 2,HIV-IG	Policlonal	ARRRP
CD4-IG	gp120 SU	Genentech
CD4-IGG2	gp120 SU	Adarc
SCD4	Sigma	Progenics
T20 (DP178)	gp41 TM	Trimeris
Rantes, IP1a/b	CCR5	SIGMA/ARRRP
SDF1a/b	CXCR4	SIGMA/ARRRP
AMD 3100	CXCR4	AnorMed
sulfato de dextrano, Heparina	No específico	Sigma

[a] R5 (correceptor CCR5), X4 (correceptor CXCR4)
SI (inductor de sincitio) NSI (No inductor de sincitio)
A, B, C, D, E, F (designación de variante de la envoltura)
[b] Programa de reactivos de referencia e investigación del SIDA

TABLA 3

CEBADORES SOMETIDOS A ENSAYO PARA LA AMPLIFICACIÓN DE LA ENVOLTURA DE VIH

CEBADORES RT	
RT env_N3	5'-GGA GCA TTT ACA AGC AGC AAC ACA GC-3'
RT env 9720	5'-TTC CAG TCA VAC CTC AGG TAC-3'
RT env 9740	5'-AGA CCA ATG ACT TAY AAG G-3'
CEBADORES 5' PCR	
5' env	5'-GGG CTC GAG ACC GGT CAG TGG CAA TGA GAG TGA AG-3'
5' env_Xho/Pin	5'-GGG CTC GAG ACC GGT GAG CAG AAG ACA GTG GCA ATG A-3'
5' env_START	5'-GGG CTC GAG ACC GGT GAG CAG AAG ACA GTG GCA ATG-3'
CEBADORES 3' PCR	
3' env	5'-GGG TCT AGA ACG CGT TGC CAC CCA TCT TAT AGC AA-3'
3' env_Xba/Mlu	5'-GGG TCT AGA ACG CGT CCA CTT GCC ACC CAT BTT ATA GC-3'
3' env_STOP	5' -GGG TCT AGA ACG CGT CCA CTT GCC ACC CAT BTT A-3'
3' delta CT	5'-GAT GGT CTA AGA CGC TGT TCA ATA TCC CTG CCT AAC TC-3'

TABLA 4 (Panel 1)

FÁRMACOS ANTI-VIH

Fármaco/Compuesto	Nombre genérico	Marca	Fabricante
AZT, ZDV	Zidovudina	Retrovir	Glaxo/Wellcome
3TC	Lamivudina	Epivir	Glaxo/Wellcome
AZT + 3TC		Combivir	Glaxo/Wellcome
d4T	Estavudina	Zerit	Bristol-Myers/Squibb
ddI	Didanosina	Videx	Bristol-Myers/Squibb
ddC	Zalcitabina	Hivid	Hoffman LaRoche
1592U89	Abacavir	Ziagen	Glaxo/Wellcome
AZT + 3TC + 1592U89		Trizivir	Glaxo/Wellcome
(-)FTC (5-fluoro-3TC; Corviracil)	Emtricitabina		Triangle Pharmaceuticals
(-)FTC + (+)FTC (50:50)	Racimir		QuadPharma
DAPD (DXG activo)	Amdoxovir		Triangle Pharmaceuticals
F-ddA (2-Fluoro-ddA)	Lodenosina		MedImmune Oncology (US Bioscience)
BCH-10652, dOTC (2-desoxi-3-oxa-4 -tiocitidina)			BioChem Pharma, Inc.
D-d4FC			Triangle Pharmaceuticals (Schinazi)
bis-POC PMPA (GS-4331)	Tenofovir		Gilead Sciences
bis-POM PMEA (GS-840)	Adefovir dipivoxil		Gilead Sciences
BI-RG-587	Nevirapina	Viramune	Boehringer/Ingleheim (Roxanne)
BHAP PNU-90152T	Delavirdina	Rescriptor	Pharmacia & Upjohn
DMP 266 (L-743, 726)	Efavirenz	Sustiva	Dupont Pharmaceuticals (Avid)
MKC442 (Coactinon)	Emivirina		Triangle/Mitsubishi Kasei
AG-1549 (S1153) (en espera)	Capravirina		Agouron Pharmaceuticals
AZT, ZDV	Zidovudina	Retrovir	Glaxo/Wellcome
3TC	Lamivudina	Epivir	Glaxo/Wellcome
AZT + 3TC		Combivir	Glaxo/Wellcome
d4T	Estavudina	Zerit	Bristol-Myers/Squibb

Fármaco/Compuesto	Nombre genérico	Marca	Fabricante
ddI	Didanosina	Videx	Bristol-Myers/Squibb
ddC	Zalcitabina	Hivid	Hoffman LaRoche
1592U89	Abacavir	Ziagen	Glaxo/Wellcome
AZT + 3TC + 1592U89		Trizivir	Glaxo/Wellcome
(-)FTC (5-fluoro-3TC; Corviracil)	Emtricitabina		Triangle Pharmaceuticals
(-)FTC + (+)FTC (50:50)	Racimir		QuadPharma
DAPD (DXG active)	Amdoxovir		Triangle Pharmaceuticals
F-ddA (2-Fluoro-ddA)	Lodenosina		MedImmune Oncology (US Bioscience)
BCH-10652, dOTC (2-deoxy-3-oxa-4-thiocytidine)			BioChem Pharma, Inc.
D-d4FC			Triangle Pharmaceuticals (Schinazi)
bis-POC PMPA (GS-4331)	Tenofovir		Gilead Sciences
bis-POM PMEA (GS-840)	Adefovir dipivoxil		Gilead Sciences
BI-RG-587	Nevirapina	Viramune	Boehringer/Ingleheim (Roxanne)
BHAP PNU-90152T	Delavirdina	Rescriptor	Pharmacia & Upjohn
DMP 266 (L-743, 726)	Efavirenz	Sustiva	Dupont Pharmaceuticals (Avid)
MKC442 (Coactinon)	Emivirina		Triangle/Mitsubishi Kasei
AG-1549 (S1153) (on hold)	Capravirina		Agouron Pharmaceuticals
PNU-142721			Pharmacia & Upjohn
DPC-961, -963, -083, -087			DuPont Pharmaceuticals
SJ-3366	¿También inhibidor de entrada?		Samjin Pharmaceuticals
BHAP PNU-87201	Atevirdina		Upjohn
GW420867X (quinoxalina)	(2º gen HBY 097)		Glaxo/Wellcome (Hoechst Bayer)
TMC 120 (R147681)			Tibotec
TMC 125 (R165335)			Tibotec
R86183	tivirapina		Janssen Pharmaceuticals
Calanolide A			Sarawak Medichem Pharmaceuticals
Ro 31-8959	Saquinavir-(hgc) Saquinavir-(sgc)	Invirase Fortivase	Hoffman LaRoche
MK-639 (L-735, 524)	Indinavir	Crixivan	Merck Research Laboratories

Fármaco/Compuesto	Nombre genérico	Marca	Fabricante
ABT-538 (A-84538)	Ritonavir	Norvir	Abbott Laboratories
AG1343	Nelfinavir	Viracept	Agouron Pharmaceuticals
141W94 (VX-478)	Amprenavir	Agenerase	Glaxo-Wellcome/Vertex
ABT-378/r	Lopinavir/ritonavir	Keletra	Abbott Laboratories
BMS 232, 632 (azapéptido)			Bristol-Myers-Squibb
PNU-140690	Tipranavir		Pharmacia & Upjohn
DMP 450 (urea cíclica)	Mozenavir		Triangle/Avid (ph I/II)
TMC 126 (compuesto de Erickson)			Tibotec
GW433908 (VX-175)	profármaco de amprenavir		Glaxo/Wellcome/Vertex
L756,423 (en espera)			Merck
PD-178390 (dihidropirona)			Parke Davis (Boehringer-Ingleheim)
¿nuevo candidato?			Roche
DPC 681 y 684			DuPont Pharmaceuticals
AG-1776 (JE-2147 = KNI-764)			Agouron Pharmaceuticals
T-20 (gp41)	Pentafusida		Trimeris Pharmaceuticals
T1249 (gp41)			Trimeris Pharmaceuticals
inhibidor D-péptido (gp41) mol. pequeña	SCH-C		Schering-Plough
AMD-311 (CXCR4)	(biciclam)		AnorMED
AMD-3664 (CXCR4)	(macrociclam)		AnorMED
ALX40-4C (CXCR4)			U. PA
FP21399			Fuji Pharmaceuticals
PRO 542 (gp120)	CD41gG2		Progenics Pharmaceuticals
PRO-140 (CCR5)	MAb CCR5		Progenics Pharmaceuticals
T-22 (CXCR4)	(péptido, 18-mero)		
Met-SDF-1 (CXCR4)			
TAK 779 (antagonista de CCR5)			Takeda
AOP-Rantes (CCR5)			Gryphon Sciences
Rantes 9-68 (CCR5)			
antagonistas de CCR5	Clase 4-(piperidina-1-il) butano		Merck
α-Inmunocina-NNS03 (CCR5, CXCR4)	α-cobratoxina		PhyloMed Corp.

Fármaco/Compuesto	Nombre genérico	Marca	Fabricante
AR-177	Zintevir		Aronex Pharmaceuticals
Dicetoácidos			Merck Research Laboratories
RB 2121	Imitador del péptido p7 cíclico		(ver PNAS 96:4886-4891 (1999))
CI-1012			Achelion Pharmaceuticals
SP1093V (BBNH Fe+3 derivados)			(Parniak)

Los fármacos aprobados por la FDA se muestran en negrita, rojo = desarrollo interrumpido, azul = no hay certeza sobre el estado del desarrollo

TABLA 4 (Panel 2)

Nombre genérico (abreviatura)	Nombre comercial	Firma	Fecha de aprobación de FDA
zidovudina, AZT	Retrovir	Glaxo Wellcome	Marzo 87
didanosina, ddI	Videx	Bristol Myers-Squibb	Octubre 91
zalcitabina, ddC	Hivid	Hoffman-La Roche	Junio 92
estavudina, d4T	Zerit	Bristol Myers-Squibb	Junio 94
lamivudina, 3TC	Epivir	Glaxo Wellcome	Noviembre 95
saquinavir, SQV, hgc	Invirase	Hoffman-La Roche	Diciembre 95
saquinavir, SQV, sgc	Fortovase	Hoffman-La Roche	Noviembre 97
ritonavir, RTV	Norvir	Abbott Laboratories	Marzo 96
indinavir, IDV	Crixivan	Merck & Co., Inc.	Marzo 96
nevirapina, NVP	Viramune	Boehringer Ingelheim	Junio 96
nelfinavir, NFV	Viracept	Agouron Pharmaceuticals	Marzo 97
delavirdina, DLV	Rescriptor	Pharmacia & Upjohn	Abril 97
ZDV+3TC	Combivir	Glaxo Wellcome	Septiembre 97
efavirenz, EFV	Sustiva	DuPont Pharmaceuticals	Septiembre 98
abacavir, ABC	Ziagen	Glaxo Wellcome	Febrero 99
amprenavir	Agenerase	Glaxo Wellcome	Abril 99
lopinavir/ritonavir	Kaletra	Abbott	Septiembre 2000
ZDV+3TC+ABC	Trizivir	GlaxoSmithKline	Noviembre 2000

REFERENCIAS

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

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

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

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

5. Baxter, J., D. Mayers, D. Wentworth, J. Neaton, y T. Merigan. 1999. A Pilot Study of the Short-term Effects of Antiretroviral Management Based on Plasma Genotypic Antiretroviral Resistance Testing (Gart) in Patients Failing Antiretroviral Therapy. Presented at the 6th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. Chicago, Il.

6. Bernard P., Kezdy K.e., Van Melderen L., Steyaert J., Wyns L., Pato M.L., Higgins P.N., y Couturier M. 1993. The F Plasmid CcdB protein Induces Efficient ATP-dependent Dna Cleavage by Gyrase. J Mol. Biol. 23:534-41.

7. Bernard, P. y Couturier, M. 1992. Cell Killing by the F Plasmid Ccdb protein Involves Poisoning of DNAtopoisomerase II Complexes. J. Mol. Bio. 226:735-45.

8. Bleul, C.C., M. Farzan, H. Choe, C. Parolin, I. Clark-Lewis, J. Sodroski, y T.A. Springer. 1996. The Lymphocyte Chemoattractant Sdf-1 Is a Ligand for Lestr/fusin and Blocks Hiv-1 Entry. Nature 382:829-33.

9. Bridger G.J, Skerlj R.T., Padmanabhan S., Martellucci S.A., Henson G.W., Struyf S., Witvrouw M., Schols D., y De Clercq E. 1999. Synthesis and Structure-activity Relationships of Phenylenebis(methylene)-linked Bis-azamacrocycles That Inhibit HIV-1 and HIV-2 Replication by Antagonism of the Chemokine Receptor CXCR4. J. Med. Chem. 42:3971-81.

10. Carpenter, C.J., Cooper D.A., Fischl, M.A., Gatell J.M., Gazzard B.G., Hammer S.M., Hirsch M.S., Jacobsen D.M., Katzenstein D.A., Montaner J.S., Richman D., Saag M.S., Schechter M., Schooley R.T., Thompson M.A., Vello S., Yeni P.G., y Volberding P.A. 2000. Antiretroviral Therapy in Adults. JAMA 283:381-89.

11. CDC (Centers for Disease Control and Prevention). HIV/AIDS Surveillance Report, 1999;11 (nº 1).

12. Coffin, J.M. 1995. HIV Population Dynamics in Vivo: Implications for Genetic Variation, Pathogenesis, and Therapy. Science 267:483-489.

13. DHHS (Department of Health and Human Services). Henry Kaiser Family Foundation: Guidelines for the Use of Antiretrovirals Agents in HIV-infected Adults and Adolescents. (En 28, 2000).

14. Gerdes, K., L.K. Poulsen. T. Thisted, A.K. Nielson, J. Martinussen, y P.H. Andreasen. 1990. The Hok Killer Gene Family in Gram-negative Bacteria. The New Biologist: 2:946-956.

15. Hertogs, K., M.P. De Béthune, V. Miller, T. Ivens, P.Schel, A. V. Cauwenberge, C. Van Den Eynde, V. Van Gerwen, H. Azijn, M. Van Houtte, F. Peeters, S. Staszewski, M. Conant, S. Bloor, S. Kemp, B. Larder, y R. Pauwels. 1998. A Rapid Method for Simultaneous Detection of Phenotypic Resistance to Inhibitors of protease and Reverse Transcriptase in Recombinant Human Immunodeficiency Virus Type 1 Isolates from Patients Treated with Antiretroviral Drugs. Antimicrob. Agents Chemother. 42:269-276.

16. Hwang, J.-j., L. Li, W.f. Anderson. 1997. A Conditional Self-inactivating Retrovirus Vector That Uses a Tetracy- cline-responsive Expression System. J. Virol. 71: 7128-7131.

17. Japour, A. J., D. L. Mayers, V. A. Johnson, D. R. Kuritzkes, L. A. Beckett, J. M. Arduino, J. Lane, B. R.J., P.S. Reichelderfer, R. T. D-aquila, C. S. Crumpacker, T.R.-S. Group, T.A.C.T. Group, y V. C.R.W. Group. 1993. Standardized Peripheral Blood Mononuclear Cell Culture Assay for Determination of Drug Susceptibilities of Clinical Human Immunodefiency Virus Type 1 Isolates. Antimicrob. Agents Chemother. 37:1095-1101.

18. Judice J.K., Tom J.Y., Huang W., Wrin T., Vennari J., Petropoulos C.J., y Mcdowell R.S. 1997. Inhibition HIV Type 1 Infectivity by Constrained Alphahelical Peptides: Implications for the Viral Fusion Mechanism. Proc. Natl. Acad Sci. U S A 94:13426-30.

19. Kilby JM, Hopkins S, Venetta Tm, Dimassimo B, Cloud Ga, Lee Jy, Alldrdge L, Hunter E, Lambert D, Bolognesi D, Matthews T, Johnson Mr. Nowak Ma, Shaw Gm, y Saag Ms. 1998. Potent Suppression of HIV-1 Replication in Humans by T-20, a Peptide Inhibitor of Gp41-mediated Virus Entry. Nat Med 4:1302-7.

20. Mascola, J.R., G. Stiegler, T.C. Vancott, H. Katinger, C.B. Carpenter, C.E. Hanson, H. Beary, D. Hayes, S.S. Frankel, D.L. Birx, y M.G. Lewis. 2000. Protection of Macaques Against Vaginal Transmission of a Pathogenic HIV-1/siv Chimeric Virus by Passive Infusion of Neutralizing Antibodies. Nature Med. 6:207-210.

21. Miyoshi, H., B. Ulrike, M. Takahashi, F.H. Gage, y I.M. Verma. 1998. Development of a Self-inactivating Lentivirus Vector. J. Virol. 72:8150-5157.

22. Naviaux, R.K., E. Costanzi, M. Haas, y I.M. Verma. 1996. The Pcl Vector System: Rapid production of Helper-free, High-titer, Recombinant Retroviruses. J. Virol. 70: 5701-5705.

23. Petropoulos, C.J., N.T. Parkin, K.L. Limoli, Y.S. Lie, T. Wrin, W. Huang, H. Tian, D. Smith, G.A. Winslow, D. Capon y J.M. Whitcomb. 2000. A Novel Phenotypic Drug Susceptibility Assay for HIV-1. Antimicrob. Agents & Chem. 44:920-928.

24. PhRMA (Pharmaceutical Research and Manufacturers of America). New Medicines in Development for Aids, 1999. Http://www.phrma.org.

25. Piketty, C., E. Race, P. Castiel, L. Belec, G. Peytavin, A. si-mohamed, G. Gonzalez-canali, L. Weiss, F. Clavel, and M. Kazatchkine. 1999. Efficacy of a Five-drug Combination Including Ritonavir, Saquinavir and Efavirenz in Patients Who Failed on a Conventional Triple-drug Regimen: Phenotypic Resistance to protease Inhibitors predicts Outcome of Therapy. Aids: 13:f71-f77.

26. Porter, C.C., K.V. Lukacs, G. Box, Y. Takeuchi, y M.K.L. Collins. 1998. Cationic Liposomes Enhance the Rate of Transduction by a Recombinant Retroviral Vector in Vitro and in Vivo. J. Virol. 72:4832-4840.

27. Reimann K.A., Cate R.L., Wu Y., Palmer L., Olson D., Waite B.C., Letvin N.L., y Burkly L.C. 1995. In Vivo Administration of CD4-specific Monoclonal Antibody: Effect on provirus Load in Rhesus Monkeys Chronically Infected with the Simian Immunodeficiency Virus of Macaques. Aids Res. Hum. Retroviruses 11:517-25.

28. Retroviruses. Coffin, J., S. Hughes, H. Varmus (Eds). 1997. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

29. Richman, D. 1998. Nailing down Another HIV Target. Nature Med. 4:1232-1233.

30. Rimsky, L.T., D.C. Shugars, y T.J. Matthews. 1998. Determinants of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Resistance to Gp41-derived Inhibitory Peptides. J. Virol. 72:986-993.

31. Rodriguez-rosado, R., Briones, C. y Soriano, V. 1999. Introduction of HIV Drug-resistance Testing in Clinical Practice. Aids 13:1007-1014.

32. Schinazi, R.F., Larder, B.A., y Mellors, J.W. 1999. Mutations in Retroviral Genes Associated with Drug Resistance. Intl. Antiviral News: 7:46-49.

33. Shi C., y J.W. Mellors. 1997. A Recombinant Retroviral System for Rapid in Vivo Analysis of Human Immunodefiency Virus Type 1 Susceptibility to Reverse Transcriptase Inhibitors. Antimicrob. Agents Chemother 41:2781-2785.

34. Stephenson, J. 1999. New Class of Anti-HIV Drugs. Jama 282:1994.

35. Who, Unaids/World Health Organization. Informe: Aids Epidemic Update: Diciembre 1999. Http://www.unaids.org/publications/documents/epidemiology.

36. Wild, C., T. Oak, C. Mcdanal, D. Bolognesi, y T. Matthews. 1992. A Synthetic Peptide Inhibitor of HIV Replication: Correlation Between Solution Structure and Viral Inhibition. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10537-10541.

37. Zennou, V., F. Mammamo, S. Paulous, D. Mathez, y F. Calvel. 1998. Loss of Viral Fitness Associated with Multiple Gag and Gag-pol processing Defects in Human Immunodefiency Virus Type 1 Variants Selected for Resistance to Protease Inhibitors in vivo. J. Virol: 72:3300-06.

38. Ziermann, R., K. Limoli, K. Das, E. Arnold, C.J. Petropoulos, y N.T. Parkin. 2000. A Mutation in HIV-1 Protease, N88s, That Causes in Vitro Hypersensitivity to Amprenavir. J.Virol. 74:4414-4419.

La presente invención se definirá ahora adicionalmente con referencia a las siguientes cláusulas numeradas

1. Un método para detectar en un paciente infectado por un virus el desarrollo de una respuesta de anticuerpos capaz de bloquear la infección que comprende:

a) poner en contacto una célula hospedadora con una preparación de anticuerpos del paciente, en donde la célula hospedadora comprende un ácido nucleico que codifica una proteína vírica del paciente y un ácido nucleico indicador que produce una señal detectable;

b) medir la cantidad de señal detectable producida por la célula hospedadora; y
c) comparar la cantidad de señal medida en la etaba (b) con la cantidad de señal producida en ausencia de la preparación de anticuerpos, en donde una cantidad reducida de señal medida en presencia de la preparación de anticuerpos indica que el paciente ha desarrollado una respuesta de anticuerpos a la proteína del virus capaz de bloquear la infección.

2. Un método para detectar en un paciente infectado por un virus el desarrollo de una respuesta de anticuerpos capaz de bloquear la infección que comprende:

a) transfectar en una primera célula

i) un ácido nucleico que codifica una proteína vírica del paciente, y
ii) un vector de expresión vírica que carece de un ácido nucleico que codifica la proteína vírica y que comprende un indicador de ácido nucleico que produccie una señal detectable, de manera que la primera célula produce paríclas víricas que comprenden la proteína vírica codificada por el ácido nucleico obtenido del paciente;

b) poner en contacto las partículas víricas producidas en la etapa (a) con una preparación de anticuerpos del paciente;
c) poner en contacto las partículas víricas y la preparación de anticuerpos de la etapa (b) con una segunda célula, en donde la segunda célula expresa un receptor de superficie celular al que se une el virus;
d) medir la canidad de señal detectable producida por la segunda célula con el fin de determinar la infectividad de las partículas víricas; y
e) comparar la cantidad de señal medida en la etapa (d) con la cantidad de señal producida en ausencia de la preparación de anticuerpos, en donde una cantidad reducida de una señal medida en presencia de la preparación de anticuerpos indica que el paciente ha desarrollado una respuesta de anticuerpos para la proteína vírica capaz de bloquear la infección.

3. Un método para detectar en un paciente infectado por un virus el desarrollo de una respuesta de anticuerpos capaz de bloquear la infección que comprende:

a) transfectar a una primera célula

i) un ácido nucleico que codifica una proteína vírica del paciente, y
ii) un vector de expresión vírica que carece de un ácido nucleico que codifica la proteína vírica,

de manera que la primera célula produce partículas víricas que comprenden la proteína vírica codificada por el ácido nucleico obtenido del paciente;
b) poner en contacto las partículas víricas producidas en la etapa (a) con una preparación de anticuerpos del paciente;
c) poner en contacto las partículas víricas y la preparación de anticuerpos de la etapa (b) con una segunda célula, en donde la segunda célula expresa un receptor de superficie celular al que se une el virus y en donde la segunda célula comprende un ácido nucleico indicador que produce una señal detectable;
d) medir la cantidad de señal detectable producida por la segunda célula con el fin de determinar la infectividad de las partículas víricas y
e) comparar la cantidad de señal medida en la etapa (d) con la cantidad de señal producida en ausencia de la preparación de anticuerpos, en donde una cantidad reducida de señal medida en la presencia de la preparación de anticuerpos indica que el paciente ha desarrollado una respuesta de anticuerpos para la proteína vírica capaz de bloquear la infección.

4. El método de la cláusula 1, 2 o 3, en donde la proteína vírica es una proteína de la envoltura.

5. El método de la cláusula 1, 2 o 3, en donde la proteína vírica es una proteína de la cápside.

6. Un método para detectar en un paciente infectado por un virus el desarrollo de una respuesta de anticuerpos capaz de bloquear la infección que comprende:

a) incubar una primera célula que comprende

(i) un ácido nucleico que codifica una proteína vírica del paciente y
(ii) un vector de expresión vírica que carece de un ácido nucleico que codifica la proteína vírica, y que comprende un ácido nucleico indicador que produce una señal detectable,

de manera que la primera célula produce partículas víricas que comprenden la proteína vírica codificada por el ácido nucleico obtenido del paciente;
b) poner en contacto las partículas víricas producidas en la etapa (a) con una preparación de anticuerpos del

paciente;
c) poner en contacto las partículas víricas y la preparación de anticuerpos de la etapa (b) con una segunda célula, en donde la segunda célula expresa un receptor de superficie celular al que se une el virus;
d) medir la cantidad de señal detectable producida por la segunda célula con el fin de determinar la infectividad de las partículas víricas y
e) comparar la cantidad de señal medida en la etapa (d) con la cantidad de señal producida en ausencia de la preparación de anticuerpos, en donde una cantidad reducida de señal medida en presencia de la preparación de anticuerpos indica que el paciente ha desarrollado una respuesta de anticuerpos para la proteína vírica capaz de bloquear la infección.

7. El método de la cláusula 6, en donde el ácido nucleico de (i) es parte del vector de expresión 15 de (ii).

8. El método de la cláusula 6 en donde el ácido nucleico de (i) se integra en el genoma de la primera célula.

9. El método de la cláusila 6 en donde el vector vírico de (ii) se integra en el genoma de la primera célula.

10. El método de la cláusula 6 en donde el ácido nucleico de (i) y el vector vírico de (ii) se integran en el genoma de la primera célula.

11. El método de la cláusula 6 en donde la proteína vírica es una proteína de la cápside.

12. El método de la cláusula 6 en donde la proteína vírica es una proteína de la envoltura.

13. El método de la cláusula 12 en donde el ácido nucleico de (i) es parte del vector de expresión vírica de (ii).

14. El método de la cláusula 12 en donde el ácido nucleico de (i) se integra en el genoma de la primera célula.

15. El método de la cláusula 12 en donde el vector vírico de (ii) se integra en el genoma de la primera célula.

16. El método de la cláusula 12 en eonde el ácido nucleico de (i) y el vector vírico de (ii) se integran en el genoma de la primera célula.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Richman, Douglas Wrin, Mary Petropoulos, Christos Little, Susan Huang, Wei Parkin, Neil Whitcomb, Jeanette

<120> COMPOSICIONES Y MÉTODOS PARA EVALUAR EL USO DE RECEPTORES/CORRECEPTORES VÍRICOS E INHIBIDORES DE ENTRADA DE VIRUS UTILIZANDO ENSAYOS DE VIRUS RECOMBINANTES

<130> 11068-008-228

<150> US 10/077,027
<151> 2002-02-15

<160> 10

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1
<211> 26
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 1
ggagcattta caagcagcaa cacagc 26

<210> 2
<211> 21
<212> ADN
<213> Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 2
ttccagtcav acctcaggta c 21

<210> 3
<211> 19
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 3
agaccaatga cttayaagg 19

<210> 4
<211> 35
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 4
gggctcgaga ccggtcagtg gcaatgagag tgaag 35

<210> 5
<211> 37
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 5
gggctcgaga ccggtgagca gaagacagtg gcaatga 37

<210> 6
<211> 36
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 6
gggctcgaga ccggtgagca gaagacagtg gcaatg 36

<210> 7
<211> 35
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 7
gggtctagaa cgcgttgcca cccatcttat agcaa 35

<210> 8
<211> 38
<212> ADN
<213> Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 8
gggtctagaa cgcgtccact tgccacccat bttatagc 38

<210> 9
<211> 34
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 9
gggtctagaa cgcgtccact tgccacccat btta 34

<210> 10
<211> 38
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 10
gatggtctaa gacgctgttc aatatccctg cctaactc 38

REIVINDICACIONES

1. Un método para evaluar la neutralización de anticuerpos de VIH-1 que comprende:

a) incubar una pluralidad de primeras células que comprenden cada una al menos un vector de expresión de VIH-1 que carece de un ácido nucleico que codifica un polipéptido de la envoltura vírica de VIH-1 y un ácido nucleico que codifica una secuencia de polipéptidos de la envoltura vírica de VIH-1 obtenida de un paciente, comprendiendo la secuencia de polipéptidos de la envoltura del VIH-1 del paciente dominios extracelulares y transmembrana de la proteína de la envoltura vírica, en donde la secuencia del polipéptido de la envoltura del VIH-1 del paciente incluye o no el dominio de cola citoplasmática (CT) intracelular o una porción del mismo, y en donde el vector de expresión del VIH-1 puede comprender secuencias de ácido nucleico que codifican un dominio de cola citoplasmática predefinido constante; de manera que la pluralidad de las primeras células produce partículas víricas que comprenden una población de dominios extracelulares y transmembrana de la proteína de la envoltura vírica de una población de virus VIH-1 del paciente;
b) poner en contacto una porción de las partículas víricas producidas en la etapa (a) con un anticuerpo de VIH-1;
c) poner en contacto las partículas víricas de las etapas (a) y (b) por separado con una pluralidad de segundas células, en donde las segundas células expresan un receptor de superficie celular al que se unen las partículas víricas y en donde o bien las segundas células o el al menos un vector comprenden un ácido nucleico indicador que produce una señal detectable;
d) medir la cantidad de señal detectable producida por la pluralidad de las segundas células con el fin de determinar la infectividad de las partículas víricas; y
e) comparar la cantidad de señal medida en la etapa (d) para las porciones de partículas víricas obtenidas de la etapa (a) y de la etapa (b), en donde una cantidad reducida de señal medida para las partículas víricas de la etaba (b) puestas en contacto con el anticuerpo en comparación con las partículas víricas de la etapa (a) mantenidas en ausencia del anticuerpo indica que los virus del paciente comprenden virus que son susceptibles de neutralización por anticuerpos.

2. El método de la reivindicación 1, en donde las primeras células comprende un ácido nucleico que codifica la secuencia de polipéptidos de la envoltura vírica de VIH-1 que comprende los dominios extracelular y transmembrana de la proteína de la envoltura vírica insertada en un primer vector, y un segundo vector de expresión vírica que carece del ácido nucleico que codifica las secuencias de polipéptidos de la envoltura vírica del VIH-1.

3. El método de las reivindicaciones 1 o 2, en donde el anticuerpo se obtiene de un paciente.

4. El método de las reivindicaciones 1 o 2, en donde el anticuerpo deriva de un panel de anticuerpos previamente caracterizados.

5. El método de las reivindicaciones 1 o 2, en donde el receptor es al menos uno de CD4, CXCR4 o CCR5.

6. El método de las reivindicaciones 1 o 2, en donde la pluralidad de las primeras células son un tipo de célula humana.

7. El método de las reivindicaciones 1 o 2, en donde las segundas células son una de un linfocito T humano, una célula mononuclear de sangre periférica, una célula de astroglioma o una célula de osteosarcoma humano.

8. El método de cualquiera de las anteriores reivindicaciones, en donde el ácido nucleico que codifica la secuencia de polipéptidos de la envoltura vírica de VIH-1 que comprende los dominios extracelular y transmembrana de la proteína de la envoltura vírica y/o el vector de expresión vírica se integra en el genoma de la primera célula.

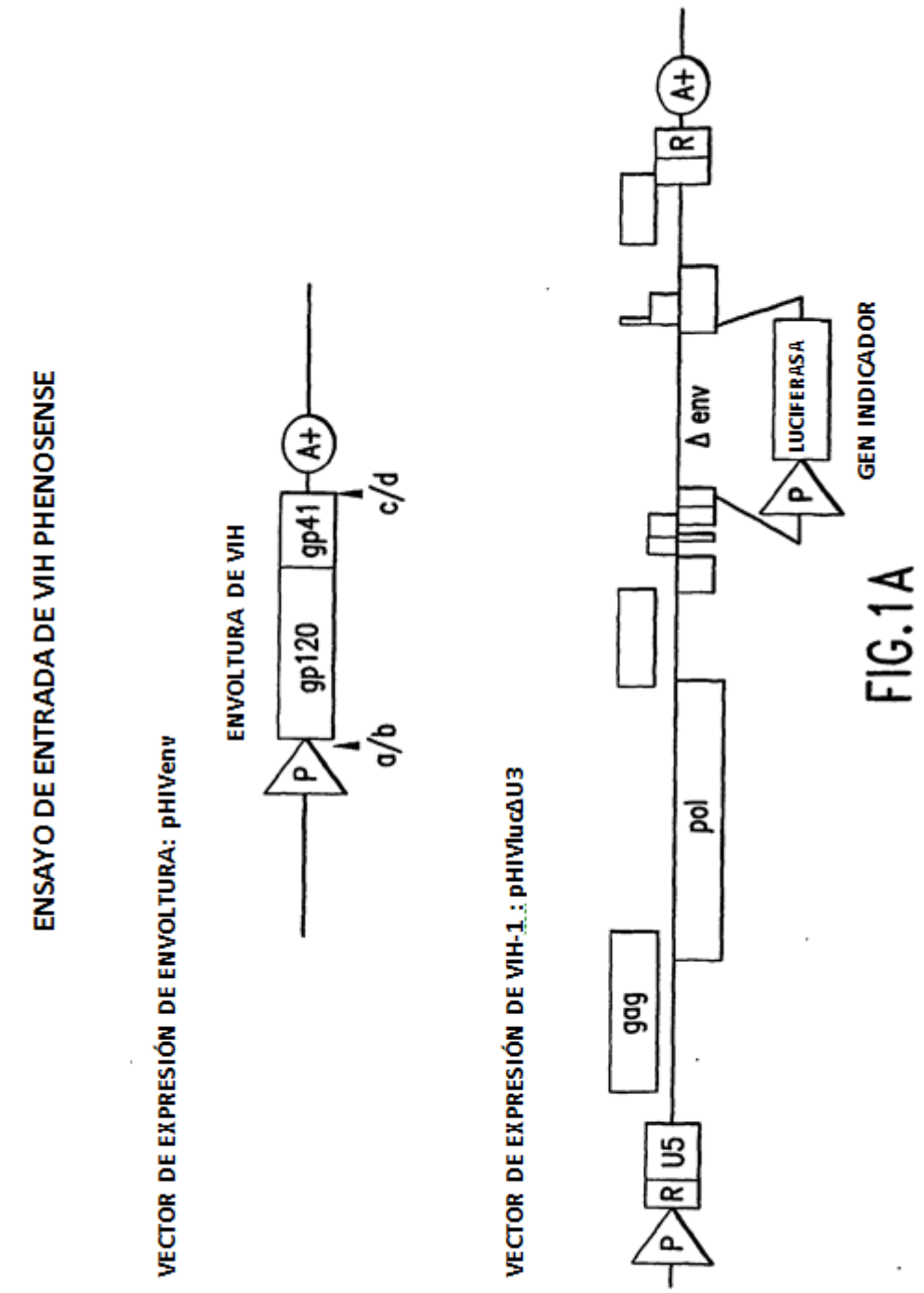

ENSAYO DE ENTRADA DE VIH PHENOSENSE
VECTOR DE EXPRESIÓN DE ENVOLTURA: pHIVenv
ENVOLTURA DE VIH
P
gp120
gp41
A+
a/b
c/d
VECTOR DE EXPRESIÓN DE VIH-1 : pHIVluc∆U3
P
R
U5
gag
pol
Δ env
P
LUCIFERASA
R
A+
GEN INDICADOR

FIG.1A

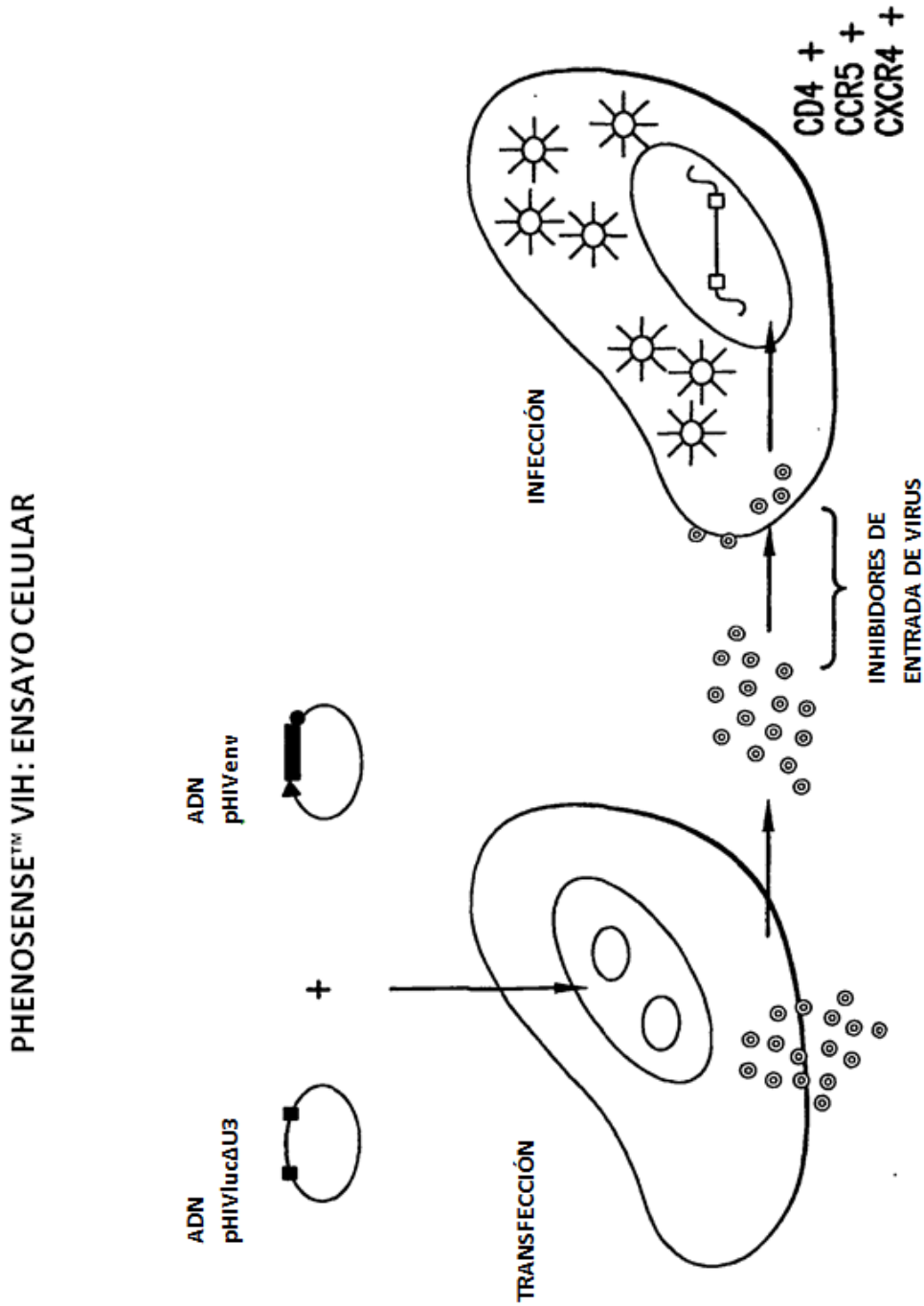

PHENOSENSE™ VIH: ENSAYO CELULAR
ADN
pHIVluc∆U3
+
ADN
pHIVenv
TRANSFECCIÓN
INFECCIÓN
CD4 +
CCR5 +
CXCR4 +
INHIBIDORES DE
ENTRADA DE VIRUS
AÑADIDOS

FIG.1B

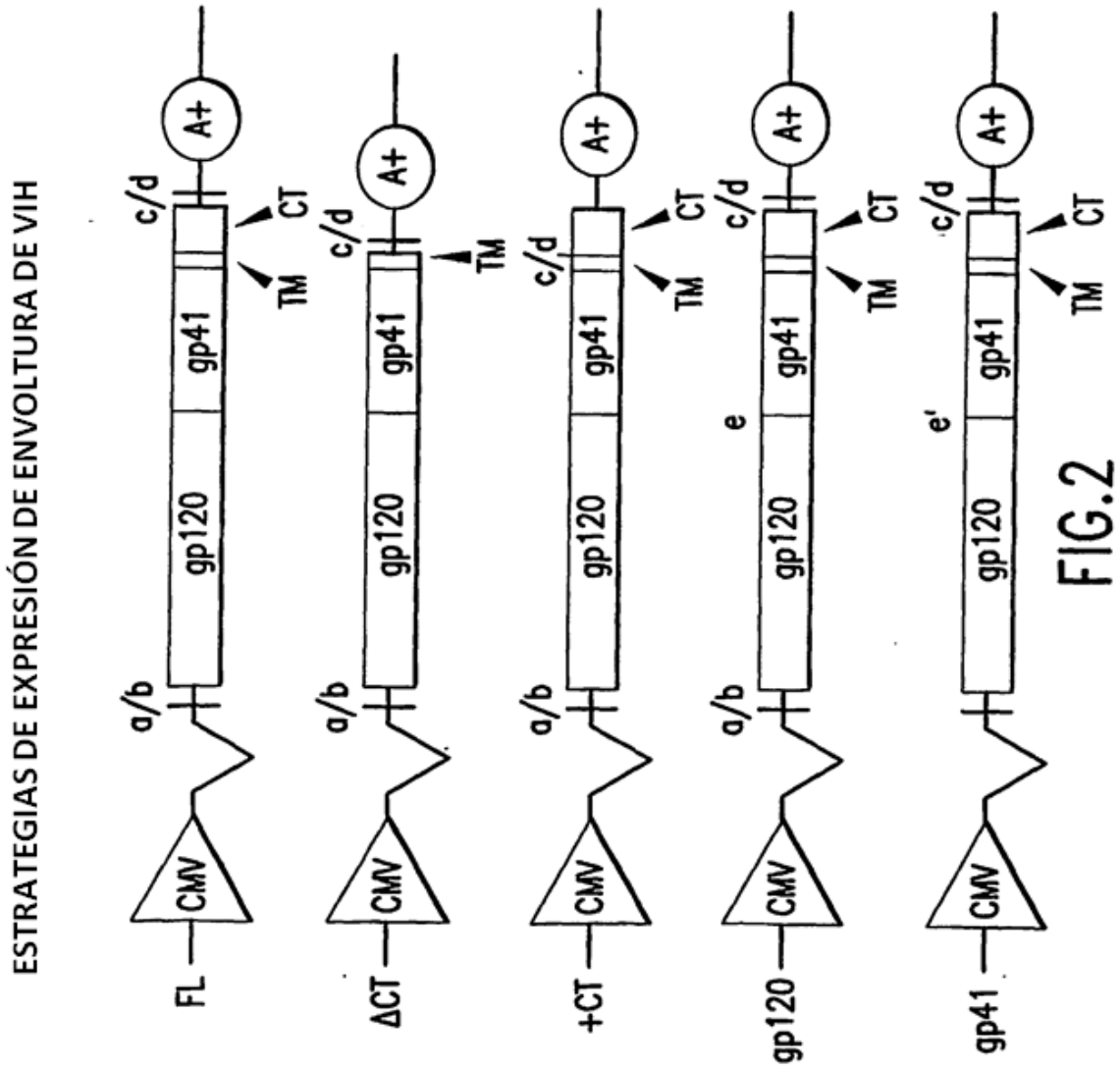

ESTRATEGIAS DE EXPRESIÓN DE ENVOLTURA DE VIH
CMV
A+
a/b
gp120
c/d
gp41
TM
CT
FL
ΔCT
+CT
gp120
e
gp41
e'

FIG.2

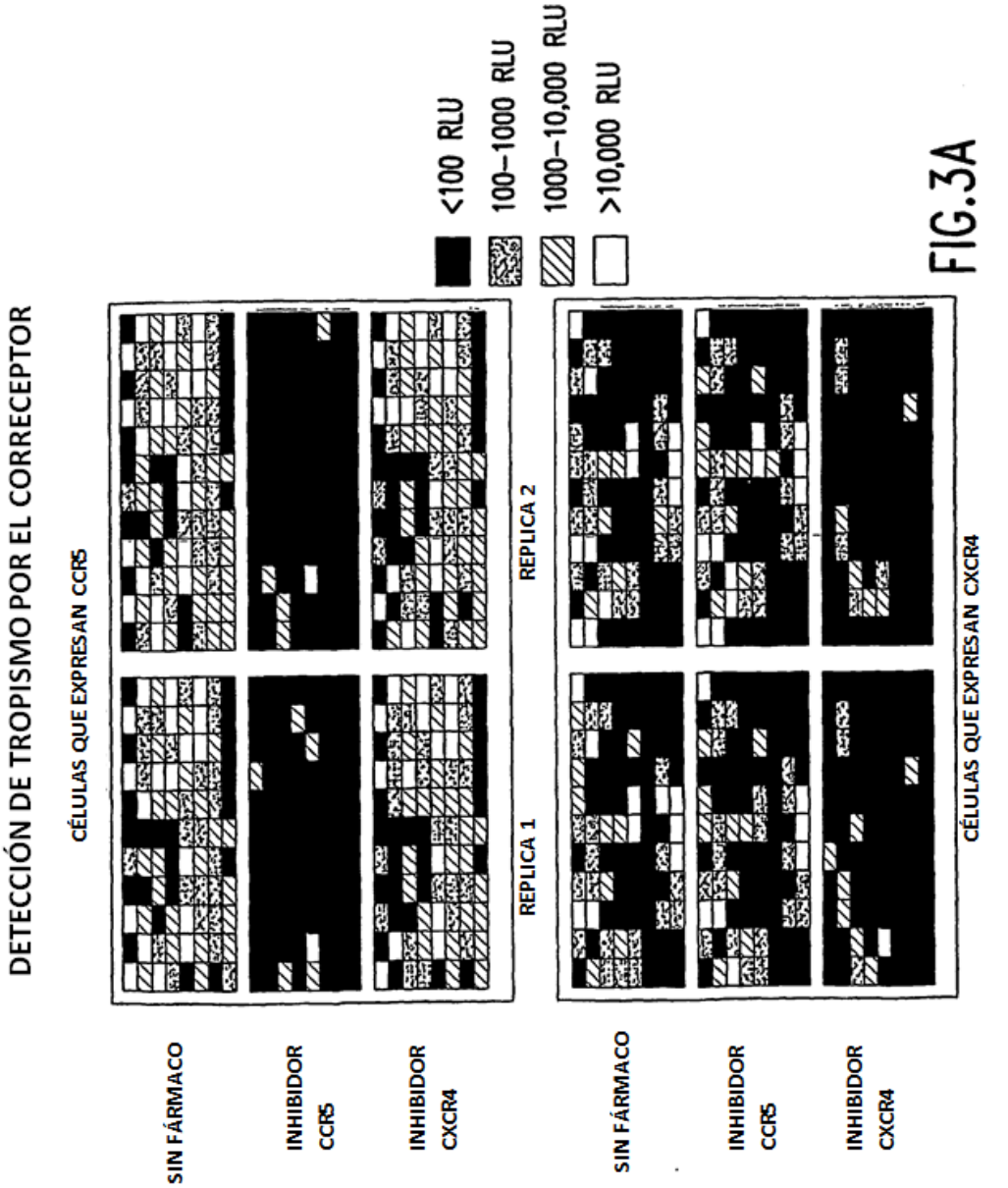

DETECCIÓN DE TROPISMO POR EL CORRECEPTOR
CÉLULAS QUE EXPRESAN CCR5
<100 RLU
100–1000 RLU
1000–10,000 RLU
>10,000 RLU
REPLICA 1
REPLICA 2
SIN FÁRMACO
INHIBIDOR CCR5
INHIBIDOR CXCR4
SIN FÁRMACO
INHIBIDOR CCR5
INHIBIDOR CXCR4
CÉLULAS QUE EXPRESAN CXCR4

FIG.3A

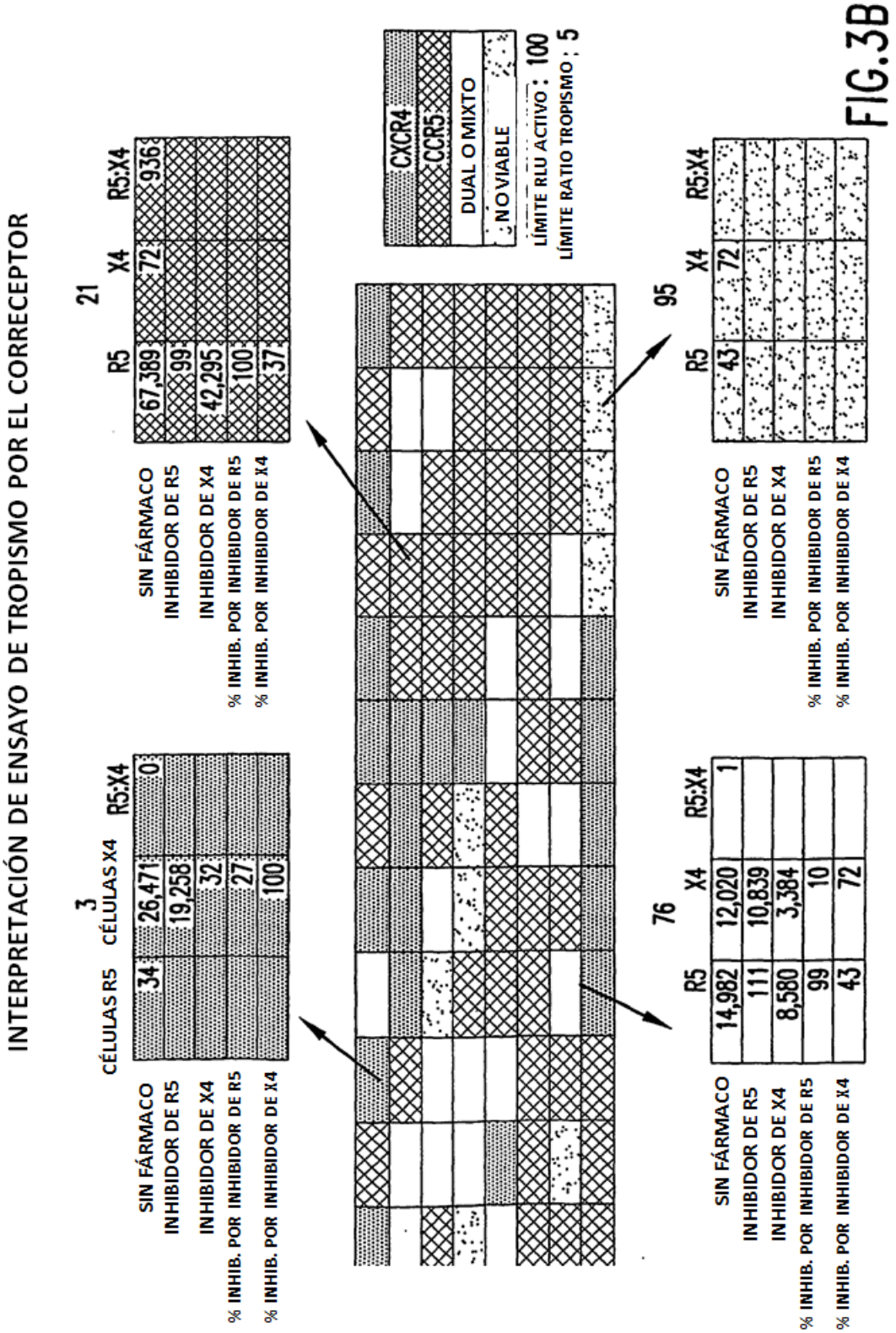

INTERPRETACIÓN DE ENSAYO DE TROPISMO POR EL CORRECEPTOR
CÉLULAS R5
CÉLULAS X4
R5:X4
SIN FÁRMACO
INHIBIDOR DE R5
INHIBIDOR DE X4
% INHIB. POR INHIBIDOR DE R5
% INHIB. POR INHIBIDOR DE X4
34
26,471
0
19,258
32
27
100
3
21
R5
X4
R5:X4
67,389
72
936
99
42,295
100
37
CXCR4
CCR5
DUAL O MIXTO
NO VIABLE
LÍMITE RLU ACTIVO: 100
LÍMITE RATIO TROPISMO: 5
76
95
R5
X4
R5:X4
14,982
12,020
1
111
10,839
8,580
3,384
99
10
43
72
43
72

FIG.3B

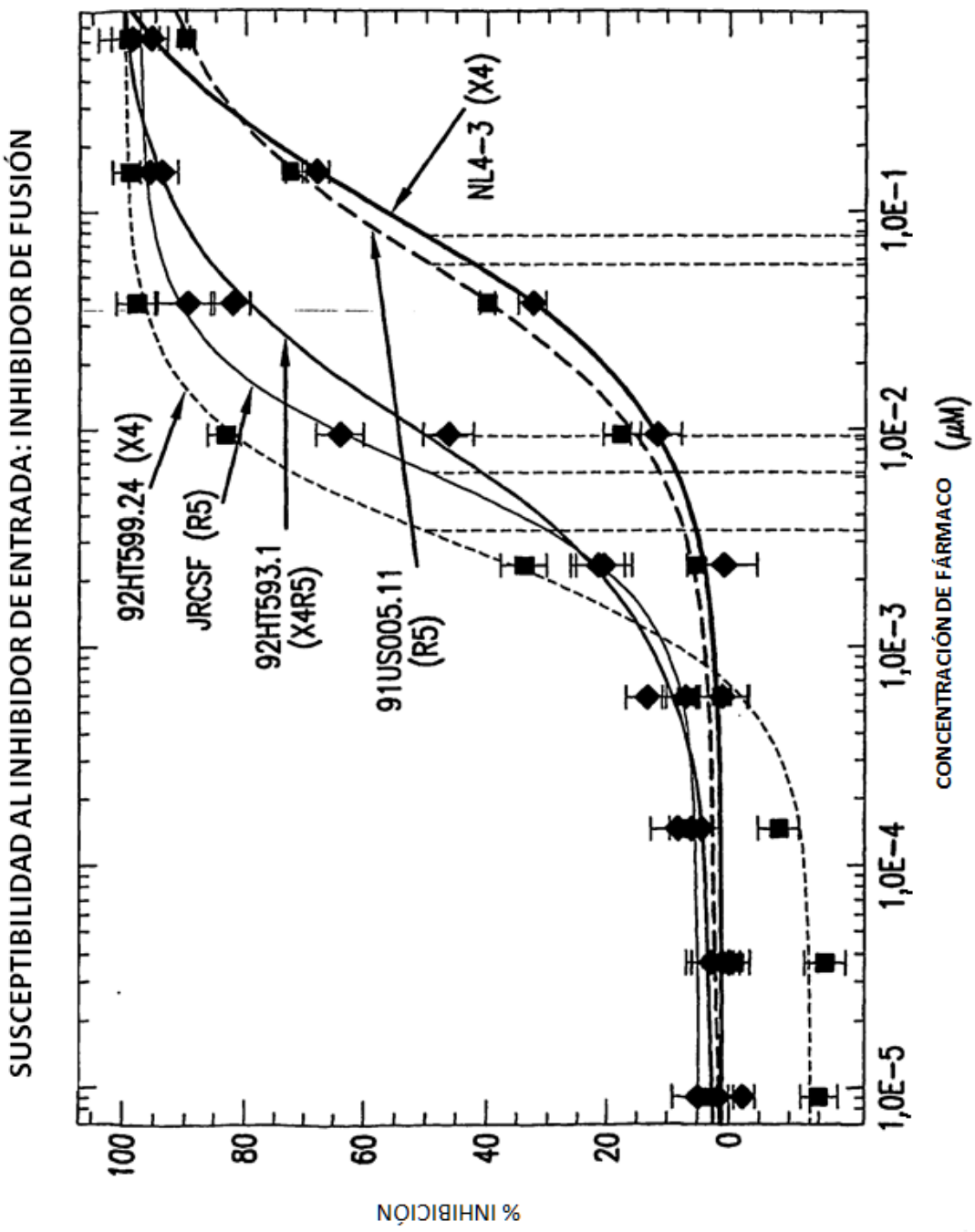

SUSCEPTIBILIDAD AL INHIBIDOR DE ENTRADA: INHIBIDOR DE FUSIÓN
% INHIBICIÓN
100
80
60
40
20
0
1,0E-5
1,0E-4
1,0E-3
1,0E-2
1,0E-1
CONCENTRACIÓN DE FÁRMACO (μM)
NL4-3 (X4)
92HT599.24 (X4)
JRCSF (R5)
92HT593.1 (X4R5)
91US005.11 (R5)

FIG. 4A

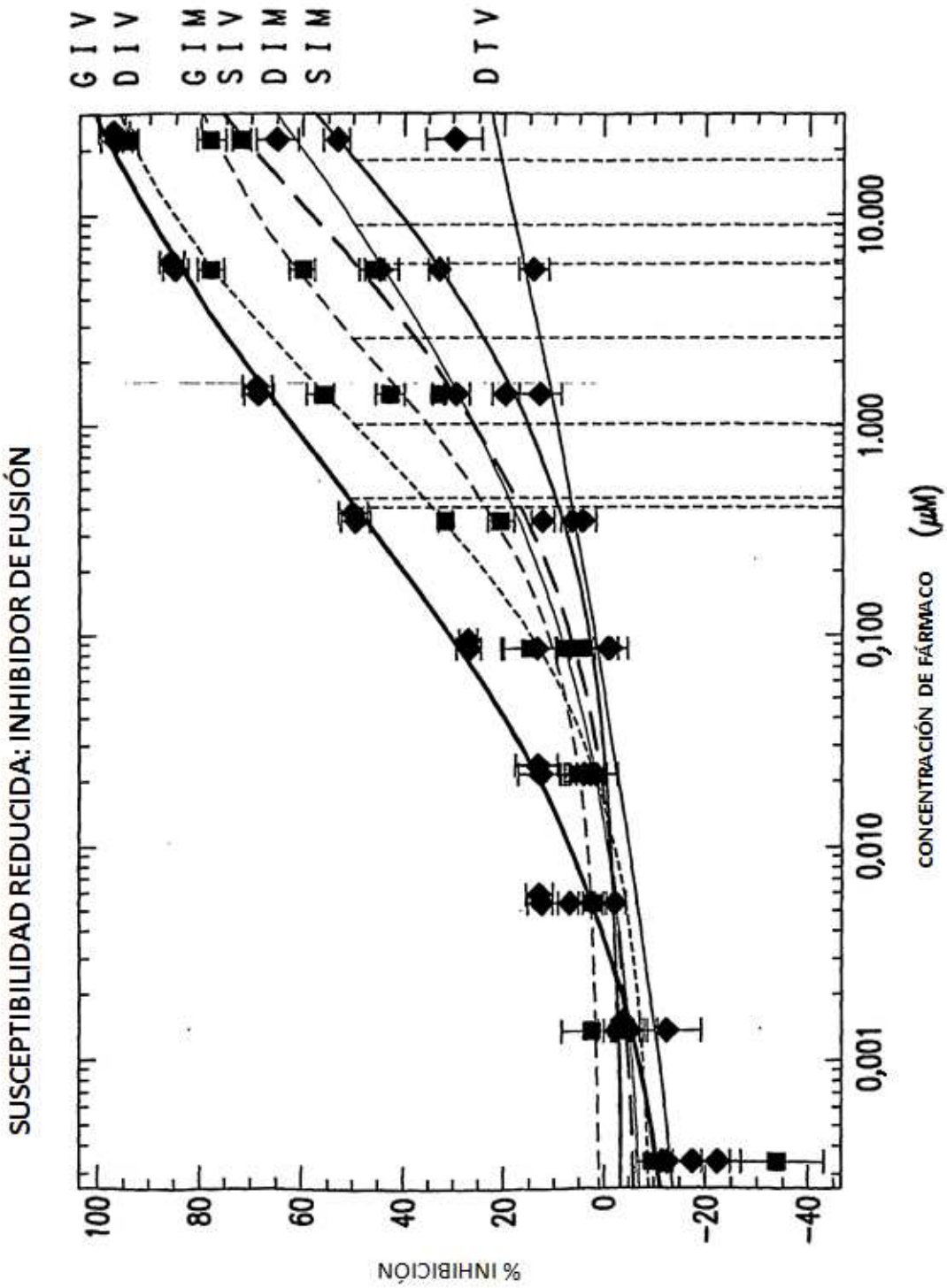

SUSCEPTIBILIDAD REDUCIDA: INHIBIDOR DE FUSIÓN
G I V
D I V
G I M
S I V
D I M
S I M
D T V
% INHIBICIÓN
100
80
60
40
20
0
-20
-40
0,001
0,010
0,100
1.000
10.000
CONCENTRACIÓN DE FÁRMACO (μM)

FIG.4B

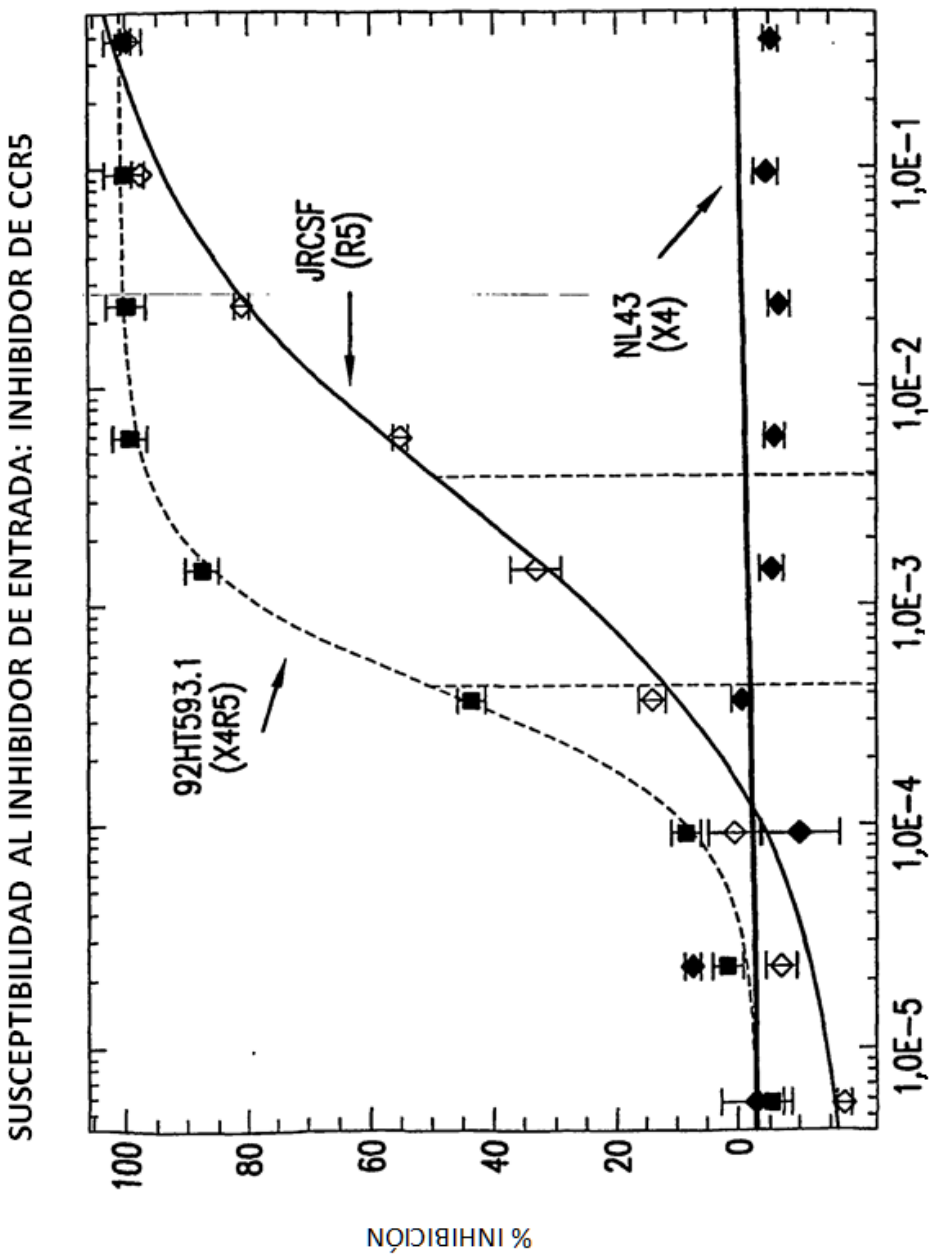

SUSCEPTIBILIDAD AL INHIBIDOR DE ENTRADA: INHIBIDOR DE CCR5
% INHIBICIÓN
100
80
60
40
20
0
1,0E−5
1,0E−4
1,0E−3
1,0E−2
1,0E−1
92HT593.1
(X4R5)
JRCSF
(R5)
NL43
(X4)
FÁRMACO: INHIBIDOR DE R5
CÉLULA: CD4/CCR5

FIG.5A

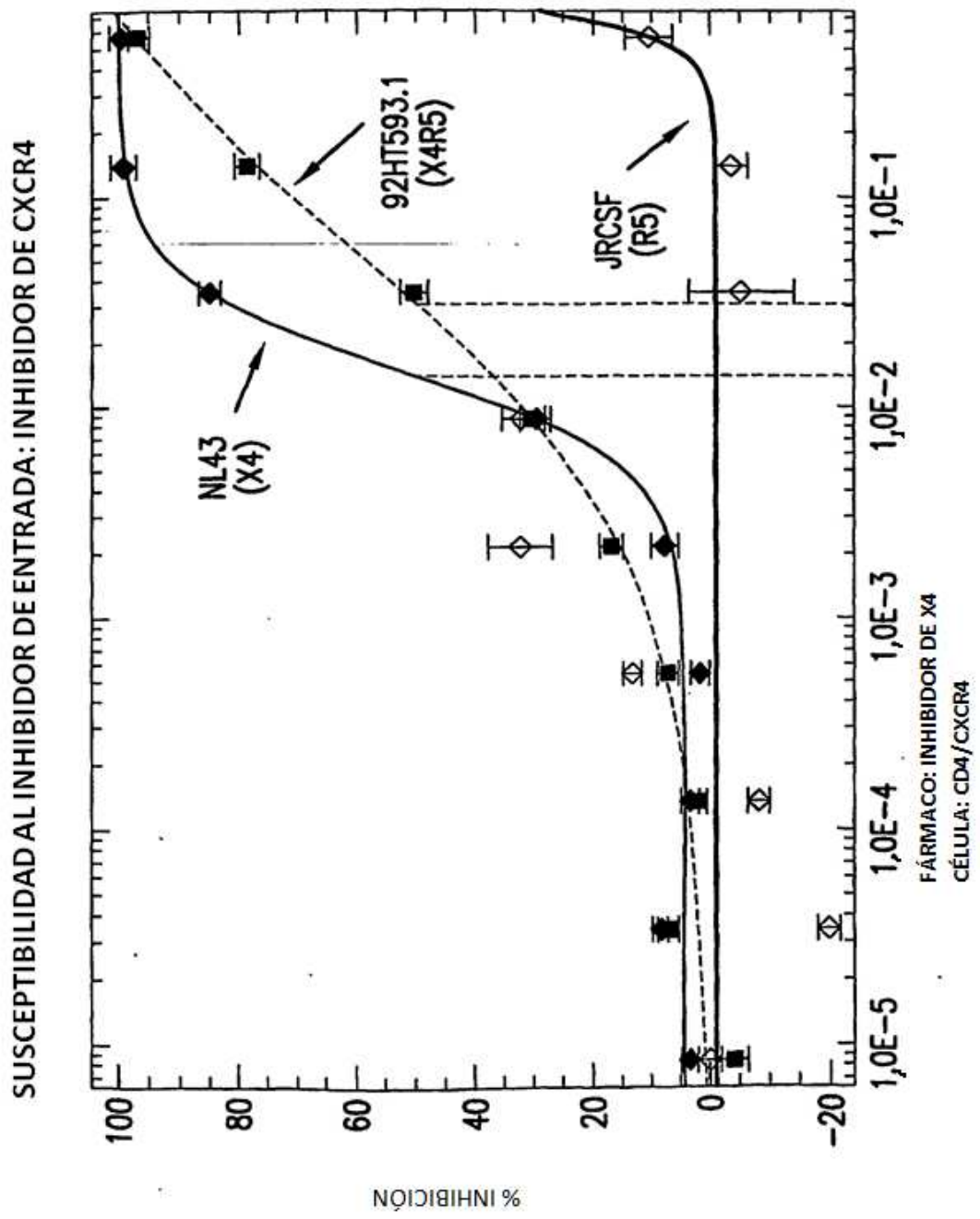
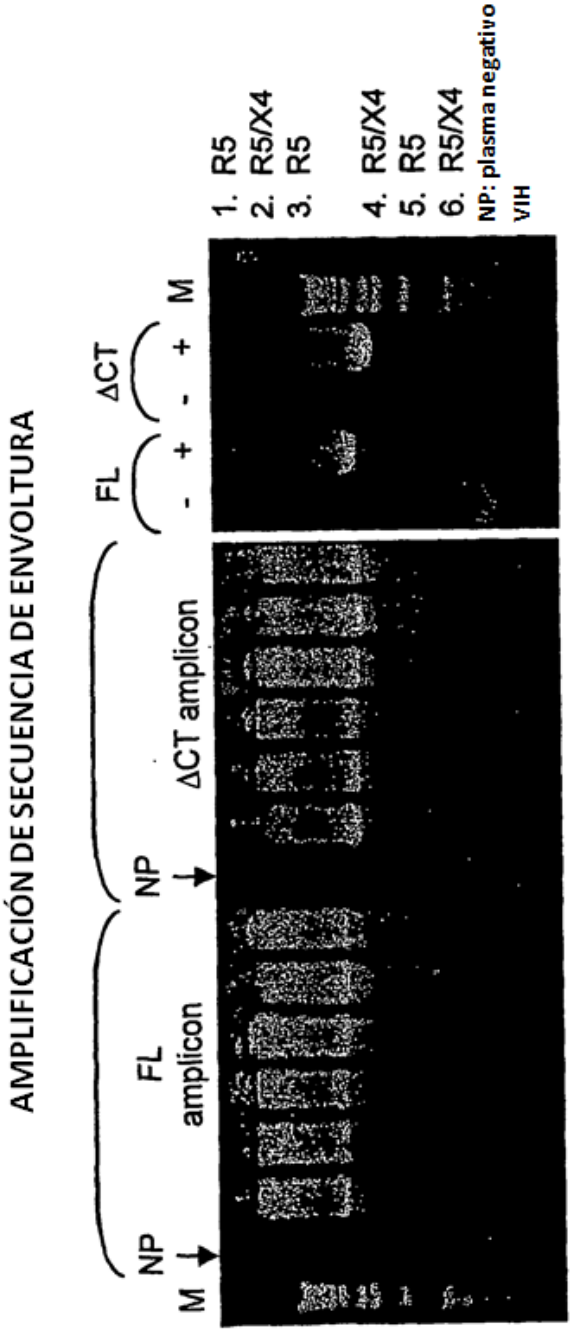

SUSCEPTIBILIDAD AL INHIBIDOR DE ENTRADA: INHIBIDOR DE CXCR4
% INHIBICIÓN
100
80
60
40
20
0
-20
1,0E-5
1,0E-4
1,0E-3
1,0E-2
1,0E-1
NL43 (X4)
92HT593.1 (X4R5)
JRCSF (R5)
FÁRMACO: INHIBIDOR DE X4
CÉLULA: CD4/CXCR4

FIG.5B



Tropismo por el correceptor	Nº de aislados
X4	15
R5	24
X4/R5	15
Indefinido	35

Subtipo de envoltura	Nº de aislados
VARIANTE A	2
VARIANTE B	76
VARIANTE C	7
VARIANTE D	1
VARIANTE E	3

FIG.6

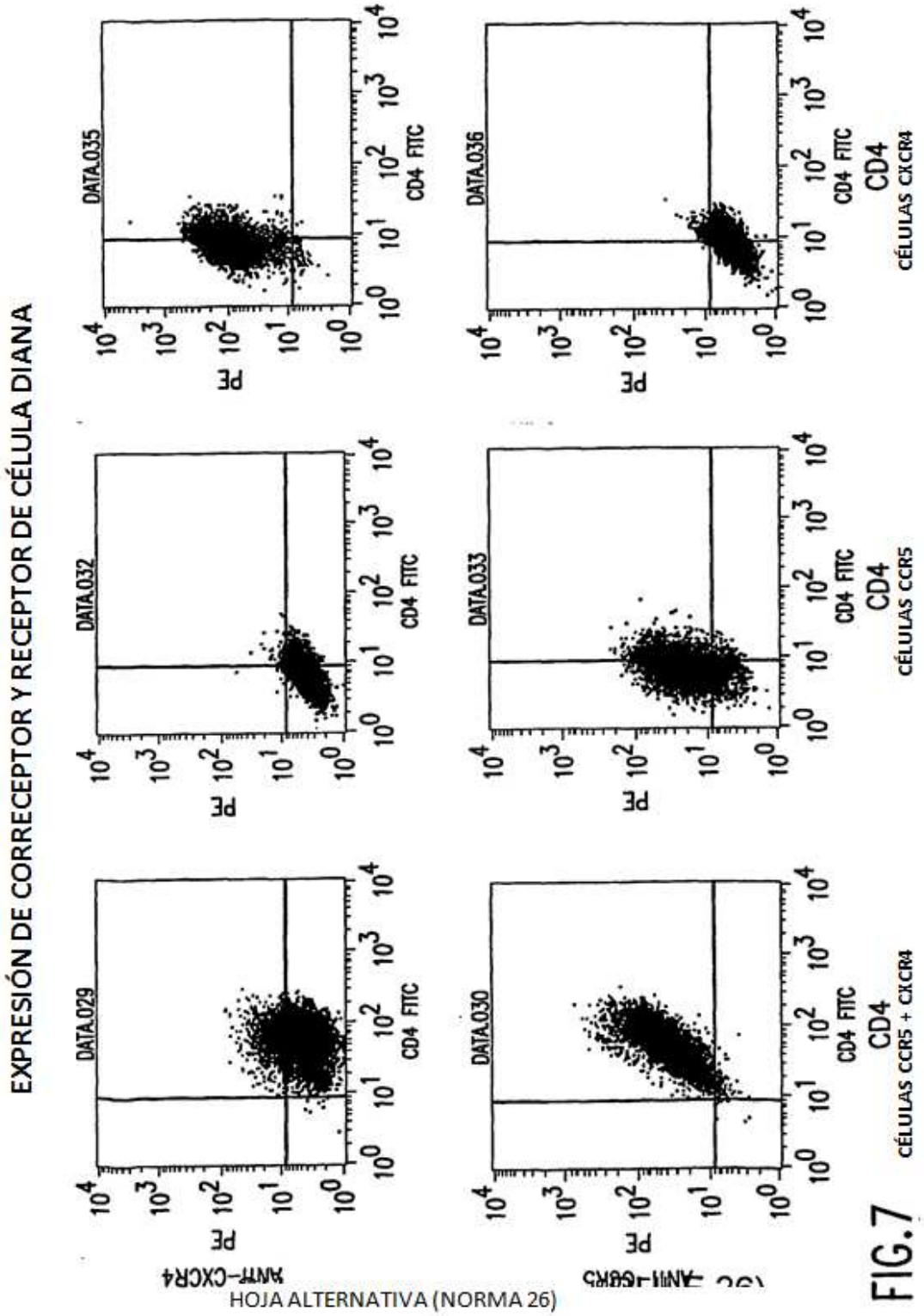


FIG.7

HOJA ALTERNATIVA (NORMA 26)

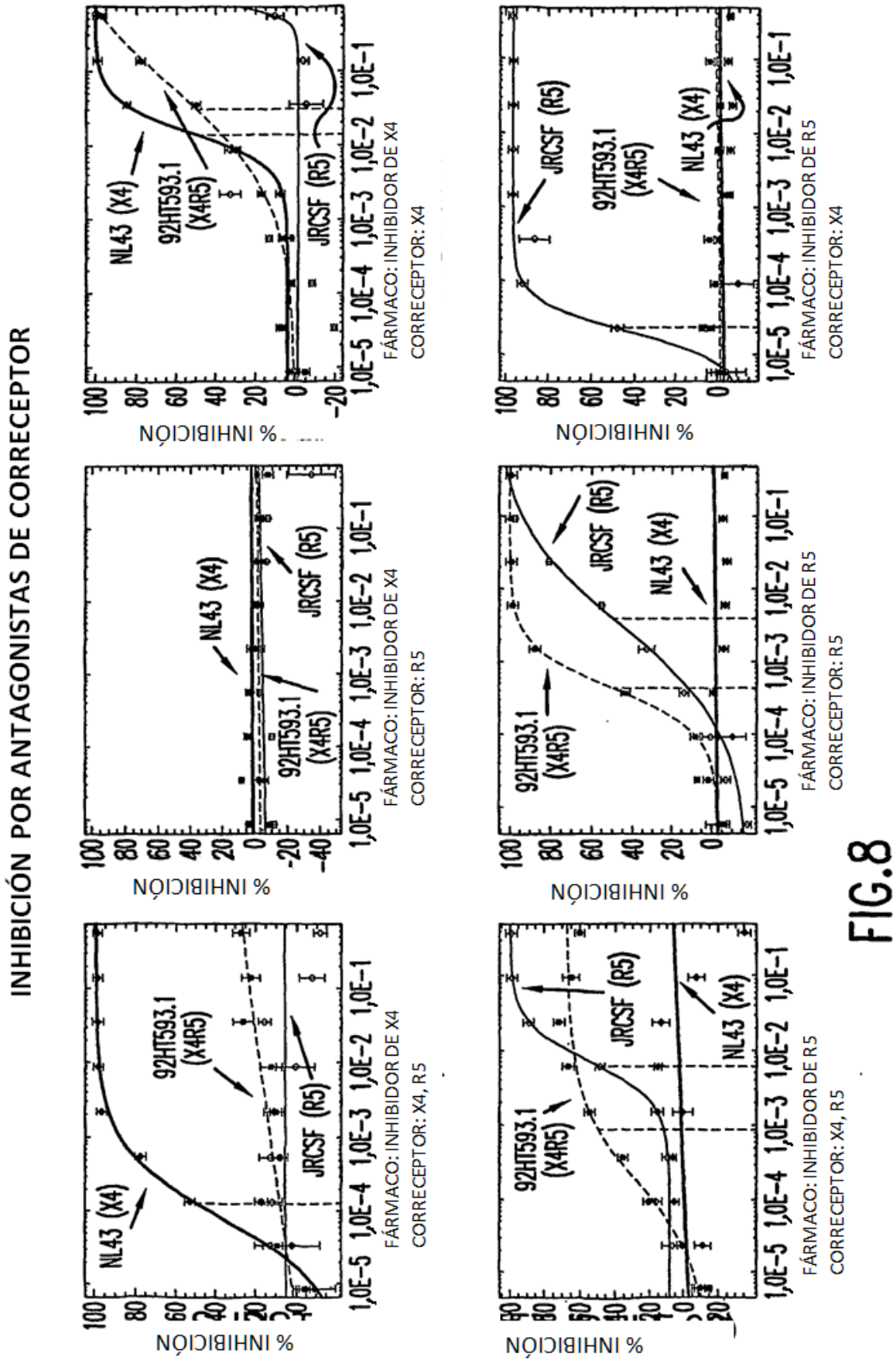

INHIBICIÓN POR ANTAGONISTAS DE CORRECEPTOR
% INHIBICIÓN
NL43 (X4)
92HT593.1 (X4R5)
JRCSF (R5)
1,0E-5 1,0E-4 1,0E-3 1,0E-2 1,0E-1
FÁRMACO: INHIBIDOR DE X4
CORRECEPTOR: X4, R5
FÁRMACO: INHIBIDOR DE R5
CORRECEPTOR: X4, R5
FÁRMACO: INHIBIDOR DE X4
CORRECEPTOR: R5
FÁRMACO: INHIBIDOR DE R5
CORRECEPTOR: R5
FÁRMACO: INHIBIDOR DE X4
CORRECEPTOR: X4
FÁRMACO: INHIBIDOR DE R5
CORRECEPTOR: X4

FIG.8

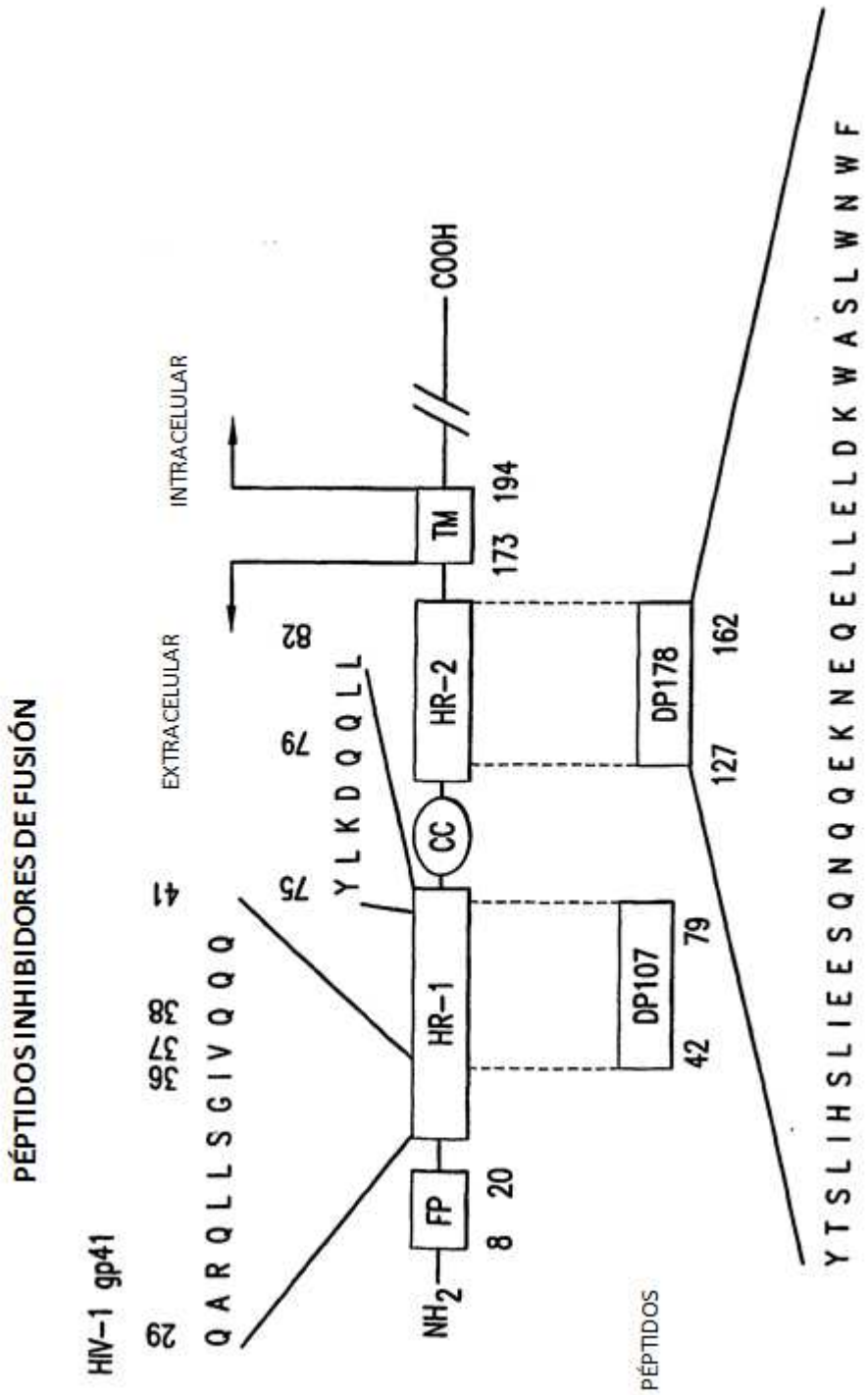

PÉPTIDOS INHIBIDORES DE FUSIÓN
HIV-1 gp41
29
Q A R Q L L S G I V Q Q Q
36
37
38
41
EXTRACELULAR
INTRACELULAR
75
Y L K D Q Q L L
79
82
NH2
FP
8 20
HR-1
CC
HR-2
TM
173 194
COOH
DP107
42 79
DP178
127 162
PÉPTIDOS
Y T S L I H S L I E E S Q N Q Q E K N E Q E L L E L D K W A S L W N W F

FIG.9

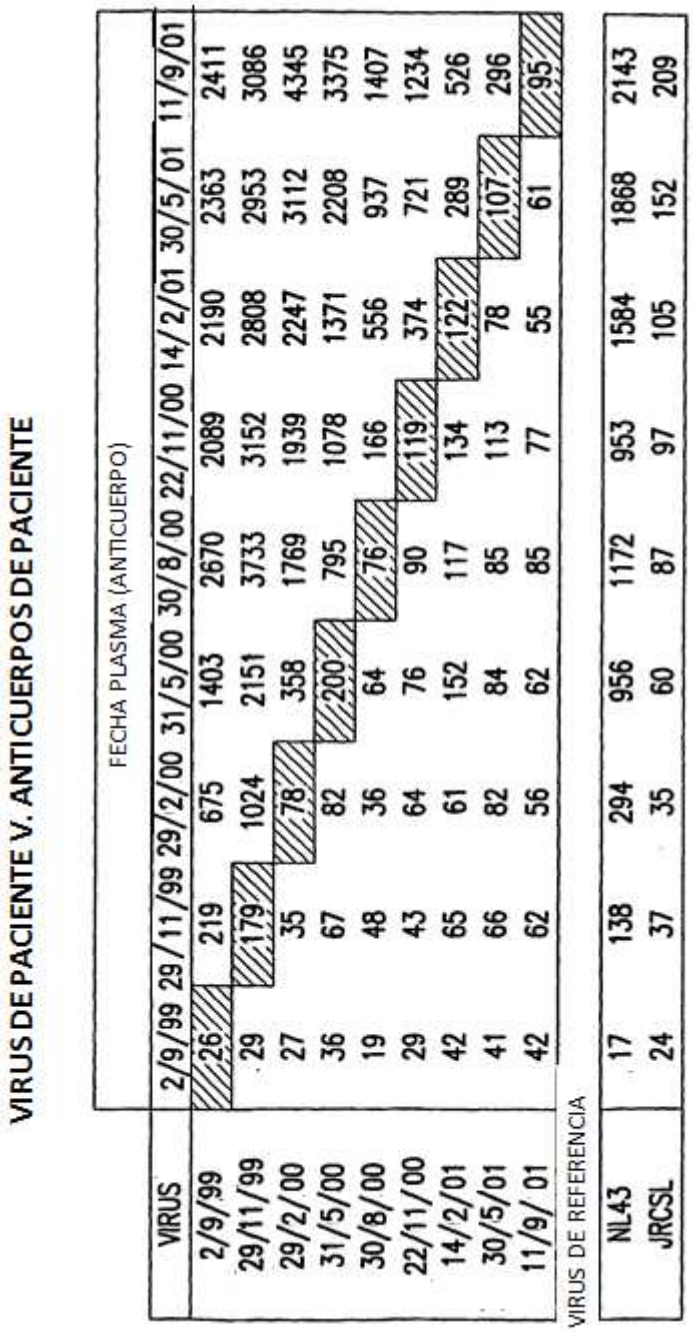

VIRUS DE PACIENTE V. ANTICUERPOS DE PACIENTE
FECHA PLASMA (ANTICUERPO)
VIRUS
2/9/99 29/11/99 29/2/00 31/5/00 30/8/00 22/11/00 14/2/01 30/5/01 11/9/01
2/9/99 26 219 675 1403 2670 2089 2190 2363 2411
29/11/99 29 179 1024 2151 3733 3152 2808 2953 3086
29/2/00 27 35 78 358 1769 1939 2247 3112 4345
31/5/00 36 67 82 200 795 1078 1371 2208 3375
30/8/00 19 48 36 64 76 166 556 937 1407
22/11/00 29 43 64 76 90 119 374 721 1234
14/2/01 42 65 61 152 117 134 122 289 526
30/5/01 41 66 82 84 85 113 78 107 296
11/9/ 01 42 62 56 62 85 77 55 61 95
VIRUS DE REFERENCIA
NL43 17 138 294 956 1172 953 1584 1868 2143
JRCSL 24 37 35 60 87 97 105 152 209

FIG.10