

OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 244 332**

② Número de solicitud: 200401116

⑤ Int. Cl.7: **C12N 15/867**

C12Q 1/70

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

② Fecha de presentación: **10.05.2004**

④ Fecha de publicación de la solicitud: **01.12.2005**

④ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:  
**01.12.2005**

⑦ Solicitante/s: **FUNDACIÓN PARA LA INVESTIGACIÓN Y LA PREVENCIÓN DEL SIDA EN ESPAÑA** (Titular al 50%)  
**Sinesio Delgado, nº 4**  
**28029 Madrid, ES**  
**INSTITUTO DE SALUD CARLOS III** (Titular al 50%)

⑦ Inventor/es: **Alcamí Pertejo, José;**  
**García Pérez, Javier;**  
**Sánchez Palomino, Sonsoles y**  
**González Fernández, Nuria**

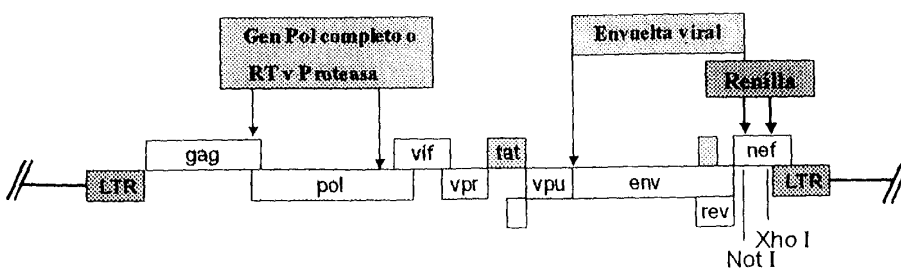
⑦ Agente: **Ungría López, Javier**

⑤ Título: **Nuevos clones virales recombinantes basados en VIH y su utilización en métodos analíticos.**

⑤ Resumen:

Nuevos clones virales recombinantes basados en VIH y su utilización en métodos analíticos.

Dichos clones poseen la siguiente estructura general (I):



y son el resultado de las siguientes manipulaciones genéticas en el gen VIH:

- delección de fragmentos de VIH (por ejemplo, gen Nef) sin perder capacidad infectiva,
- inserción de un gen no expresado en células humanas,
- inserción del gen LacZ,
- introducción de sitios de restricción para extraer fragmentos de ADN del provirus matriz y sustituirlos por genes de pacientes a valorar.

Aplicación en métodos analíticos relacionados con el SIDA.

ES 2 244 332 A1

## DESCRIPCIÓN

Nuevos clones virales recombinantes basados en VIH y su utilización en métodos analíticos.

5 **Campo técnico de la invención**

Dentro del amplio campo de la investigación que se está llevando a cabo en torno al SIDA y más concretamente al desarrollo de nuevas familias de fármacos, la presente invención se centra en la generación de unos nuevos clones virales recombinantes basados en el genoma del Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) destinados a utilizarse ventajosamente en tests de sensibilidad a fármacos, ensayos de detección de anticuerpos neutralizantes, estudio del tropismo y capacidad replicativa viral y métodos de cribado y caracterización de compuestos con actividad antiviral, etc.

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

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

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

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

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

Concomitantemente al desarrollo de estas estrategias para combatir la enfermedad, es imprescindible el desarrollo de métodos y técnicas analíticas para evaluar estos nuevos abordajes: modelos de determinación de resistencias a antirretrovirales, caracterización biológica de aspectos cualitativos de la biología del virus y desarrollo de modelos para la generación de plataformas de cribado y caracterización de la actividad antiviral de nuevos compuestos. En los párrafos siguientes se hará referencia a alguno de los métodos analíticos que se están empleando en la actualidad, y en los que la presente invención tiene una especial incidencia por sus ventajosas aportaciones.

50 - *Sistemas de determinación de resistencias fenotípicas a fármacos antirretrovirales*

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

- 55 a. *Sistemas clásicos*: Comprenden, en un primer paso, el aislamiento del VIH a partir de cultivos de linfocitos del paciente y, en un segundo paso, la infección de células diana en presencia de los distintos antirretrovirales para determinar la concentración inhibitoria de los fármacos (IC50) sobre un aislado concreto. Estos sistemas son terriblemente costosos, largos, tediosos y requieren condiciones de bioseguridad accesibles a muy pocos laboratorios de virología (Richman y cols., 1993; Nagy y cols., 1994).
- 60 b. *Sistemas basados en técnicas de recombinación genética*. En esta tecnología, las secuencias del gen *pol* son amplificadas a partir del plasma de los pacientes y transfectadas junto con provirus deletados en dichas secuencias, en líneas celulares. Por reacciones de ligación "in vivo", en el interior de estas células se recombina un virus que lleva las secuencias Transcriptasa Inversa y Proteasa del virus del paciente. La progenie viral recombinante generada se utiliza para evaluar la IC50 en la infección de células diana. Existen distintas variantes de esta tecnología en cuanto a las secuencias y pasos de amplificación, células diana y utilización de marcadores (Boucher y cols., 1996; Hertogs y cols., 1998; Ruiz y cols, 1998; Little

## ES 2 244 332 A1

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

55 Este modelo tiene dos inconvenientes importantes:

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

65 Se han propuesto otras técnicas basadas en microscopía o citometría de células infectadas pero revisten una complejidad que no las hace viables como tests de rutina (Hausmann y cols., 1987; Mascola y cols., 2002). Recientemente se ha introducido la técnica de inhibición de infección por virus recombinantes para analizar la capacidad neutralizante de sueros en distintos abordajes experimentales (Kolchinski y cols., 2001) y en muestras clínicas (Wei y cols., 2003; Richman y cols., 2003). Se hace por tanto imprescindible el desarrollo de nuevas técnicas que solventen estos dos

grandes inconvenientes, permitiendo el análisis directo de la replicación viral y su inhibición por los anticuerpos del paciente, de alta sensibilidad y fiabilidad y que puedan llevarse a cabo de forma sencilla, rápida y económica.

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

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

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

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

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

- *Modelos experimentales que permitan el rápido cribado de compuestos con potencial actividad antiviral*

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

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

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

Pues bien, ante la situación actual anteriormente expuesta, el solicitante ha encaminado sus esfuerzos investigadores en la búsqueda de nuevos clones virales recombinantes, cuya obtención, identificación y aplicaciones les han permitido la culminación de la presente invención, que representa un gran avance en la resolución de los problemas e inconvenientes antes mencionados, como se irá deduciendo fácilmente de la lectura detallada del resto de la presente memoria descriptiva.

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

- **Agrafiotis DK et al.** Combinatorial informatics in the post-genomics ERA. *Nat Rev Drug Discov.* 2002; 1:337

- **Barbour JD, Wrin T, Grant RM, Martin JN, Segal MR, Petropoulos CJ, Deeks SG.** Evolution of phenotypic drug susceptibility and viral replication capacity during long-term virologic failure of protease inhibitor therapy in human immunodeficiency virus-infected adults. *J Virol.* 2002; 76: 11104-12.

- **Berger EA, Doms RW, Fenyo EM, Korber BT, Littman DR, Moore JP, Sattentau QJ, Schuitemaker H, Sodroski J, Weiss RA.** A new classification for HIV-1. *Nature.* 1998; 391: 240.

- **Bleicher KH.** Hit and lead generation: beyond high-throughput screening. *Nat Rev Drug Discov.* 2003; 2:369.

- **Borden D, Hurley A, Zhang L.** Y cols. HIV-1 drug resistance in newly infected individuals. *JAMA* 1999; 282: 1135-41.

- **Boucher CA, Keulen W van Bommel T, Nijhuis M, de Jong D, de Jong MD, Schipper P, Back NK.** Human

immunodeficiency virus type 1 drug susceptibility determination by using recombinant viruses generated from patient sera tested in a cell-killing assay. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; 40:2404-9.

- **Burton DR.** Opinion: Antibodies, viruses and vaccines. *Nat Rev Immunol.* 2002; 2:706-13

- **Cao Y, Qin L, Zhang L, Safrit J, Ho DD.** Virologic and immunologic characterization of long-term survivors of human immunodeficiency virus type 1 infection. *N Engl J Med.* 1995; 332:201-8.

- **Cherepanov.** Mode of interaction of G-quartets with the integrase of HIV. *Mol Pharmacol.* 1997;52:771

- **Chu CK and Cutler HG (Eds).** Natural Products as Antiviral Agents.Ed.C.K., (1992), Plenum, Press, N.Y.

- **Chun TW, Carruth L, Finzi D, y cols.** Quantification of latent tissue reservoirs and total body viral load in HIV-1 infection. *Nature* 1997; 387:183-8.

- **Chun TW, Stuyver L, Mizell SB, Ehler LA, Mican JA, Baseler M, Lloyd Al, Nowank MA, Fauci AS.** Presence of an inducible HIV-1 latent reservoir during highly active antiretroviral therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997 Nov 25;94(24):13193-7.

- **De Clercq E.** Strategies in the design of antiviral drugs. *Nat Rev Drug Discov.* 2002; 1:13-25.

- **Deeks SG, Wrin T, Liegler T, Hoh R, Hayden M, Barbour JD, Hellmann NS, Petropoulos CJ, McCune JM, Hellerstein MK, Grant RM.** Virologic and immunologic consequences of discontinuing combination antiretroviral-drug therapy in HIV-infected patients with detectable viremia. *N Engl J Med.* 2001; 344: 472-80.

- **Domingo E, Mas A, Yuste E, Pariente N, Sierra S, Gutierrez-Riva M, Menendez-Arias L.** Virus population dynamics, fitness variations and the control of viral disease: an update. *Prog Drug Res.* 2001; 57: 77-115.

- **Dorantz BJ, Rucker J, Yi Y, et al.** A dual-tropic primary HIV-1 isolate that uses fusin and the beta-chemokine receptors CKR5, CKR3 and CKR2 as fusion coreceptors. *Cell* 1996; 35:1149-1158.

- **Este JA.** Virus entry as a target for anti-HIV intervention. *Curr Med Chem.* 2003; 10: 1617-32.

- **Federsel HJ.** Logistics of process R&D: transforming laboratory methods to manufacturing scale. *Nat Rev Drug Discov.* 2003; 2:654

- **Finzi D, Hermankova M, Pierson T, y cols.** Identification of a reservoir for HIV-1 in patients on highly active antiretroviral therapy. *Science* 1997; 278:1295-300.

- **Furtado M, Callaways DS, Phair JP, y cols.** Persistence of HIV transcription in patients receiving combination antiretroviral therapy. *N. Eng. J. Med.* 1999; 340:1614-22.

- **García F, Plana M, Vidal C. y cols** Dynamics of viral load rebound and immunological changes after stopping effective antiretroviral therapy. *AIDS* 1999; 13:f79-86.

- **Glushakova S, Grivel JC, Fitzgerald, W Sylwester A, Zimmerberg J, MargolisLB.** Evidence for HIV-1 phenotype switch as a causal factor in acquired immunodeficiency. *Nature Med* 1998; 4:346-348.

- **Hausmann EH, Gelderblom HR, Clapham PR, Pauli G, Weiss RA.** Detection of HIV envelope specific antibodies by immunoelectron microscopy and correlation with antibody titer and virus neutralizing activity. *J Virol Methods.* 1987; 16: 125-37

- **Havli DV, Lange JM.** New antiretrovirals and new combinations. *AIDS* 1998; 12 Suppl A:S165-74.

- **Havli DV, Marschner IC, Hirsch MS y cols,** Maintenance antiretroviral therapies in HIV infected patients with undetectable plasma HIV RNA after triple-drug therapy. AIDS Clinical Trials Group Study 343 Team. *N Engl J Med* 1998; 339:1261-8.

- **Hazuda DJ, et al.** Inhibitors of strand transfer that prevent integration and inhibit HIV-1 replication in cells. *Science.* 2000; 287:646

- **Hertogs K, de Bethune MP, Miller V y cols.** A rapid method for simultaneous detection of phenotypic resistance to inhibitors of protease and reverse transcriptase in recombinant human immunodeficiency virus type 1 isolates from patients treated with antiretroviral drugs. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42:269-76.

- **Ho DD.** Toward HIV eradication or remission: the tasks ahead. *Science* 1998; 280:1866-7.

- **Iglesias-Ussel MD, Casado C, Yuste E, Olivares I, Lopez-Galindez C.** *In vitro* analysis of human immunodeficiency

- ciency virus type 1 resistance to nevirapine and fitness determination of resistant variants. *J Gen Virol.* 2002; 83): 93-101
- **Jung M.** Recent studies on natural products as anti-HIV agents. *Curr. Med. Chem.* 2000; 649:125
- 5 - **Knowles J.** A guide to drug discovery: Target selection in drug discovery. *Nat Rev Drug Discov.* 2003; 2:63
- **Kolchinsky P, Kiprilov E, Sodroski J.** Increased neutralization sensitivity of D4-independent human immunodeficiency virus variants. *J Virol.* 2001; 75: 2041-50
- 10 - **Lathey JL, Pratt RD, Spector SA.** Appearance of autologous neutralizing antibody correlates with reduction in virus load and phenotype switch during primary infection with human immunodeficiency virus type 1 [Letter]. *J Infect Dis.* 1997; 175:231-2.
- 15 - **Langlois AJ, Matthews TJ, Weinhold KJ, Chaffee S, Hershfield M, Bolognesi DP.** Detection of HIV-1 neutralizing antibodies by a simple, rapid, colorimetric assay. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 1988 Feb;4(1): 63-9.
- **Lazzarín A, Clotet B, Cooper D, Reynes J, Arasteh K, Nelson M, Katlama C, Stellbrink HJ, Delfraissy JF, Lange J, Huson L, DeMasi R, Wat C, Delehanty J, Drobnies C, Salgo M; TORO 2 Study Group.** Efficacy of enfuvirtide in patients infected with drug-resistant HIV-1 in Europe and Australia. *N Engl J Med.* 2003; 348: 2186-95
- 20 - **Learmont JC, Geczy AF, Mills J, Ashton LJ, Raynes-Greenow CH, Garsia RJ, et al.** Immunologic and virologic status after 14 to 18 years of infection with an attenuated strain of HIV-1. A report from the Sydney Blood Bank Cohort. *N Engl J Med.* 1999; 340:1715-22.
- 25 - **Little SJ, Daar ES, D'Aquila RT.** Y cols reduced antiretroviral drug susceptibility among patient with primary HIV infection. *JAMA* 1999; 282:1142-49.
- **Loetscher P, Moser B, Baggiolini M.** Chemokines and their receptors in lymphocyte traffic and HIV infection. *Adv Immunol.* 2000; 74:127-80
- 30 - **Loomis-Price LD, Cox JH, Mascola JR, VanCott TC, Michael NL, Fouts TR, et al.** Correlation between humoral responses to human immunodeficiency virus type 1 envelope and disease progression in early-stage infection. *J Infect Dis.* 1998; 178:1306-16.
- 35 - **Mammano F, Trouplin V, Zennou V, Clavel F.** Retracing the evolutionary pathways of human immunodeficiency virus type 1 resistance to protease inhibitors: virus fitness in the absence and in the presence of drug. *J Virol.* 2000; 7: 8524-31.
- 40 - **Martinez-Picado J, Savara AV, Shi L, Sutton L, D'Aquila RT.** Fitness of human immunodeficiency virus type 1 protease inhibitor-selected single mutants. *Virology.* 2000 Sep 30; 275: 318-22.
- **Mascola JR, Louder MK, Winter C, Prabhakara R, De Rosa SC, Douek DC, Hill BJ, Gabuzda D, Roederer M.** Human immunodeficiency virus type 1 neutralization measured by flow cytometric quantitation of single-round infection of primary human T cells. *J Virol.* 2002; 76: 4810-21
- 45 - **McMichael AJ and Rowland-Jones SL.** Cellular immune responses to HIV. *Nature* 2001; 410:980-7.
- **McMichael AJ and Hanke T.** HIV vaccines 1998-2003; *Nat.Med.* 2003; 9:874-880.
- 50 - **Michael NL, Chang G, d'Arcy LA, Ehrenberg PK, Mariani R, Busch MP, et al.** Defective accessory genes in a human immunodeficiency virus type 1- infected long-term survivor lacking recoverable virus. *J Virol.* 1995; 69:4228-36.
- 55 - **Moore JP and Burton DR.** HIV-1 neutralizing antibodies: how full is the bottle?. *Nat Med* 1999; 5:142-144
- **Nagy K, Young M, Baboonian C, Merson J, Whittle P, Oroszlan S.** Antiviral activity of human immunodeficiency virus type 1 protease inhibitors in a single cycle of infection: evidence for a role protease in the early phase. *J Virol* 1994; 68:757-65.
- 60 - **Nijhuis M, Deeks S and Boucher C.** Implications of antiretroviral resistance on viral fitness. *Curr. Opinion Inf. Dis.* 2001; 14:23-28
- **Oberlin E, Amara A, Bachelier F, et al.** The CXc chemokine SDF-1 is the lignd for LESTR/Fusin and prevents infection by a T-cell line adapted HIV-1. *Nature* 1997; 382:833-835.
- 65 - **Pantaleo G, Menzo S, Vaccarezza M, Graziosi C, Cohen OJ, Demarest JF, et al.** Studies in subjects with long-term nonprogressive human immunodeficiency virus infection. *N Engl J Med.* 1995; 332:209-16.

- **Pauwels, R. et al.** Sensitive and rapid assay on MT-4 cells for detection of antiviral compounds against the AIDS virus. *J Virol Methods*. 1987. 16:171-185.
- 5 - **Pilgrim AK, Pantaleo G, Cohen OJ, Fink LM, Zhou JY, Zhou JT, et al.** Neutralizing antibody responses to human immunodeficiency virus type 1 in primary infection and long-term-nonprogressive infection. *J Infect Dis*. 1997; 176:924-32.
- **Poignard P.** Neutralizing antibodies have limited effects on the control of established HIV-1 infections *in vivo*. *Immunity* 1999; 10:431-438.
- 10 - **Pomerantz RJ** Residual HIV-1 disease in the era of HAART. *N. Eng. J. Med.* 1999; 340: 1625-27.
- **Ramratnam B, Mitler JE, Zhang L.** Y cols. The decay of the latent reservoir of replication-competent HIV-1 is inversely correlated with the extent of residual viral replication during prolonged antiretroviral therapy. *Nat.Med.* 15 2000; 6:82-85.
- **Richman DD, Johnson VA, Shirasaka T, O'Brien MC, Mitsuya H.** Measurement of susceptibility of HIV-1 to antiviral drug. In: Strober W, Shevach E, eds. *Current Protocols in Immunology*. New York: Green Publishing associates, 1993:12.9.1.
- 20 - **Richman DD, Wrin T, Little SJ, Petropoulos CJ.** Rapid evolution of the neutralizing antibody response to HIV type 1 infection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003; 100: 4144-9.
- **Rudin M et al.** Molecular imaging in drug discovery and development. *Nat Rev Drug Discov.* 2003; 2:123.
- 25 - **Ruiz L, Nijhuis M, Boucher C, Puig T,** y cols. Efficacy of adding indinavir to previous reverse transcriptase nucleoside analogues in relation to genotypic and phenotypic resistance development in advanced HIV-1-infected patients. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 1998; 19:19-28.
- 30 - **Ruiz-Jarabo CM, Arias A, Molina-Paris C, Briones C, Baranowski E, Escarmis C, Domingo E.** Duration and fitness dependence of quasispecies memory. *J Mol Biol.* 2002; 315:285-96
- **Sattentau Q.** Neutralization of HIV-1 by antibody. *Curr.Opin.Immunol.* 1996; 8:540-5.
- 35 - **Sharkey ME, Teo I, Greenough T** y cols. Persistence of episomal HIV-1 infection intermediates in patients on highly active antiretroviral therapy. *Nat.Med.* 2000; 6:76-81.
- **Spira S, Wainberg MA, Loemba H, Turner D, Brenner BG.** Impact of clade diversity on HIV-1 virulence, antiretroviral drug sensitivity and drug resistance. *J Antimicrob Chemother.* 2003; 51: 229-40.
- 40 - **Tersmette M, Lange JM, de Goede RE, de Wolf F, Eeftink-Schattenkerk JK, Schellekens PT, et al.** Association between biological properties of human immunodeficiency virus variants and risk for AIDS and AIDS mortality. *Lancet.* 1989; 1:983-5.
- 45 - **Walters WP.** Designing screens: how to make your hits a hit. *Nat Rev Drug Discov.* 2003; 2:259.
- **Wei X, Decker JM, Wang S, Hui H, Kappes JC, Wu X, Salazar-Gonzalez JF, Salazar MG, Kilby JM, Saag MS, Komarova NL, Nowak MA, Hahn BH, Kwong PD, Shaw GM.** Antibody neutralization and escape by HIV-1. *Nature.* 2003; 422: 307-12.
- 50 - **Wein L, D'Amato R, Perelson A.** Mathematical analysis of antiretroviral therapy aimed at HIV-1 eradication or maintenance of low viral loads. *J Theor Biol* 1998; 192:81- 98.
- **Weiss RA.** HIV receptors and the pathogenesis of AIDS. *Science* 1996; 272:1885-1886.
- 55 - **Wong JK, Hezareh M, Günthard HF, Havlir DV, Ignacio CA, Spina CA and Richman D.** Recovery of replicatio competent -HIV despite prolonged suppression of plasma viremia. *Science* 1997; 278:1291-5.
- **Yuste E, Sanchez-Palomino S, Casado C, Domingo E, Lopez-Galindez C.** Related Articles, Links Drastic fitness loss in human immunodeficiency virus type 1 upon serial bottleneck events. *J Virol.* 1999; 73: 2745-51
- 60 - **Zaitseva M, Peden K, Golding H.** HIV coreceptors: role of structure, posttranslational modifications, and internalization in viral-cell fusion and as targets for entry inhibitors. *Biochim Biophys Acta.* 2003; 1614: 51-61.
- 65 - **Zhang I, Ramratnam B, Tenner-Racz K.** Y cols. Quantifying residual HIV-1 replication in patients receiving combination antiretroviral therapy. *N. Eng. J. Med.* 1999; 340:1605-13.

**Descripción detallada de la invención**

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

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

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

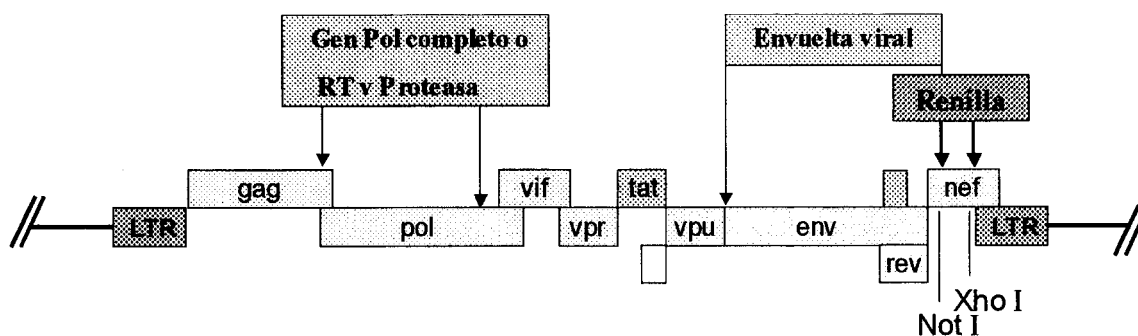
En concreto, en el desarrollo de la presente invención se ha procedido de acuerdo con las siguientes estrategias:

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

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

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

Los clones virales recombinantes de la presente invención se caracterizan porque poseen la siguiente Estructura General I:



donde:



## ES 2 244 332 A1

- LTR (long terminal repeats) son las regiones con secuencia redundante (R) que juega un papel primordial durante el proceso de retrotranscripción;

5 - *gag* es el gen que codifica para la proteína p55 de la cápsida formada por 3 subunidades proteicas (MA, CA y NC);

- *pol* es el gen que codifica las enzimas virales necesarias para el proceso de replicación viral: proteasa (PRO), la transcriptasa inversa (RT) e integrasa;

10 - *vif* codifica la proteína Vif asociada con la infecciosidad de los viriones extracelulares;

- *vpr* codifica la proteína Vpr que actúa como acelerador del ciclo de replicación a distintos niveles;

15 - *tat* codifica la proteína Tat que es un transactivador;

- *vpu* codifica para Vpu implicada en la liberación de los viriones;

- *env* es el gen que codifica la proteína gp160 de la envuelta viral;

20 - *rev* produce la proteína Rev, encargada del procesamiento y transporte al citoplasma del ARN mensajero;

- *nef* codifica la proteína Nef que regula negativamente moléculas CD4 y HLA de la célula infectada y desempeña un papel en la patogenicidad del virus:

25 - NotI y XhoI indican sitios únicos de restricción en *la secuencia de ADN*;

- Renilla indica la posición de clonaje del gen reportero.

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

a). Introducción por mutagénesis dirigida el sitio de restricción Not I al inicio del gen *nef* (**IP NL Not**).

40 b). Delección del gen *nef* (corte con los enzimas de restricción Not I y XhoI).

c). Clonación del gen de renilla en las posiciones Not I/Xho I. (**IP HIV NL Ren**). Estructura general I.

45 d). Eliminación de la única diana Nco I mediante digestión y relleno con Klenow e introducción por mutagénesis dirigida de otro sitio de restricción Nco I en la posición correspondiente al aminoácido 15 de la retrotranscriptasa (cambio de glicina por alanina). (**IP HIV NL Nco Ren**).

50 e). Clonaje en el vector **IP HIV NL Nco Ren** del gen beta-galactosidasa en la posición de la RT (**IP HIV NL LacZ/rt Ren**), Proteasa (**IP HIV NL LacZ/pr Ren**), o el gen Pol completo (**IP HIV NL LacZ/pol Ren**) con el fin de aumentar la eficacia de clonaje y evitar el arrastre de poblaciones minoritarias del virus de referencia. Los clones religados sin el inserto del paciente dan colonias azules, mientras que el plásmido que ha incorporado la RT, Pr o el gen pol completo del paciente da colonias blancas.

55 f). A partir del plásmido **IP HIV NL LacZ/pr Ren**, destrucción del sitio de restricción NarI externo al provirus mediante mutagénesis dirigida e introducción del sitio de restricción KspI en la posición 4498 por mutagénesis dirigida (**IP HIV NL LacZ/gag-pr Ren**).

g). Introducción por mutagénesis dirigida del sitio de restricción XbaI en la posición 6112 en el clon **IP HIV NL Ren** (**IP HIV NL Xba Ren**).

60 h) Delección de la envuelta en el plásmido **IP HIV NL XbaI Ren** mediante el corte con los enzimas de restricción XbaI y NotI y clonaje en su lugar del gen lacZ (**IP HIV NL LacZ/env Ren**).

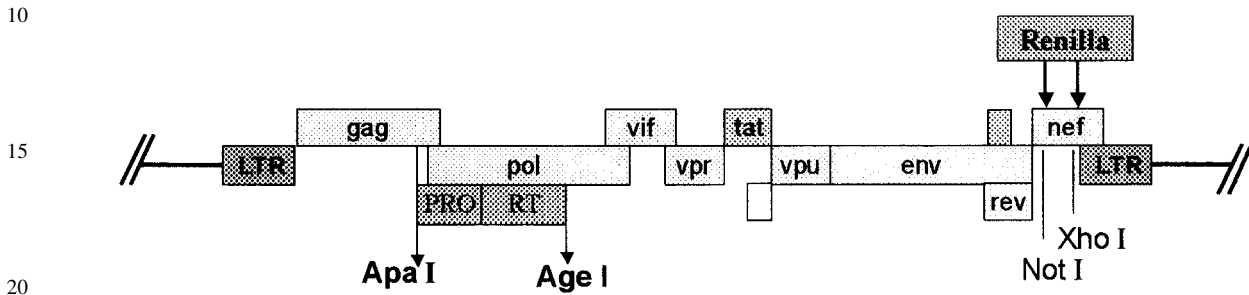
65 i). Generación del clon viral IP HIV JR Ren clonando la envuelta del clon JR-CSF en el plásmido **IP HIV NL LacZ/Env Ren**.

Los vectores finales así generados corresponden a los nuevos clones virales recombinantes objeto de la presente invención, comprendidos todos ellos dentro de la estructura general I. Dichos clones virales han sido depositados en la Colección Española de Cultivos Tipos (Universidad de Valencia, Burjassot, Valencia, España), conforme a la

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

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

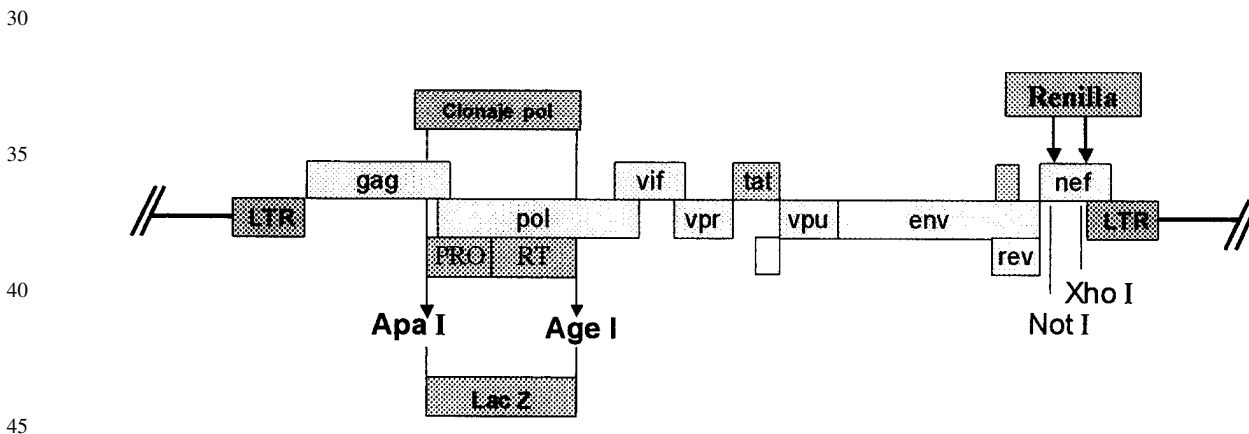
**IP HIV NL Ren (CECT 5842)**



donde:

Apa I y Age I representan sitios únicos de restricción en la secuencia de ADN y los restantes símbolos tienen el significado dado anteriormente para la Estructura general I.

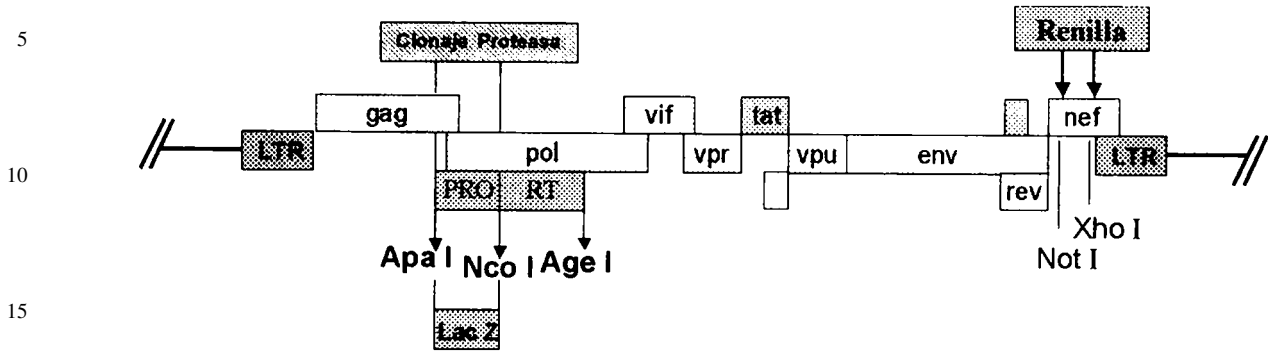
**IP HIV NL LacZ/pol Ren (CECT 5847)**



donde

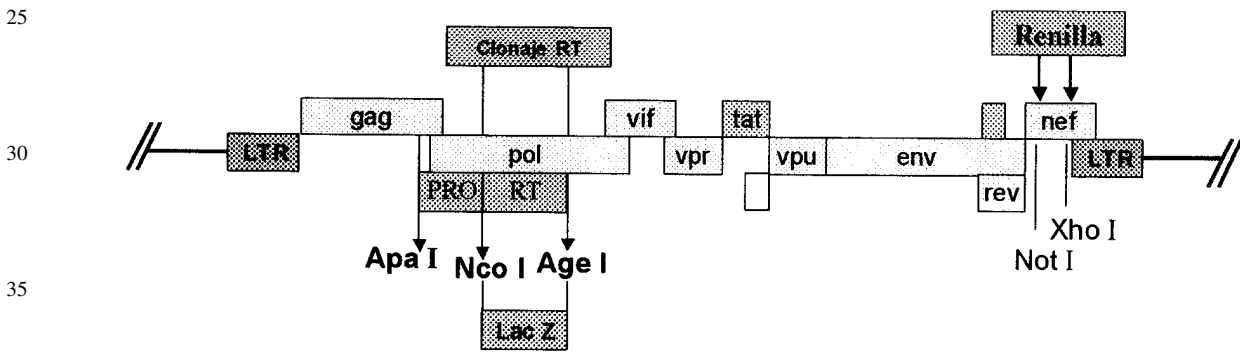
LacZ indica la posición de clonaje del gen LacZ sustituyendo un fragmento del *gen pol*, y los restantes símbolos tienen el significado dado anteriormente.

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



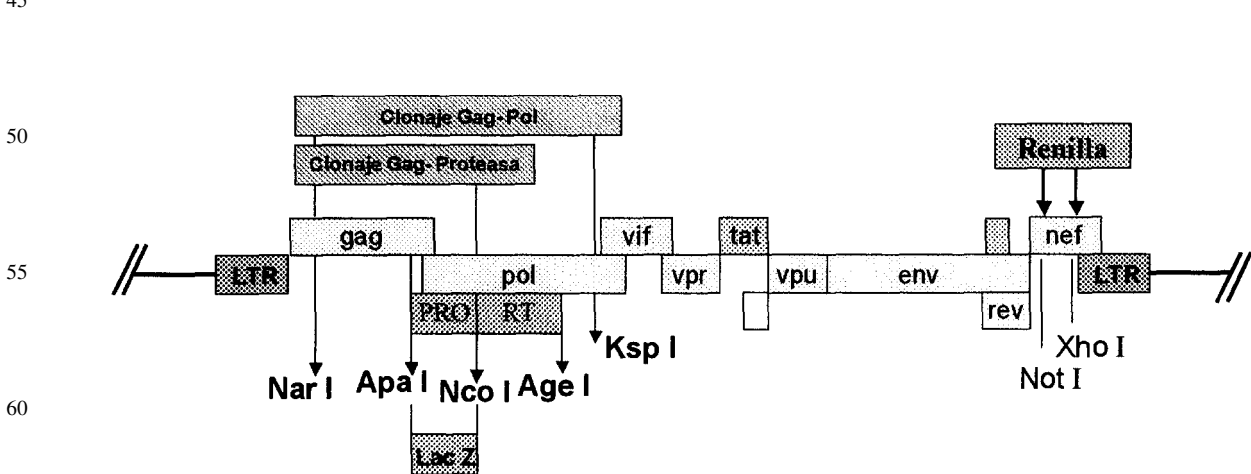
donde Nco I indica un sitio único de restricción en la secuencia de ADN,  
y los restantes símbolos tienen el significado dado anteriormente.

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



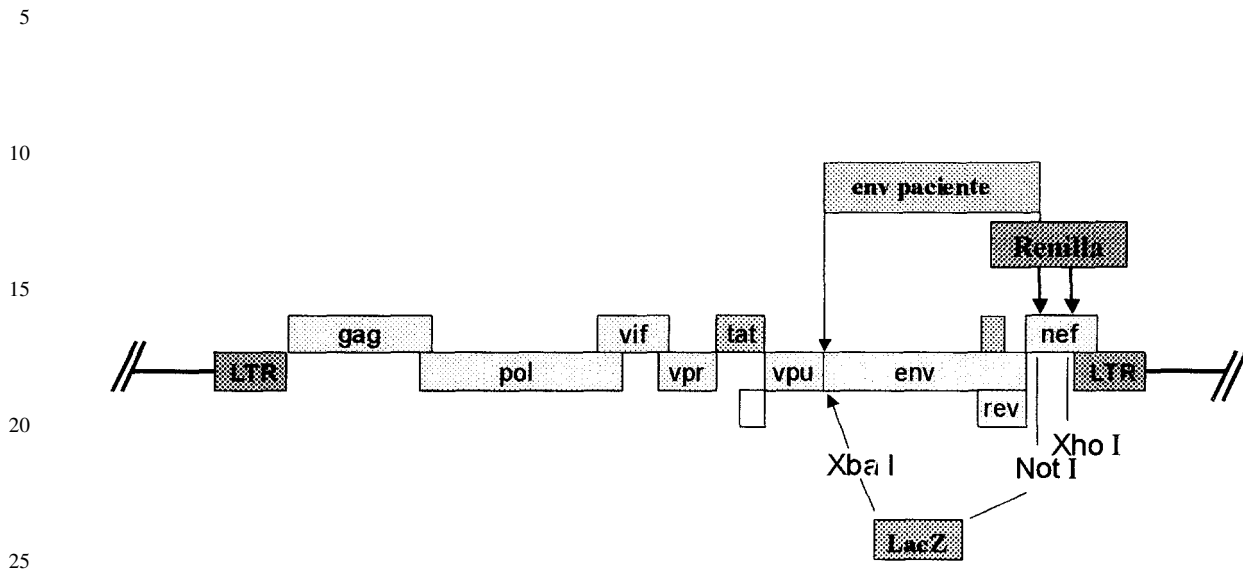
donde los diferentes símbolos tienen los mismos significados indicados anteriormente.

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



donde Nar I y Ksp I indican sitios únicos de restricción en la secuencia de ADN y los restantes símbolos tienen el significado dado anteriormente.

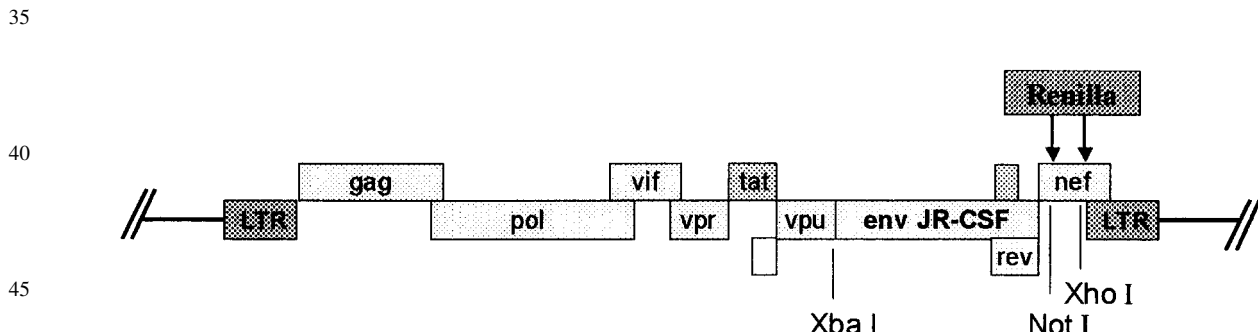
**IP HIV NL LacZ/env Ren (CECT 5844)**



donde XbaI indica un sitio único de restricción en la secuencia de ADN, “env paciente”, indica la posición de clonaje del gen del paciente,

y los demás símbolos tienen el significado dado anteriormente.

**IP HIV JRRen (CECT 5843)**



donde XbaI indica un sitio único de restricción en la secuencia de ADN, “env JR-CSF” indica la posición de clonaje del gen env del clon JR-CSF en lugar de la envuelta de NL 4.3, y los restantes símbolos tienen el significado dado anteriormente.

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

*- Sistemas de determinación de resistencias fenotípicas a fármacos antirretrovirales*

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

- a) La posibilidad de analizar separadamente la resistencia a inhibidores de la Proteasa, de la Transcriptasa Inversa y de la envuelta. Esto posibilita la evaluación independiente de resistencias a distintos grupos farmacológicos.
- b) La utilización de sistemas virales de ciclo múltiple.

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

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

5 La invención propuesta permite determinar este parámetro y analizar directamente la capacidad replicativa viral en dianas celulares muy próximas a las fisiológicas como linfocitos de sangre periférica. El clonaje de los genes de la envuelta y distintos fragmentos del ADN de gag-pol del paciente en virus portadores de genes marcadores de ciclo múltiple (Renilla) confiere al virus quimérico las propiedades replicativas del virus mutado. A diferencia de los sistemas de evaluación del fitness viral, extremadamente laboriosos, el desarrollo permite el análisis de la capacidad replicativa del virus recombinante de forma prácticamente continua.

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

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

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

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

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

30 *- Modelos experimentales para el cribado de compuestos con potencial actividad antiviral*

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

**Breve descripción de las figuras**

40 Figuras 1a y 1b: Esquemas ilustrativos correspondientes a la producción de los clones virales de la presente invención, conforme al proceso descrito en la realización preferida 1.

Figura 2a y 2b: Representaciones gráficas correspondientes a los resultados de los ensayos expuestos en el apartado 2.1 de Modos de Realización de la Invención.

45 Figura 3: Representación gráfica correspondiente a los estudios de determinación de capacidad replicativa expuestos en el apartado 2.2. de Modos de Realización de la Invención.

Figura 4: Expresión de CCR5 y CXR4 por el clon SSPA-B7, conforme al apartado 2.3 y 2.4 de Modos de Realización de la Invención.

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

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

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

60 **Modos de realización de la invención**

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

## ES 2 244 332 A1

### 1.- Obtención de clones virales recombinantes

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

#### (A) Descripción general de la técnica

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

El proceso comprende las siguientes operaciones:

- A partir de 0,5 ml de plasma del paciente se realiza la extracción del ARN del VIH.
- El ARN viral es retrotranscrito y posteriormente amplificado utilizando cebadores específicos de cada gen viral mediante la reacción en cadena de la polimerasa. Los cebadores incluyen sitios de restricción específicos para el posterior clonaje en el virus de referencia del gen *pol* o sus fragmentos o del gen *env* en los diferentes clones virales según el tipo de virus recombinante que se desea generar.
- Tras la digestión enzimática del amplificado y del virus de referencia se realiza un proceso de ligación *in vitro* utilizando la T4 ligasa.
- La población del provirus recombinante generado se transfecta en la línea celular 293-T y actúa como célula productora de virus recombinantes.
- La progenie infecciosa de virus recombinantes se recoge a las 48 horas de la transfección y se utiliza para infectar la línea celular SSPA-B7.
- Cuando la aplicación es la determinación de resistencias a antiretrovirales los dos últimos procesos se realizan en presencia de inhibidores de la Proteasa (tratando las células productoras 293-T), inhibidores de la transcriptasa inversa (tratando las células diana SSPA-B7) o inhibidores de la entrada viral (tratando las células diana SSPA-B7).
- El nivel de sensibilidad de los distintos fármacos se define mediante la concentración inhibitoria del 50% de la replicación viral (IC50) en comparación con un virus de referencia sin mutaciones de resistencia asociadas.
- La lectura de la sensibilidad a los distintos fármacos se realiza cuantificando la actividad renilla mediante un luminómetro Berthold Orion Microplate.

#### (B) Virus

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

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

#### (C) Cebadores

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

## ES 2 244 332 A1

### - Mutagénesis

#### Mutagénesis Not I:

5 5' GCTATAAGATGGGTGGCGCGGCCGCAAAAAGTAGTGTGATTGG 3'  
5' CCAATCACACTACTTTTTGCGGCCGCGCCACCCATCTTATAGC 3'

#### Mutagénesis Nco I:

10 5' CCAGTAAATTAAGCCAGCCATGGATGGCCCAAAG 3'  
5' CTTTTGGGCCATCCATGGCTGGCTTTAATTTTACTGG 3'

#### Mutagénesis Ksp I:

15 5' GAAGCAGAAGTAATTCCCGCGGAGACAGGGCAAGAAAC 3'  
5' GTTCTTGCCCTGTCTCCGCGGGAATTACTTCTGCTTC 3'

#### Mutagénesis Nar I:

20 5' GAAATACCGCATCAGGACCCATTCGCCATTCAGGC 3'  
5' GCCTGAATGGCGAATGGGTCCTGATGCGGTATTTTC 3'

#### Mutagénesis XbaI:

30 5'GCATTAGTAGTAGCAATAATAATAGCTCTAGAGCTGTGGTCCATAGTAATCATAG  
5'CTATGATTACTATGGACCACAGCTCTAGAGCTATTATTATTGCTACTACTAATGC

### - Amplificación de gen pol de pacientes

35 **POL : 5' GCCAAAAATTGCAGGGCCCCTAGGA3'**  
**5' TCTTTTGATGGGTCATAATACTCCATGTACCGG3'**

40 **PRO : 5' GCCAAAAATTGCAGGGCCCCTAGGA3'**  
**5' CATGCCATGGCTGGCTTTAATTTTACTGGTACAGTC3'**

45 **RT : 5' CATGCCATGGATGGCCCAAAGTTAAACAATGGCC3'**  
**5' TCTTTTGATGGGTCATAATACTCCATGTACCGG3'**

50 **GAG-PR : 5' GGAAAATCTCTAGCAGTGGCGCCCGAACAG3'**  
**5' CATGCCATGGCTGGCTTTAATTTTACTGGTACAGTC3'**

55 **GAG-POL : 5' GGAAAATCTCTAGCAGTGGCGCCCGAACAG3'**  
**5' CTTGCCCTGTCTCTGCTGGAATTACTTCTGC3'**

### - Amplificación gen Env de pacientes

#### • Primera amplificación

60 5' TATGAAACTTACGGGGATACTTGGG 3' (posición 5697 -5721 del pNL4.3)

65 5' CTGCCAATCAGGGAAGTAGCCTTGTGT 3' (posición 9135 -9161 del pNL4.3)

• **Nested-PCR**

(diana XbaI)

5 5' GTAGCAATAATAATAGCTCTAGAGCTGTGGTCCATAGTAATC3'

(posición 6097 - 6138 del pNL4.3)

(diana Not I) 5' TACTTTTTGCGGCCGCGCCACCCATCTTATAGC

10

(posición 8779 - 8811 del pNL4.3)

(D) *Clones virales recombinantes basados en VIH*

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

**IP HIV NL Ren: Número de Depósito CECT 5842**

20 **IP HIV NL LacZ/pr Ren: Número de Depósito CECT 5846**

**IP HIV NL LacZ/rt Ren: Número de Depósito CECT 5845**

25 **IP HIV NL LacZ/pol Ren: Número de Depósito CECT 5847**

**IP HIV NL LacZ/gag-pr Ren: Número de Depósito CECT 5848**

**IP HIV NL LacZ/env Ren: Número de Depósito CECT 5844**

30 **IP HIV JRRen: Número de Depósito CECT 5843**

2.- *Evaluación de los clones virales de la invención en diferentes sistemas de determinación analítica*

2.1.- *Sistema de determinación de resistencias fenotípicas a fármacos antirretrovirales*

35

Los clones ensayados han sido los siguientes:

**IP HIV NL Ren,**

40 **IP HIV NL LacZ/pol Ren,**

**IP HIV NL LacZ/pr Ren,**

**IP HIV NL LacZ/rt Ren,**

45

**IP HIV NL LacZ/ gag-pr Ren y**

**IP HIV NL LacZ/env Ren.**

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

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

60 La figura 2b es una representación gráfica ilustrativa de un estudio de la determinación de la resistencia de AZT en un virus Widl type (línea continua) y en virus con las mutaciones M41L,K70R,T215F,K219Q (línea discontinua):Fold=36.

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

- 65
- a. Posibilidad de analizar separadamente la resistencia a inhibidores de la proteasa y de la transcriptasa inversa. Esto posibilita la evaluación independiente de resistencias a distintos grupos farmacológicos.
  - b. Mayor eficacia en la evaluación de aislados virales con baja capacidad replicativa.



- c. Permite el seguimiento de determinados pacientes en fracaso terapéutico.
- d. Con respecto al sistema patentado por Virologic (Patente US 5.837.464), el sistema de clones virales recombinantes de la presente invención tiene sensibles diferencias, las cuales repercuten en las importantes ventajas citadas anteriormente, a saber:
- Virologic clona el gen luciferasa en la envuelta y el solicitante en Nef.
  - Virologic utiliza enzimas similares pero no idénticos a los que se utilizan aquí.
  - El sistema de la presente invención ha modificado por mutagénesis el esqueleto de NL4.3
  - En la presente invención se pueden utilizar vectores de ciclo múltiple y clonaje separado de la RT y Proteasa y la evaluación de los fragmentos gag-Proteasa y gag-pol aspectos que el sistema de Virologic no permite.

### 2.2.- Sistema de determinación de la capacidad replicativa

En la figura 3 se representa un histograma en el que se demuestra la mejora en la recuperación de un virus con múltiples mutaciones de resistencia en la Proteasa y la RT cuando se realiza el clonaje por separado de ambos fragmentos, que del gen *pol* en bloque. Este efecto es debido al acúmulo de pérdida de fitness viral que puede dar virus con escasa capacidad replicativa difícil de detectar en ensayos de ciclo único cuando se suman las pérdidas de fit debido a mutaciones en la Transcriptasa Inversa y la Proteasa.

Los clones virales sometidos a evaluación han sido los siguientes:

**IP HIV NL LacZ/pol Ren,**

**IP HIV NL LacZ/pr Ren,**

**IP HIV NL LacZ/rt Ren, y**

**IP HIV NL LacZ/gag-pr Ren,**

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

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

### 2.3.- Sistema de determinación del tropismo viral, resistencias fenotípicas a inhibidores de la fusión

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

#### (A) Descripción general de la técnica

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

- El ARN viral es retrotranscrito y posteriormente amplificado utilizando cebadores mediante la reacción en cadena de la polimerasa. Los cebadores incluyen sitios de restricción específicos para el posterior clonaje en el virus de referencia e incluyen toda la envuelta del virus.

## ES 2 244 332 A1

- Tras la digestión enzimática del amplificado y del virus de referencia se realiza un proceso de ligación *in vitro* utilizando la T4 ligasa.
- La población de virus recombinantes generados se transfecta en la línea celular 293-T y actúa como célula productora de virus recombinantes.
- La progenie infecciosa de virus recombinantes se recoge a las 48 horas de la transfección y se utiliza para infectar la línea celular diana SSPA-B7 que expresa CCR5 y CXCR4 (Figura 4).

### (B) Virus

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

**IP HIV NL Ren,**

**IP HIV JRRen y**

**IP HIV NL LacZ/env Ren.**

### (C) Células

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

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

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

## 2.4.- Sistema de detección y titulación de anticuerpos neutralizantes

### (A) Descripción general de la técnica

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

### (B) Virus

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

**IP HIV NL Ren,**

**IP HIV JRRen y**

**IP HIV NL LacZ/env Ren**

### (C) Células

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

*(D) Resultados*

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

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

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

- a. El sistema es muy sensible al utilizar la actividad renilla.
- b. El sistema mide directamente actividad antiviral, no como el test de MTT que mide protección frente al efecto citopático, una medida indirecta de la replicación viral.
- c. Tiene la posibilidad de clonar la envuelta completa de diferentes VIH o incluso la del propio paciente (“test de neutralización autóloga”).
- d. La utilización de sistemas virales en los que puede detectarse replicación con un número limitado de ciclos permite que, cuando existe escape viral, no se igualen las curvas de neutralización en múltiples ciclos del virus.
- e. La disponibilidad de una célula propia que expresa los receptores CCR5 y CXCR4.
- f. El interés renovado en el estudio de anticuerpos neutralizantes en el contexto de nuevos modelos de vacunas y su utilización como marcador surrogado que aumentará la demanda de estos tests en un futuro inmediato.
- g. El sistema es robotizable.

*2.5.- Sistema de cribado de compuestos y productos con potencial actividad frente al VIH**(A) Descripción general de la técnica*

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

*(B) Virus*

Se parte del vector proviral NL4.3 (Adachi *et al.* 1986). Estos clones han sido modificados genéticamente en el laboratorio produciendo clones virales de ciclo múltiple con la envuelta del VIH.

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

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

**IP HIV NL Ren.***(C) Resultados*

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

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

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

## ES 2 244 332 A1

- b. El sistema es muy sensible al utilizar la actividad renilla.
- c. El sistema mide directamente actividad antiviral, no como el test de MTT que mide protección frente al efecto citopático, una medida indirecta de la replicación viral.
- d. El sistema es robotizable y aplicable a cribado masivo.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Clones virales recombinantes basados en VIH, **caracterizados** porque poseen la siguiente estructura general:

5

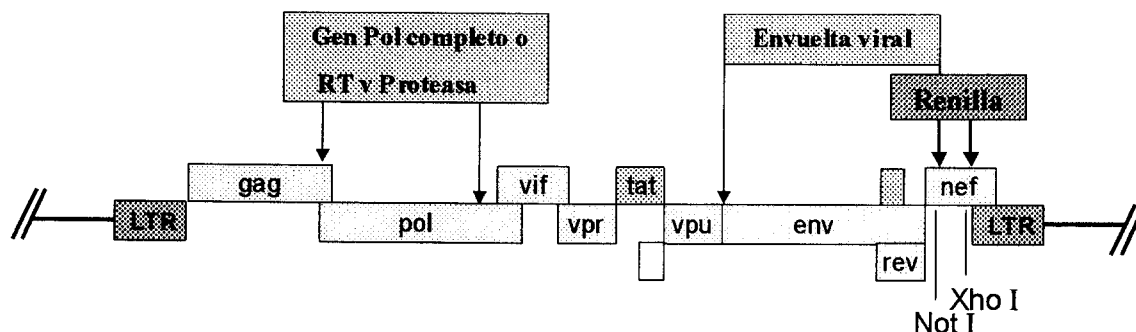
10

15

20

25

30



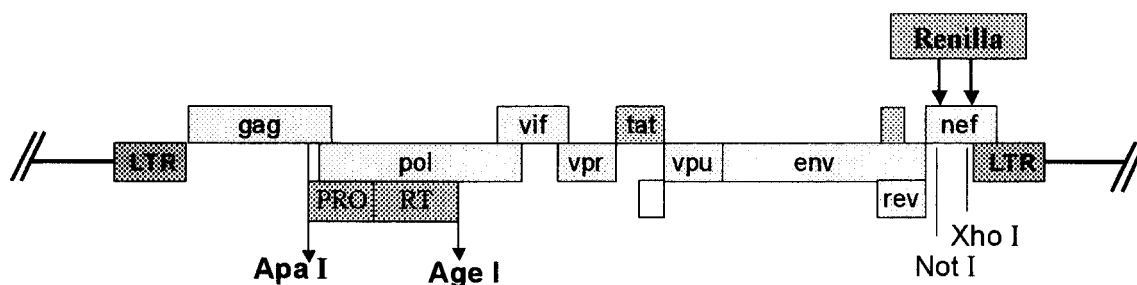
(I) donde LTR son regiones con secuencia redundante (R) que juega un papel primordial durante el proceso de retrotranscripción; gag es el gen que codifica para la proteína p55 de la cápsida formada por 3 subunidades proteicas (MA, CA y NC); pol es el gen que codifica las enzimas virales necesarias para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

2. Clon viral recombinante según la reivindicación 1, **caracterizado** porque dicho clon es el clon IP HIV NL Ren, depositado en la Colección Española de Cultivos Tipo como CECT 5842 y que tiene la siguiente estructura general:

35

40

45



donde Apa I y Age I representan sitios únicos de restricción en la secuencia de ADN y los restantes símbolos tienen el significado dado anteriormente para la Estructura general I.

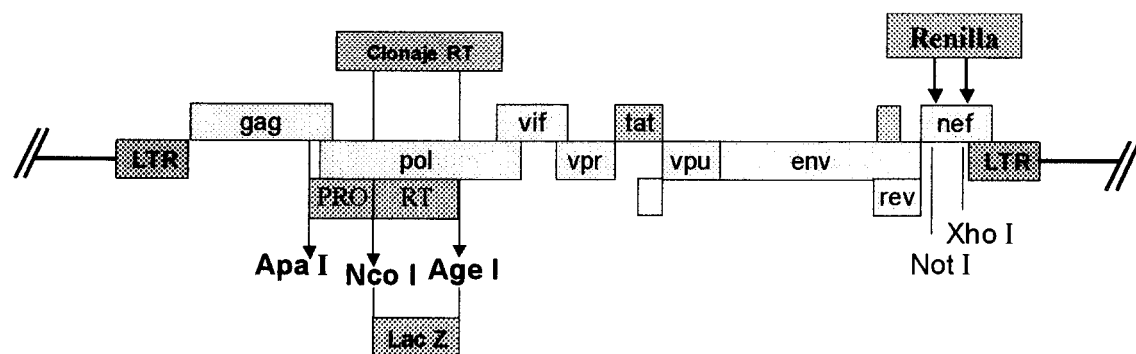
50

3. Clon viral recombinante según la reivindicación 1, **caracterizado** porque dicho clon es el clon IP HIV NL LacZ/rt Ren, depositado en la Colección Española de Cultivos Tipo como CECT 5845 y que tiene la siguiente estructura general:

55

60

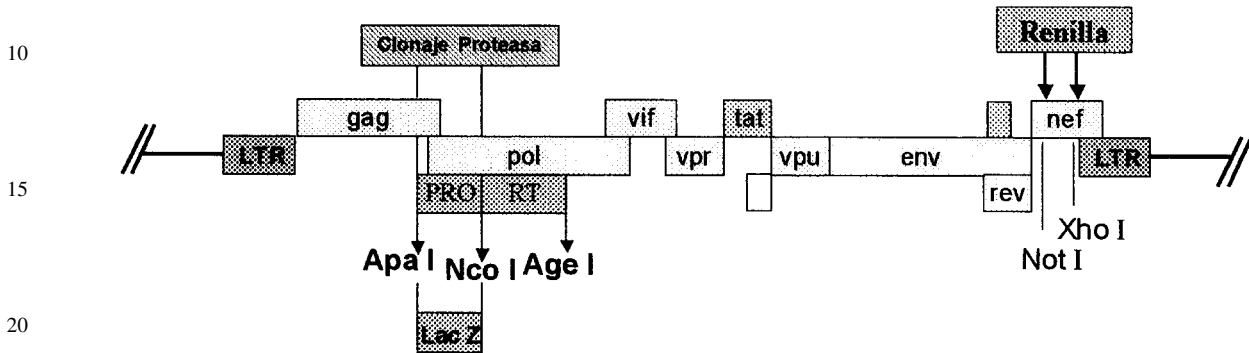
65



ES 2 244 332 A1

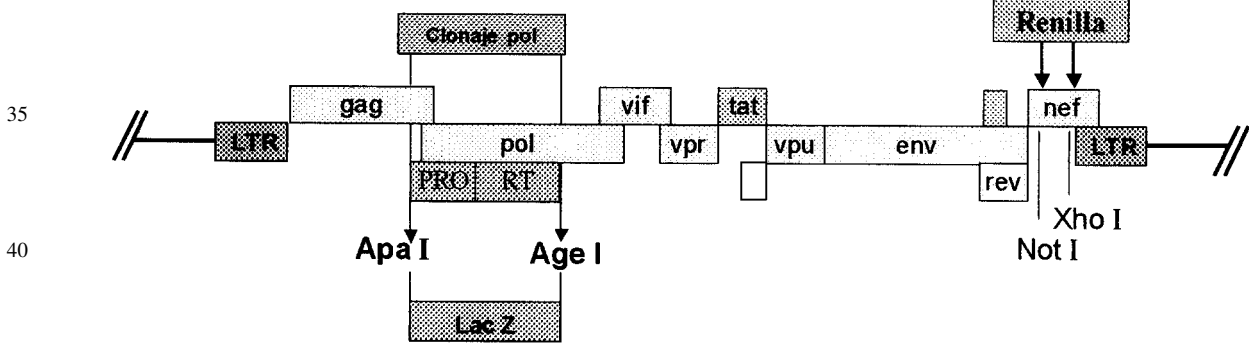
donde LacZ indica la posición de clonaje del gen LacZ sustituyendo un fragmento del gen pol, y los restantes símbolos tienen los significados definidos en las reivindicaciones precedentes.

4. Clon viral recombinante según la reivindicación 1, **caracterizado** porque dicho clon es el clon IP HIV NL LacZ/pr Ren, depositado en la Colección Española de Cultivos Tipo como CECT 5846 y que tiene la siguiente estructura general:



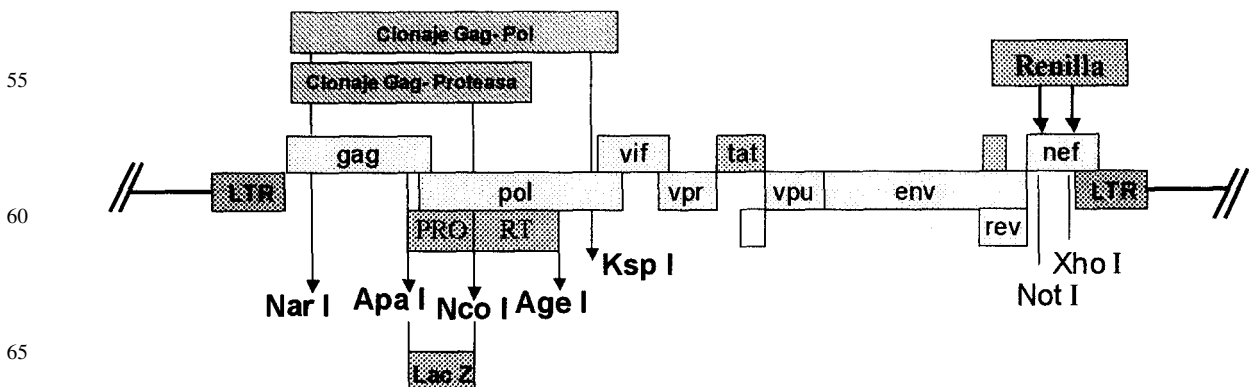
donde NcoI indica un sitio único de restricción en la secuencia de ADN, y los restantes símbolos tienen el significado dado en las reivindicaciones precedentes.

5. Clon viral recombinante según la reivindicación 1, **caracterizado** porque dicho clon es el clon IP HIV NL LacZ/pol Ren, depositado en la Colección Española de Cultivos Tipo como CECT 5847 y que tiene la siguiente estructura general:



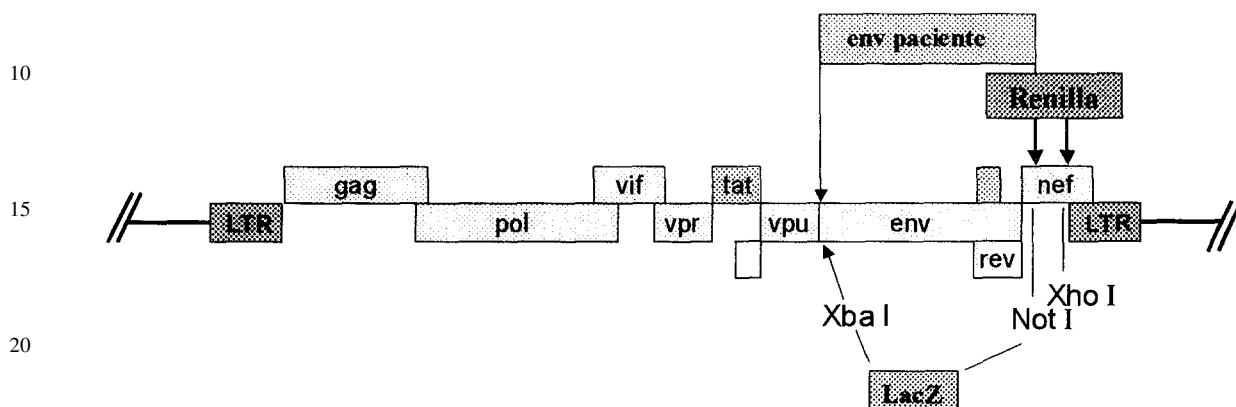
donde los diferentes símbolos tienen el significado dado en las reivindicaciones precedentes.

6. Clon viral recombinante según la reivindicación 1, **caracterizado** porque dicho clon es el clon IP HIV NL LacZ/gag-pr Ren, depositado en la Colección Española de Cultivos Tipo como CECT 5848 y que tiene la siguiente estructura general:



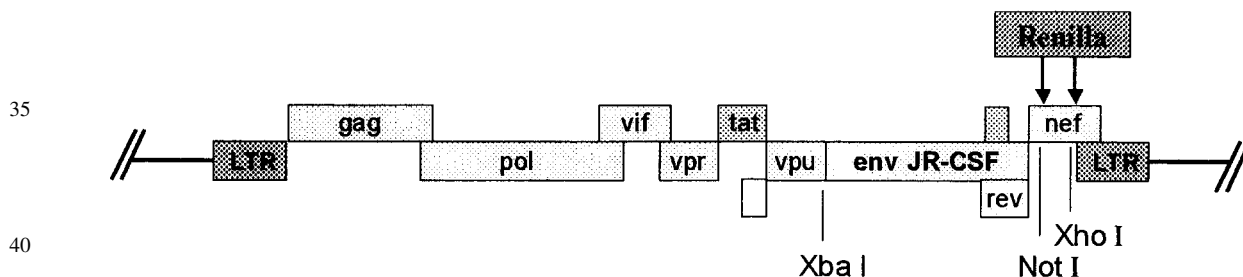
donde *NarI* y *KspI* indican sitios únicos de restricción en la secuencia de ADN y los restantes símbolos tienen el significado dado en las reivindicaciones precedentes.

7. Clon viral recombinante según la reivindicación 1, **caracterizado** porque dicho clon es el clon IP HIV NL LacZ/env Ren, depositado en la Colección Española de Cultivos Tipo como CECT 5844 y que tiene la siguiente estructura general:



donde *XbaI* indica un sitio único de restricción en la secuencia de ADN, “env paciente”, indica la posición de clonaje del gen del paciente, y los demás símbolos tienen el significado dado en las reivindicaciones precedentes.

8. Clon viral recombinante según la reivindicación 1, **caracterizado** porque dicho clon es el clon IP HIV JR Ren, depositado en la Colección Española de Cultivos Tipo como CECT 5843 y que tiene la siguiente estructura general:



donde *XbaI* indica un sitio único de restricción en la secuencia de ADN; “env JR-CSF” indica la posición de clonaje del gen env del clon JR-CSF en lugar de la envuelta de NL4.3,

y los restantes símbolos tienen el significado dado en las reivindicaciones precedentes.

9. Uso de clones virales recombinantes basados en VIH, según la reivindicación 1, en métodos analíticos para la determinación de resistencias fenotípicas a fármacos antirretrovirales para el tratamiento de la infección por VIH.

10. Uso de clones virales recombinantes basados en VIH conforme a la reivindicación 1, en métodos analíticos para la determinación de la capacidad replicativa de virus recombinantes que portan secuencias *gag*, *pol* y/o *env* de pacientes con infección por VIH.

11. Uso de clones virales recombinantes basados en VIH conforme a la reivindicación 1, en métodos analíticos para la caracterización del tropismo viral en la infección por VIH.

12. Uso de clones virales recombinantes basados en VIH conforme a la reivindicación 1, en métodos analíticos para la detección de anticuerpos neutralizantes frente al VIH en suero de pacientes seropositivos para VIH sometidos o no a vacunación.

13. Uso de clones virales recombinantes basados en VIH conforme a la reivindicación 1, en métodos analíticos para el estudio del cribado y caracterización de la actividad antiviral de nuevos compuestos frente a VIH.

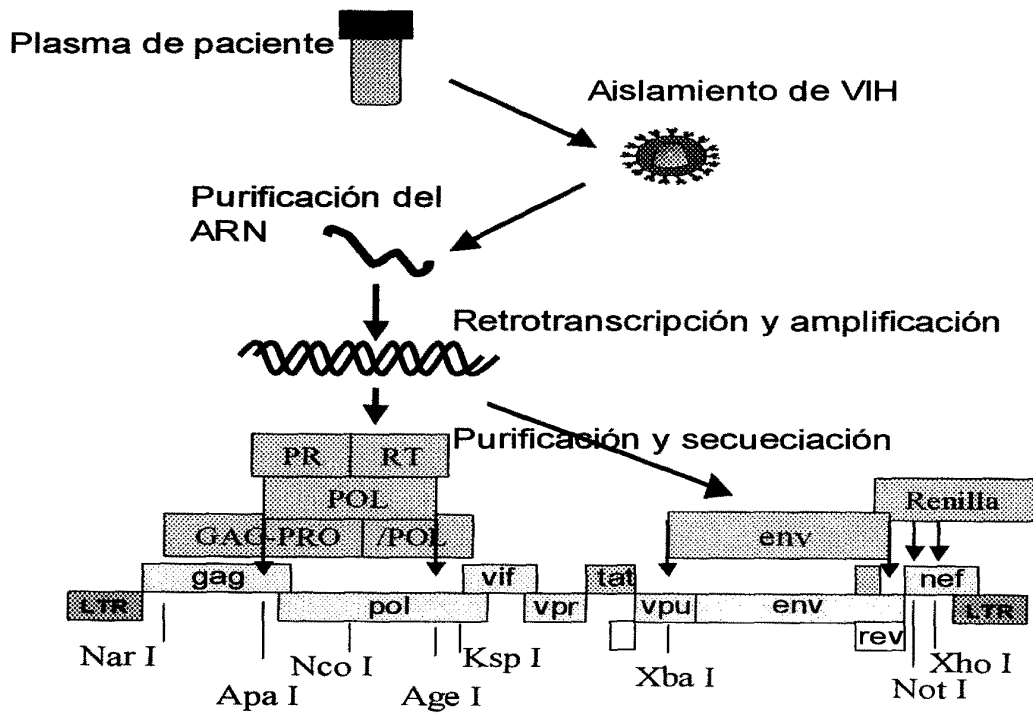


Figura 1a

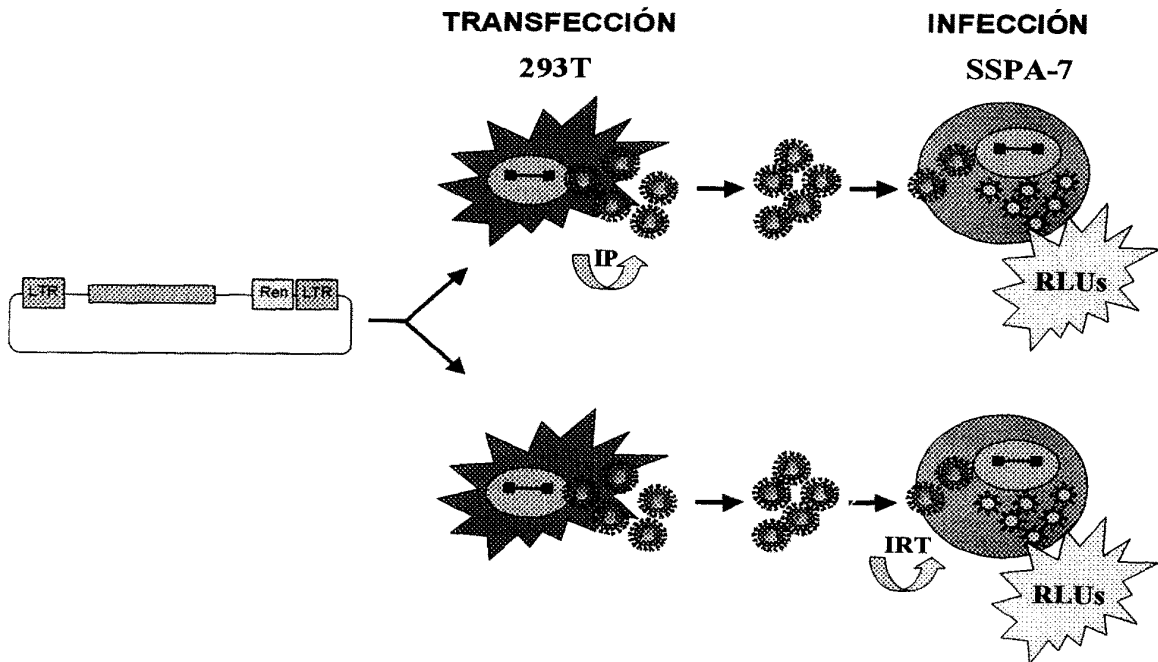


Figura 1b



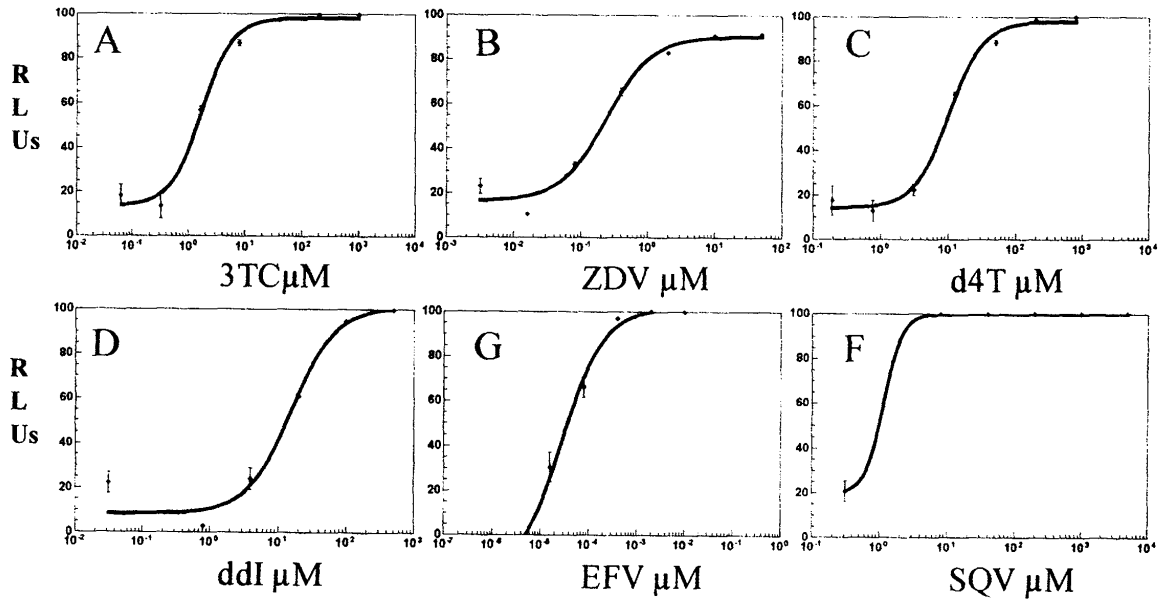


Figura 2a

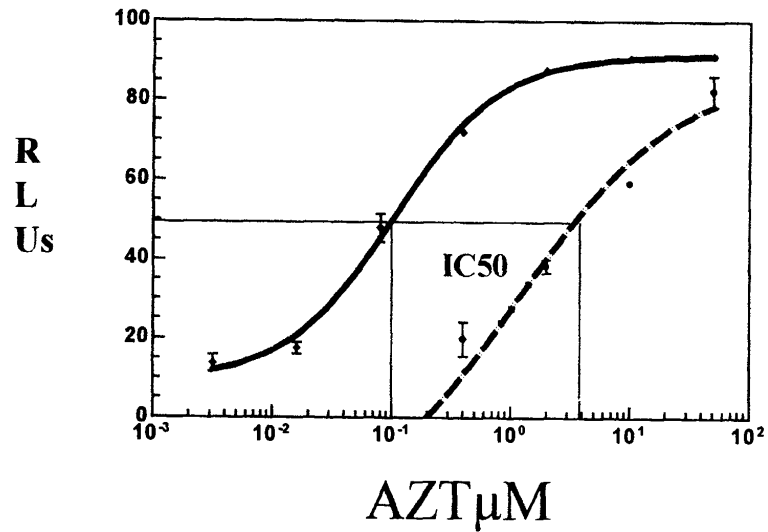


Figura 2b

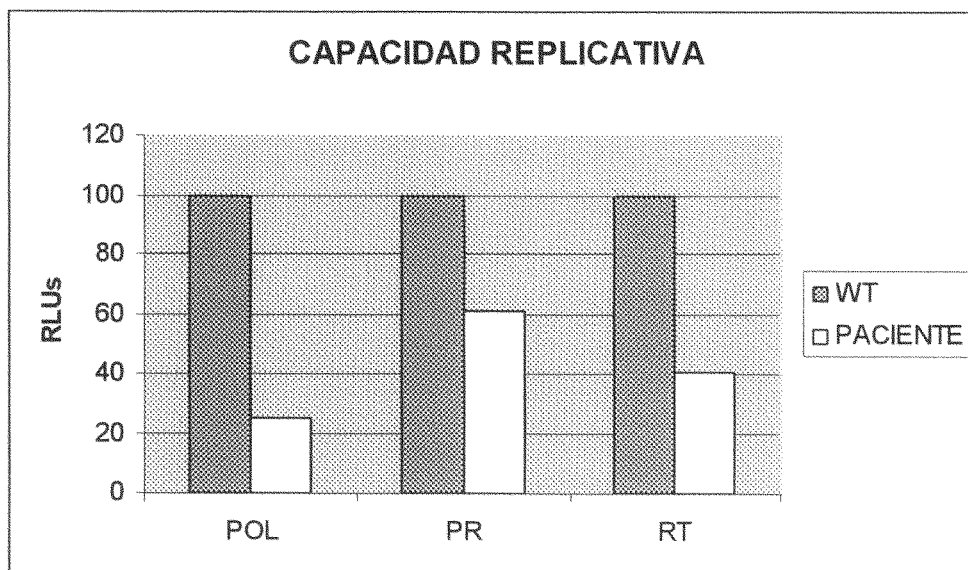


Figura 3

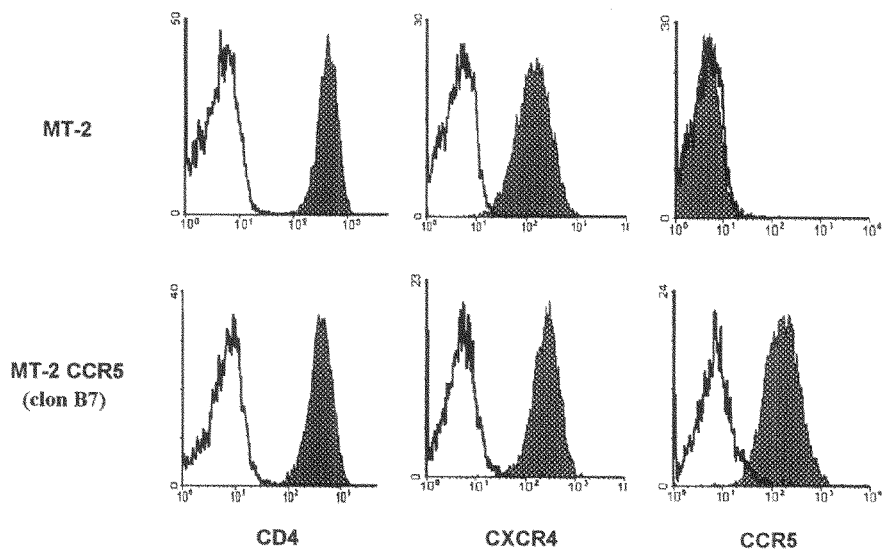


Figura 4

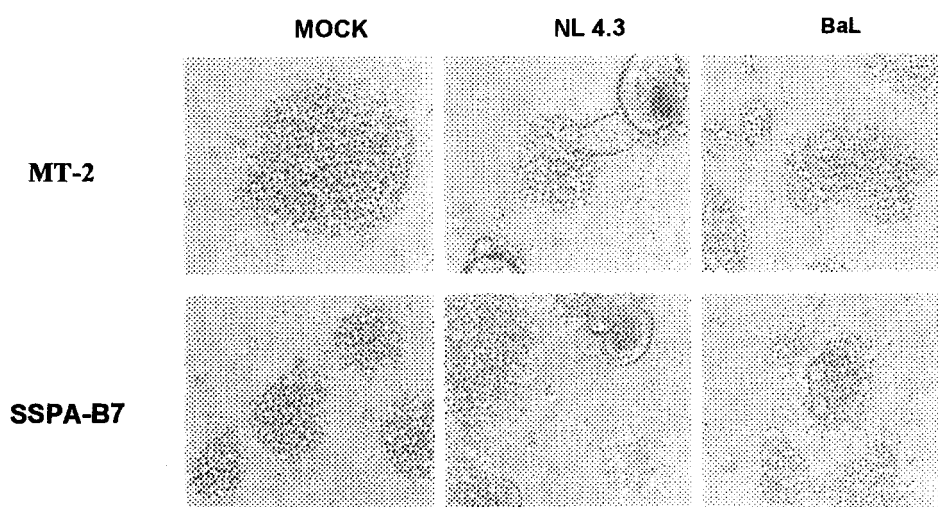


Figura 5

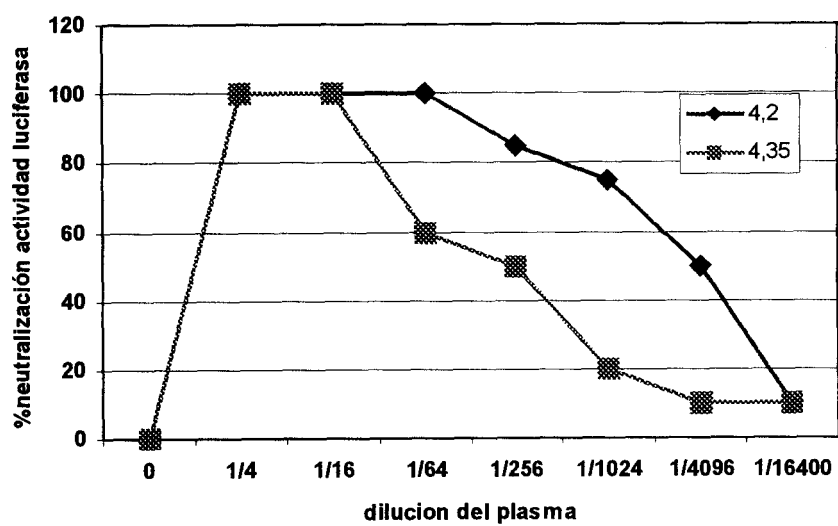


Figura 6

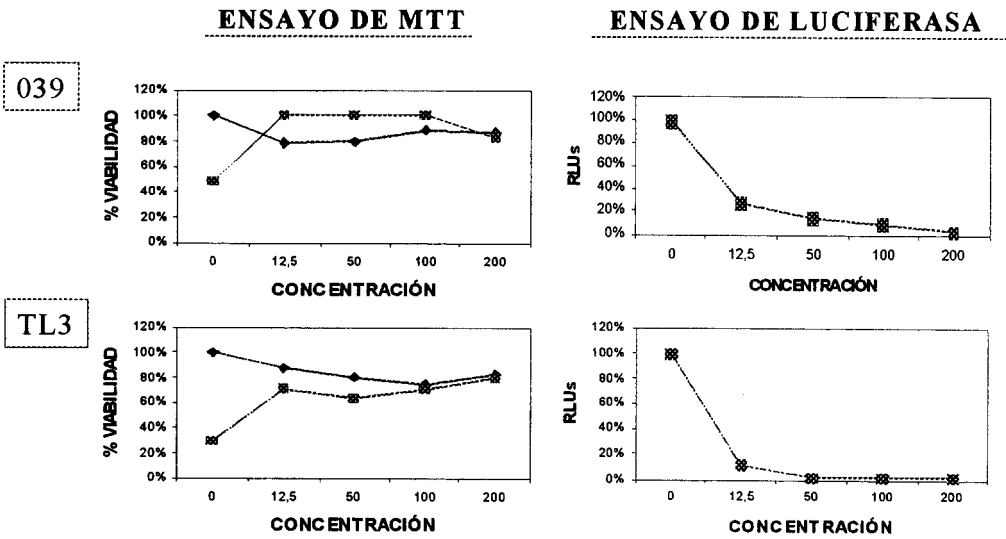


Figura 7



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 244 332

② Nº de solicitud: 200401116

③ Fecha de presentación de la solicitud: 10.05.2004

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.7: C12N 15/867, C12Q 1/70

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	US 2003013078 A1 (BLAIR, W. & SPICER, T. P.) 16.01.2003, todo el documento.	1,8,11,13
Y		2,9,10
Y	PETROPOULOS, C.J.; PARKIN, N.T.; LIMOLI, K.L. et al. A novel phenotypic drug susceptibility assay for human immunodeficiency virus type 1. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Abril 2000, Vol. 44, Nº 4, páginas 920-928. ISSN 0066-4804.	2,9,10
A		5,13
A	MARTÍNEZ-PICADO, J.; SUTTON, L.; DE PASCUALE, M.P. et al. Human immunodeficiency virus type 1 cloning vectors for antiretroviral resistance testing. Journal of Clinical Microbiology. Septiembre 1999, Vol. 37, Nº 9, páginas 2943-2951. ISSN 0095-1137.	2-6,9,10, 13
A	WO 2001079542 A2 (GLAXO GROUP LIMITED) 25.10.2001, todo el documento	2-13
A	DITTMAR, M.T.; EICHLER, S.; REINBERGER, S. et al. A recombinant virus assay using full-length envelope sequences to detect changes in HIV-1 co-receptor usage. Virus Genes. 2001, Vol. 23, Nº 3, páginas 281-290.	7-13

**Categoría de los documentos citados**

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

**El presente informe ha sido realizado**

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

**Fecha de realización del informe**  
28.10.2005

**Examinador**  
E. Relaño Reyes

**Página**  
1/1