



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 325 042**

(51) Int. Cl.:

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

C12Q 1/70 (2006.01)

G01N 33/555 (2006.01)

G01N 33/567 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **96921473 .3**

(96) Fecha de presentación : **07.06.1996**

(97) Número de publicación de la solicitud: **0847452**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **17.06.1998**

(54) Título: **Anticuerpo monoclonal para inhibir la fusión de membrana mediada por glicoproteína de la envoltura de VIH-1.**

(30) Prioridad: **07.06.1995 US 475515**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
24.08.2009

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
24.08.2009

(73) Titular/es: **PROGENICS PHARMACEUTICALS, Inc.**
Old Saw Mill River Road
Tarrytown, New York 10591, US

(72) Inventor/es: **Allaway, Graham, P.;**
Litwin, Virginia, M. y
Maddon, Paul, J.

(74) Agente: **Arias Sanz, Juan**

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

Anticuerpo monoclonal para inhibir la fusión de membrana mediada por glicoproteína de la envoltura de VIH-1.

5 Antecedentes de la invención

VIH infecta principalmente linfocitos T cooperadores y monocitos/macrófagos - células que expresan CD4 de superficie- produciendo una pérdida gradual de la función inmune que resulta en el desarrollo del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) humano. La fase inicial del ciclo replicativo del VIH implica la interacción de alta afinidad entre la glicoproteína de la envoltura exterior del VIH gp120 y el receptor celular CD4 (Klatzmann, D.R., *et al.*, Immunodef. Rev. 2, 43-66 (1990)). Tras la unión de VIH a la superficie celular, las membranas vírica y diana se fusionan, dando como resultado la introducción del genoma vírico en el citoplasma. Varias líneas de evidencia demuestran el requerimiento de esta interacción para la infectividad vírica. *In vitro*, la introducción de un ADNc funcional que codifica CD4 en células humanas que normalmente no expresan CD4 es suficiente para hacer susceptibles a la infección por VIH estas células de otra manera resistentes (Maddon, P.J., *et al.*, Cell 47, 333-348 (1986)).

La caracterización de la interacción entre gp120 de VIH y CD4 se ha facilitado por el aislamiento de clones de ADNc que codifican ambas moléculas (Maddon, P.J., *et al.*, Cell 42, 93-104 (1985), Wain-Hobson, S., *et al.*, Cell 40, 9-17 (1985)). CD4 es una glicoproteína de superficie celular no polimórfica, de linaje restringido que es un miembro de la superfamilia de genes de inmunoglobulinas. Se ha descrito la expresión a nivel alto de versiones tanto completas como truncadas, solubles de CD4 (sCD4) en sistemas estables de expresión. La disponibilidad de grandes cantidades de sCD4 purificada ha permitido un entendimiento detallado de la estructura de esta glicoproteína compleja. CD4 madura tiene un peso molecular relativo de 55.000 y consiste en un dominio extracelular amino terminal de 372 aminoácidos que contiene cuatro regiones en tándem similares a inmunoglobulina designadas V1-V4, seguido por un dominio transmembrana de 23 aminoácidos y un segmento citoplásmico de 38 aminoácidos. Experimentos usando proteínas sCD4 truncadas demuestran que los determinantes de la unión de alta afinidad a gp120 de VIH están en el dominio amino terminal similar a inmunoglobulina V1 (Arthos, J., *et al.*, Cell 57, 469-481 (1989)). El análisis mutacional de V1 ha definido un sitio de unión discreto a gp120 (residuos 38-52 de la proteína CD4 madura) que comprende una región estructuralmente homóloga a la segunda región determinante de complementariedad (CDR2) de las inmunoglobulinas (Arthos, J., *et al.*, Cell 57, 469-481 (1989)).

El gen de la envoltura de VIH env codifica un precursor de la proteína de la envoltura, gp160, que es cortado por las proteasas celulares antes del transporte a la membrana plasmática para dar gp120 y gp41. La proteína que atraviesa la membrana, gp41, está asociada de forma no covalente con gp120, una proteína puramente extracelular. La molécula de gp120 madura está muy glicosilada (aproximadamente 24 oligosacáridos N-unidos), contiene aproximadamente 480 residuos de aminoácidos con 9 puentes disulfuro dentro de la cadena (Leonard, C.K., *et al.*, J. Biol. Chem. 265, 10373-10382 (1990)), y se proyecta desde la membrana vírica como una molécula dimerica o multimérica (Earl, P.L., *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87, 648-652 (1990)).

Los estudios mutacionales de gp120 de VIH-1 han delineado regiones funcionales importantes de esta molécula. Las regiones de gp120 que interaccionan con gp41 mapean principalmente en los extremos N y C (Helseth, E., *et al.*, J. Virol. 65, 2119-2123 (1991)). El epítipo neutralizante predominante específico de cepa en gp120 está localizado en los residuos de aminoácidos 32-34 del tercer lazo variable, denominado aquí como lazo V3, que se sitúa cerca del centro de la secuencia de gp120 (Bolognesi, D.P. TIBTech 8, 40-45 (1990)). El sitio de unión a CD4 mapea en regiones discontinuas de gp120 que incluyen residuos de aminoácidos muy conservados o invariables en los dominios conservados segundo, tercero y cuarto (los dominios C2, C3 y C4) de gp120 (Olshevsky, U., *et al.* J. Virol. 64, 5701-5707 (1990)). Se ha postulado que el pequeño bolsillo formado por estos residuos conservados en gp120 podría acomodar el lazo CDR2 de CD4, una región definida mediante análisis mutacionales como importante en la interacción con gp120 (Arthos, J., *et al.*, Cell 57, 469-481 (1989)).

Después de la unión de gp120 de VIH-1 a CD4 de la superficie celular, las membranas vírica y diana se fusionan, resultando en la introducción de la cápside vírica en el citoplasma de la célula diana (Maddon, P.J. *et al.*, Cell 54:865 (1988)). La mayor parte de las evidencias hasta la fecha indican que la fusión de VIH-1 es independiente de pH y sucede en la superficie celular. La proteína de fusión de VIH-1 es gp41, el componente transmembrana de la glicoproteína de la envoltura. Esta proteína tiene un péptido de fusión hidrofóbico en el extremo amino y mutaciones en este péptido inhiben la fusión (Kowalski, M. *et al.*, Science 237:1351 (1987)). Además de gp41, observaciones recientes sugieren que gp120 desempeña un papel en la fusión de membranas diferente de su función en la unión. Por ejemplo, anticuerpos contra el epítipo principal neutralizante en gp120, el lazo V3, pueden bloquear la infección sin inhibir la unión (Skinner, M.A. *et al.*, J. Virol. 62:4195 (1988)). Además, mutaciones en la punta de este lazo reducen o previenen la formación de sincios en células HeLa-CD4 que expresan las moléculas gp120/gp41 mutadas (Freed, E.O. *et al.*, J. Virol. 65:190 (1991)).

Varias líneas de evidencia han implicado moléculas además de CD4 y gp120/gp41 en la fusión de membranas inducida por VIH-1. Por ejemplo, estudios recientes han indicado que las células humanas pueden contener una molécula accesoria, no presente en células que no son de primates, que se requiere para la fusión por VIH-1 (Dragic, T. *et al.*, J. Virol. 66:4794 (1992)). La naturaleza de esta molécula o moléculas accesorias es desconocida. Aunque algunos estudios han postulado que podría ser una proteasa de la superficie celular (Hattori, T. *et al.*, Febs. Lett. 248:48 (1989)), esto aún se tiene que confirmar.

La fusión del virión VIH-1 con la membrana plasmática de la célula huésped se mimetiza de muchas maneras mediante la fusión de células infectadas por VIH-1 que expresan gp120/gp41 con células no infectadas que expresan CD4. Tal fusión célula-con-célula produce la formación de células gigantes multinucleadas o sincicios, un fenómeno observado con muchos virus que se fusionan en la superficie celular. Gran parte del entendimiento actual de la fusión de membrana inducida por VIH-1 deriva de estudios de la formación de sincicios. Por ejemplo, este planteamiento se usó para demostrar que la expresión de gp120/gp41 de VIH-1 en una membrana, en ausencia de cualquier otra proteína vírica, es necesaria y suficiente para inducir fusión con una membrana CD4⁺ (Lifson, J.D. *et al.*, Nature 323:725 (1986)).

Comparada con la fusión de viriones con células, la formación de sincicios inducida por VIH-1 parece implicar un paso adicional. Primero, la membrana que tiene gp120/gp41 se fusiona con la membrana que tiene CD4. Este es un proceso rápido y reversible que une las membranas en sitios localizados y permite que colorantes unidos a la membrana fluyan de una célula a la otra (Dimitrov, D. *et al.*, AIDS Res. Human Retroviruses 7:799 (1991)). Este paso es presumiblemente paralelo a la unión de un virión a una célula CD4⁺ y la fusión entre ellas. La segunda fase en la fusión de células es la fusión irreversible de células para formar sincicios. La eficacia de este proceso aumenta por la interacción de moléculas de adhesión celular tal como ICAM-1 y LFA-1, aunque estas moléculas no sean absolutamente requeridas para que la formación de sincicios proceda (Golding, H. *et al.*, AIDS Res. Human Retroviruses 8:1593 (1992)).

La mayoría de los estudios de fusión de VIH-1, incluyendo los discutidos anteriormente, se han realizado con cepas de VIH-1 que se han propagado extensamente en líneas de células T humanas transformadas. Estas cepas, conocidas como cepas adaptadas al laboratorio, se diferencian en varias características importantes de aislados primarios o clínicos de los virus obtenidos de individuos infectados con VIH-1 (O'Brien, W.A. *et al.*, Nature 348:69 (1990)). Algunos ejemplos de estas diferencias se enumeran en la tabla a siguiente.

Cepas adaptadas a laboratorio	Aislados primarios
Tropismo por líneas de células T transformadas, no infectan monocitos primarios	Muchos tienen tropismo por monocitos primarios y no infectan líneas de células T transformadas
Muy sensibles a la neutralización por CD4 soluble	Relativamente insensibles al neutralización por sCD4
gp120 se disocia de gp41 espontáneamente, y esta separación aumenta por sCD4	poca separación espontánea y sCD4 sólo produce separación a 4°C, no a 37°C

Estas diferencias se reflejan mediante diferencias en la secuencia primaria de las proteínas víricas, y en particular de las glicoproteínas de la envoltura. En algunos casos, los diferentes tropismos de los aislados primarios y cepas adaptadas al laboratorio de VIH-1 se han mapeado a regiones en gp120 tal como el lazo V3 (O'Brien, W.A. *et al.*, Nature 348:69 (1990)). Es posible que diferentes lazos V3 interactúen con diferentes moléculas accesorias en líneas de células T o monocitos, mediando de esta manera el tropismo.

La fusión celular mediada por la envoltura de VIH-1 es un modelo para las fases iniciales de la infección por VIH-1 y se puede usar como un ensayo para moléculas antivirales que bloquean la unión y fusión de VIH-1 (Sodroski, J. *et al.*, Nature 322:470 (1986), Lifson, J.D. *et al.*, Nature 323:725 (1986)). Además, la fusión celular inducida por VIH-1 es importante por derecho propio como un mecanismo potencial para la patogénesis de infecciones por VIH-1. Es un modo de transmisión de VIH-1 de células infectadas a no infectadas (Gupta, P. *et al.*, J. Virol. 63:2361 (1989), Sato, H. *et al.*, Virology 186:712 (1992)) y mediante este mecanismo, podría contribuir a la expansión del VIH-1 a lo largo del cuerpo del individuo infectado. La fusión celular también es un mecanismo directo de muerte celular inducida por VIH-1 (Sodroski, J. *et al.*, Nature 322:470 (1986), Lifson, J.D. *et al.*, Nature 323:725 (1986)). Los sincicios se ven *in vivo*, de forma notable en cerebros de pacientes de SIDA que padecen complicaciones neurológicas tal como complejo de demencia del SIDA (Pumarola-Suné, T. *et al.*, Ann. Neurol. 21:490 (1987)). Además, los sincicios se han observado en los bazo de individuos infectados por VIH-1 (Byrnes, R.K. *et al.*, JAMA 250:1313 (1983)). Es posible que la fusión celular desempeñe un papel en la eliminación de linfocitos T CD4⁺ que es característica del proceso patológico que lleva al SIDA (Haseltine, W.A. en AIDS and the new viruses, Dalgleish, A.G. y Weiss, R.A. eds. (1990)).

En este contexto, puede ser significativo que los aislados de VIH-1 de individuos asintomáticos infectados por VIH-1 con frecuencia infecten células *in vitro* sin inducir sincicios. Por el contrario, los aislados clínicos de pacientes con ARC y SIDA son normalmente cepas muy virulentas, inductoras de sincicios (Tersmette, M. *et al.*, J. Virol. 62:2026 (1988)). Además, con frecuencia hay un cambio de aislados no inductores de sincicios (NSI) a inductores sincicios (SI) en pacientes según progresa la enfermedad y aparecen síntomas (Tersmette, M. *et al.*, J. Virol. 63:2118 (1989), Cheng-Mayer, C. *et al.*, science 240:80 (1988)). No está claro por qué algunas cepas de VIH-1 no inducen sincicios, aunque es posible que las células infectadas con estas cepas no expresen niveles suficientes de gp120/gp41 para que se produzca fusión celular, por analogía con algunos otros virus fusogénicos. Sin embargo, se cree que este cambio de cepas de VIH-1 de NSI a SI tiene influencia en la evolución clínica de la infección por VIH-1. La presencia de anticuerpos naturales anti-sincicios en algunos sujetos puede retrasar el desarrollo de enfermedades relacionadas con VIH-1 en estos sujetos (Brenner, T.J. *et al.*, Lancet 337:1001 (1991)).

El desarrollo de métodos para medir la fusión de membranas mediada por la glicoproteína de la envoltura de VIH-1 tiene un papel útil en la elucidación adicional del mecanismo de infección por VIH-1, y permite la identificación de agentes que alteran la fusión celular mediada por glicoproteínas de la envoltura de VIH-1. Actualmente existen varios métodos potenciales para medir tal fusión.

El primero es un ensayo de fusión celular mediada por glicoproteínas de la envoltura de VIH-1 en el que se mide la fusión de forma microscópica midiendo la transferencia de colorantes fluorescentes entre células (Dimitrov, D.S., *et al.*, AIDS Res. Human Retroviruses 7: 799-805 (1991)). Esta técnica mide la distribución de colorante más que la intensidad de fluorescencia y como tal no se puede realizar usando un fluorímetro. El ensayo no sería fácilmente automatizado y no se ha realizado con células que expresan la glicoproteína de la envoltura de VIH-1 establemente.

El segundo es un ensayo para la fusión celular mediada por glicoproteína de la envoltura de VIH-1 entre (a) células que expresan de forma estable el producto del gen tat de VIH-1 además de gp120/gp41, y (b) células CD4⁺ que contienen una construcción que consiste en el gen de la β -galactosidasa bajo el control del promotor de la LTR de VIH-1. Cuando estas células se fusionan, la β -galactosidasa se expresa y se puede medir usando un sustrato cromogénico apropiado soluble o insoluble (Dragic, T., *et al.*, Journal of Virology 66:4794 (1992)). Este ensayo lleva al menos 1 día para realizarlo y no se puede adaptar fácilmente a nuevas células diana tal como células macrófagos primarios. Este ensayo tampoco mide la fusión celular en tiempo real y de esta manera no es susceptible de usarse en analizar cinética de fusión.

Por último, el tercero es un ensayo de aumento de fluorescencia para la fusión de viriones de VIH-1 a células (Sinangil, F., *et al.*, FEES Letters 239:88-92 (1988)). Este ensayo requiere el uso de viriones VIH-1 purificados, y tanto la purificación de viriones VIH-1 como el ensayo se deben realizar en instalaciones de confinamiento. Sería difícil aislar fácilmente cantidades suficientes de aislados de virus clínicos para realizar el ensayo. Además, este ensayo es más complicado y menos reproducible que un ensayo RET que usa células que expresan de forma estable las glicoproteínas de la envoltura de VIH-1 y CD4.

Los métodos de la invención emplean un ensayo basado en transferencia de energía de resonancia (RET) que salva los problemas inherentes en los métodos identificados anteriormente para medir la fusión de membranas mediada por glicoproteínas de la envoltura de VIH-1. Específicamente, los métodos de la invención emplean un ensayo RET que es rápido, reproducible, cuantitativo, adaptable a varios tipos de células, y relativamente seguro, y se puede automatizar.

La presente descripción divulga un método para determinar si un agente es capaz de inhibir específicamente la fusión de una célula glicoproteína de envoltura de VIH-1⁺ con una célula CD4⁺ apropiada que comprende: (a) poner en contacto una muestra que contiene una cantidad adecuada del agente con una cantidad adecuada de la célula CD4⁺ apropiada y una cantidad adecuada de la célula glicoproteína de envoltura de VIH-1⁺ en condiciones que permitirían la fusión de la célula CD4⁺ con la célula glicoproteína de envoltura de VIH-1⁺ en ausencia del agente, estando marcadas las membranas celulares de la célula CD4⁺ y de la célula glicoproteína de envoltura de VIH-1⁺ con un primer colorante y un segundo colorante, respectivamente, primer y segundo colorantes que permiten la transferencia de energía de resonancia entre ellos sólo cuando se juxtaponen en la misma membrana; (b) determinar el valor del porcentaje de transferencia de energía de resonancia de la muestra resultante después de un periodo de tiempo adecuado; (c) comparar el valor del porcentaje de transferencia de energía de resonancia así determinado con un estándar conocido, de modo que se determine si el agente es capaz de inhibir la fusión la célula CD4⁺ con la célula glicoproteína de envoltura de VIH-1⁺; y (d) determinar si el agente inhibe la fusión de una primera célula control con una segunda célula control en condiciones que permitirían la fusión no mediada por glicoproteína de la envoltura del VIH-1 de las células control primera y segunda en ausencia del agente, de modo que se determine si el agente es capaz de inhibir específicamente la fusión de la célula CD4⁺ con la célula glicoproteína de envoltura de VIH-1⁺.

La presente descripción también divulga un método para determinar si un agente es capaz de inhibir específicamente la infección de una célula CD4⁺ con VIH-1 que comprende determinar si el agente es capaz de inhibir específicamente la fusión de una célula CD4⁺ con una célula glicoproteína de envoltura de VIH-1⁺ mediante el método de la invención, de modo que se determine de esta manera si el agente es capaz de inhibir específicamente la infección de una célula CD4⁺ con VIH-1.

La presente descripción divulga además un método para determinar si un agente es capaz de inhibir la fusión de una célula glicoproteína de envoltura de VIH-1⁺ con una célula CD4⁺ apropiada que comprende: (a) poner en contacto una

muestra que contiene una cantidad adecuada del agente con una cantidad adecuada de la célula CD4⁺ y una cantidad adecuada de la célula glicoproteína de envoltura de VIH-1⁺ en condiciones que permitirían la fusión de la célula CD4⁺ con la célula glicoproteína de envoltura de VIH-1⁺ en ausencia del agente, estando marcadas las membranas celulares de la célula CD4⁺ y la célula glicoproteína de envoltura de VIH-1⁺ con un primer colorante y un segundo colorante, respectivamente, primer y segundo colorantes que permiten la transferencia de energía de resonancia entre ellos sólo cuando se yuxtaponen en la misma membrana; (b) determinar el valor del porcentaje de transferencia de energía de resonancia de la muestra resultante después de un periodo de tiempo adecuado; y (c) comparar el valor del porcentaje de transferencia de energía de resonancia así determinado con un estándar conocido, de modo que se determine si el agente es capaz de inhibir la fusión la célula CD4⁺ con la célula glicoproteína de envoltura de VIH-1⁺.

La presente descripción divulga además un método para determinar cuantitativamente la capacidad de una muestra que contiene anticuerpo de inhibir específicamente la fusión de una célula glicoproteína de envoltura de VIH-1⁺ con una célula CD4⁺ apropiada que comprende: (a) poner en contacto una cantidad predeterminada de la muestra que contiene anticuerpo con una cantidad adecuada de la célula CD4⁺ y una cantidad adecuada de la célula glicoproteína de envoltura de VIH-1⁺ en condiciones que permitirían la fusión de la célula CD4⁺ con la célula glicoproteína de envoltura de VIH-1⁺ en ausencia de la muestra que contiene anticuerpo, estando marcadas las membranas celulares de la célula CD4⁺ y la célula glicoproteína de envoltura de VIH-1⁺ con un primer colorante y un segundo colorante, respectivamente, primer y segundo colorantes que permiten la transferencia de energía de resonancia entre ellos sólo cuando se yuxtaponen en la misma membrana; (b) determinar el valor del porcentaje de transferencia de energía de resonancia de la muestra resultante después de un periodo de tiempo adecuado; (c) comparar el valor del porcentaje de transferencia de energía de resonancia así determinado con un estándar conocido, de modo que se determine cuantitativamente la capacidad de la muestra que contiene anticuerpo de inhibir la fusión de la célula CD4⁺ con la célula glicoproteína de envoltura de VIH-1⁺; y (d) determinar si la muestra que contiene anticuerpo inhibe la fusión de una primera célula control con una segunda célula control en condiciones que permitirían fusión no mediada por glicoproteína de la envoltura del VIH-1 de las células control primera y segunda en ausencia del agente, de modo que se determine cuantitativamente la capacidad de la muestra que contiene anticuerpo de inhibir específicamente la fusión de la célula CD4⁺ con la célula glicoproteína de envoltura de VIH-1⁺.

La presente descripción divulga además un método para determinar cuantitativamente la capacidad de una muestra que contiene anticuerpo de inhibir la fusión de una célula glicoproteína de envoltura de VIH-1⁺ con una célula CD4⁺ apropiada que comprende: (a) poner en contacto una cantidad predeterminada de la muestra que contiene anticuerpo con una cantidad adecuada de la célula CD4⁺ y una cantidad adecuada de la célula glicoproteína de envoltura de VIH-1⁺ en condiciones que permitirían la fusión de la célula CD4⁺ con la célula glicoproteína de envoltura de VIH-1⁺ en ausencia de la muestra que contiene anticuerpo, estando marcadas las membranas celulares de la célula CD4⁺ y la célula glicoproteína de envoltura de VIH-1⁺ con un primer colorante y un segundo colorante, respectivamente, colorantes primero y segundo que permiten la transferencia de energía de resonancia entre ellos sólo cuando se yuxtaponen en la misma membrana; (b) determinar el valor del porcentaje de transferencia de energía de resonancia de la muestra resultante después de un periodo de tiempo adecuado; y (c) comparar el valor del porcentaje de transferencia de energía de resonancia así determinado con un estándar conocido, de modo que se determine cuantitativamente la capacidad de la muestra que comprende anticuerpo de inhibir la fusión la célula CD4⁺ con la célula glicoproteína de envoltura de VIH-1⁺.

La presente descripción divulga además un método para determinar la fase o pronóstico clínico de una infección por VIH-1 en un sujeto infectado con VIH-1 que comprende: (a) obtener una muestra que contiene anticuerpo del sujeto infectado con VIH-1; (b) determinar cuantitativamente la capacidad de la muestra que contiene anticuerpo así obtenida de inhibir la fusión de una célula CD4⁺ con una célula glicoproteína de envoltura de VIH-1⁺ mediante el método de la invención; y (c) comparar la capacidad de la muestra que contiene anticuerpo de inhibir la fusión de la célula CD4⁺ con la célula glicoproteína de envoltura de VIH-1⁺ así determinada con la de una muestra que contiene anticuerpo obtenida de un sujeto infectado con VIH-1 que tiene una infección por VIH-1 en una fase conocida o que tiene un pronóstico clínico conocido, de modo que se determine la fase o el pronóstico clínico de la infección por VIH-1 en el sujeto infectado con VIH-1.

La presente descripción divulga además un método para determinar la eficacia de una vacunación anti-VIH-1 en un sujeto vacunado, no infectado con VIH-1 que comprende: (a) obtener una muestra que contiene anticuerpo del sujeto vacunado no infectado con VIH-1; (b) determinar cuantitativamente la capacidad de la muestra que contiene anticuerpo así obtenida de inhibir la fusión de una célula CD4⁺ con una célula glicoproteína de envoltura de VIH-1⁺ mediante el método de la invención; y (c) comparar la capacidad de la muestra que contiene anticuerpo de inhibir la fusión de la célula CD4⁺ con la célula glicoproteína de envoltura de VIH-1⁺ así determinada con la de una muestra que contiene anticuerpo obtenida de un sujeto vacunado, no infectado con VIH-1 para el que la vacunación anti-VIH-1 tiene una eficacia conocida, de modo que se determine la eficacia de la vacunación anti-VIH-1 en el sujeto vacunado, no infectado con VIH-1.

La presente descripción divulga además un kit para determinar si un agente es capaz de inhibir específicamente la fusión de una célula glicoproteína de envoltura de VIH-1⁺ con una célula CD4⁺ apropiada que comprende, en compartimentos separados: (a) una cantidad adecuada de una célula CD4⁺ cuya membrana celular está marcada con un primer colorante; (b) una cantidad adecuada de una célula glicoproteína de envoltura de VIH-1⁺ cuya membrana celular está marcada con un segundo colorante, siendo capaz la célula glicoproteína de envoltura de VIH-1⁺ de fusionarse con la célula CD4⁺ de (a) en condiciones adecuadas en ausencia del agente, y permitiendo los colorantes primero y segun-

do la transferencia de energía de resonancia entre ellos sólo cuando se yuxtaponen en la misma membrana; (c) una cantidad adecuada de una primera célula control cuya membrana celular está marcada con el primer colorante; y (d) una cantidad adecuada de una segunda célula control cuya membrana celular está marcada con el segundo colorante, siendo capaz la segunda célula control de fusión no mediada por glicoproteína de envoltura de VIH-1 con la primera célula control de (c) en condiciones adecuadas en ausencia del agente.

La presente descripción divulga además un kit para determinar si un agente es capaz de inhibir la fusión de una célula CD4⁺ con una célula glicoproteína de envoltura de VIH-1⁺ que comprende, en compartimentos separados: (a) una cantidad adecuada de una célula CD4⁺ cuya membrana celular está marcada con un primer colorante; y (b) una cantidad adecuada de una célula glicoproteína de envoltura de VIH-1⁺ cuya membrana celular está marcada con un segundo colorante, siendo capaz la célula glicoproteína de envoltura de VIH-1⁺ de fusionarse con la célula CD4⁺ de (a) en condiciones adecuadas en ausencia del agente, y permitiendo los colorantes primero y segundo la transferencia de energía de resonancia entre ellos sólo cuando se yuxtaponen en la misma membrana.

La presente descripción divulga además un método para determinar si un aislado de VIH-1 es inductor de sincicios que comprende: (a) obtener una muestra de una célula glicoproteína de envoltura de aislado de VIH-1⁺ cuya membrana celular está marcada con un primer colorante; (b) poner en contacto una cantidad adecuada de la muestra con una cantidad adecuada de una célula CD4⁺ en condiciones que permitirían la fusión de la célula CD4⁺ con una célula glicoproteína de envoltura de cepa inductora de sincicios de VIH-1⁺, estando marcada la membrana celular de la célula CD4⁺ con un segundo colorante que permite la transferencia de energía de resonancia entre el primer y segundo colorante sólo cuando el primer y el segundo colorantes están yuxtapuestos en la misma membrana; (c) determinar el valor del porcentaje de transferencia de energía de resonancia de la muestra resultante después de un periodo de tiempo adecuado; y (d) comparar el valor del porcentaje de transferencia de energía de resonancia así determinado con un estándar conocido, de modo que se determine si el aislado de VIH-1 es inductor de sincicios.

Por último, la presente descripción divulga un método para determinar la fase de una infección por VIH-1 en un sujeto infectado con VIH-1 que comprende determinar mediante el método de la invención si el aislado de VIH-1 con el que está infectado el sujeto infectado con VIH-1 es inductor de sincicios, de modo que se determine de esta manera la fase de la infección por VIH-1 en el sujeto infectado con VIH-1.

Compendio de la invención

La invención proporciona un anticuerpo monoclonal capaz de ser generado contra una línea celular susceptible de infección por aislados de VIH-1 con tropismo por macrófagos, y derivada de la línea de células T linfoblastoides HuT 78, en donde dicho anticuerpo inhibe la fusión de membrana mediada por glicoproteína de la envoltura de VIH-1 entre HeLa-env_{JR-FL} y dicha línea celular, pero no inhibe la fusión de membranas mediada por glicoproteína de la envoltura de VIH-1 entre células HeLa-env_{LAI} y Sup-T1 o entre células HeLa-env_{LAI} y HeLa-CD4⁺.

La invención además proporciona el uso de un anticuerpo monoclonal según la invención para la preparación de un medicamento para el tratamiento de infección por VIH-1.

Breve descripción de las figuras

Figura 1

Evolución temporal de la fusión entre células HeLa-env⁺ y células HeLa-CD4⁺ medida mediante el ensayo RET.

Figura 2

Bloqueo de la fusión entre células HeLa-env⁺ y células HeLa-CD4⁺ por OKT4a, medida usando RET.

Figura 3

Bloqueo de la fusión entre células 160G7 y células C8166 por sCD4, medida usando RET.

Figura 4

Un análisis comparativo de resultados de experimentos de bloqueo mediante dos métodos usando OKT4a para inhibir la fusión de células HeLa-env⁺ y HeLa-CD4⁺.

Figura 5

Análisis de evolución temporal de RET. Se midió la evolución temporal de la fusión entre células HeLa-env_{LAI}⁺ y HeLa-CD4⁺ (recuadros abiertos) o células HeLa-env_{JR-FL}⁺ y PM1 (recuadros cerrados) usando el ensayo RET a varios intervalos después de mezclar las células.

Figura 6

Inhibición de RET usando el anticuerpo monoclonal anti-unión OKT4A. Se midió el % de RET resultante de la fusión de células HeLa-env_{LAI}⁺ y HeLa-CD4⁺ (recuadros abiertos) o células HeLa-env_{JR-FL}⁺ y PM1 (recuadros cerrados) en presencia y ausencia de varias concentraciones de OKT4A. Se calculó el porcentaje de inhibición de RET a cada concentración de OKT4A a partir de esta fórmula:

$$\% \text{ de inhibición de RET} = [(A-B)/(A-C)] * 100.$$

Donde A es el % máximo de RET en ausencia de anticuerpo, B es el % de RET tras la incubación con OKT4A y C es el % de RET de fondo usando células HeLa en lugar de células HeLa-env_{LAI}⁺ o HeLa-env_{JR-FL}⁺.

Descripción detallada de la invención

Se depositó el plásmido designado pMA243 de acuerdo con, y satisfaciendo, los requerimientos del Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos a los Fines de Procedimientos en Materia de Patentes con la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC), 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852 con el No. de acceso de ATCC 75626. El plásmido pMA423 se depositó con la ATCC el 16 de diciembre, 1993.

Esta descripción divulga un método para determinar si un agente es capaz de inhibir la fusión de un aislado primario de VIH-1 con tropismo por macrófagos con una célula CD4⁺ que comprende: (a) poner en contacto (i) una célula CD4⁺ apropiada, que está marcada con un primer colorante, con (ii) una célula que expresa en su superficie la glicoproteína de la envoltura de VIH-1 de un aislado primario de VIH-1 con tropismo por macrófagos, que está marcada con un segundo colorante, en presencia de un exceso del agente en condiciones que permiten la fusión de la célula CD4⁺ con la célula que expresa la glicoproteína de la envoltura de VIH-1 en su superficie en ausencia del agente, estando seleccionados el primer y segundo colorantes de modo que permitan la transferencia de energía de resonancia entre los colorantes; (b) exponer el producto del paso (a) a condiciones que producirían transferencia de energía de resonancia si la fusión ha sucedido; y (c) determinar si hay una reducción en la transferencia de energía de resonancia, cuando se compara con la transferencia de energía de resonancia en ausencia del agente, indicando una disminución en la transferencia que el agente es capaz de inhibir la fusión de VIH-1 con células CD4⁺.

La descripción divulga un método para determinar si un agente es capaz de inhibir específicamente la fusión de una célula glicoproteína de envoltura de VIH-1⁺ con una célula CD4⁺ apropiada que comprende: (a) poner en contacto una muestra que contiene una cantidad adecuada del agente con una cantidad adecuada de la célula CD4⁺ apropiada y una cantidad adecuada de la célula glicoproteína de envoltura de VIH-1⁺ en condiciones que permitirían la fusión de la célula CD4⁺ con la célula glicoproteína de envoltura de VIH-1⁺ en ausencia del agente, estando marcadas las membranas celulares de la célula CD4⁺ y la célula glicoproteína de envoltura de VIH-1⁺ con un primer colorante y un segundo colorante, respectivamente, colorantes primero y segundo que permiten la transferencia de energía de resonancia entre ellos sólo cuando se yuxtaponen en la misma membrana; (b) determinar el valor del porcentaje de transferencia de energía de resonancia de la muestra resultante después de un periodo de tiempo adecuado; (c) comparar el valor del porcentaje de transferencia de energía de resonancia así determinado con un estándar conocido, de modo que se determine si el agente es capaz de inhibir la fusión de la célula CD4⁺ con la célula glicoproteína de envoltura de VIH-1⁺; y (d) determinar si el agente inhibe la fusión de una primera célula control con una segunda célula control en condiciones que permitirían fusión no mediada por glicoproteína de la envoltura del VIH-1 en ausencia del agente, de modo que se determine si el agente es capaz de inhibir específicamente la fusión de la célula CD4⁺ con la célula glicoproteína de envoltura de VIH-1⁺.

Esta descripción proporciona un agente determinado que es capaz de inhibir específicamente la fusión de una célula glicoproteína de envoltura de VIH-1⁺ con una célula CD4⁺ apropiada usando el método descrito anteriormente.

Esta invención proporciona un anticuerpo monoclonal capaz de ser generado contra una línea celular susceptible de infección por aislados de VIH-1 con tropismo por macrófagos, y derivada de la línea de células T linfoblastoides HuT 78 en donde dicho anticuerpo inhibe la fusión de membranas mediada por glicoproteína de la envoltura de VIH-1 entre HeLa-env_{JR-PL} y dicha línea celular pero no inhibe la fusión de membranas mediada por glicoproteína de la envoltura de HIV-1 entre células HeLa-env_{LAI} y Sup-T1 o entre células HeLa-env_{LAI} y HeLa-CD4⁺.

Como se usa aquí, el término "agente" incluye tanto grupos proteicos como no proteicos. En una forma de realización, el agente es una molécula pequeña. En otra forma de realización, el agente es una proteína. La proteína puede ser, a modo de ejemplo, un anticuerpo dirigido contra una parte de una glicoproteína de la envoltura de VIH-1, por ejemplo gp120. El agente puede derivar de una librería de compuestos de bajo peso molecular o una librería de extractos de plantas u otros organismos. En una forma de realización, el agente es conocido. En una forma de realización separada, el agente no es previamente conocido.

Como se usa aquí, "capaz de inhibir específicamente la fusión de una célula glicoproteína de envoltura de VIH-1⁺ con una célula CD4⁺ apropiada" significa (a) capaz de reducir la velocidad de fusión de una membrana de célula CD4⁺ con una membrana de célula glicoproteína de envoltura de VIH-1⁺ en al menos el 5%, pero no capaz de de

- reducir la velocidad de fusión de membrana celular no mediada por CD4/glicoproteína de la envoltura de VIH-1, o (b) capaz de reducir en al menos el 5% la cantidad total de fusión de una membrana celular CD4⁺ con una membrana celular glicoproteína de envoltura de VIH-1⁺ que se produce al final de la fusión, pero no capaz de reducir la cantidad total de fusión de membranas no mediada por CD4/glicoproteína de la envoltura de VIH-1 que sucede al final de la fusión. Como se usa aquí, la velocidad de fusión de membranas celulares significa la cantidad de membranas celulares fusionadas por unidad de tiempo. Como se usa aquí, el “final de la fusión” significa el punto en el tiempo en que se ha producido toda la fusión de membrana celular CD4⁺ con membrana celular glicoproteína de envoltura de VIH-1⁺ capaz de producirse.
- A continuación se proporciona un ejemplo del método de la invención. Se pone en contacto una cantidad conocida de célula glicoproteína de envoltura de VIH-1⁺ con una cantidad conocida de célula CD4⁺ junto con un agente en condiciones que permitirían la fusión de la cantidad Y de membrana celular por unidad de tiempo en ausencia del agente, en donde Y es igual a la suma de la cantidades de membrana celular CD4⁺ y membrana celular glicoproteína de envoltura de VIH-1⁺, por ejemplo, 0,5 x Y membrana celular CD4⁺ + 0,5 x Y membrana celular glicoproteína de envoltura de VIH-1⁺. En presencia del agente, se fusiona 0,2 x Y cantidad de membrana celular por unidad de tiempo. Se muestra que el agente no reduce la velocidad de fusión de membrana celular no mediada por CD4/glicoproteína de la envoltura de VIH-1. Según esto, el agente inhibe específicamente la fusión de una célula CD4⁺ con una célula glicoproteína de envoltura de VIH-1⁺.
- Como se usa aquí, la fusión de membrana celular CD4⁺ y membrana celular glicoproteína de envoltura de VIH-1⁺ significa la unión hidrofóbica e integración de membrana celular CD4⁺ con membrana celular glicoproteína de envoltura de VIH-1⁺ para formar una membrana híbrida que comprende componentes de ambas membranas celulares, y no significa la adhesión mediada por CD4/glicoproteína de la envoltura de VIH-1 entre ellas, adhesión que es un prerequisite para la fusión.
- Como se usa aquí, el término “CD4” incluye (a) proteína CD4 nativa y (b) una proteína basada en CD4 unida a membrana. Como se usa aquí, una proteína basada en CD4 unida a membrana es cualquier proteína unida a membrana, diferente de CD4 nativa, que comprende al menos esa parte de CD4 nativa que se requiere para que CD4 nativa forme un complejo con la glicoproteína de la envoltura de VIH-1 gp120. En una forma de realización, la proteína basada en CD4 comprende una parte de una proteína no CD4. Si la proteína basada en CD4 comprende una parte de una proteína no CD4, entonces la parte de CD4 nativa que se requiere para que CD4 nativa forme un complejo con la glicoproteína de la envoltura de VIH-1 gp120 es la parte de CD4 que tiene la secuencia de aminoácidos desde +1 hasta alrededor de +179.
- Como se usa aquí, la palabra “célula” incluye una célula biológica, por ejemplo, una célula HeLa, y una célula no biológica, por ejemplo, una vesícula lipídica (por ejemplo, una vesícula de fosfolípido) o virión.
- Como se usa aquí, una célula CD4⁺ es una célula que tiene CD4 añadida a la superficie de su membrana celular, en donde la célula CD4⁺ apropiada es capaz de unirse específicamente a y fusionarse con una célula glicoproteína de la envoltura de VIH-1⁺ expuesta allí. En una forma de realización, la célula CD4⁺ adecuada es una célula HeLa CD4⁺. En otra forma de realización, la célula CD4⁺ adecuada es una célula PM1. En una forma de realización adicional, la célula CD4⁺ es un linfocito T primario humano. En una forma de realización aún adicional, la célula CD4⁺ es un macrófago primario humano.
- Como se usa aquí, una célula glicoproteína de la envoltura de VIH-1⁺ es una célula que tiene añadida una glicoproteína de envuelta de VIH-1 a la superficie de su membrana celular de modo que permite a la célula glicoproteína de la envoltura de VIH-1⁺ unirse específicamente a y fusionarse con una célula CD4⁺ apropiada expuesta allí. En una forma de realización, la célula glicoproteína de la envoltura de VIH-1⁺ es una célula HeLa glicoproteína de la envoltura de VIH-1⁺. En otra forma de realización, la célula glicoproteína de la envoltura de VIH-1⁺ es VIH-1.
- Cada aislado de VIH-1 tiene tropismo por un número limitado de tipos de células CD4⁺. Según esto, en la invención, la fusión de una célula CD4⁺ con una célula glicoproteína de la envoltura de VIH-1⁺ significa la fusión de una célula CD4⁺ con una célula glicoproteína de la envoltura de VIH-1⁺, cuya glicoproteína de la envoltura de VIH-1 corresponde a una glicoproteína de envoltura de un aislado de VIH-1 con tropismo por la célula CD4⁺. Por ejemplo, los aislados de VIH-1 JR-FL, JR-CSF y BaL tienen tropismo por macrófagos humanos primarios, los aislados de VIH-1 LAI y IIB tienen tropismo por líneas celulares de linfocitos T CD4⁺ humanos y células HeLa-CD4, y los aislados de VIH-1 MN y SF-2 tienen tropismo por líneas celulares de linfocitos T CD4⁺ humanos. Los aislados de VIH-1 JR-FL, JR-CSF, BaL, LAI, IIB, MN y SF-2 también pueden tener tropismo por tipos de células CD4⁺ diferentes de los enumerados anteriormente.
- Como se usa aquí, una línea celular CD4⁺ apropiada es una línea celular que se fusiona con una línea celular glicoproteína de la envoltura de VIH-1⁺, de modo que la medida del % de RET obtenida es al menos 5 veces mayor que el nivel de fondo obtenido usando una combinación de células que no se fusionan (por ejemplo, células HeLa mezcladas con la línea celular CD4⁺). Además, el % de RET obtenido usando la línea celular CD4⁺ y la línea celular glicoproteína de la envoltura de VIH-1⁺ se debe inhibir a niveles de fondo usando OKT4A 1 ug/ml.
- Las cantidades adecuadas de agente, célula CD4⁺ y célula glicoproteína de la envoltura de VIH-1⁺ se pueden determinar según métodos bien conocidos para los expertos en la materia.

Las condiciones que permitirían la fusión de la célula CD4⁺ apropiada con la célula glicoproteína de la envoltura de VIH-1⁺ en ausencia del agente son bien conocidas para los expertos en la materia.

5 Como se usa aquí, una célula “marcada” con un colorante significa una célula que tiene un colorante integrado en su membrana celular, es decir, una célula que tiene moléculas de colorante entremezcladas con las moléculas lipídicas de su membrana celular.

La transferencia de energía de resonancia se define como sigue: Para colorantes yuxtapuestos D1, que tiene espectros de excitación y emisión Ex1 y Em1, respectivamente, y D2, que tiene espectros de excitación y emisión Ex2 y Em2, respectivamente, en donde (a) Em1 tiene una frecuencia media mayor que la de Em2 y (b) Em1 y Ex2 se solapan, la transferencia de energía de resonancia es la transferencia de energía electromagnética de D1 a D2 a una frecuencia en el solapamiento de Em1 y Ex2, transferencia de energía de resonancia que (a) resulta de la excitación electromagnética de D1 a una frecuencia en el espectro de Ex1 y (b) produce la emisión posterior de energía electromagnética de D2 a una frecuencia en el espectro de Em2. Según esto, se puede detectar la transferencia de energía de resonancia entre D1 y D2 excitando D1 con energía electromagnética a una frecuencia dentro de Ex1 y midiendo la energía electromagnética posteriormente emitida a una frecuencia en Em2, indicando la emisión de energía electromagnética a una frecuencia en Em2 la existencia de transferencia de energía de resonancia entre D1 y D2.

El primer y segundo colorantes están “yuxtapuestos en la misma membrana” si están presentes dentro de la misma membrana lipídica a una distancia adecuadamente corta uno del otro, distancia adecuadamente corta que puede determinar fácilmente el experto en la materia.

En el dicho método, determinar el valor del porcentaje de la transferencia de la energía de resonancia se puede realizar según métodos bien conocidos para los expertos en la materia. En una forma de realización, el valor del porcentaje de transferencia de energía de resonancia se determina mediante: (1) determinación del valor de la transferencia de energía de resonancia (RET) restando de la emisión total de D1 y D2 a una frecuencia en Em2 la emisión de energía electromagnética debido a emisiones directas de D1 y D2 tras la excitación a una frecuencia en Ex1 y emisión a una frecuencia en Em2, emisiones de D1 y D2 que se miden midiendo separadamente la emisión de energía electromagnética debida a células marcadas con cada colorante; y (2) determinación del valor del porcentaje de la transferencia de la energía de resonancia (valor del % de RET) dividiendo el valor de transferencia de energía de resonancia obtenido en el paso (1) por el total de la emisión de D2 a la frecuencia en Em2.

El periodo adecuado de tiempo después del cual se determina el valor del porcentaje de transferencia de energía de resonancia de la muestra resultante se puede determinar según métodos bien conocidos por los expertos en la materia.

El estándar conocido es un valor del porcentaje de transferencia de energía de resonancia obtenido usando la célula CD4⁺, la célula glicoproteína de la envoltura de VIH-1⁺ y un agente que tiene una capacidad conocida para inhibir la fusión de las mismas.

En el dicho método, la primera célula control y la segunda célula control son capaces de fusionarse entre sí a través de fusión no mediada por glicoproteína de la envoltura del VIH-1 tanto en presencia como en ausencia de un agente capaz de inhibir la fusión mediada por glicoproteína de la envoltura del VIH-1, y no son capaces de fusionarse a través de fusión mediada por glicoproteína de la envoltura del VIH-1. Tales células son bien conocidas por los expertos en la materia, e incluyen, a modo de ejemplo, células HeLa que se pueden inducir a fusionarse entre sí mediante incubación a 37°C con polietilenglicol 1000 o con virus Sendai. Estos métodos de inducir fusión de células HeLa son bien conocidos por los expertos en la materia.

En una forma de realización, el agente es un anticuerpo. Como se usa en la invención, el término “anticuerpo” incluye, pero no está limitado a, anticuerpos tanto naturales como no naturales. Específicamente, el término “anticuerpo” incluye anticuerpos policlonales y monoclonales, y fragmentos de unión a antígenos de los mismos. Además, el término “anticuerpo” incluye anticuerpos quiméricos, anticuerpos completamente sintéticos, y fragmentos de unión a antígeno de los mismos.

En una forma de realización, el primer colorante es una molécula que contiene un grupo rodamina y el segundo colorante es una molécula que contiene un grupo fluoresceína. Las moléculas que contienen un grupo rodamina y las moléculas que contienen un grupo fluoresceína son bien conocidas para los expertos en la materia.

En la forma de realización preferida, la molécula que contiene un grupo rodamina es cloruro de octadecil rodamina B y la molécula que contiene un grupo fluoresceína es éster octadecílico de fluoresceína.

En otra forma de realización, el primer colorante es una molécula que contiene un grupo fluoresceína y el segundo colorante es una molécula que contiene un grupo rodamina.

En una forma de realización, la célula CD4⁺ es una célula HeLa CD4⁺. En otra forma de realización de la invención, la célula glicoproteína de la envoltura de VIH-1⁺ es una célula HeLa gp120/gp41 VIH-1_{LAI}⁺. En una forma de realización separada, la célula CD4⁺ es una célula PM1 y la célula glicoproteína de la envoltura de VIH-1⁺ es una célula HeLa gp120/gp41 VIH-1_{JR-FL}⁺. En una forma de realización adicional, la célula CD4⁺ es un linfocito T humano primario. En una forma de realización aún adicional, la célula CD4⁺ es un macrófago humano primario.

La presente descripción también divulga un método para determinar si un agente es capaz de inhibir específicamente la infección de una célula CD4⁺ con VIH-1 que comprende determinar si el agente es capaz de inhibir específicamente la fusión de una célula CD4⁺ con una célula glicoproteína de la envoltura de VIH-1⁺ mediante el método de la invención, de modo que se determine de esta manera si el agente es capaz de inhibir específicamente la infección de una célula CD4⁺ con VIH-1.

La presente descripción divulga además un método para determinar si un agente es capaz de inhibir la fusión de una célula glicoproteína de envoltura de VIH-1⁺ con una célula CD4⁺ apropiada que comprende: (a) poner en contacto una muestra que contiene una cantidad adecuada del agente con una cantidad adecuada de la célula CD4⁺ y una cantidad adecuada de la célula glicoproteína de envoltura de VIH-1⁺ en condiciones que permitirían la fusión de la célula CD4⁺ apropiada con la célula glicoproteína de envoltura de VIH-1⁺ en ausencia del agente, estando marcadas las membranas celulares de la célula CD4⁺ y la célula glicoproteína de envoltura de VIH-1⁺ con un primer colorante y un segundo colorante, respectivamente, colorantes primero y segundo que permiten la transferencia de energía de resonancia entre ellos sólo cuando se yuxtaponen en la misma membrana; (b) determinar el valor del porcentaje de transferencia de energía de resonancia de la muestra resultante después de un periodo de tiempo adecuado; y (c) comparar el valor del porcentaje de transferencia de energía de resonancia así determinado con un estándar conocido, de modo que se determine si el agente es capaz de inhibir la fusión la célula glicoproteína de envoltura de VIH-1⁺ con la CD4.

Como se usa aquí, “capaz de inhibir la fusión de una célula glicoproteína de envoltura de VIH-1⁺ con una célula CD4⁺ apropiada” significa capaz de (a) reducir la velocidad de fusión de membrana celular CD4⁺ con membrana celular glicoproteína de envoltura de VIH-1⁺ en al menos el 5%, o (b) reducir en al menos el 5% la cantidad total de fusión de membrana celular CD4⁺ con membrana celular glicoproteína de envoltura de VIH-1⁺ que sucede al final de la fusión. Un agente capaz de inhibir la fusión de una célula glicoproteína de envoltura de VIH-1⁺ con una célula CD4⁺ apropiada también puede ser capaz de reducir la velocidad de fusión de membranas celulares no mediada por CD4/glicoproteína de la envoltura de VIH-1.

Esta invención proporciona un agente que se ha determinado que es capaz de inhibir la fusión de una célula glicoproteína de envoltura de VIH-1⁺ con una célula CD4⁺ apropiada usando el método anteriormente descrito.

En una forma de realización, el primer colorante es una molécula que contiene un grupo rodamina y el segundo colorante es una molécula que contiene un grupo fluoresceína.

En una forma de realización, la célula CD4⁺ es una célula HeLa CD4⁺. En otra forma de realización de la invención, la célula glicoproteína de la envoltura de VIH-1⁺ es una célula HeLa gp120/gp41 de VIH-1_{LAI}⁺. En una forma de realización separada, la célula CD4⁺ es una célula PM1 y la célula glicoproteína de la envoltura de VIH-1⁺ es una célula HeLa gp120/gp41 de VIH-1_{JR-FL}⁺. En una forma de realización adicional, la célula CD4⁺ es un linfocito T humano primario. En una forma de realización aún adicional, la célula CD4⁺ es un macrófago humano primario.

En la forma de realización preferida, la molécula que contiene un grupo rodamina es cloruro de octadecil rodamina B y la molécula que contiene un grupo fluoresceína es éster octadecílico de fluoresceína.

En otra forma de realización, el primer colorante es una molécula que contiene un grupo fluoresceína y el segundo colorante es una molécula que contiene un grupo rodamina.

La presente descripción divulga además un método para determinar cuantitativamente la capacidad de una muestra que contiene anticuerpo de inhibir específicamente la fusión de una célula glicoproteína de envoltura de VIH-1⁺ con una célula CD4⁺ apropiada que comprende: (a) poner en contacto una cantidad predeterminada de la muestra que contiene anticuerpo con una cantidad adecuada de la célula CD4⁺ apropiada y una cantidad adecuada de la célula glicoproteína de envoltura de VIH-1⁺ en condiciones que permitirían la fusión de la célula CD4⁺ con la célula glicoproteína de envoltura de VIH-1⁺ en ausencia de la muestra que contiene anticuerpo, estando marcadas las membranas celulares de la célula CD4⁺ y la célula glicoproteína de envoltura de VIH-1⁺ con un primer colorante y un segundo colorante, respectivamente, colorantes primero y segundo que permiten la transferencia de energía de resonancia entre ellos sólo cuando se yuxtaponen en la misma membrana; (b) determinar el valor del porcentaje de transferencia de energía de resonancia de la muestra resultante después de un periodo de tiempo adecuado; (c) comparar el valor del porcentaje de transferencia de energía de resonancia así determinado con un estándar conocido, de modo que se determine cuantitativamente la capacidad de la muestra que comprende anticuerpo de inhibir la fusión la célula CD4⁺ con la célula glicoproteína de envoltura de VIH-1⁺; y (d) determinar si la muestra que contiene anticuerpo inhibe la fusión de una primera célula control con una segunda célula control en condiciones que permitirían fusión no mediada por glicoproteína de la envoltura de VIH-1 de las células controles primera y segunda en ausencia del agente, de modo que se determine cuantitativamente la capacidad de la muestra que contiene anticuerpo de inhibir específicamente la fusión de la célula CD4⁺ con la célula glicoproteína de envoltura de VIH-1⁺.

La muestra que contiene anticuerpo puede ser cualquier muestra que contiene anticuerpo. En una forma de realización, la muestra que contiene anticuerpo es una muestra de suero. En otra forma de realización, la muestra que contiene anticuerpo es una preparación de IgG. Los métodos para obtener una muestra que contiene anticuerpo son bien conocidos para los expertos en la materia.

En una forma de realización, el primer colorante es una molécula que contiene un grupo rodamina y el segundo colorante es una molécula que contiene un grupo fluoresceína.

En la forma de realización preferida, la molécula que contiene un grupo rodamina es cloruro de octadecil rodamina B y la molécula que contiene un grupo fluoresceína es éster octadecílico de fluoresceína.

En otra forma de realización, el primer colorante es una molécula que contiene un grupo fluoresceína y el segundo colorante es una molécula que contiene un grupo rodamina.

En una forma de realización, la célula CD4⁺ es una célula HeLa CD4⁺. En otra forma de realización de la invención, la célula glicoproteína de la envoltura de VIH-1⁺ es una célula HeLa gp120/gp41 de VIH-1_{LAI}⁺. En una forma de realización separada, la célula CD4⁺ es una célula PM1 y la célula glicoproteína de la envoltura de VIH-1⁺ es una célula HeLa gp120/gp41 de VIH-1_{JR-FL}⁺. En una forma de realización adicional, la célula CD4⁺ es un linfocito T humano primario. En una forma de realización aún adicional, la célula CD4⁺ es un macrófago humano primario.

La presente descripción divulga además un método para determinar cuantitativamente la capacidad de una muestra que contiene anticuerpo de inhibir la fusión de una célula glicoproteína de envoltura de VIH-1⁺ con una célula CD4⁺ apropiada que comprende: (a) poner en contacto una cantidad predeterminada de la muestra que contiene anticuerpo con una cantidad adecuada de la célula CD4⁺ apropiada y una cantidad adecuada de la célula glicoproteína de envoltura de VIH-1⁺ en condiciones que permitirían la fusión de la célula CD4⁺ con la célula glicoproteína de envoltura de VIH-1⁺ en ausencia de la muestra que contiene anticuerpo, estando marcadas las membranas celulares de la célula CD4⁺ y la célula glicoproteína de envoltura de VIH-1⁺ con un primer colorante y un segundo colorante, respectivamente, colorantes primero y segundo que permiten la transferencia de energía de resonancia entre ellos sólo cuando se yuxtaponen en la misma membrana; (b) determinar el valor del porcentaje de transferencia de energía de resonancia de la muestra resultante después de un periodo de tiempo adecuado; y (c) comparar el valor del porcentaje de transferencia de energía de resonancia así determinado con un estándar conocido, de modo que se determine cuantitativamente la capacidad de la muestra que contiene anticuerpo de inhibir la fusión la célula glicoproteína de envoltura de VIH-1⁺ con la CD4⁺.

En una forma de realización, el primer colorante es una molécula que contiene un grupo rodamina y el segundo colorante es una molécula que contiene un grupo fluoresceína.

En la forma de realización preferida, la molécula que contiene un grupo rodamina es cloruro de octadecil rodamina B y la molécula que contiene un grupo fluoresceína es éster octadecílico de fluoresceína.

En otra forma de realización, el primer colorante es una molécula que contiene un grupo fluoresceína y el segundo colorante es una molécula que contiene un grupo rodamina.

En una forma de realización, la célula CD4⁺ es una célula HeLa CD4⁺. En otra forma de realización de la invención, la célula glicoproteína de la envoltura de VIH-1⁺ es una célula HeLa gp120/gp41 de VIH-1_{LAI}⁺. En una forma de realización separada, la célula CD4⁺ es una célula PM1 y la célula glicoproteína de la envoltura de VIH-1⁺ es una célula HeLa gp120/gp41 de VIH-1_{JR-FL}⁺. En una forma de realización adicional, la célula CD4⁺ es un linfocito T humano primario. En una forma de realización aún adicional, la célula CD4⁺ es un macrófago humano primario.

La presente descripción divulga además un método para determinar la fase de pronóstico clínico de una infección por VIH-1 en un sujeto infectado con VIH-1 que comprende: (a) obtener una muestra que contiene anticuerpo del sujeto infectado con VIH-1; (b) determinar cuantitativamente la capacidad de la muestra que contiene anticuerpo así obtenida de inhibir la fusión de una célula glicoproteína de envoltura de VIH-1⁺ con una célula CD4⁺ apropiada mediante el método de la invención; y (c) comparar la capacidad de la muestra que contiene anticuerpo de inhibir la fusión de la célula CD4⁺ con la célula glicoproteína de envoltura de VIH-1⁺ así determinada con la de una muestra que contiene anticuerpo obtenida de un sujeto infectado con VIH-1 que tiene una infección por VIH-1 en una fase conocida o que tiene un pronóstico clínico conocido, de modo que se determine la fase o el pronóstico clínico de la infección por VIH-1 en el sujeto infectado con VIH-1.

Como se usa aquí, un "sujeto infectado con VIH-1" significa un sujeto que tiene al menos una de sus propias células invadida por VIH-1. En la forma de realización preferida, el sujeto es un ser humano.

La presente descripción divulga además un método para determinar la eficacia de una vacunación anti-VIH-1 en un sujeto vacunado, no infectado con VIH-1 que comprende: (a) obtener una muestra que contiene anticuerpo del sujeto vacunado no infectado con VIH-1; (b) determinar cuantitativamente la capacidad de la muestra que contiene anticuerpo así obtenida de inhibir la fusión de una célula glicoproteína de envoltura de VIH-1⁺ con una célula CD4⁺ apropiada mediante el método de la invención objeto; y (c) comparar la capacidad de la muestra que contiene anticuerpo de inhibir la fusión de la célula CD4⁺ con la célula glicoproteína de envoltura de VIH-1⁺ así determinada con la de una muestra que contiene anticuerpo obtenida de un sujeto vacunado, no infectado con VIH-1 para el que la vacunación anti-VIH-1 tiene una eficacia conocida, de modo que se determine la eficacia de la vacunación anti-VIH-1 en el sujeto vacunado, no infectado con VIH-1.

Como se usa aquí, “vacunación anti-VIH-1” significa la administración a un sujeto de una vacuna que se pretende provoque la producción de anticuerpos por el sujeto vacunado que son capaces de específicamente unirse a epítopos presentes en una glicoproteína de la envoltura de superficie de VIH-1. Las vacunas en general son bien conocidas por los expertos en la materia, y comprenden un antígeno, por ejemplo, una proteína, y un adyuvante.

Como se usa aquí, la “eficacia de una vacunación anti-VIH-1” significa el grado que la vacunación o vacunaciones sucesivas (es decir, inmunización) produce que aumente el título de anticuerpos neutralizantes contra VIH-1 en el sujeto vacunado. En otras palabras, cuanto mayor sea la eficacia de una vacunación anti-VIH-1, mayor será el título de anticuerpos neutralizantes contra VIH-1 en el sujeto vacunado.

Como se usa aquí, un “sujeto no infectado con VIH-1” significa un sujeto que no tiene ninguna de sus propias células invadidas por VIH-1. En la forma de realización preferida, el sujeto es un ser humano.

La presente descripción divulga además un kit para determinar si un agente es capaz de inhibir específicamente la fusión de una célula glicoproteína de envoltura de VIH-1⁺ con una célula CD4⁺ apropiada que comprende, en compartimentos separados: (a) una cantidad adecuada de una célula CD4⁺ apropiada cuya membrana celular está marcada con un primer colorante; (b) una cantidad adecuada de una célula glicoproteína de envoltura de VIH-1⁺ cuya membrana celular está marcada con un segundo colorante, siendo capaz la célula glicoproteína de envoltura de VIH-1⁺ de fusionarse con la célula CD4⁺ de (a) en condiciones adecuadas en ausencia del agente, y permitiendo los colorantes primero y segundo la transferencia de energía de resonancia entre ellos sólo cuando se yuxtaponen en la misma membrana; (c) una cantidad adecuada de una primera célula control cuya membrana celular está marcada con el primer colorante; y (d) una cantidad adecuada de una segunda célula control cuya membrana celular está marcada con el segundo colorante, siendo capaz la segunda célula control de fusión no mediada por glicoproteína de envoltura de VIH-1 con la primera célula control de (c) en condiciones adecuadas en ausencia del agente.

El kit puede comprender además tampones adicionales. Además, las células pueden estar secas o suspendidas en líquido o gel.

Las cantidades adecuadas de células son cantidades que permitirían al experto en la materia determinar, sin experimentación excesiva, si un agente es capaz de inhibir específicamente la fusión de una célula CD4⁺ con una célula glicoproteína de envoltura de VIH-1⁺. Tales cantidades se pueden determinar fácilmente según métodos bien conocidos por los expertos en la materia.

En una forma de realización, el primer colorante es una molécula que contiene un grupo rodamina y el segundo colorante es una molécula que contiene un grupo fluoresceína.

En la forma de realización preferida, la molécula que contiene un grupo rodamina es cloruro de octadecil rodamina B y la molécula que contiene un grupo fluoresceína es éster octadecílico de fluoresceína.

En otra forma de realización, el primer colorante es una molécula que contiene un grupo fluoresceína y el segundo colorante es una molécula que contiene un grupo rodamina.

En una forma de realización, la célula CD4⁺ es una célula HeLa CD4⁺. En otra forma de realización de la invención, la célula glicoproteína de la envoltura de VIH-1⁺ es una célula HeLa gp120/gp41 de VIH-1_{LA1}⁺. En una forma de realización separada, la célula CD4⁺ es una célula PM1 y la célula glicoproteína de la envoltura de VIH-1⁺ es una célula HeLa gp120/gp41 de VIH-1_{JR-FL}⁺. En una forma de realización adicional, la célula CD4⁺ es un linfocito T humano primario. En una forma de realización aún adicional, la célula CD4⁺ es un macrófago humano primario.

La presente descripción divulga además un kit para determinar si un agente es capaz de inhibir la fusión de una célula CD4⁺ con una célula glicoproteína de envoltura de VIH-1⁺ que comprende, en compartimentos separados: (a) una cantidad adecuada de una célula CD4⁺ cuya membrana celular está marcada con un primer colorante; y (b) una cantidad adecuada de una célula glicoproteína de envoltura de VIH-1⁺ cuya membrana celular está marcada con un segundo colorante, siendo capaz la célula glicoproteína de envoltura de VIH-1⁺ de fusionarse con la célula CD4⁺ de (a) en condiciones adecuadas en ausencia del agente, y permitiendo los colorantes primero y segundo la transferencia de energía de resonancia entre ellos sólo cuando se yuxtaponen en la misma membrana.

El kit puede comprender además tampones adicionales. Además, las células pueden estar secas o suspendidas en un soporte líquido o gel.

Las cantidades adecuadas de células son cantidades que permitirían al experto en la materia determinar, sin experimentación excesiva, si un agente es capaz de inhibir específicamente la fusión de una célula CD4⁺ con una célula glicoproteína de envoltura de VIH-1⁺. Tales cantidades se pueden determinar fácilmente según métodos bien conocidos por los expertos en la materia.

En una forma de realización, el primer colorante es una molécula que contiene un grupo rodamina y el segundo colorante es una molécula que contiene un grupo fluoresceína.

En la forma de realización preferida, la molécula que contiene un grupo rodamina es cloruro de octadecil rodamina B y la molécula que contiene un grupo fluoresceína es éster octadecílico de fluoresceína.

En otra forma de realización, el primer colorante es una molécula que contiene un grupo fluoresceína y el segundo colorante es una molécula que contiene un grupo rodamina.

En una forma de realización, la célula CD4⁺ es una célula HeLa CD4⁺. En otra forma de realización de la invención, la célula glicoproteína de la envoltura de VIH-1⁺ es una célula HeLa gp120/gp41 de VIH-1_{LAI}⁺. En una forma de realización separada, la célula CD4⁺ es una célula PM1 y la célula glicoproteína de la envoltura de VIH-1⁺ es una célula HeLa gp120/gp41 de VIH-1_{JR-FL}⁺. En una forma de realización adicional, la célula CD4⁺ es un linfocito T humano primario. En una forma de realización aún adicional, la célula CD4⁺ es un macrófago humano primario.

La presente descripción divulga además un método para determinar si un aislado de VIH-1 es inductor de sincicios que comprende: (a) obtener una muestra de una célula glicoproteína de envoltura de aislado de VIH-1⁺ cuya membrana celular está marcada con un primer colorante; (b) poner en contacto una cantidad adecuada de la muestra con una cantidad adecuada de una célula CD4⁺ en condiciones que permitirían la fusión de la célula CD4⁺ con una célula glicoproteína de envoltura de cepa de VIH-1 inductora de sincicios⁺, estando marcada la membrana celular de la célula CD4⁺ con un segundo colorante que permite la transferencia de energía de resonancia entre el primer y segundo colorante sólo cuando el primer y el segundo colorantes están yuxtapuestos en la misma membrana; (c) determinar el valor del porcentaje de transferencia de energía de resonancia de la muestra resultante después de un periodo de tiempo adecuado; y (d) comparar el valor del porcentaje de transferencia de energía de resonancia así determinado con un estándar conocido, de modo que se determine si el aislado de VIH-1 es inductor de sincicios.

Como se usa aquí, “inductor de sincicios” significa capaz de producir la formación de sincicios (células multinucleadas resultantes de la fusión celular mediada por glicoproteína de la envoltura de VIH-1) cuando se pone en contacto con una pluralidad de células CD4⁺ en condiciones adecuadas.

Obtener una muestra de células glicoproteína de envoltura de aislado de VIH-1⁺ se puede realizar según métodos bien conocidos para los expertos en la materia.

Las células glicoproteína de envoltura de aislado de VIH-1⁺ se pueden obtener de sangre o cualquier otro líquido corporal que se sabe que contiene células glicoproteína de envoltura de aislado de VIH-1⁺ en sujetos infectados con VIH. De forma alternativa, se pueden obtener células glicoproteína de envoltura de aislado de VIH-1⁺ cultivando células *in vitro* con sangre u otros líquidos corporales que contienen el aislado de VIH-1 o células infectadas con el aislado de VIH-1, y recuperando las células glicoproteína de envoltura de aislado de VIH-1⁺ producidas allí.

Las cantidades adecuadas de muestra y célula CD4⁺ se pueden determinar según métodos bien conocidos por los expertos en la materia.

En una forma de realización, el primer colorante es una molécula que contiene un grupo rodamina y el segundo colorante es una molécula que contiene un grupo fluoresceína.

En la forma de realización preferida, la molécula que contiene un grupo rodamina es cloruro de octadecil rodamina B y la molécula que contiene un grupo fluoresceína es éster octadecílico de fluoresceína.

En otra forma de realización, el primer colorante es una molécula que contiene un grupo fluoresceína y el segundo colorante es una molécula que contiene un grupo rodamina.

En una forma de realización, la célula CD4⁺ es una célula HeLa CD4⁺. En otra forma de realización, la célula CD4⁺ es una célula PM1. En una forma de realización adicional, la célula CD4⁺ es un linfocito T humano primario. En una forma de realización aún adicional, la célula CD4⁺ es un macrófago humano primario.

La presente descripción divulga además un método para determinar la fase de una infección por VIH-1 en un sujeto infectado con VIH-1 que comprende determinar mediante el método de la invención si el aislado de VIH-1 con el que está infectado el sujeto infectado con VIH-1 es inductor de sincicios, de modo que se determine de esta manera la fase de la infección por VIH-1 en el sujeto infectado con VIH-1.

Por último, la presente descripción divulga un método para medir de forma cuantitativa la fusión de una célula glicoproteína de envoltura de VIH-1⁺ con una célula CD4⁺ apropiada que comprende: (a) poner en contacto una muestra de la célula CD4⁺ apropiada con la célula glicoproteína de envoltura de VIH-1⁺ en condiciones que permiten la fusión entre ellas, estando marcadas las membranas celulares de la célula CD4⁺ y la célula glicoproteína de envoltura de VIH-1⁺ con un primer colorante y un segundo colorante, respectivamente, primer y segundo colorantes que permiten la transferencia de energía de resonancia entre ellos sólo cuando se yuxtaponen en la misma membrana; (b) determinar el valor del porcentaje de transferencia de energía de resonancia de la muestra resultante después de un periodo de tiempo adecuado; y (c) comparar el valor del porcentaje de transferencia de energía de resonancia así determinado con un estándar conocido, de modo que se mida cuantitativamente la fusión de la célula CD4⁺ con la célula glicoproteína de envoltura de VIH-1⁺.

Esta invención se entenderá mejor mediante referencia a los detalles experimentales que siguen, pero los expertos en la materia apreciarán fácilmente que los experimentos específicos detallados son sólo ilustrativos de la invención como se describe más completamente en las reivindicaciones que siguen después.

5 Detalles experimentales

Primera serie de experimentos

A - Antecedentes

10

El ensayo de fusión basado en RET de la invención mide la fusión entre células que expresan la glicoproteína de la envoltura de VIH-1 (gp120/gp41) y células que expresan CD4. Tal fusión célula-célula puede llevar a la producción de células multinucleadas o sincicios. Las moléculas que bloquean la unión o fusión de VIH-1 a células huésped también bloquean la formación de sincicios. Los ensayos de sincicios se han usado en muchos laboratorios para detectar virus o moléculas anti-virus, y típicamente tienen una lectura visual. En el desarrollo del ensayo, se usaron líneas celulares permanentes que expresan gp120/gp41 o CD4 de forma estable.

15

La técnica de transferencia de energía de resonancia se ha usado en una variedad de estudios de fusión de membranas incluyendo la fusión de células nucleadas inducida por virus o polietilenglicol. Sin embargo, no se ha usado previamente para estudiar la fusión de membranas mediada por glicoproteína de la envoltura de VIH-1. La técnica implica marcar un compañero de fusión (por ejemplo una línea celular que expresa gp120/gp41) con un colorante fluorescente tal como octadecil fluoresceína (F18) y el otro compañero de fusión (por ejemplo, una línea celular que expresa CD4) con un colorante tal como octadecil rodamina (R18). Los colorantes se eligen de modo que el espectro de emisión de uno (F18) solape el espectro de excitación del segundo (R18). Cuando las células se fusionan, F18 y R18 se asocian lo suficientemente cerca para que la estimulación de F18 produzca transferencia de energía de resonancia a R18 y emisión en las longitudes de onda de emisión de R18. Las versiones octadecilo de los fluorocromos se insertan espontáneamente en las membranas plasmáticas de las células usando el protocolo de marcaje descrito más adelante.

25

B - Células ensayadas

30

(1) Se mezcló una línea de células de ovario de hámster chino (CHO) que expresan gp120/gp41 de VIH-1_{IIB} (160G7) con una línea celular de linfocitos T humanos que expresa CD4 (C8166). Las células CD4⁺ están comercialmente disponibles. Las células 160G7 se pueden obtener del AIDS Directed Program del MRC (Reino Unido). Las células C8166 se pueden obtener del AIDS Directed Program del MRC (Reino Unido) y del AIDS Research and Reference Reagent Program del NIH (Bethesda, Maryland). Se ha demostrado previamente que las células 160G7 y las células C8166 se fusionan para formar sincicios multinucleados. Este ensayo es un ensayo de sincicios que requiere conteo visual de sincicios con la ayuda de un microscopio de poco aumento. Este ensayo es adecuado para analizar agentes bloqueantes tales como moléculas basadas en CD4 y anticuerpos neutralizantes dirigidos contra gp120 y gp41.

40

(2) También se usaron células de carcinoma epitelial humano (HeLa) que expresan gp120/gp41 de VIH-1_{LAI} (HeLa-env) y células HeLa que expresan CD4 (HeLa-CD4⁺). Las células HeLa-CD4⁺ se pueden obtener del AIDS Directed Program del MRC (Reino Unido) y del AIDS Research and Reference Reagent Program del NIH (Bethesda, Maryland). Las células HeLa-env⁺ expresan niveles muchos más altos de gp120/gp41 que las células 160G7, como se demostró por la capacidad de detectar fácilmente gp120 en la superficie de células HeLa-env⁺ pero no de células 160G7 mediante citometría de flujo usando un anticuerpo anti-gp120. El análisis visual demuestra que las células HeLa-env⁺ se fusionan rápidamente con células C8166 y HeLa-CD4⁺ para formar sincicios.

45

Las células HeLa-env⁺ se pueden obtener, por ejemplo, transfectando células HeLa con un plásmido que codifica env, tal como pMA243, usando el método de precipitación con fosfato de calcio y selección posterior de los transfectantes con metotrexato 2 μ M. El plásmido pMA243 está diseñado para expresar los genes env, tat, rev y vpu de VIH-1_{LAI}, además del marcador de selección DHFR*, con todos los genes bajo el control de la LTR de VIH-1 (Dragic, T., *et al.*, J. Virol. 66:4794-4802 (1992)). DHFR* es un gen mutante de la dihidrofolato reductasa que demuestra una afinidad reducida por metotrexato. En pMA243, el gen DHFR* se expresa del transcrito de ARNm procesado que normalmente codifica el gen nef de VIH-1 que está deletado en este vector. Los genes tat y rev codificados por VIH-1 se requieren para niveles de expresión altos del gen env. El plásmido pMA243 también codifica un marcador de resistencia a ampicilina y un origen de replicación bacteriano.

55

C - Método de ensayo en cubeta

60

Se modificaron las condiciones de marcaje de las células de aquellas usadas en un estudio previo donde se usó RET para seguir la fusión celular inducida por polietilenglicol (Wanda, P.E. y Smith, J.D., J. Histochem. Cytochem. 30:1297 (1982)). Se disolvieron F18 (éster octadecílico de fluoresceína; Molecular Probes Eugene, Oregón. No. de catálogo F3857) ó R18 (octadecil rodamina B, sal cloruro; Molecular Probes, No. de catálogo 0246) en etanol a 5-10 mg/ml y se diluyeron aproximadamente 1000 veces en el medio de crecimiento apropiado. La concentración exacta en el medio se ajustó para llevar la DO a 0,34 a 506 nm (F18) ó a 1,04 a 565 nm (R18). Se incubaron monocapas de células con el medio apropiado durante la noche, después se lavaron y se contaron. Se mezclaron 100.000 células de cada tipo en pocillos de una placa de cultivo de 24 pocillos. A intervalos después de mezclar, se separaron las células

65

con EDTA, se lavaron y se colocaron en una cubeta de fluorímetro. Se midió la fluorescencia a tres series de longitudes de onda de excitación y emisión (ver la tabla 1 a continuación) usando un fluorímetro Perkin-Elmer LS50.

TABLA 1

Longitud de onda de excitación	Longitud de onda de emisión	Medida obtenida
450 nm	530 nm	Fluorescencia total de F18
557 nm	590 nm	Fluorescencia total de R18
450 nm	590 nm	RET*

* El cálculo de RET requiere primero restar la fluorescencia debida a la fluorescencia directa de F18 y R18 tras la excitación a 450 y la emisión a 590. Las medidas de fluorescencia se determinan midiendo la fluorescencia de células marcadas con cada colorante por separado.

El valor de RET, calculado como se ha descrito anteriormente, se divide por la fluorescencia total de R18 para dar un valor de % de RET. Los resultados de los experimentos iniciales indican que se puede medir RET usando ambas combinaciones de células enumeradas anteriormente. Se produjo una señal mayor cuando las células que expresaban la glicoproteína de la envoltura estaban marcadas con F18 y las células que expresaban CD4 estaban marcadas con R18 que cuando las células que expresaban la glicoproteína de la envoltura estaban marcadas con R18 y las células que expresaban CD4 estaban marcadas con F18.

D - Resultados de estudios de evolución temporal de RET y experimentos con líneas celulares control, usando el método de ensayo en cubeta

Se realizaron experimentos de evolución temporal con la combinación HeLa-env⁺ + HeLa-CD4⁺ (Figura 1). Se usó una línea celular control, HeLa-Δenv⁺. Las células HeLa-Δenv⁺ expresan glicoproteína de la envoltura de VIH-1, con una delección de 400 pares de bases en la región del gen env que codifica gp120. Estas células no se fusionan con células CD4⁺ humanas.

Los resultados demuestran que se puede medir la fusión mediante el ensayo RET a 2 horas, pero no a 1 hora, consistente con estudios previos de fusión celular mediada por la envoltura de VIH-1 usando microscopía de fluorescencia. A 4 horas, era evidente una fusión celular masiva mediante inspección visual del cultivo, y este punto temporal produjo valores de RET reproducibles en varios experimentos. En otros experimentos, la combinación de células 160G7 con células C8166 dio un valor máximo de RET reproducible a alrededor de 4 horas pero con valores menores que los obtenidos usando HeLa-env⁺ y HeLa-CD4⁺ (datos no mostrados). Presumiblemente, esta diferencia resulta del nivel de expresión mucho más alto de gp120/gp41 en células HeLa-env⁺ comparado con células 160G7.

Se realizaron un número de experimentos control usando combinaciones de células que, basados en estudios previos, se sabe que no se fusionan. Estas combinaciones incluyeron células HeLa combinadas con células HeLa-CD4⁺, o células HeLa-env⁺ combinadas con CHO-CD4 o la línea celular de glioma humano U87.MG-CD4. Las células CHO-CD4, como otras células que no son de primate, no se fusionan con células que expresan gp120/gp41 de VIH-1. Las células U87.MG-CD4 son una de las pocas líneas celulares humanas CD4⁺ que no se fusionan con células que expresan glicoproteína de la envoltura de VIH-1. Los valores de RET obtenidos con estas combinaciones de células (datos no mostrados) en general fueron similares a aquellos usando el control HeLa-Δenv⁺ + HeLa-CD4⁺ (Figura 1).

E - Resultados de experimentos de RET con agentes bloqueantes usando el método de ensayo en cubeta

A continuación se determinó si sCD4 (que interacciona con células gp120/gp41⁺) o el MAb murino OKT4a (que interacciona con células CD4⁺) podrían bloquear RET (Figuras 2 y 3). Se sabe que ambas moléculas inhiben la infección por VIH-1 y la formación de sincicios. Se calculó el porcentaje bloqueante como el % de RET a cada concentración de agente bloqueante dividido por el % de RET en ausencia de agente bloqueante a 4 horas.

ES 2 325 042 T3

Como se muestra en las figuras 2 y 3, tanto sCD4 como OKT4a bloquean la fusión medida por RET. Las concentraciones de estos agentes requeridas para la inhibición al 50% son similares a las determinadas usando otros ensayos. Por ejemplo, la IC₅₀ para inhibición por sCD4 de la fusión entre 160G7 y C8166 fue aproximadamente de 4 µg/ml medida usando el ensayo RET, comparada con 5,5 µg/ml medida mediante un ensayo visual de sincicios (es decir, un ensayo para medir la inhibición de la formación de sincicios, en donde los sincicios se cuantifican visualmente usando un microscopio de poco aumento) usando la misma combinación de células. En resumen, estos resultados demuestran que el método RET se puede usar para medir la fusión celular mediada por glicoproteína de la envoltura de VIH-1 de una manera rápida y reproducible. Cuando se compran con datos del ensayo visual de sincicios más convencional, los resultados están en excelente conformidad.

F - Experimento control de bloqueo con IKT4 usando el método de ensayo en cubeta

Se realizaron experimentos control para examinar la inhibición del % de RET por OKT4. OKT4 es un anticuerpo monoclonal de ratón que se une a CD4 pero no inhibe la interacción CD4-gp120, la infección por VIH-1, o la fusión celular inducida por VIH-1. Usando el método en cubeta y la combinación Hela-env⁺ y Hela-CD4⁺, OKT4 dio el 0% de inhibición de RET a 0,2 µg/ml ó 2,0 µg/ml, comparado con el 65% de inhibición por OKT4a a 0,2 µg/ml en el mismo experimento. Estos resultados demuestran que la inhibición de la fusión de membranas mediada por la envoltura de VIH-1 medida por RET es específica para agentes que bloquean la infección por VIH-1 y la fusión celular inducida por VIH-1.

G - Automatización del ensayo RET usando el ensayo de lector de placas

Se usó un lector de placas fluorescentes para analizar el ensayo RET. Este método tiene la ventaja de reducir las manipulaciones requeridas, notablemente la necesidad de retirar células para medidas de fluorescencia en una cubeta. El lector de placas mide la fluorescencia de células directamente en una placa de cultivo multi-pocillo. Además, la velocidad de la lectura del ensayo aumenta de manera espectacular (en aproximadamente 100 veces). En este experimento se usó el "Cytofluor" de Millipore. Este es un lector de placas dedicado que se ha usado en un variedad de ensayos de fluorescencia diferentes basados en células y es adecuado para su uso en un rango de formatos de placas que incluyen placas de cultivo de 24 pocillos y de 96 pocillos. El Cytofluor también tiene las ventajas importantes de la velocidad y la compatibilidad con programas de análisis de software de IBM.

Los resultados indican que el ensayo se puede realizar fácilmente en placas de cultivos de 24 ó 96 pocillos usando el lector de placas fluorescentes.

En una forma de realización, cuando se realiza el ensayo de forma rutinaria, se hacen dos tipos de medida. En la primera, se mide RET en un punto temporal único tras mezclar las células marcadas y un agente bloqueante candidato. En la segunda, el ensayo se adapta para medir cambios en la velocidad de fusión celular en presencia o ausencia de agentes bloqueantes. Una de las ventajas del ensayo RET es que mide la fusión en tiempo real y de esta manera es factible para análisis cinéticos.

Por ejemplo, a continuación se proporciona un método de usar el ensayo del lector de placas y medir RET en un punto temporal único. En este ensayo se usa una placa de cultivo de 96 pocillos de fondo plano. El método es una modificación del método en cubeta descrito anteriormente.

Ejemplo de método de ensayo de lector de placa en un punto temporal único.

1. Preparar los colorantes:

R18: 10 mg/ml en EtOH al 100% (para células HeLa-CD4⁺)

F18: 5 mg/ml en EtOH al 100% (para células HeLa-env⁺)

2. Añadir los colorantes a concentraciones apropiadas, en medio de cultivo celular que contiene suero fetal de ternera al 10%, como se determina mediante medidas de absorbancia:

medio F18⁺: 0,34 a 506 nm

medio R18⁺: 0,52 a 565 nm

3. Añadir medio + colorante a las células apropiadas como se indica anteriormente, después incubar durante la noche para teñir las células.

4. Lavar las células y contar.

5. Sembrar 20.000 células de línea/pocillo, teniendo algunos pocillos una u otra línea celular por separado, otros pocillos con ambas líneas celulares, y otros pocillos con varias concentraciones de anticuerpos u otros agentes inhibidores añadidos además de ambas líneas celulares.

5

6. 4 horas después, eliminar el medio y lavar todos los pocillos tres veces con PBS (las células permanecen adherentes en los pocillos). Añadir 200 μ l de PBS a cada pocillo. Leer la fluorescencia en los pocillos usando el lector de placas Cytofluor de Millipore con las combinaciones de filtros enumeradas a continuación:

- 10 F18: excitación 450 nm emisión 530 nm (X)
- R18: excitación 530 nm emisión 590 nm (Y)
- 15 F18 + R18: excitación 450 nm emisión 590 nm (Z)

Se registran los valores de emisión, X, Y, y Z (indicado anteriormente) para cada combinación de células:

- 20 A) HeLa-env⁺ + HeLa-CD4⁺
- B) HeLa-env⁺ solas
- 25 C) HeLa-CD4⁺ solas

Por ejemplo, la lectura de F18 para células HeLa-env⁺ solas se da mediante B_x.

Después se calcula el % de RET usando esta fórmula:

30

35

$$\% \text{ RET} = \frac{A_z - (A_x \cdot B_z/B_x) - (A_y \cdot C_z/C_y)}{A_y} \cdot 100$$

40 Se obtuvieron resultados similares en experimentos comparando la inhibición del % de RET usando el método en cubeta y el método del lector de placas. Por ejemplo, la figura 4 ilustra la inhibición de la fusión entre células HeLa-env⁺ y HeLa-CD4⁺ por el anticuerpo monoclonal anti-CD4, OKT4a, medido como una reducción en el % de RET determinada por ambos métodos 4 horas después de mezclar las células.

Segunda Serie de Experimentos

45

Como se ha discutido en la primera serie de experimentos, las propiedades de las cepas de VIH-1 adaptadas a laboratorio se diferencian de las de los aislados primarios del virus. Mientras que las primeras infectan continuamente líneas de células T linfoblastoides u otras líneas celulares humanas manipuladas para expresar CD4 humana, las segundas con frecuencia tienen tropismo por macrófagos y normalmente infectan sólo cultivos de macrófagos primarios. Los aislados de VIH-1 con tropismo por macrófagos son particularmente importantes porque normalmente son las cepas que median la transmisión de individuo a individuo, sea esta transmisión por vía sexual, parenteral o vertical (Zhu, T., *et al.*, Science 261:1179 (1993); van't Wout, A.B. *et al.*, J. Clin. Invest., 94:2060 (1994)).

55 En la primera serie de experimentos, se presentaron ejemplos donde se usó la transferencia de energía de resonancia para medir la fusión celular mediada por cepas del virus adaptadas a laboratorio (por ejemplo, VIH-1_{LAI}). En este caso, se mezclaron células HeLa que expresaban establemente la glicoproteína de la envoltura de VIH-1_{LAI} con células HeLa que expresaban establemente CD4 humano y se midió el nivel de fusión celular mediante determinaciones de RET a intervalos tras la mezcla.

60 En la primera serie de experimentos, los solicitantes se refirieron a la línea estable de células HeLa que expresaba la glicoproteína de la envoltura de VIH-1_{LAI} como HeLa-env⁺. Los solicitantes se referirán ahora a estas células como HeLa-env_{LAI}⁺ para distinguirlas de las células HeLa-env_{JR-FL}⁺ descritas más adelante.

65 Puesto que las propiedades de las cepas de VIH-1 con tropismo por macrófagos se diferencian de las de las cepas adaptadas a laboratorio, los solicitantes han desarrollado ahora un ensayo RET para medir la fusión de membranas mediada por la glicoproteína de la envoltura de un aislado de VIH-1 con tropismo por macrófagos. Los solicitantes creen que este ensayo tendría ventajas particulares para identificar agentes que inhiben la fusión mediada por cepas

del virus con tropismo por macrófagos. Tales agentes pueden ser diferentes de los identificados usando en ensayo RET con glicoproteína de la envoltura de HeLa-env_{JR-FL}. En el contexto del cribado de fármacos, los agentes que inhiben la fusión mediada por una glicoproteína de la envoltura de un aislado con tropismo por macrófagos podrían ser más valiosos como moléculas de partida en el desarrollo de fármacos para el tratamiento de la infección por VIH-1.

5 Como se describe en más detalle a continuación, los solicitantes han construido una línea de células HeLa (HeLa-env_{JR-FL}⁺) que expresa de forma estable la glicoproteína de la envoltura de la cepa con tropismo por macrófagos VIH-1_{JR-FL} (Koyanagi, Y. *et al.*, Science 236:819(1987)). Las medidas de RET indicaron que las células HeLa-env_{JR-FL}⁺ no se fusionan con células HeLa-CD4⁺ o la línea de células T linfoblastoides CD4⁺ C8166. Los solicitantes ensayaron después la capacidad de las células HeLa-env_{JR-FL}⁺ para fusionarse con tres líneas celulares que según se informa son susceptibles a infección por aislados de VIH-1 con tropismo por macrófagos. Estas incluyen la línea celular híbrida de células T/células B CEMx174 (Stefano, K.A., *et al.*, J. Virol. 67:6707 (1993)), la línea celular de leucemia monocítica THP-1 (Meylan, P.R.A. *et al.*, Virology 193:256 (1993)), y la línea celular PM1 que recientemente se ha derivado la línea de células T linfoblastoides Hut78 (Lusso, P., *et al.*, J. Virol. 69:3712 (1995)). Las medidas de RET muestran que las células HeLa-env_{JR-FL}⁺ se fusionan con células PM1, pero no con CEMx174 o THP-1. La fusión de las células HeLa-env_{JR-FL}⁺ con células PM1 se inhibió por agentes tales como el anticuerpo OKT4A, que inhibe la unión de VIH-1. Esto indica que la fusión medida en este ensayo RET esta específicamente inducida por la interacción de la glicoproteína de la envoltura de VIH-1_{JR-FL} con CD4. Se ha modificado el ensayo RET para hacerlo adecuado para detectar agentes que inhiben la fusión mediada por VIH-1_{JR-FL}. Este ensayo usa el formato de microplaca semiautomático descrito como una de las dos opciones de formato en la solicitud original.

Construcción de un vector de expresión que codifica gp120/gp41 de VIH-1_{JR-FL}

Se expresó la glicoproteína de la envoltura de VIH-1_{JR-FL} (gp120/gp41) usando el vector pMA243_{JR-FL}. Este es idéntico al vector pMA243 usado para expresar gp120/gp41 de VIH-1_{LAI}, excepto que se cortaron las secuencias que codifican gp120/gp41 de VIH-1_{LAI} de pMA243 y se cambiaron por las secuencias codificantes de VIH-1_{JR-FL}. pMA243 se describe en Dragic, T., *et al.*, J. Virol. 66:4794 (1992) así como previamente en la página 37. pMA243 se ha depositado con la ATCC como se describe previamente en la página 15.

30 *El método detallado para construir pMA243_{JR-FL} fue como sigue*

La secuencia de la envoltura de VIH-1_{JR-FL} se amplificó mediante PCR del vector plasmídico pUCFL112-1 (amablemente proporcionado por el Dr. I.S.Y. Chen, U.C.L.A., CA) y se subclonó en el vector pMA243. Se usó el procesamiento por extensión de solapamiento (SOEing) para crear el segmento génico gp160 de VIH-1_{JR-FL}-dhfr*. Primero, se amplificó la secuencia de gp160 de VIH-1_{JR-FL} de pUCFL112-1 usando los cebadores 1 y 2. El cebador 1 (5'--ATT-CAG-AAG-AGT-CGC-CAG-AGT-AGA-AAA-GTT-GTG-GGT-CAC-3') se alineó con el extremo 5' del gen gp160 (5' del sitio KpnI) mientras que el cebador 2 (5'--GAT-GGC-ACC-AAG-CTT-ATC-GAT-CTT-ATA-GCA-AAG-CCC-TTT-CCA-AGC--3') incluía la hebra antisentido de la región intergénica de env-dhfr* fusionada al complemento del extremo 3' del gen VIH-1_{JR-FL}. A continuación, la secuencia dhfr* se amplificó de pMA243 usando los cebadores 3 y 4. El cebador 3 (5'--GAT-CGA-TAA-GCT-TGG-TGC-CAT-CAT-GGT-TCG-ACC-ATT-GAA-CTG-3') incluía la hebra sentido de la región intergénica de env-dhfr* fusionada al extremo 5' del gen dhfr* mientras el cebador 4 (5'--ATG-AGC-CTT-GTG-TGT-GGTAG--3') se alineó dentro de la región 3'-LTR. Los dos productos de PCR se juntaron, se eliminó el exceso de cebadores y se realizó una segunda ronda de PCR en presencia de los cebadores 1 y 4. El producto final de PCR consistió en el gen de la envoltura de VIH-1_{JR-FL} fusionado al gen dhfr*. Por último, el fragmento KpnI de pMA243 (que abarcaba los genes de la envoltura de VIH-1_{LAI} y dhfr*) se cortó y se cambió por el segmento génico gp160 de VIH-1_{JR-FL}-dhfr*. Para verificar que no se habían introducido mutaciones mediante el procedimiento de clonación el fragmento KpnI se secuenció usando el método del dideoxi. El plásmido resultante se ha designado pMA243_{JR-FL}.

50 *Transfección de pMA243_{JR-FL} en células HeLa*

Se hizo la línea celular HeLa-env_{JR-FL}⁺ introduciendo el plásmido pMA243_{JR-FL} en células HeLa usando el procedimiento de lipofectina (Gibco BRL, Grand Island, NY), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se seleccionaron transfectantes en metotrexato 2 µM y se clonaron dos veces mediante dilución limitante. Se determinaron los niveles de expresión de gp120 en HeLa-env_{JR-FL}⁺ mediante citometría de flujo y mediante un enzoinmunoanálisis de adsorción para detectar gp120 vertida en el sobrenadante del cultivo.

Ensayo RET

60 La tinción de células fue similar a la descrita en la primera serie de experimentos con modificaciones mínimas. El procedimiento modificado funciona eficazmente con todas las combinaciones de células como se describe más adelante.

Se disuelven octadecil rodamina B, sal de cloro (R18) y éster octadecílico de fluoresceína (F18) (Molecular Probes, Eugene, OR) en EtOH al 100% a concentraciones finales de 10 mg/ml y 5 mg/ml, respectivamente. R18 se diluye después 1:2000 en el medio de cultivo completo apropiado (sin selección) y la concentración del colorante se ajusta de modo que la DO a 565 nm sea 0,52 +/- 5%. F18 se diluye 1:1000 en medio de cultivo completo y se ajusta de modo que la DO a 506 nm sea 0,34 +/- 5%. Se coloca el medio que contiene F18 sobre monocapas de la línea celular apropiada

que expresa la envoltura (HeLa-env_{LAI}⁺ o HeLa-env_{JR-FL}⁺). Se coloca el medio que contiene R18 sobre monocapas de la célula apropiada que lleva CD4 en el caso de células adherentes (por ejemplo, HeLa-CD4⁺) o se añade a un volumen igual de medio que contiene células en suspensión (por ejemplo, células PM1). Las células adherentes se tiñen cuando están aproximadamente al 60-80% de confluencia. Las células en suspensión se tiñen a una concentración de 0,25-0,5 x 10⁶/ml. Las células se incuban después durante la noche en medio de cultivo que contiene colorante fluorescente.

Después de la tinción, las células adherentes se separan de las botellas de cultivo mediante tratamiento con EDTA 0,5 mM y se lavan varias veces en medio de cultivo que contiene SBF al 10%. Las células en suspensión se lavan mediante varios ciclos de centrifugación. Se siembran 20.000 células que expresan la envoltura con un número igual de células que expresan CD4 por pocillo de una placa de 96 pocillos y se incuban durante 4 horas a 37°C. Donde ambas líneas celulares son adherentes, se usan placas con pocillos de fondo plano. Se usan placas con pocillos de fondo redondeado cuando la célula que expresa CD4 es una línea celular en suspensión (por ejemplo, células PM1). Los controles incluyen pocillos que contienen cada línea celular sola. Después de tres lavados en PBS (con centrifugación a baja velocidad entre lavados para las células en suspensión), se lee la fluorescencia en un lector de placas Cytofluor de Millipore usando las combinaciones de filtros descritas previamente en la página 42.

Cálculo del % de RET

Se registran los valores de emisión X, Y y Z para cada combinación de células:

A) Células Hela o HeLa que expresan la glicoproteína de la envoltura de VIH-1 + células que expresan CD4.

B) Células Hela o HeLa que expresan la glicoproteína de la envoltura de VIH-1 solas

C) Células que expresan CD4 solas.

Después se calcula el porcentaje de RET usando la fórmula previamente descrita en la página 43.

Resultados experimentales

Los resultados del % de RET obtenidos usando este ensayo con varias combinaciones de células se dan en la Tabla 2. Como se muestra en la Tabla 2, las células HeLa-env_{LAI}⁺ se fusionan rápidamente con células HeLa-CD4⁺ (valor del % de RET >5). De forma similar, las células HeLa-env_{LAI}⁺ se fusionan rápidamente con la línea de células T linfoblastoides CD4⁺ C8166. En ambos casos la fusión se inhibe a niveles de fondo (valores del % de RET <1) por el anticuerpo OTK4A (Ortho Diagnostics Systems, Raritan, NJ). OKT4A es un anticuerpo anti-CD4 que se sabe que bloquea la unión de gp120 a CD4, el paso de unión de la entrada vírica y un preludio esencial para la fusión celular mediada por la envoltura de VIH-1. Las células HeLa-env_{LAI}⁺ no se fusionan con células de ovario de hámster chino que expresan CD4 (CHO-CD4⁺), puesto que parece que las células que no son de primate carecen de las moléculas accesorias que se requieren para la fusión celular mediada por la envoltura de VIH-1.

(Tabla pasa a página siguiente)

TABLA 2

Medidas de RET obtenidas usando varias combinaciones de células y el anticuerpo inhibidor OKT4A (0,3 µg/ml)

Células marcadas con F18	Células marcadas con R18	Inhibidor	% de RET
HeLa-env _{LAI} ⁺	HeLa-CD4 ⁺	ninguno	7,3
HeLa-env _{LAI} ⁺	HeLa-CD4 ⁺	OKT4A	0,4
HeLa	HeLa-CD4 ⁺	ninguno	0,7
HeLa-env _{LAI} ⁺	C8166	ninguno	13
HeLa-env _{LAI} ⁺	C8166	OKT4A	0,6
HeLa	C8166	ninguno	0,5
HeLa-env _{LAI} ⁺	CHO-CD4 ⁺	ninguno	0
HeLa-env _{JR-FL} ⁺	HeLa-CD4 ⁺	ninguno	0,8
HeLa-env _{JR-FL} ⁺	C8166	ninguno	0
HeLa-env _{JR-FL} ⁺	CEMx174	ninguno	0
HeLa-env _{JR-FL} ⁺	THP-1	ninguno	0
HeLa-env _{JR-FL} ⁺	PM1	ninguno	7,5
HeLa-env _{JR-FL} ⁺	PM1	OKT4A	0,7
HeLa	PM1	ninguno	0,3

Como se muestra en la Tabla 2, las células HeLa-env_{JR-FL}⁺ no se fusionan con células HeLa-CD4⁺ ó C8166 como se indica mediante los niveles de fondo del % de RET (% de RET <1). A este respecto, las células HeLa-env_{JR-FL}⁺ mimetizan VIH-1_{JR-FL} que tiene tropismo por macrófagos. Como otros aislados de VIH-1 con tropismo por macrófagos, VIH-1_{JR-FL} generalmente no se fusiona con o infecta líneas celulares de linfocitos T u otras líneas celulares CD4⁺ (O'Brien, W.A. *et al.*, Nature 348:69 (1990)).

A continuación, los solicitantes ensayaron varias líneas celulares que se había descrito que eran infectables por cepas de VIH-1 con tropismo por macrófagos como se ha descrito anteriormente. Los solicitantes encontraron que las células HeLa-env_{JR-FL}⁺ no se fusionan con células CEMx174 o THP-1 en el ensayo RET (Tabla 2). Los solicitantes también ensayaron la fusión entre células HeLa-env_{JR-FL}⁺ y la línea celular PM1. Estas células se obtuvieron de M. Norcross (FDA, Bethesda, MD) y M. Crowley (NIH, Bethesda, MD). Como se muestra en la tabla 2, las células HeLa-env_{JR-FL}⁺ y las células PM1 se fusionaron determinado por medidas del % de RET. La evolución temporal de la fusión entre células HeLa-env_{JR-FL}⁺ y células PM1, medida usando el ensayo RET, era similar a la vista con la combinación de células HeLa-env_{LAI}⁺ y HeLa-CD4⁺ (Figura 5). Nótese que los resultados usando células HeLa-env_{LAI}⁺ y HeLa-CD4⁺ son similares a, pero no idénticos con, los presentados en la figura 1. Las diferencias menores pueden resultar del uso del método de ensayo de lector de placa en la figura 5 más que el método del ensayo en cubeta de la figura 1.

La especificidad de fusión entre células HeLa-env_{JR-FL}⁺ y PM1 medida usando el ensayo RET está apoyada por la falta de fusión (medidas de fondo del % de RET) obtenido cuando se mezclaron células HeLa-env_{JR-FL}⁺ con otras células CD4⁺ (Tabla 2 y anteriormente). Además, sólo se encontraron niveles de fondo del % de RET cuando se mezclaron células PM-1 y células HeLa en el ensayo (Tabla 2). Por último, la fusión entre las células PM-1 y las células HeLa-env_{JR-FL}⁺, mediada por el ensayo RET, era tan sensible a inhibición por OKT4A como lo era la fusión entre células HeLa-env_{LAI}⁺ y células HeLa-CD4⁺ (Figura 6). RET se inhibió completamente a niveles de fondo mediante OKT4A 0,3 µg/ml (Tabla 2). No se vio inhibición de RET usando la misma concentración del anticuerpo OKT4 (Ortho Diagnostics Systems), que no inhibe la unión de VIH-1 (no mostrado).

Tercera Serie de Experimentos

Inhibición de la fusión de membranas mediada por glicoproteína de la envoltura de VIH-1 en el ensayo RET por sobrenadantes de hibridoma anti-PM1

El ensayo RET descrito en esta solicitud es útil para el cribado de anticuerpos capaces de inhibir la fusión de membranas mediada por glicoproteína de la envoltura de VIH-1. Se generaron hibridomas contra células PM1 y se cribaron los sobrenadantes de estos hibridomas en el ensayo RET para identificar hibridomas que secretan anticuerpos

capaces de inhibir la fusión entre células HeLa-env_{JR-FL}⁺ y PM1. Los sobrenadantes de los cultivos de los hibridomas PA-3, PA-5, PA-6 y PA-7 inhibieron la fusión entre células HeLa-env_{JR-FL}⁺ y PM1 en el ensayo RET, y también inhibieron la fusión entre células HeLa-env_{LAI}⁺ y ciertas células diana CD4⁺ (Tabla 3). La fusión de membranas mediada por la glicoproteína de la envoltura de VIH-1_{LAI} con PM-1 y HUT-78 se inhibió por todos los MAb secretados por estas líneas celulares de hibridoma. Mientras, la fusión entre HeLa-env_{LAI}⁺ y CEM se inhibió por PA-3 y PA-5 pero menos por PA-6 ó PA-7. La fusión entre HeLa-env_{LAI}⁺ y células C8166 ó Sup-T1 se inhibió mínimamente o en absoluto por todos estos mAb.

TABLA 3

Inhibición de la fusión celular mediada por glicoproteína de la envoltura de VIH-1 por nuevos mAb

Células que expresan la envoltura	Células CD4 ⁺	% de RET	% de inhibición de RET por mAb nuevos			
			PA-3	PA-5	PA-6	PA-7
HeLa-env _{JR-FL}	PM-1	16,3	85,3	96,3	92	67
HeLa-env _{LAI}	PM-1	12,4	89,7	100	81	69
HeLa-env _{LAI}	HUT-78	10,9	51,3	60,3	55,7	52,7
HeLa-env _{LAI}	CEM	9,5	71,8	68	33	21
HeLa-env _{LAI}	HeLa-CD4	11,4	0	0	7,7	0
HeLa-env _{LAI}	SUP-T1	19,8	2,5	0	18	11
HeLa-env _{LAI}	C8166	15,4	9,7	22	22,3	13

Efecto de β -quimioquinas sobre la fusión de membranas mediada por glicoproteína de la envoltura de VIH-1 analizada mediante el ensayo RET

Se desarrolló el ensayo RET adicionalmente para analizar la fusión entre células que expresan la glicoproteína de la envoltura de VIH-1 y células CD4⁺ primarias. Se marcaron las células CD4⁺ diana (linfocitos CD4⁺ humanos primarios activados por mitógenos, macrófagos humanos primarios o células PM-1) con octadecil rodamina (Molecular Probes, Eugene, OR), y las células HeLa-env_{JR-FL}⁺, células HeLa-env_{LAI}⁺ (o células HeLa control, no mostrado) con octadecil fluoresceína (Molecular Probes), durante la noche a 37°C. Se mezclaron números igual de células diana marcadas y células que sobreexpresan env en placas de 96 pocillos y se añadieron β -quimioquinas (o el MAb de CD4 OKT4a) a las concentraciones finales (ng/ml) indicadas en paréntesis en la primera columna de la Tabla 4.

Se determinaron los valores de emisión de fluorescencia 4 horas después de la mezcla de células. Se calcularon RET y el porcentaje de inhibición de RET como se ha descrito anteriormente. En este experimento, HeLa-env_{JR-FL}⁺ se fusionó con linfocitos T CD4⁺ humanos normales (% de RET = 6,0) y macrófagos (% de RET = 4,3) así como células PM1 (% de RET = 11,5). HeLa-env_{LAI}⁺ también se fusionó con linfocitos T CD4⁺ humanos normales (% de RET = 10,5) y células PM1 (% de RET = 10,5) pero no con macrófagos (% de RET = 1,2, similar al % de RET usando células HeLa en lugar de células HeLa-env).

TABLA 4

Inhibición de la fusión de membranas por β -quimioquinas

		% de inhibición de RET	
		HeLa-env _{JR-FL}	HeLa-env _{LAI}
a) <u>Células PM1</u>			
	sin quimioquinas	0	0
	+R/M α /M β (80/400/100)	99	5
	+RANTES (80)	92	0
	+MIP-1 α (400)	61	0
	+MIP-1 β (100)	87	7
	+MCP-1 (100)	1	2
	+MCP-2 (100)	28	7
	+MCP-3 (100)	2	1
b) <u>Células LW5 CD4⁺</u>			
	sin quimioquinas	0	0
	+R/M α /M β (106/533/133)	61	0
	+RANTES (106)	35	5
	+MIP-1 α (533)	28	0
	+MIP-1 β (133)	56	8
	+OKT4A (3 ug/ml)	100	100
c) <u>Células EU2 CD4⁺</u>			
	sin quimioquinas	*	0
	+R/M α /M β (320/1600/400)	*	0
	+RANTES (320)	*	0
	+MIP-1 α (1600)	*	0
	+MIP-1 β (400)	*	0
d) <u>Macrófagos</u>			
	sin quimioquinas	0	*
	+R/M α /M β (80/400/100)	54	*
	+RANTES (80)	20	*
	+MIP-1 α (400)	15	*
	+MIP-1 β (100)	37	*
	+MCP-1 (100)	0	*
	+MCP-2 (100)	28	*
	+MCP-3 (100)	18	*

* Fusión no detectable.

Como se muestra en la Tabla 4, RANTES, MIP-1 β (y en menor grado, MIP-1 α) inhibieron fuertemente la fusión de membrana de células HeLa-env_{JR-FL} con células PM1, mientras que la fusión entre células PM1 y células HeLa-env_{LAI} fue insensible a estas β -quimioquinas (Tabla 4a). Se obtuvieron resultados similares con células T CD4⁺ primarias de un trabajador de laboratorio normal (LW5, Tabla 4b), aunque se requirieron concentraciones mayores de β -quimioquinas para inhibir la fusión de membranas en las células primarias que en las células PM1. De esta manera, las acciones de las β -quimioquinas no están restringidas a la línea celular PM-1. En marcado contraste con las células de LW5, las células T CD4⁺ de un individuo expuesto, pero no infectado (EU2) no se fusionaron con células HeLa-env_{JR-FL} (% de RET = 0,1), mientras que se pudieron fusionar claramente con células HeLa-env_{LAI} (% de RET = 4,1) en una manera resistente a β -quimioquinas (Tabla 4c). La fusión entre HeLa-env_{JR-FL} y macrófagos primarios sólo se inhibió débilmente por β -quimioquinas, mientras que HeLa-env_{LAI} no se fusionó con macrófagos primarios (Tabla 4d). El ensayo RET demuestra que las β -quimioquinas interfieren con la fusión de membranas mediada por env. También establece que las glicoproteínas de la envoltura de una cepa NSI primaria no se pueden fusionar con células T CD4⁺ de un individuo EU, proporcionando una pista crítica sobre cómo estas células pueden resistir la infección por VIH-1 *in vitro*, y probablemente *in vivo*.

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo monoclonal capaz de ser generado contra una línea celular susceptible de infección por aislados de VIH-1 con tropismo por macrófagos, y derivada de la línea de células T linfoblastoides HuT 78, en donde dicho anticuerpo inhibe la fusión de membranas mediada por glicoproteína de la envoltura de VIH-1 entre HeLa-env_{JR-FL} y dicha línea celular, pero no inhibe la fusión de membranas mediada por glicoproteína de la envoltura de VIH-1 entre células HeLa-env_{LAI} y Sup-T1 o células HeLa-env_{LAI} y HeLa-CD4⁺.

2. Uso de un anticuerpo monoclonal según la reivindicación 1 para la preparación de un medicamento para el tratamiento de una infección por VIH-1.

FIGURA 1

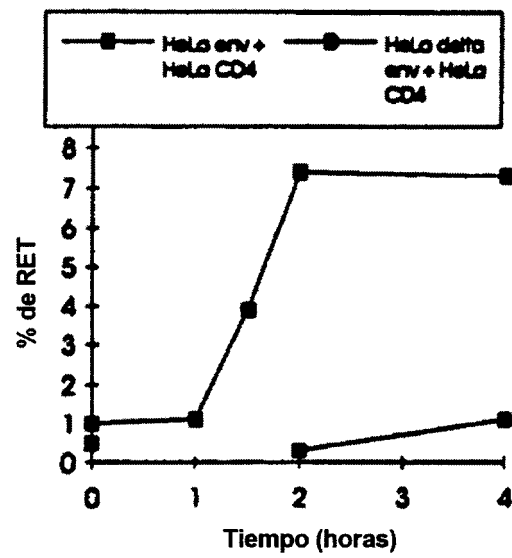


FIGURA 2

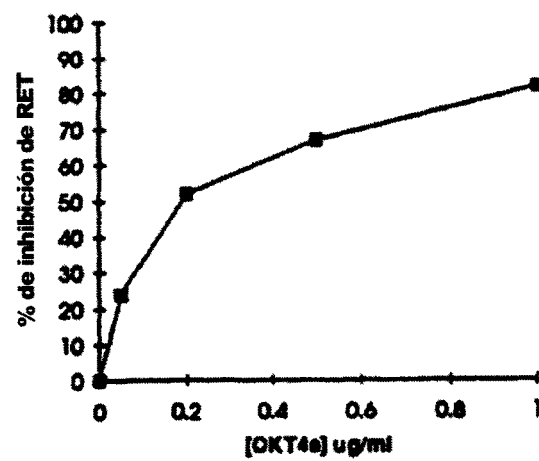


FIGURA 3

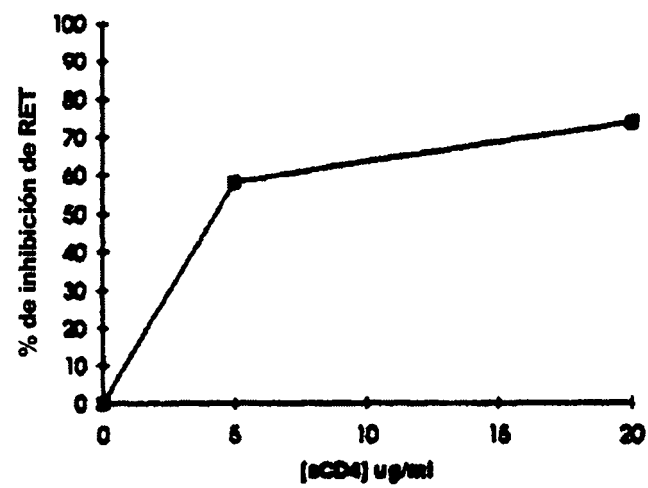


FIGURA 4

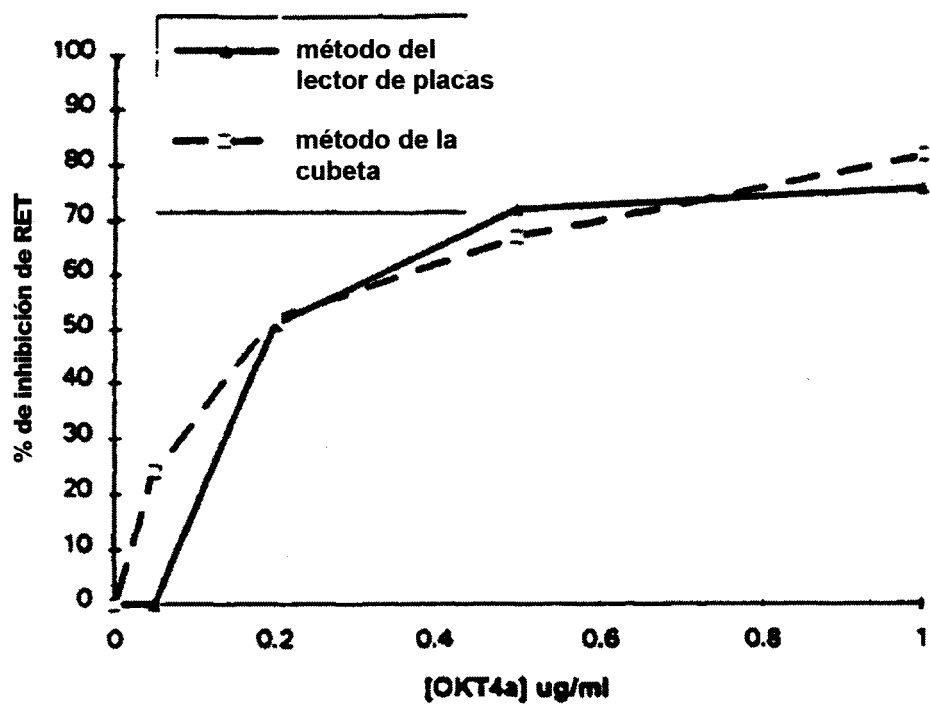


FIGURA 5

**Evolución temporal
de RET**

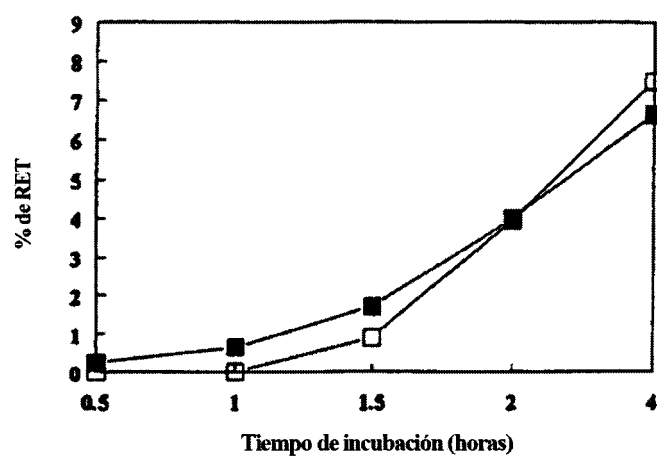


FIGURA 6

**Inhibición
de RET**

