

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 362 779**

21 Número de solicitud: 200931309

51 Int. Cl.:
C12Q 1/68 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación: **30.12.2009**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **13.07.2011**

Fecha de la concesión: **23.05.2012**

45 Fecha de anuncio de la concesión: **04.06.2012**

45 Fecha de publicación del folleto de la patente:
04.06.2012

73 Titular/es:
**FUNDACION PUBLICA ANDALUZA PARA LA
GESTION DE LA INVESTIGACION EN SALUD DE
SEVILLA
H.UNIVERSITARIO VIRGEN DEL ROCIO,
EDIF.LABORATORIOS 6.PLT.AVDA.MANUEL
SIUROT S/N
41013 SEVILLA, ES;
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS (CSIC) y
UNIVERSIDAD DE SEVILLA**

72 Inventor/es:
**RUIZ-MATEOS CARMONA, EZEQUIEL;
GONZALEZ-SERNA MARTIN, MANUEL
ALEJANDRO y
LEAL NOVAL, MANUEL**

74 Agente/Representante:
Pons Ariño, Ángel

54 Título: **MÉTODO DE IDENTIFICACIÓN DEL TROPISMO DEL VIRUS VIH.**

57 Resumen:

Método de identificación del tropismo del virus VIH.
La presente invención se refiere a un método de identificación del tropismo del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) en pacientes infectados con dicho virus. El método comprende el cocultivo de células aisladas mononucleares de sangre periférica (PBMCs) de un paciente infectado con el VIH y PBMCs de un sujeto control sano, donde se deplecionan las células PBMCs CD8 positivas del paciente infectado con VIH y/o del sujeto control sano. Los viriones liberados al medio de cultivo son inoculados mediante espinoculación a una línea celular humana aislada del cuerpo humano, CD4 positiva que expresan el correceptor CCR5 (CD4+/CCR5+/CXCR4-) ya una línea celular humana aislada del cuerpo humano, CD4 positiva que expresa el correceptor CXCR4 (CD4+/CCR5-/CXCR4+). Dicho método permite determinar el tropismo viral mediante la cuantificación de la proporción de cuasiespecies víricas que utilizan uno u otro correceptor.

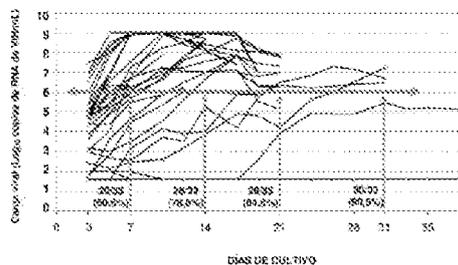


FIG. 1

ES 2 362 779 B1

DESCRIPCIÓN

Método de identificación del tropismo del virus VIH.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se encuadra dentro del campo de la biomedicina y concretamente se refiere a un método de identificación del tropismo del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) en pacientes infectados con dicho virus.

10 **Estado de la técnica anterior**

El VIH entra en las células que expresan el receptor CD4 y los receptores de quimioquinas CCR5 y/o CXCR4. Según el virus utilice para entrar el correceptor CCR5, CXCR4 o ambos se definirá el tropismo vírico como R5, X4 o dual, respectivamente.

15 En la década de los noventa se produjeron una serie de observaciones sobre los mecanismos del VIH de gran relevancia, que sentaron las bases para la investigación de moléculas capaces de ejercer un efecto antagónico sobre los receptores de quimioquinas: 1) La capacidad de algunos aislados víricos de pacientes para inducir la formación de sincitios cuando se cultivan en células MT2, y su valor pronóstico a lo largo de la historia natural de la infección (Koot *et al.*, 1993. *Ann Int Med.*, 118: 681-688). 2) El requerimiento de un cofactor, en conjunción con la molécula
20 CD4, para la entrada del VIH en la célula (Harrington *et al.*, 1993. *J Virol.*, 67: 5939-6947). 3) La propiedad de CC-quimioquinas para inhibir la replicación viral (Cocchi *et al.*, 1995. *Science*, 270: 1811-1815). 4) El descubrimiento de que el receptor de quimioquina CXCR4 era necesario para la entrada del virus (Bleul *et al.*, 1996. *Nature*, 382: 829-833). 5) Los sujetos homocigotos para la delección $\Delta 32$ en el gen que codifica para el receptor CCR5 son resistentes a
25 la infección, y los heterocigotos, aunque susceptibles, experimentan un curso más lento en su historia natural (Huang *et al.*, 1996. *Nat Med.*, 2: 1240-1243). Estos estudios seminales han ido forjando un sólido cuerpo de doctrina sobre el tropismo viral de gran relevancia patogénica, clínica y terapéutica, que han culminado con la reciente aprobación, por parte de las Agencias Reguladoras de Medicamentos, de Maraviroc (MRV), el primer antagonista de correceptores de quimioquinas CCR5 que ha demostrado eficacia clínica. Ello exige la determinación previa del tropismo viral.

30 Para determinar el tropismo del virus VIH en pacientes infectados existen diferentes herramientas genotípicas y fenotípicas (Berger *et al.*, 1998. *Nature*, 391: 240). Braun y Wiesmann (2007) muestran una revisión de los métodos fenotípicos existentes para la identificación del tropismo vírico presente en los pacientes infectados por el VIH. En dicha revisión se analizan las características así como las ventajas e inconvenientes de cada uno de ellos (Braun y
35 Wiesmann, 2007. *Eur J Med Res.*, 12(9): 463-472).

Los algoritmos genotípicos no tienen suficiente sensibilidad y su valor predictivo es limitado (Low *et al.*, 2007. *AIDS*, 21: F17-24; Huang *et al.*, 2008. *Protein J Virol.*, 82: 5584-5593; de Mendoza *et al.*, 2008. *J Acquir Immune Defic Syndr.*, 48: 241-244). Otra aproximación genotípica es la secuenciación “*ultra deep*”, pero esta técnica es cara y
40 no aplicable en la práctica clínica (Archer *et al.*, 2009. *AIDS*, 23: 1209-1218).

El ensayo fenotípico más ampliamente utilizado y el único validado clínicamente para la determinación del tropismo vírico es Trofile[®] (Whitcomb *et al.*, 2007. *Antimicrob Agents Chemother.*, 51: 556-575), basado en la generación de virus recombinante de ciclo único, pero aunque es un ensayo validado clínicamente, tiene algunas limitaciones,
45 como su elevado coste, dificultades técnicas, el tiempo hasta la obtención de un resultado ya que sólo se realiza en USA (Monogram Biosciences Inc., South San Francisco, CA) y esto exige el transporte de la muestra con lo que el resultado final puede tardar entre 4-6 semanas, su acceso es muy limitado para países en desarrollo por su elevado coste y sin apoyo logístico para el transporte de muestras, entorno al 20% los resultados suministrados por el ensayo son indeterminados (“no reportables”), generalmente para que el ensayo funcione se requiere que la viremia del paciente sea superior a 1000 copias de RNA vírico/ml, lo que limita el uso de MRV en pacientes con viremias más bajas, que están en fracaso virológico y con escasas opciones terapéuticas, en diferentes estudios (Wilkin *et al.*, 2007. *Clin Infect Dis.*, 44: 591-595; Kitrinis *et al.*, 2009. *Antimicrob Agents Chemother.*, 53: 1124-1131; Landovitz *et al.*, 2008. *J Infect Dis.*, 198: 1113-1122), se ha observado que entorno al 10% de los pacientes, presentan un “cambio” de tropismo (de R5 a dual/mixto, o X4), entre dos muestras separadas en torno a un mes, probablemente debido a problemas de sensibilidad de la técnica, lo que genera incertidumbre sobre la reproductibilidad del Trofile[®] en algunos pacientes, si el resultado es clasificado como “dual/mixto”, el ensayo no suministra información sobre la proporción de cuasiespecies R5 y X4, cuando ya ha sido comunicado (Irlbeck *et al.*, 2008. *AIDS*, 22: 1425-1431) que estos pacientes tienen una distribución de tropismos heterogénea, con claro predominio de R5, algunos de los cuales quizás pudieran beneficiarse del tratamiento con MRV (Harrigan *et al.*, 2009. 16th CROI Abstract MHLB0311). Se ha comunicado también que el
60 7% de sujetos nunca expuestos a quimiantagonistas y con tropismo R5, presentan mutaciones de resistencia a MRV en la región V3 (Soulie *et al.*, 2008. *AIDS*, 22: 2212-2214). Así, estos pacientes podrían ser inadecuadamente tratados con MRV, en base al resultado del Trofile[®].

Aunque el ensayo fenotípico Trofile[®] aporta información para la determinación del tropismo del VIH en pacientes infectados, persiste el problema de la determinación precisa de las cuasiespecies virales y de sus proporciones relativas mediante un método que sea, además, de bajo coste, sencillo y que solucione los inconvenientes que se han descrito en el estado de la técnica.

Explicación de la invención

La presente invención se refiere a un método de identificación del tropismo del VIH en un paciente infectado con dicho virus que comprende el cocultivo de PBMCs de un paciente infectado con el VIH y PBMCs de un sujeto control sano, donde las células PBMCs CD8 positivas del paciente infectado con VIH y/o del sujeto control sano han sido previamente eliminadas de manera selectiva. Los viriones liberados al medio de cultivo son inoculados mediante espinoculación a al menos dos líneas celulares humanas aisladas, CD4 positivas, una de las cuales expresa el correceptor CCR5, pero no el CXCR4 (CD4+/CCR5+/CXCR4-) y otra que expresa el correceptor CXCR4, pero no el CCR5 (CD4+/CCR5-/CXCR4+). Dicho método permite determinar el tropismo viral mediante la cuantificación de la proporción de cuasiespecies víricas que utilizan uno u otro correceptor. Además, el método descrito se emplea para determinar mediante el conocimiento del tropismo del VIH de un paciente infectado, si es tributario al tratamiento con antagonistas de CCR5.

La presente invención provee un nuevo método para el ensayo de tropismo fenotípico. En adelante, para referirse al método de la presente invención, se utilizará indistintamente el acrónimo TROCAI, (del inglés *Tropism Correceptor Assay Information*). Los resultados de TROCAI se interpretaron y clasificaron según la respuesta virológica a una exposición a corto plazo a Maraviroc (Prueba Clínica del Maraviroc, MCT). Finalmente, se compararon los resultados de TROCAI con los obtenidos mediante TROFILE[®] de segunda generación ó TROFILE[®] (ES) y diferentes algoritmos genotípicos. En adelante, para referirse a TROFILE[®] (ES) se pueden emplear indistintamente los términos “Trofile” o “Trofile[®]”.

Tal como se describe en los ejemplos de realización de la presente invención, los resultados obtenidos por TROCAI mostraron una coincidencia de 22/24 (91,6%) con TROFILE[®] (ES) y de 22/26 (84,6%) con los ensayos genotípicos. Con el método TROCAI se consiguieron resultados en 27/27 (100%) de pacientes con cargas víricas superiores a 500 copias/ml de ARN de VIH y en 3/6 (50%) de pacientes con cargas víricas inferiores a 500 copias/ml de ARN de VIH. TROCAI mostró menos de un 0,5% de variantes X4 en el sobrenadante de la línea celular indicadora X4 en todos los pacientes positivos a MCT y más de un 0,5% de variantes X4 en el sobrenadante de la línea celular indicadora X4 en todos los pacientes negativos a MCT.

El método TROCAI muestra una serie de ventajas respecto al método Trofile. Las principales ventajas son las siguientes:

- Eficacia: TROCAI permite determinar el tropismo R5 y/o X4 del virus VIH en un 91% de los casos de 33 pacientes infectados, en contraste con el 72,7% que se consigue determinar con el método Trofile. Al contrario que con el método Trofile, no es necesario que la viremia del paciente sea superior a 1000 copias de RNA vírico por mL. Con TROCAI se ha conseguido determinar el tropismo del virus VIH en pacientes con carga viral menor de 1000 copias e incluso menor de 500 copias. Esta ventaja permite determinar el tropismo del virus de pacientes infectados con una viremia baja, que están en fracaso virológico y, al no poder determinarse dicho tropismo con el método Trofile, tendría escasas opciones terapéuticas.

- Precisión: De todos los tropismos determinados en las muestras de pacientes infectados, el 92% mostró el mismo resultado con el método TROCAI y con Trofile.

- Rapidez: Los resultados se obtienen en una media de 10-15 días mientras que con Trofile son necesarios una media de 28 a 42 días, teniendo en cuenta el transporte.

- Fiabilidad: La determinación de TROCAI está basada en la utilización del virus completo del paciente, mientras que en el método Trofile, se utilizan fragmentos de secuencias codificantes para construir los virus quimera que se emplean en él.

- Sencillez: Cocultivos, inoculaciones y amplificaciones de fragmentos de ácidos nucleicos por la técnica de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) para determinar de manera cuantitativa la presencia o ausencia del virus que utiliza el correceptor CCR5 y/o CXCR4.

- Determinación cuantitativa: El método TROCAI permite conocer la proporción de cuasiespecies R5 y X4 en pacientes con virus de tropismo dual. Trofile no proporciona información acerca de dicha proporción y, por tanto, algunos pacientes que tengan virus R5 en mayor proporción de lo que indica el método trofile podrían no verse beneficiados con el tratamiento con Maraviroc.

En la tabla 1 se muestra una síntesis de las ventajas principales. Los resultados obtenidos con TROCAI muestran una elevada concordancia con Trofile y aumenta considerablemente el número de resultados obtenidos en comparación con este ensayo fenotípico y las aproximaciones genotípicas. La aplicación directa de los resultados obtenidos con este método es la determinación del tropismo viral de cada paciente, información que es imprescindible para que los pacientes puedan beneficiarse del tratamiento con MRV. Por tanto, el método TROCAI de la presente invención soluciona los inconvenientes que se han descrito en el estado de la técnica.

TABLA 1

Ventajas principales del método TROCAI respecto del método Trofile

	Eficacia	Precisión	Fiabilidad	Tipo de determinación
TROCAI	91%, Funciona con $<10^3$ copias RNA virus/mL e incluso con < 500 copias RNA virus/mL	92%	Virus completo del paciente	Cuantitativa
TROFILE	72,7%, Necesario $>10^3$ copias RNA virus/mL		Fragmento en virus quimera	Cualitativa

Un aspecto de la presente invención se refiere a un método de identificación del tropismo del VIH en un paciente infectado con dicho virus que comprende los siguientes pasos:

a) Cocultivar células aisladas mononucleares de sangre periférica (PBMCs) de un paciente infectado con el virus VIH y PBMCs de un sujeto control sano, donde las células PBMCs CD8 positivas del paciente infectado con VIH y/o del sujeto control sano han sido previamente eliminadas de manera selectiva,

b) obtener las partículas virales infectivas liberadas al medio en el que se cocultivan las células del paso (a),

c) inocular mediante espinoculación las partículas virales, obtenidas en el paso (b), a al menos dos líneas celulares humanas aisladas CD4 positivas, donde una de ellas expresa el correceptor CCR5, pero no expresa el correceptor CXCR4 (células CD4+/CCR5+/CXCR4-) y la otra expresa el correceptor CXCR4, pero no expresa el correceptor CCR5 (células CD4+/CCR5-/CXCR4+),

d) cultivar las líneas celulares inoculadas en el paso (c) de manera independiente, y en condiciones apropiadas para la infección viral, y

e) determinar la concentración de las partículas virales liberadas (carga viral) al medio de cultivo de las células CD4+/CCR5+/CXCR4- y/o al de las células CD4+/CCR5-/CXCR4+ cultivadas en el paso (d), para la determinación del tropismo viral mediante la cuantificación de la proporción de cuasiespecies víricas que utilizan uno u otro correceptor.

El término “tropismo del virus VIH” tal como se entiende en la presente invención se refiere a la especificidad de un tipo de VIH hacia una célula en particular, donde dicha especificidad está determinada en parte por los marcadores de superficie de las células. Cuando el VIH se acopla a una célula CD4+ que va a infectar, utiliza moléculas de la superficie de la célula. Estas moléculas de superficie se llaman receptores. El primer receptor que el VIH utiliza es la molécula CD4. A continuación el virus usa un “correceptor”. Este puede ser el correceptor CCR5 o CXCR4. El virus generalmente usa uno u otro correceptor. En la presente invención, para denominar el tropismo del virus VIH que usa el correceptor CCR5, se puede utilizar el término “tropismo R5” o “tropismo CCR5”. De forma análoga, para denominar el tropismo del virus VIH que usa el correceptor CXCR4, se puede utilizar el término “tropismo X4” o “tropismo CXCR4”. Sin embargo, el tropismo viral puede ser CCR5, CXCR4 ó “doble/mezclado” (D/M) si algunas de las muestras de virus usan cada correceptor.

Quando la infección por VIH de un individuo está en un estado avanzado se llega a un estado sintomático de la infección conocido como síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA).

Los PBMCs son células sanguíneas que representan un componente importante en el sistema inmune para combatir las infecciones. Las células PBMCs están formadas, entre otros tipos celulares, por linfocitos T4, a los cuales infecta el virus VIH. Dichas células se aíslan tanto de un paciente infectado con VIH como de un sujeto control sano. El sujeto control sano es un individuo que no está infectado con el virus VIH. Dichas células PBMCs se cocultivan en un medio de cultivo adecuado, conocido por el experto en la materia. El medio de cultivo puede ser, por ejemplo y de manera no limitante para otros medios básicos, el medio RPMI-1640 (Ver ejemplos de realización).

Las células CD8+, también conocidas como linfocitos T citotóxicos, linfocitos TC o CTL, células T asesinas o células T CD8+, son un grupo de linfocitos capaces de inducir la muerte de células somáticas o tumorales infectadas que expresan la glicoproteína CD8. Estas células inducen la muerte de las células infectadas con virus u otros patógenos, entre algunos tipos de células. Por tanto dichas células tienen una función citotóxica en el sistema inmune. En el método descrito en la presente invención se eliminan las células PBMCs CD8 positivas (CD8+) de la muestra del paciente infectado con VIH y/o del sujeto control sano, de esta manera se aumenta considerablemente la proporción de células PBMCs sanas infectadas, amplificando de esta manera la cantidad de virus VIH como consecuencia de que las células sanas que son infectadas por el virus VIH procedente del paciente, no son eliminadas por la acción de las células CD8+ presentes en la muestra de células PBMCs. Preferiblemente se eliminan las células PBMCs CD8+ de la muestra del paciente infectado con VIH y del sujeto control sano.

El término “partículas virales infectivas”, tal como se entiende en la presente invención se refiere a los viriones liberados al medio en el que se cultivan las células infectadas (transfectadas) por el VIH. La partícula viral infectiva o virión está compuesta al menos por:

Ácido nucleico vírico: El ácido nucleico es RNA de cadena sencilla.

Proteínas víricas: Pueden ser proteínas estructurales como las que forman la cubierta externa o cápside, o también pueden ser otro tipo de proteínas enzimáticas (por ejemplo POL, VIF, VPR, TAT, etc...).

La obtención de los viriones se lleva a cabo mediante cualquier técnica conocida por el experto en la materia. Dichos viriones son inoculados mediante espinoculación a dos líneas celulares humanas CD4 positivas aisladas del cuerpo humano, una que expresa el correceptor CCR5, pero no el CXCR4 (células CD4+/CCR5+/CXCR4-) y otra que expresa el correceptor CXCR4, pero no el CCR5 (CD4+/CCR5-/CXCR4+).

La inoculación de las partículas virales en la presente invención se lleva a cabo mediante espinoculación. El término “espinoculación” tal como se emplea en la presente invención se refiere a la inoculación mediada por centrifugación. Es decir, la mezcla de los viriones y de las células que se desea infectar son centrifugadas. Como ejemplo de espinoculación se puede citar que los viriones de VIH y las células CD4+/CCR5+/CXCR4- o CD4+/CCR5-/CXCR4+ se centrifugan de entre 1000 y 1200 x g durante un tiempo de entre 1 y 3 horas a una temperatura de entre 20 y 30°C. Dicha centrifugación aumenta el número de viriones que se adsorben a las membranas de las células que se desea infectar respecto de la unión que se experimenta cuando los viriones y las células son mezclados sin centrifugación.

Las células infectadas por espinoculación pertenecen a líneas celulares humanas CD4+. Dichas células inoculadas son cultivadas en un medio y en condiciones conocidos por el experto en la materia. El medio de cultivo se selecciona dependiendo del tipo de línea celular humana empleada debido a sus diferentes requerimientos. Las células CD4+, también conocidas como linfocitos colaboradores, linfocitos T efectores o linfocitos Th, son un subgrupo de linfocitos que desempeña un papel muy importante en establecer y maximizar las capacidades de defensa del sistema inmune y siempre expresan su proteína de superficie CD4. Estos linfocitos no son capaces de producir efectos citotóxicos o fagocitarios contra la célula huésped (también conocidas como células somáticas) o patógenos. Por tanto, están involucrados en la activación de otras células inmunitarias. Son esenciales en el proceso de conmutación para la posterior formación de anticuerpos por parte de los linfocitos B, entre otros procesos.

La identificación del tropismo viral se lleva a cabo mediante la determinación de la concentración de las partículas virales liberadas (carga viral) por las células CD4+/CCR5+/CXCR4- y/o por las células CD4+/CCR5-/CXCR4+ del paso (c) del método. La identificación de tropismo viral, tal como se entiende en la presente invención, se refiere a la determinación del tropismo viral R5 o X4, o a la determinación de la proporción de las cuasiespecies de virus que infectan vía correceptor CCR5 y de las cuasiespecies de virus que infectan vía correceptor CXCR4 si el tropismo es dual. Puesto que los virus cuyo genoma está compuesto por RNA presentan altas tasas de mutación, las poblaciones virales están compuestas por un conjunto de genomas relacionados que difieren en algún/os nucleótido/s. Esta estructura poblacional se denomina cuasiespecie.

Una realización preferida de la presente invención se refiere al método de identificación del tropismo del virus VIH, donde las células de las líneas celulares CD4+/CCR5+/CXCR4- y CD4+/CCR5-/CXCR4+ inoculadas en el paso (c) del método se cultivan durante un tiempo de entre 5 y 7 días, o alternativamente, método de identificación del tropismo del virus VIH donde el paso (d) de cultivo se realiza durante un tiempo de entre 5 y 7 días. Dichas células se pueden mantener en cultivo durante un tiempo máximo no superior a 20 días de manera que la formación de viriones con tropismo CXCR4 y CCR5 reduzca su variabilidad. Esta variable es conveniente que esté controlada y la expresión de viriones sea constante. Preferiblemente las células se cultivan entre 5 y 7 días y más preferiblemente se cultivan durante un tiempo de 6 días.

Otra realización más preferida de la presente invención se refiere al método de identificación del tropismo del virus VIH, donde las células PBMCs del paciente infectado con el virus VIH proceden de un paciente con una carga vírica plasmática menor o igual a 10^3 (1000) copias de RNA del virus VIH por mL. Una realización aún más preferida se refiere al método de identificación del tropismo del virus VIH, donde las células PBMCs del paciente infectado con el virus VIH proceden de un paciente con una carga vírica plasmática menor o igual a 500 copias de RNA del virus VIH por mL. Por tanto, un aspecto clave de la presente invención es la descripción de un método que permite identificar el tropismo viral del VIH partiendo de muestras de pacientes infectados con una viremia plasmática ó carga vírica inferior a 10^3 copias de RNA del virus VIH por mL, o incluso inferior a 500 copias de RNA del virus VIH por mL.

Otra realización preferida de la presente invención se refiere al método de identificación del tropismo del virus VIH, donde se añade al menos una proteína lectina a las células PBMCs del paciente infectado y/o a las células PBMCs del sujeto control sano del paso (a), en el cocultivo y/o previamente a dicho cocultivo. La principal función de la lectina es el reconocimiento molecular o celular, produciendo la aglutinación de linfocitos y otros tipos celulares. Preferiblemente la lectina seleccionada tiene origen vegetal. Según una realización más preferida, la lectina es fitohemaglutinina. La fitohemaglutinina (conocida como PHA por la abreviación de *Phytohaemagglutinin*) es una lectina ampliamente distribuida entre las legumbres y en algunas oleaginosas incluida la soja (*Glycine max*). La PHA estimula inespecíficamente la proliferación de células T, es decir, de las CD4+ que forman parte de la muestra de células PBMCs.

Otra realización preferida de la invención se refiere al método de identificación del tropismo del virus VIH, donde el porcentaje de células PBMCs del sujeto control sano en el cocultivo del paso (a) es de entre 25 y 75% respecto del total de células PBMCs al inicio del cocultivo y, opcionalmente, tras la repoblación de dicho cocultivo con nuevas células procedentes de un sujeto control sano que puede ocurrir con una periodicidad de entre 7 y 14 días. Otra realización más preferida se refiere al método de identificación del tropismo del virus VIH, donde dicho porcentaje es de entre 50 y 75%.

Otra realización preferida de la presente invención se refiere al método de identificación del tropismo del virus VIH, donde la cantidad total de células PBMCs en el cocultivo del paso (a) es de entre 15×10^6 y 20×10^3 . Es decir la cantidad de células PBMCs de un paciente infectado con el virus VIH y PBMCs de un sujeto control sano es de entre 15×10^6 y 20×10^3 .

Otra realización preferida de la presente invención se refiere al método de identificación del tropismo del virus VIH, donde el medio de cultivo de las células CD4+/CCR5+/CXCR4- y/o de las células CD4+/CCR5-/CXCR4+ del paso (d) se renueva tras un periodo de tiempo de entre 2 y 4 días desde la inoculación del virus. De esta manera se consigue disminuir el ruido de fondo y ello permite calcular de manera más fidedigna las proporciones de virus que usan uno y otro correceptor.

Las células humanas CD4+/CCR5+/CXCR4- y CD4+/CCR5-/CXCR4+ pueden proceder de diferentes líneas celulares como por ejemplo, pero sin limitarse, Hep-G2 (cáncer de hígado), DU145 (cáncer de próstata), Lncap (cáncer de próstata), MCF-7 (cáncer de mama), MDA-MB-438 (cáncer de mama), PC3 (cáncer de próstata), T47D (cáncer de mama), THP-1 (leucemia mieloide aguda), U87 (glioma), SHSY5Y (neuroblastoma humano), Saos-2 (cáncer óseo), MT2, Ghost, NP2 o U373-MAGI. Otra realización preferida de la invención se refiere al método de identificación del tropismo del virus VIH, donde las células humanas CD4+/CCR5+/CXCR4- y CD4+/CCR5-/CXCR4+ son de la línea celular de astrocitoma U87. La línea celular de astrocitoma humano U87 (ó U87 MG) se usa como modelo *in vitro* de células humanas de glioblastoma.

Según otra realización preferida de la presente invención, se emplea para determinar el tropismo del virus VIH de un paciente infectado con el objeto de conocer si dicho paciente es tributario a un tratamiento con al menos un antagonista de CCR5. Según una realización más preferida, el antagonista de CCR5 es Maraviroc.

Según la nomenclatura IUPAC, el Maraviroc es: 4,4-difluoro-N-[(1S)-3-[(1R,5S)-3-(3-metil-5-propan-2-il-1,2,4-triazol-4-il)-8-azabicyclo[3.2.1]octan-8-il]-1-fenilpropil]ciclohexano-1-carboxamida. El número de registro CAS para el Maraviroc es: 376348-65-1.

Algunos sinónimos de Maraviroc son: Selzentry; Celsentri; Maraviroc [USAN]; PRO 140+Maraviroc; AIDS104834; AIDS415067; AIDS-104834; AIDS-415067; UK-427.857; CID3002977; DB04835; UK 427857; UK-427857; LS-182818; 376348-65-1; Ciclohexanocarboxamida; 4,4-difluoro-N-((1S)-3-((3-exo)-3-(3-metil-5-(1-metil-4H-1,2,4-triazol-4-il)-8-azabicyclo[3.2.1]oct-8-il)-1-fenilpropil); 4,4-difluoro-N-[(1S)-3-[(1R,5S)-3-(3-metil-5-propan-2-il-1,2,4-triazol-4-il)-8-azabicyclo[3.2.1]octan-8-il]-1-fenilpropil]ciclohexano-1-carboxamida; 674782-29-7; exo-4,4-Difluoro-N-[3-[(3-isopropil-5-metil-4H-1,2,4-triazol-4-il)-8-azabicyclo[3.2.1]oct-8-il]-1(S)-fenilpropil]ciclohexanocarboxamida.

El Maraviroc, es un tipo de medicamento inhibidor de la entrada del virus VIH. Estos productos bloquean la entrada del VIH a las células humanas. Concretamente dicho medicamento fue autorizado por la FDA el 6 de agosto de 2007 para el tratamiento de la infección por el VIH-1 con tropismo por el correceptor CCR5 en pacientes adultos previamente tratados. Se suele administrar en combinación con otro tratamiento antirretroviral. La presente invención se puede emplear para determinar el tropismo del virus VIH de un paciente infectado, para determinar si es tributario a un tratamiento con otros inhibidores de la entrada del virus con tropismo CCR5, dichos fármacos son PR0140 (Progenies),

Vicriviroc (Schering Plough) o Aplaviroc (GW-873140) (GlaxoSmithKline). La presente invención se puede emplear para determinar el tropismo del virus VIH de un paciente infectado, para determinar si es tributario a tratamiento con otros inhibidores de la entrada del virus con tropismo CXCR4 como es el caso del inhibidor de la entrada de los virus con tropismo CXCR4 Plerixafor (AMD3100).

5

Una realización más preferida de la presente invención se refiere al método de identificación del tropismo del virus VIH de un paciente infectado, donde el paciente tributario tiene tropismo viral R5 si la concentración de copias de las partículas virales liberadas de las células CD4+/CCR5-/CXCR4+ es menor de 0,5% respecto del número total de copias de las partículas virales liberadas de las células CD4+/CCR5-/CXCR4+ y CD4+/CCR5+/CXCR4-.

10

Tal como se describe en los ejemplos de realización de la presente invención, el método descrito ha sido validado clínicamente con la prueba clínica de Maraviroc (MRV). Esta comparación ha permitido fijar un dintel de cepas X4 que permite conocer si un determinado paciente responde a una corta exposición a MRV y por tanto, es tributario al tratamiento con este fármaco. La correlación entre prueba clínica de MRV (MCT) y el método descrito en la presente invención es caso lineal, es decir, no se dan resultados discordantes.

15

Una realización aún más preferida de la presente invención se refiere al método de identificación del tropismo del virus VIH de un paciente infectado, donde la concentración de copias de partículas virales liberadas de las células CD4+/CCR5-/CXCR4+ es menor de 3×10^3 copias de RNA del virus VIH por mL de sobrenadante. El término "sobrenadante" se refiere al medio al que se liberan los viriones después de completar su ciclo de infección en las células.

20

Por ejemplo, tal como puede observarse en la tabla 3, en los ejemplos de realización de la presente invención, el paciente número 19 tiene unas cantidades de virus con tropismo X4 de $1,55 \times 10^3$ copias de RNA/mL y con tropismo R5 de $3,75 \times 10^5$ copias de RNA/mL, teniendo por tanto un porcentaje de virus con tropismo X4 de 0,41% y de virus con tropismo R5 de 99,59%, resultando por tanto que el tropismo del virus, determinado mediante el método de la presente invención, es el R5.

25

Otra realización más preferida de la invención se refiere al método de identificación del tropismo del VIH de un paciente infectado, donde el paciente tributario tiene tropismo viral dual (D/M) si la concentración de copias de las partículas virales liberadas de las células CD4+/CCR5-/CXCR4+ es igual o mayor de 0,5% respecto del número total de copias de las partículas virales liberadas de las células CD4+/CCR5-/CXCR4+ y CD4+/CCR5+/CXCR4-.

30

Una realización aún más preferida de la presente invención se refiere al método de identificación del tropismo del VIH de un paciente infectado, donde la concentración de copias de las partículas virales liberadas de las células CD4+/CCR5-/CXCR4+ es igual o mayor de $5,5 \times 10^4$ copias de RNA del virus VIH por mL de sobrenadante.

35

Por ejemplo, tal como puede observarse en la tabla 3, el paciente número 23 tiene unas cantidades de virus con tropismo X4 de $5,91 \times 10^4$ copias de RNA/mL y con tropismo R5 de $9,81 \times 10^6$ copias de RNA/mL, teniendo un porcentaje de virus con tropismo X4 de 0,6% y de virus con tropismo R5 de 99,4%, resultando, por tanto, que el tropismo del virus, determinado mediante el método de la presente invención, es el dual (D/M).

40

Otra realización preferida de la invención se refiere al método de identificación del tropismo del VIH de un paciente infectado, donde las células PBMCs se han congelado junto con un criopreservante previamente al cocultivo del paso (a). Las células han sido congeladas en nitrógeno líquido. Según una realización más preferida de la presente invención, el criopreservante comprende suero bovino fetal y dimetil sulfóxido. Preferiblemente el suero bovino fetal está en un 90% y dimetil sulfóxido en un 10%, respecto de la cantidad total de suero bovino fetal y dimetil sulfóxido.

45

Otra realización preferida de la presente invención se refiere al método de identificación del tropismo del VIH de un paciente infectado, donde la cuantificación de la proporción de cuasiespecies víricas que utilizan uno u otro correceptor del paso (e), se lleva a cabo mediante PCR cuantitativa.

50

La técnica de la PCR cuantitativa (también conocida como qPCR, Q-PCR, PCR PCR en tiempo real) es una variante de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizada para amplificar y simultáneamente cuantificar de forma absoluta el producto de la amplificación de DNA. Para ello emplea, del mismo modo que la PCR convencional, un molde de DNA, al menos un par de cebadores específicos, dNTPs, un tampón de reacción adecuado, y una DNA polimerasa termoestable; a dicha mezcla se le adiciona una sustancia marcada con un fluoróforo que, en un termociclador que disponga de sensores para medir fluorescencia, tras excitar el fluoróforo a la longitud de onda apropiada, permite medir la tasa de generación de uno o más productos específicos. Dicha medición, se realiza después de de cada ciclo de amplificación y por ello se le denomina PCR en tiempo real. El molde que se emplea para la PCR cuantitativa puede ser cDNA (DNA complementario) de hebra simple, obtenido por retrotranscripción de RNA, en este caso, en la presente invención se podría usar dicha técnica, denominada RT-PCR cuantitativa, RT-PCR en tiempo real o RT-Q-PCR.

55

60

Otra realización preferida de la invención se refiere al método de identificación del tropismo del VIH de un paciente infectado, donde el virus VIH es VIH-1.

65

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra “comprende” y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Las siguientes figuras y ejemplos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

Descripción de las figuras

Con la intención de complementar la descripción que se ha llevado a cabo, así como de ayudar a un mejor entendimiento de las características de la invención, de acuerdo con algunos ejemplos realizados, se muestran aquí, con carácter ilustrativo y no limitante, las siguientes figuras:

Fig. 1. Muestra la dinámica viral durante los cocultivos.

La línea horizontal gris representa el umbral de los cultivos positivos ($>10^6$ copias de RNA/mL). Las líneas verticales grises muestran los cultivos positivos y la frecuencia acumulada después de 7, 14, 21 y 31 días de cultivo. Las líneas negras representan la producción viral de cada paciente. Algunos cultivos fueron parados si la concentración de virus sobrepasaba al menos en dos medidas consecutivas el valor de 10^6 copias de RNA/mL.

Ejemplos

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos ilustrativos y de carácter no limitante, realizados por los inventores que describen el método de identificación del tropismo del virus VIH en un paciente infectado con dicho virus. En adelante, para hacer referencia al método de la presente invención se puede usar el término TROCAI, de las siglas en inglés *Tropism Correceptor Assay Information*.

Ejemplo 1

Determinación del uso del correceptor de VIH-1

Los ensayos se llevaron a cabo en el Servicio de Enfermedades Infecciosas del Hospital universitario Virgen del Rocío (Sevilla, España). Hasta el 1 de Octubre de 2009, se incluyeron cuarenta y cuatro pacientes en el MCT y treinta y tres tenían muestras de células mononucleares de la sangre periférica (PBMC) disponibles para ensayar TROCAI. Los criterios de inclusión fueron, de manera breve: a) carga vírica detectable persistentemente (> 40 copias/ml de RNA de VIH) durante los últimos 6 meses; b) sin modificación de HAART en los últimos 6 meses; c) sin reintroducción de HAART en pacientes bajo interrupción previa supervisada del tratamiento (STI); d) sin tratamiento previo con antagonistas del receptor CCR5; e) opciones terapéuticas futuras disponibles además de MRV.

Se midió el RNA de VIH-1 en muestras de plasma reciente de los pacientes y en muestras congeladas de sobrenadantes libres de células mediante la PCR cuantitativa (*COBAS Ampliprep/COBAS Taqman HIV-1 test, Roche molecular systems, Basilea, Suiza*) según las instrucciones del fabricante.

La determinación del uso del correceptor utilizado por el virus VIH-1 se llevó a cabo por medio de las siguientes aproximaciones:

1.1. *MCT*: Los pacientes comenzaron una exposición de 8 días a MRV y la respuesta se consideró positiva si se conseguía una reducción significativa en la carga vírica, definida como una reducción $\geq 1 \log_{10}$ copias/ml de RNA de VIH, o una carga vírica no detectable (< 40 copias/ml de RNA de VIH) en el día 8.

1.2. *TROFILE[®](ES)*: Se ensayaron los virus en circulación a partir de muestras de plasma con más de 1000 copias/ml de RNA de VIH según las instrucciones del fabricante (Whitcomb *et al.*, 2007. *Antimicrob Agents Chemother.*, 51: 566-575) usando el ensayo de entrada de VIH *PhenoSense* para el tropismo del correceptor (*Monogram Biosciences Inc., South San Francisco, CA*). Esta nueva versión de *TROFILE[®]* reivindica tener mayor sensibilidad detectando un 0,3% de las cepas X4 (Reeves *et al.*, 2009. *J Viral Entry*, 3: 94-102).

1.3. *Procedimientos genotípicos*: Se llevó a cabo la amplificación y secuenciación del bucle v3 según se ha descrito anteriormente (Vallejo *et al.*, 2006. *Viral Immunol.*, 19: 759-767). A continuación se interpretaron las secuencias V3 generadas usando 4 predictores genotípicos bioinformáticos diferentes del tropismo (PSSM, *Geno2Pheno*, C4.5 y SVM) según se ha informado anteriormente (Chueca *et al.*, 2009. *J Med Virol.*, 81: 763-767) que están disponibles de manera pública en 3 sitios Web: *geno2pheno* está disponible en <http://coreceptor.bioinf.mpi-inf.mpg.de/index.php>; PSSM está disponible en http://fortinbras.us/cgi-bin/fssm/f_ssm.pl, y C4.5 y SVM, están disponibles en <http://genomiac2.ucsd.edu:8080/wetcat/tropism.html>. En todos los casos, se clasificaron las variantes de VIH-1 como R5 o trópica Doble/Mixto (D/M); incluyendo la última los virus X4 puros y doble/mixtos. Cuando dos o más predictores genotípicos obtuvieron un resultado D/M, se consideró el tropismo como D/M.

1.4. *TROCAI*: TROCAI está basado en la producción de aislados víricos procedentes de pacientes mediante una modificación de una técnica de cultivo simultáneo, y múltiples rondas de infección de células indicadoras.

TROCAI consiste en dos etapas principales:

1.4.1. Aislamiento primario de VIH-1

5 Células PBMC congeladas de los pacientes justo antes de la administración de MRV se cultivaron simultáneamente (cocultivo) con PBMC de donantes no infectados con VIH y se estimularon con fitohemaglutinina (PHA; *Boehringer Ingelheim*). Dicha estimulación se llevó a cabo durante 3 días previos al cocultivo a una concentración de 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, en cantidades iguales para ambos tipos de células. Se cultivaron las células en medios RPMI-1640 (*Biochrom AG*) suplementados con suero de ternera fetal al 10% (FCS) (FCS, *Biochrom AG*), 20 U/ml de IL-2 (*R&D Systems*), glutamina
10 20 mM, estreptomycin 20 mM y penicilina 20 mM (*Sigma Aldrich*). La mayor parte de los cultivos se mantuvieron durante 3 semanas y se cosecharon los sobrenadantes libres de células tres veces a la semana y se almacenaron a -80°C . Se alimentaron los cultivos una vez a la semana con PBMC donantes no infectadas con VIH estimuladas con PHA.

15 Los cultivos se consideraron positivos si al menos dos medidas consecutivas de la carga vírica fueron $> 10^6$ copias/ml de RNA de VIH. Se usó el primer sobrenadante libre de células con carga vírica de VIH superior a este valor para los ensayos adicionales de infección. En algunos pacientes con carga vírica en plasma inferior a 1000 copias/ml de RNA de VIH-1, las células T CD8⁺ se deplecionaron (se eliminaron) de las células PBMCs, tanto infectadas como no infectadas, utilizando separación con bolitas magnéticas (*Miltenyi Biotec, Auburn EE.UU*) para favorecer la replicación vírica.
20

1.4.2. Determinación del tropismo de VIH-1

Se determinó el tropismo usando líneas celulares U87 (U87-CD4⁺CCR5⁺ y U87-CD4⁺CXCR4⁺) cultivadas en
25 Medio *Eagle* modificado por Dulbecco (DMEM con alto contenido en glucosa, *PAA Laboratories, Alemania*) suplementado con suero de ternera fetal al 5% (FCS, *Biochrom AG*), glutamina 20 mM, estreptomycin y penicilina (*Sigma Aldrich*), 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de Puomicina y 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de Geneticina G418 (*Sigma*).

30 Se infectaron las líneas de células U87 con 10^6 copias/ml de RNA de VIH del sobrenadante vírico libre de células durante la noche. Se cambió el medio en el día 3 y se ensayó para las copias/ml del RNA de VIH-1 en el día 6. Se usó espinoculación para aumentar la adsorción vírica en la membrana celular sin afectar la entrada vírica (Ruiz-Mateos *et al.*, 2008. *J Virol.*, 82: 4751-4761) cuando fue necesario.

35 De esta manera, las medidas de copias/ml de RNA de VIH en el sobrenadante de los cultivos de las líneas celulares X4 y R5 mostraron el tropismo de los aislados víricos procedentes de los pacientes. Se presentaron también los resultados en forma de proporción de aislados víricos usando el correceptor X4 o R5. Se usó la cepa NL4.3 del virus trópico X4 y la cepa BaL del virus trópico R5 como controles positivos. El resultado final se obtuvo entre 10 y 30 días tras recoger la muestra del paciente.

40 Los análisis estadísticos se llevaron a cabo usando el Paquete Estadístico del software *Social Sciences* (SPSS 16.0, Inc, Chicago, EE.UU). Se analizaron las diferencias entre grupos con la prueba U de *Mann-Whitney* para las variables continuas y con el test de la Chi cuadrado para las variables categóricas. Todas las variables continuas se expresaron en forma de promedio (intervalo intercuartil [IQR]) y las variables categóricas en forma de porcentaje. Todas las diferencias con un $p < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativas.
45

Ejemplo 2

Aplicación y validación del método TROCAI

50 2.1. Producción vírica en cultivos simultáneos de células PBMCs

En la Tabla 2 se muestran los valores iniciales característicos de los pacientes.

55

60

65

TABLA 2

Valores iniciales característicos de los pacientes (n=33)

5	Edad (años)	42,1 (32,5 - 45,4)
	Sexo masculino (%)	23 (69,7)
10	Coinfección HCV ^a (%)	13 (39,4)
	CD4 ⁺ (células/mm ³)	223 (112 – 365)
15	Grupo de riesgo	
	IDU ^b (%)	19 (57,6)
	Sexual (%)	7 (21,3)
20	Vertical (%)	5 (15,2)
	Blood transfusion (%)	2 (6,1)
25	Sujetos con SIDA ^c (%)	17 (51,5)

Los valores diferentes de n (%) está expresados como mediana (Rango intercuartil [IQR]), ^aPCR positivo para virus hepatitis C, ^bIDU: Usuarios drogas intravenosas, ^cEstado C o <200 CD4/mm³.

En la Fig. 1 se muestra la producción vírica. Se puede observar que 30/33 (90,9%) cultivos fueron positivos antes de un mes. Se obtuvieron cultivos positivos en 27/27 (100%) de los pacientes con cargas víricas superiores a 500 copias/ml de RNA de VIH y en 3/6 (50%) de los pacientes con cargas víricas inferiores a 500 copias/ml de RNA de VIH. En los nueve cultivos procedentes de pacientes con cargas víricas inferiores a 1000 copias/ml de RNA de VIH, los dos primeros fueron positivos sin depleción de las células T CD8⁺ pero los dos siguientes fueron negativos, de tal manera que los autores llevaron a cabo la depleción de las células T CD8⁺ en estos dos, obteniendo cultivos positivos en ambos. En los siguientes cinco cultivos se deplecionaron las células T CD8⁺, volviéndose positivos dos de ellos y permaneciendo negativos los otros tres, cuyas cargas víricas fueron inferiores a 500 copias/ml de RNA de VIH. Por tanto, se realizó depleción de células T CD8⁺ en 7/9 pacientes con cargas víricas < 1000 copias/ml de RNA de VIH, recuperando 4/7 (57%) de los mismos. Mencionar que los pacientes con recuentos bajos de células T CD4⁺ y/o cargas víricas elevadas se asociaron con cultivos positivos en el día 7 (p<0,05 y p<0,001, respectivamente, prueba U de Mann-Whitney).

2.2. Interpretación y clasificación de TROCAI mediante comparación con el test clínico de Maraviroc (MCT)

Se usó el test MCT para clasificar los resultados de TROCAI, con el fin de conocer la proporción de virus X4 en el sobrenadante de la línea celular U87 que se asoció con una respuesta negativa en pacientes en exposición a MRV a corto plazo. Según se muestra en la tabla 3, todos los pacientes con un MCT positivo mostraron un resultado en TROCAI ≤ 0,41% de cepas X4, y se clasificaron como R5. Todos los pacientes con un MCT negativo mostraron un resultado en TROCAI ≥ 0,6% de cepas X4, y se clasificaron como D/M. Además de esto, todos los pacientes con un MCT positivo mostraron ≤ 2,52 x 10³ copias/ml en el sobrenadante de las células U87-CD4⁺CXCR4⁺ y todos los pacientes negativos a MCT, excepto el paciente 24, mostraron ≥ 5,91 x 10⁴ copias/ml en el sobrenadante de las células U87-CD4⁺CXCR4⁺. El paciente 24 mostró únicamente 1,28 x 10³ copias/ml en el sobrenadante de las células U87-CD4⁺CXCR4⁺, atendiendo sin embargo a la proporción de X4/R5, este paciente fue clasificado como D/M mediante TROCAI.

De manera interesante, la producción de virus en cultivo procedente del paciente 24 alcanzó únicamente 2,98 x 10⁵ copias/ml de RNA de VIH y esta cantidad de virus no fue suficiente para infectar las líneas de células U87. Por tanto, los autores ensayaron una nueva estrategia para infectar las líneas de células U87 consistente en la espinoculación, según se ha descrito anteriormente. Como control, los autores llevaron a cabo la espinoculación en otro paciente con cultivo positivo, obteniendo el mismo porcentaje de cepas X4 y R5 con y sin espinoculación.

TABLA 3
Resultados del método TROCAI

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Pac	MCT	TROCAI					Tropism	Trofile®	Genot.	CV
		CV U87- X4	CV U87- R5	% X4	% R5	o				
1	+	0	9,28x10 ⁶	0	100	R5	R5	R5	421000	
2	+	0	4,31x10 ⁶	0	100	R5	R5	R5	7350	
3	+	0	1,27x10 ⁴	0	100	R5	R5	R5	16100	
4	+	0	5,23x10 ⁴	0	100	R5	R5	R5	28000	
5	+	0	5,68x10 ⁶	0	100	R5	D/M	R5	15500	
6	+	0	5,53x10 ⁷	0	100	R5	—	N.M.	810	
7	+	0	3,49x10 ⁴	0	100	R5	—	R5	496	
8	+	2,19x10 ²	4,61x10 ⁷	0	100	R5	R5	R5	114000	
9	+	4,38x10 ²	1,00x10 ⁹	0	100	R5	R5	N.M.	1660	
10	+	5,17x10 ²	3,90x10 ⁷	0	100	R5	R5	R5	10500	
11	+	6,87x10 ²	2,53x10 ⁷	0	100	R5	—	R5	835	
12	+	7,06x10 ²	7,19x10 ⁸	0	100	R5	R5	R5	22500	
13	+	1,62x10 ³	7,50x10 ⁷	0	100	R5	R5	R5	47000	
14	+	1,99x10 ³	6,41x10 ⁷	0	100	R5	R5	R5	14100	
15	+	2,52x10 ³	2,43x10 ⁷	0,01	99,99	R5	—	R5	437	

	16	+	1,05x10 ²	4,76x10 ⁵	0,02	99,98	R5	R5	R5	50900
5	17	+	9,40x10 ²	1,89x10 ⁶	0,05	99,95	R5	R5	R5	167000
	18	+	7,94x10 ²	6,75x10 ⁵	0,12	99,88	R5	R5	N.A.	6060
	19	+	1,55x10 ³	3,75x10 ⁵	0,41	99,59	R5	R5	R5	42700
10	20	+	—	—	—	—	C. N.	—	R5	457
	21	+	—	—	—	—	C. N.	—	N.A.	294
	22	+	—	—	—	—	C. N.	—	N.A.	87
15	23	-	5,91x10 ⁴	9,81x10 ⁶	0,6	99,4	D/M	D/M	D/M	32900
	24	-	1,28x10 ³	1,64x10 ⁵	0,77	99,23	D/M	—	D/M	827
20	25	-	2,70x10 ⁷	1,11x10 ⁹	2,37	97,63	D/M	R5	D/M	40000
	26	-	7,47x10 ⁵	2,75x10 ⁷	2,65	97,35	D/M	D/M	D/M	192000
										100000
25	27	-	2,21x10 ⁵	2,89x10 ⁶	7,1	92,9	D/M	D/M	R5	0
	28	-	1,49x10 ⁶	6,20x10 ⁶	19,38	80,62	D/M	D/M	R5	74300
	29	-	7,98x10 ⁶	1,84x10 ⁶	81,26	18,74	D/M	D/M	R5	33000
30	30	-	4,12x10 ⁶	6,67x10 ⁵	86,07	13,93	D/M	D/M	D/M	5110
	31	-	3,36x10 ⁶	1,95x10 ⁴	99,42	0,57	D/M	—	N.A.	271
	32	-	1,44x10 ⁸	4,69x10 ⁶	96,85	3,15	D/M	D/M	D/M	147000
35	33	-	5,05x10 ⁷	6,37x10 ⁵	98,75	1,25	D/M	D/M	R5	306000

40 Pac, n° paciente; MCT, Test clínico Maraviroc; VL U87-X4, carga vírica (copias RNA VIH/mL) en sobrenadante de células U87-CD4⁺CXCR4⁺; VL U87-R5, carga vírica (copias RNA VIH/mL) en sobrenadante de células U87-CD4⁺CCR5⁺; C. N., cultivo negativo; N.M., no muestra; N.A., No amplificable; Las no coincidencias entre las predicciones de los tropismos se muestran en negrita.

45 2.3. Correlación entre los resultados del método TROCAI, TROFILE®(ES) y el análisis genotípico

2.3.1. TROCAI- TROFILE®(ES)

50 TROFILE®(ES) produjo resultados en 24/33 (72,7%). Todos los pacientes sin resultados de TROFILE®(ES) tenían cargas víricas inferiores a 1000 copias/ml de RNA de VIH de las que no se puede dar cuenta eficazmente mediante el ensayo TROFILE® (Whitcomb *et al.*, 2007. *Antimicrob Agents Chemother.*, 51: 566-575). Se observó una concordancia global de 22/24 (91,6%) entre TROCAI y TROFILE®(ES). Se encontraron dos resultados no concordantes (pacientes 5 y 25). Se informó del paciente 5 como D/M 5 según TROFILE®(ES) pero fue positivo para MCT y TROCAI mostró un resultado consistente en el 100% de cepas R5. Por otra parte, se informó del paciente 25 como R5 según TROFILE®(ES), pero fue negativo para MCT y TROCAI mostró un resultado de 2,4% de cepas X4 y 97,6% de cepas R5.

60 2.3.2. TROCAI - GENOTIPO

Los enfoques genotípicos produjeron resultados en 27/33 (81,8%) pacientes debido a que no se pudo amplificar el bucle V3 de 4 pacientes y 5 no se dispuso de muestras de otros 2 pacientes. Se informó de una concordancia global de 22/26 (84,6%) entre TROCAI y el genotipo en las muestras de suero disponibles de los pacientes.

65 Al ensayar los cuatro algoritmos por separado, se encontró la correlación mayor con TROCAI en *Geno2Pheno* (88,5%), seguida por PSSM (80,8%), a continuación por SVM (80,8%) y la menor en C4.5 (76,9%) (Tabla 4).

TABLA 4

Predicciones del tipo de tropismo según las cuatro aproximaciones genotípicas

	<i>Pac</i>	<i>Muestra</i>	<i>G2P</i>	<i>PSSM</i>	<i>SVM</i>	<i>C4.5</i>	<i>MCT</i>	<i>TROCAI</i>
5	1	Suero	CCR5	CCR5	D/M	CCR5	+	R5
10	2	Suero	CCR5	CCR5	CCR5	CCR5	+	R5
		V-Iso	D/M	D/M	D/M	CCR5	+	R5
	3	Suero	CCR5	CCR5	CCR5	CCR5	+	R5
15		V-Iso	CCR5	CCR5	CCR5	CCR5	+	R5
		P-DNA	CCR5	CCR5	CCR5	CCR5	+	R5
20	4	Suero	CCR5	CCR5	CCR5	CCR5	+	R5
		V-Iso	CCR5	CCR5	CCR5	CCR5	+	R5
		P-DNA	CCR5	CCR5	D/M	CCR5	+	R5
25	5	Suero	CCR5	CCR5	CCR5	CCR5	+	R5
		V-Iso	CCR5	CCR5	CCR5	CCR5	+	R5
		P-DNA	CCR5	CCR5	CCR5	CCR5	+	R5
30	6	Suero		NO MUESTRA			+	R5
	7	Suero	CCR5	CCR5	CCR5	CCR5	+	R5
	8	Suero	CCR5	CCR5	CCR5	CCR5	+	R5
35	9	Suero		NO MUESTRA			+	R5
	10	Suero	CCR5	CCR5	CCR5	CCR5	+	R5
40	11	Suero	D/M	CCR5	CCR5	CCR5	+	R5
	12	Suero	CCR5	D/M	CCR5	CCR5	+	R5
	13	Suero	CCR5	CCR5	CCR5	CCR5	+	R5
45		P-DNA	CCR5	CCR5	CCR5	CCR5	+	R5
	14	Suero	CCR5	CCR5	CCR5	CCR5	+	R5
	15	Suero	CCR5	CCR5	CCR5	CCR5	+	R5
50		P-DNA	CCR5	CCR5	CCR5	CCR5	+	R5
	16	Serum	CCR5	CCR5	CCR5	CCR5	+	R5
	17	Suero	CCR5	CCR5	CCR5	CCR5	+	R5
55	18	Suero		NO AMPLIFICADO			+	R5
	19	Suero	CCR5	CCR5	CCR5	CCR5	+	R5
60	20	Suero	CCR5	CCR5	CCR5	CCR5	+	N.D.
	21	Suero		NO AMPLIFICADO			+	N.D.
	22	Suero		NO AMPLIFICADO			+	N.D.
65	23	Suero	D/M	D/M	D/M	D/M	-	D/M
	24	Suero	D/M	D/M	D/M	CCR5	-	D/M

	25	Suero	D/M	D/M	D/M	D/M	-	D/M
5	26	Suero	D/M	D/M	CCR5	CCR5	-	D/M
		V-Iso	D/M	D/M	CCR5	CCR5	-	D/M
		P-DNA	D/M	D/M	CCR5	CCR5	-	D/M
10	27	Suero	CCR5	CCR5	CCR5	CCR5	-	D/M
		V-Iso	CCR5	CCR5	CCR5	CCR5	-	D/M
15		P-DNA	D/M	D/M	CCR5	CCR5	-	D/M
	28	Suero	CCR5	CCR5	D/M	CCR5	-	D/M
		V-Iso	CCR5	CCR5	CCR5	CCR5	-	D/M
20	29	Suero	D/M	CCR5	CCR5	CCR5	-	D/M
	30	Suero	D/M	D/M	D/M	D/M	-	D/M
25		P-DNA	D/M	D/M	D/M	D/M	-	D/M
	31	Suero	NO AMPLIFICADO				-	D/M
	32	Suero	D/M	D/M	D/M	D/M	-	D/M
30	33	Suero	D/M	CCR5	CCR5	CCR5	-	D/M

35 Pac, n° paciente. G2P, algoritmo Geno2Pheno. SM, algoritmo PSSM. C4.5, algoritmo C4.5. SVM, algoritmo SVM. MCT, Test clínico Maraviroc. V-Iso, aislado vírico. P-DNA, DNA provírico. N.D., no disponible.

40 Para explorar posibles cambios de tropismo entre el suero, los aislados víricos y el DNA provírico, se llevó a cabo también el análisis del genotipo en estas tres condiciones en diez pacientes con muestras disponibles. De manera interesante, se encontró el mismo resultado de tropismo en la mayor parte de las muestras a pesar del hallazgo de algunos cambios en la secuencia de aminoácidos (aa) con un cambio promedio de 2.1 aa por secuencia entre el suero y el DNA provírico. Los autores encontraron discordancias entre las muestras en 2/10 pacientes. En el paciente 27, el resultado del genotipo del suero y los aislados víricos fue R5, concordante con TROCAI, pero en el DNA provírico el resultado se consideró D/M. En el paciente 2, informado como R5 por TROCAI, el genotipo fue concordante con TROCAI en el suero pero no en los aislados víricos, obteniendo un resultado D/M.

2.4. Evolución del tropismo viral durante la producción de aislados víricos

50 Una importante preocupación sería que la evolución vírica durante los ciclos de infección múltiples para la producción de aislados víricos pudiera producir un artefacto en el tropismo de VIH (Trouplin *et al.*, 2001. *J Virol.*, 75: 251-259). Para clarificar este punto los autores repitieron TROCAI en tres aislados víricos, procedentes del mismo paciente, con una producción vírica retardada, obtenidos en tres días consecutivos de cultivo simultáneo (días 26, 28 y 31). El resultado de TROCAI fue similar en todos ellos, aumentando gradualmente la cantidad de virus encontrado en el sobrenadante de ambas líneas celulares, X4 y R5, pero sin cambios en la proporción de las variantes del virus X4/R5 (Tabla 5).

60

65

TABLA 5

Resultados de TROCAI en relación con la evolución del virus durante el cocultivo

<i>Pac</i>	<i>Día</i>	<i>CV U87- X4</i>	<i>CV U87- R5</i>	<i>% X4</i>	<i>% R5</i>	<i>TROCAI</i>
11	26	6,87x10 ²	2,53x10 ⁷	0,00	100,00	R5
11	28	2,62x10 ³	2,25x10 ⁷	0,01	99,99	R5
11	31	4,18x10 ⁴	1,00x10 ⁹	0,00	100,00	R5

Pac, n° paciente. VL U87-X4, carga vírica (copias RNA VIH/mL) en sobrenadante de células U87-CD4+CXCR4+; VL U87-R5, carga vírica (copias RNA VIH/mL) en sobrenadante de células U87-CD4+CCR5+. Día, días de cocultivo; R5, Virus de tropismo CCR5.

Conclusiones de los resultados obtenidos

Los resultados de este estudio muestran que TROCAI es un ensayo adicional para evaluar el tropismo de VIH para decidir la indicación potencial de antagonistas CCR5.

El test clínico MCT proporcionó una posibilidad única para explorar la proporción de virus X4 en el sobrenadante de la línea celular U87 asociada con la respuesta a una exposición a corto plazo a MRV. Con objeto de clasificación, los sujetos con variantes de virus con tropismo X4 > 0,5% se clasificaron como D/M según TROCAI. Los resultados obtenidos según TROCAI mostraron que los pacientes con un MCT positivo tuvieron una proporción de virus R5 en la línea celular U87-CD4⁺ CCR5⁺ entre 99,6-100%. Sin embargo, en pacientes con un MCT negativo, la cantidad de virus encontrado en el sobrenadante de la línea celular X4 es bastante heterogénea oscilando entre 0,6-99,4%. Esto significa que los pacientes que tienen una cantidad muy baja de virus con tropismo X4, no responden a MRV. Esta baja cantidad de virus podría detectarse eficazmente en la línea celular U87-CD4⁺ CXCR4⁺ según la valoración de los autores, atribuible al límite de detección de la PCR cuantitativa. Las razones por las cuales, en el TROCAI, los pacientes con una cantidad muy baja de cepas X4 en el sobrenadante de la línea celular (incluso menos de un 1%) no responden a la exposición a MRV son desconocidas y requieren estudios adicionales.

En la presente invención, la concordancia global entre TROCAI y Trofile®(ES) fue de 22/24 (91,6%). Únicamente se encontraron dos resultados discordantes según TROCAI (paciente 5 y 25) y ambos fueron concordantes con MCT y con los enfoques genotípicos.

Estudios recientes de comparación entre TROFILE® y diferentes valoraciones fenotípicas mostraron correlaciones similares que TROCAI con número similar de pacientes (Hosoya *et al.*, 2009. *J Clin Microbiol.*, Jun 3) sin aumentar la capacidad de detectar la presencia de virus que usan CXCR4 en comparación con TROCAI.

Las correlaciones encontradas con algoritmos bioinformáticos en la presente invención, son similares a las de otros estudios (Low *et al.*, 2007. *AIDS*, 21: F17-24; Raymond *et al.*, 2008. *AIDS*, 22(14): F11-16). En 8/10 (80%) de los pacientes genotipados en suero, DNA provírico y aislados víricos, se predijo el mismo tropismo. Esto está de acuerdo con la noción de ausencia de diferencias en el tropismo entre diferentes fuentes víricas. Sin embargo, en los pacientes 2 y 27, los algoritmos fueron discordantes.

Es necesario mencionar que TROCAI aumenta el número de resultados positivos un 18,2% en comparación con TROFILE®(ES) (90,9% frente a 72,7%), incluyendo los pacientes con cargas víricas inferiores a 1000 copias/ml de RNA de VIH, que no se pueden informar eficazmente mediante la valoración de Trofile® según las instrucciones del fabricante (Whitcomb *et al.*, 2007. *Antimicrob Agents Chemother.*, 51: 556-575). También es necesario señalar que 26/30 (86,6%) de los resultados de TROCAI se obtuvieron en menos de tres semanas a partir del muestreo. El índice de 90,9% de cultivos positivos usando PBMC congeladas fue mayor de lo que se informa en trabajos recientes (52%) (Hosoya *et al.*, 2009. *J Clin Microbiol.*, Jun 3) que usaron también PBMC congeladas y que otros estudios que usaron sangre fresca (66,4%) (Demeter *et al.*, 2002. *J Clin Microbiol.*, 40: 2089-2094).

Únicamente 5/33 cultivos fueron negativos tras tres semanas de tal manera que los autores mantuvieron estos cultivos dos semanas más, recuperando dos de ellos. Tal como los autores han mostrado en el paciente 24, la espinoculación es una herramienta de interés en situaciones de bajos niveles de producción vírica.

Los resultados obtenidos con TROCAI no parecen indicar adaptación de las cuasiespecies al nuevo ambiente (tabla 4). Este resultado apoya la noción de que múltiples ciclos de infección no cambian el tropismo del virus, al menos durante este periodo de tiempo. Además, este resultado es importante debido a que sugiere que la proporción de virus X4/R5 es más fiable para dar un resultado de tropismo mediante TROCAI que las copias/ml de RNA de VIH encontradas en los sobrenadantes de la línea celular U87-CD4⁺CXCR4⁺.

En resumen, con el método TROCAI de la presente invención, se demuestra que el 100% de los casos estudiados tiene una clara correlación entre los porcentajes obtenidos por TROCAI y la respuesta virológica a una exposición a corto plazo a MRV, sin ningún desemparejamiento entre ellos. Adicionalmente, los resultados obtenidos por este ensayo son muy concordantes con TROFILE[®](ES) y los enfoques genotípicos. Los procedimientos de cultivo celular usados en el método TROCAI son más accesibles, fáciles y económicos, que los procedimientos moleculares.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Método de identificación del tropismo del virus VIH en un paciente infectado con dicho virus que comprende:

- a) Cocultivar células aisladas mononucleares de sangre periférica (PBMCs) de un paciente infectado con el virus VIH y PBMCs de un sujeto control sano, donde las células PBMCs CD8 positivas del paciente infectado con VIH y/o del sujeto control sano han sido previamente eliminadas de manera selectiva,
- b) obtener las partículas virales infectivas liberadas al medio en el que se cocultivan las células del paso (a),
- c) inocular mediante espinoculación las partículas virales, obtenidas en el paso (b), a al menos dos líneas celulares humanas aisladas CD4 positivas, donde una de ellas expresa el correceptor CCR5, pero no expresa el correceptor CXCR4 (células CD4+/CCR5+/CXCR4-) y la otra expresa el correceptor CXCR4, pero no expresa el correceptor CCR5 (células CD4+/CCR5- /CXCR4+),
- d) cultivar las líneas celulares inoculadas en el paso (c) de manera independiente, y en condiciones apropiadas para la infección viral, y
- e) determinar la concentración de las partículas virales liberadas al medio de cultivo de las células CD4+/CCR5+/CXCR4- y/o al de las células CD4+/CCR5-/CXCR4+ cultivadas en el paso (d), para la determinación del tropismo viral mediante la cuantificación de la proporción de cuasiespecies víricas que utilizan uno u otro correceptor.

2. Método según la reivindicación 1, donde las células CD4+/CCR5+/CXCR4- y CD4+/CCR5-/CXCR4+ inoculadas en el paso (c) se cultivan durante un tiempo de entre 5 y 7 días.

3. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, donde las células PBMCs del paciente infectado con el virus VIH proceden de un paciente con una carga vírica plasmática menor o igual a 10^3 copias de RNA del virus VIH por mL.

4. Método según la reivindicación 3, donde las células PBMCs del paciente infectado con el virus VIH proceden de un paciente con una carga vírica plasmática menor o igual a 500 copias de RNA del virus VIH por mL.

5. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde se añade al menos una proteína lectina a las células PBMCs del paciente infectado y/o a las células PBMCs del sujeto control sano del paso (a), en el cocultivo y/o previamente a dicho cocultivo.

6. Método según la reivindicación 5, donde la lectina es fitohematoglutina.

7. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde el porcentaje de células PBMCs del sujeto control sano al inicio del cocultivo del paso (a) es de entre 25 y 75% respecto del total de células PBMCs.

8. Método según la reivindicación 7, donde dicho porcentaje es de entre 50 y 75%.

9. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, donde la cantidad total de células PBMCs en el cocultivo del paso (a) es de entre 15×10^6 y 20×10^3 .

10. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, donde el medio de cultivo de las células CD4+/CCR5+/CXCR4- y/o el de las células CD4+/CCR5-/CXCR4+ del paso (d) se renueva tras un periodo de tiempo de entre 2 y 4 días desde la inoculación del virus.

11. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, donde las células humanas CD4+/CCR5+/CXCR4- y CD4+/CCR5-/CXCR4+ son de la línea celular de astrocitoma U87.

12. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, para determinar el tropismo del virus VIH de un paciente infectado con el objeto de conocer si dicho paciente es tributario a un tratamiento con al menos un antagonista de CCR5.

13. Método según la reivindicación 12, donde el antagonista de CCR5 es Maraviroc.

14. Método según cualquiera de las reivindicaciones 12 ó 13, donde el paciente tributario tiene tropismo viral R5 si la concentración de copias de las partículas virales liberadas de las células CD4+/CCR5-/CXCR4+ es menor de 0,5% respecto del número total de copias de las partículas virales liberadas de las células CD4+/CCR5-/CXCR4+ y CD4+/CCR5+/CXCR4-.

15. Método según la reivindicación 14, donde la concentración de copias de partículas virales liberadas de las células CD4+/CCR5-/CXCR4+ es menor de 3×10^3 copias de RNA del virus VIH por mL.

5 16. Método según cualquiera de las reivindicaciones 12 ó 13, donde el paciente tributario tiene tropismo viral dual si la concentración de copias de partículas virales liberadas de las células CD4+/CCR5-/CXCR4+ es igual o mayor de 0,5% respecto del número total de copias de las partículas virales liberadas de las células CD4+/CCR5-/CXCR4+ y CD4+/CCR5+/CXCR4-.

10 17. Método según la reivindicación 16, donde la concentración de copias de las partículas virales liberadas de las células CD4+/CCR5-/CXCR4+ es igual o mayor de $5,5 \times 10^4$ copias de RNA del virus VIH por mL.

18. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, donde las células PBMCs se han congelado junto con un criopreservante previamente al cocultivo del paso (a).

15 19. Método según la reivindicación 18, donde el criopreservante comprende suero bovino fetal y dimetil sulfóxido.

20 20. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19, donde la cuantificación de la proporción de cuasiespecies víricas que utilizan uno u otro correceptor del paso (e), se lleva a cabo mediante PCR cuantitativa.

21. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20, donde el virus VIH es VIH-1.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

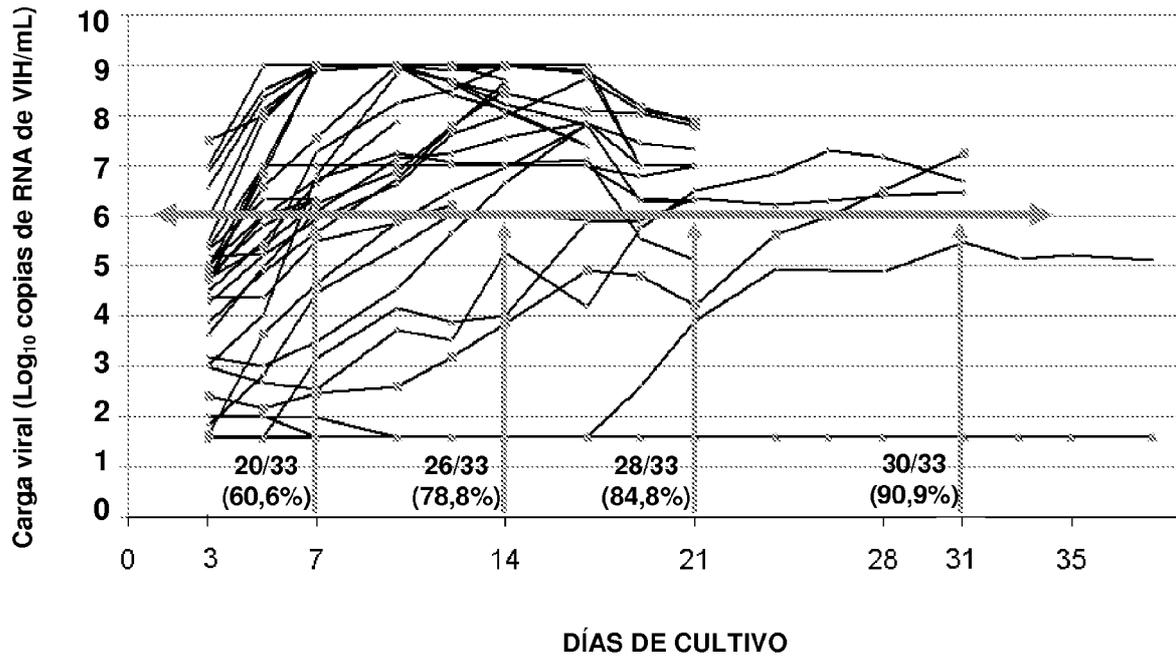


FIG. 1



21 N.º solicitud: 200931309

22 Fecha de presentación de la solicitud: 30.12.2009

32 Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

51 Int. Cl.: **C12Q1/68** (01.01.2006)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	GENEBAT M. et al. Correlation between the Trofile [®] test and virological response to a short-term maraviroc exposure in HIV-infected patients. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 11.08.2009, Vol. 64, páginas 845-849, todo el documento.	1-21
A	WHITCOMB J. M. et al. Development and characterization of a novel single-cycle recombinant-virus assay to determine Human Immunodeficiency Virus Type 1 coreceptor tropism. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 02.2007, Vol. 51, N ^º 2, páginas 566-575, todo el documento.	1-21
A	POLES M. A. et al. A preponderance of CCR5+ CXCR4+ mononuclear cells enhances gastrointestinal mucosal susceptibility to Human Immunodeficiency Virus Type 1 infection. Journal of Virology, 09. 2001, Vol. 75, No. 18, páginas 8390–8399, todo el documento.	1-21
A	SKRABAL K. et al. Determining Human Immunodeficiency Virus coreceptor use in a clinical setting: degree of correlation between two phenotypic assays and a bioinformatic model. Journal of Clinical Microbiology, 02. 2007, Vol. 45, No. 2, páginas 279–284, todo el documento.	1-21
A	WEBER J. et al. HIV type 1 tropism and inhibitors of viral entry: clinical implications. AIDS Reviews. 2006, Vol. 8, páginas 60-77, todo el documento.	1-21

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

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

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

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

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

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

04.03.2011

Examinador

M. Cumbreño Galindo

Página

1/5

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12Q

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, BIOSIS, MEDLINE, NPL, EMBASE

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 04.03.2011

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-21	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones	SI
	Reivindicaciones 1-21	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Numero Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	GENEBAT M. et al. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. Vol. 64, páginas 845-849.	11.08.2009
D02	WHITCOMB J. M. et al. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Vol. 51, Nº 2, páginas 566-575.	02.2007
D03	POLES M. A. et al. Journal of Virology. Vol. 75, No. 18, páginas 8390-8399.	09.2001
D04	SKRABAL K. et al. Journal of Clinical Microbiology. Vol. 45, No. 2, páginas 279-284.	02.2007
D05	WEBER J. et al. AIDS Reviews. Vol. 8, páginas 60-77.	2006

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La presente invención tiene por objeto un método de identificación del tropismo del virus VIH en un paciente infectado con dicho virus que comprende:

- cocultivar PBMCs de un paciente infectado con el virus VIH y PBMCs de un sujeto sano donde las células CD8+ han sido previamente eliminadas
- obtener las partículas virales infectivas liberadas al medio en el que se cocultivan las células del paso a)
- inocular las partículas virales obtenidas en el paso b) a células CD4+/CCR5+/CXCR4- y a células CD4+/CCR5-/CXCR4+
- cultivar dichas líneas celulares de manera independiente
- determinar la concentración de partículas virales liberadas por tales líneas celulares en el paso d) para la determinación del tropismo viral mediante la cuantificación de la proporción de cuasiespecies víricas que utilizan uno u otro receptor (reivindicación 1)

Las células inoculadas en el paso c) se cultivan un tiempo entre 5 y 7 días, la carga viral del paciente ha de ser menor o igual a 1000 copias/ml y en el paso a) las células se cocultivan con fitohemaglutinina (reivindicaciones de la 2 a la 6). Además, el porcentaje de PBMCs del sujeto control debe ser entre 25 y 75%, las células humanas utilizadas son de la línea celular U87 y en función de la concentración de copias de las partículas virales liberadas al medio en el paso d) se determina el tropismo del virus mediante PCR cuantitativa (reivindicaciones de la 7 a la 21).

D01 tiene como objetivo correlacionar la respuesta vírica a una exposición a maraviroc a corto plazo (MCT) con Trofile[®], el cual es un método validado para determinar el tropismo del HIV. La concordancia entre ambos fue del 93.5% y, así mismo, se llevó a cabo un ensayo adicional fenotípico para determinar el tropismo en pacientes con discordancia entre MCT y Trofile[®]. En tal ensayo se cocultivan PBMCs de pacientes de HIV con fitohemaglutinina, HIV-HCV y PBMCs de individuos sanos, recogiendo el sobrenadante que es utilizado en el posterior ensayo de infección. El tropismo del virus aislado de los pacientes se determina usando células de la línea celular humana U87 (U87-CD4+CCR5+ y U87-CD4+CXCR4+) que son infectadas con los virus del sobrenadante previamente obtenido, manteniéndose 6 días en cultivo tras los cuales se mide el número de copias/ml de RNA mediante PCR cuantitativa, lo que permite concluir si el tropismo es X4, R5 o D/M. Para participar en el estudio se requiere, entre otros requisitos, presentar una carga viral superior a 50 copias/ml.

D02 describe un procedimiento automatizado y preciso para determinar el tropismo del HIV-1 y su validación para su uso rutinario en laboratorio. Para ello se generan pseudovirus HIV-1 utilizando los genes *env* a partir de los virus obtenidos de pacientes y después se determina su habilidad para infectar células CD4+/U87 que expresan bien el correceptor CXCR4, bien el correceptor CCR5. Los virus que sólo infectan las células CXCR4+/CD4+/U87 se designan como X4, mientras que los que infectan exclusivamente las células CCR5+/CD4+/U87 se designan como R5. Los virus capaces de infectar ambas se denominan D/M o duales. Para realizar este método se requiere una carga viral superior a 1000 copias/ml de plasma.

D03 expone que la mucosa gastrointestinal representa una diana especialmente susceptible al virus HIV-1 debido a su numerosa población de células CXCR4+ CCR5+. Entre los métodos utilizados para llevar a cabo el estudio, se realiza el aislamiento del virus a partir de sangre y biopsias de los pacientes que han de presentar una carga viral mayor a 5000 copias/ml. PBMCs de sujetos sanos resuspendidas a una densidad de 10⁶ células/ml son estimuladas con fitohemaglutinina y transferidas a pocillos que contienen PBMCs de pacientes infectados a una densidad de 10⁶ células/ml, recogiendo posteriormente el sobrenadante que contiene los aislados primarios del virus. El tropismo de estos aislados primarios se comprueba utilizando células de osteosarcoma humano transfectadas con CD4 humano solo o con CCR5 o CXCR4 y el posterior análisis de la fluorescencia emitida por la proteína GFP mediante citometría de flujo.

D04 compara el método Trofile para determinar el tropismo de HIV con el uso de virus aislados o virus recombinantes con capacidad de replicarse. Para ello se cocultiva PBMCs obtenidas de controles con PBMCs de individuos infectados y fitohemaglutinina, se recoge después el virus liberado al sobrenadante y se comprueba la capacidad que tiene de formar sincitios en células MT-2. Para analizar el tropismo también recurre al uso de virus recombinantes los cuales son inoculados en pocillos que contienen 0.2×10^6 células U87.CD4.CCR5 o la misma cantidad de células U87.CD4.CXCR4. El sobrenadante se recoge cada 3 ó 4 días y se analiza la producción de virus cuantificando el antígeno p24 mediante ELISA.

D05 expone que la exactitud en la determinación del tropismo del HIV es esencial a la hora de establecer un tratamiento farmacológico adecuado y resume los fundamentos de algunos de los métodos disponibles que pueden ser divididos en dos grupos: los basados en el aislamiento del virus y el uso de líneas celulares que expresan diferentes receptores y la utilización de virus recombinantes *env*. Así por ejemplo, se utilizan células MT-2 lo cual permite distinguir las variantes NSI y SI, líneas celulares como las de glioma humano (U87, U373, NP-2) que expresan CD4 y uno o más correceptores como CCR5 o CXCR4, etc. En la mayoría de los procedimientos se requiere al empleo de virus aislados de pacientes para lo cual se cocultivan PBMCs de los pacientes con PBMCs de controles estimuladas con fitohemaglutinina o anti-CD3/CD28. Entre los métodos que usan virus recombinantes *env* se encuentran Phenoscript™ o PhenoSense™.

NOVEDAD Y ACTIVIDAD INVENTIVA

D01 tiene como objetivo correlacionar la respuesta vírica a una exposición a maraviroc a corto plazo (MCT) con Trofile®, el cual es un método validado para determinar el tropismo del HIV. La concordancia entre ambos fue del 93.5% y, así mismo, se llevó a cabo un ensayo adicional fenotípico para determinar el tropismo en pacientes con discordancia entre MCT y Trofile®. En tal ensayo se cocultivan PBMCs de pacientes de HIV con fitohemaglutinina, HIV-HCV y PBMCs de individuos sanos, recogiendo el sobrenadante que es utilizado en el posterior ensayo de infección. El tropismo del virus aislado de los pacientes se determina usando células de la línea celular humana U87 (U87-CD4+CCR5+ y U87-CD4+CXCR4+) que son infectadas con los virus del sobrenadante previamente obtenido, manteniéndose 6 días en cultivo tras los cuales se mide el número de copias/ml de RNA mediante PCR cuantitativa, lo que permite concluir si el tropismo es X4, R5 o D/M. Para participar en el estudio se requiere, entre otros requisitos, presentar una carga viral superior a 50 copias/ml.

Además, es conocido en el estado de la técnica que para determinar el tropismo del HIV se utilicen virus aislados de pacientes para cuya obtención se cocultivan PBMCs de los pacientes con PBMCs de controles estimulados con fitohemaglutinina y que después con estos virus aislados se infecten células de líneas celulares humanas como U87 que expresan CD4 y uno o más coreceptores como CCR5 o CXCR4 (D02 a D05).

Por lo tanto, la reivindicaciones de la 1 a la 21 son nuevas pero no presentan actividad inventiva.