

# In vitro characterization of patient derived HIV-1 isolates

A dissertation submitted to the  
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZUERICH

for the degree of  
Doctor of Natural Sciences

presented by  
PETER RUSERT  
Dipl. mikrobio., University of Zuerich

born  
27.03.1971

citizen of  
Mogelsberg (SG)

accomplished at the  
University Hospital Zuerich  
Division of infectious diseases

accepted on the recommendation of  
PROF. DR. Sebastian Bonhoeffer, examiner  
PROF. DR. Hans Hengartner, co-examiner  
PROF. DR. Alexandra Trkola, co-examiner

2005

## Chapter 1

### 1.1 Research summary

During my thesis I focused on characterizing the infectious pool of HIV-1 virions derived from patient plasma and CD4 T lymphocytes. The overall objective of the project was to study virus determinants of plasma derived and cell associated viruses in patients at various stages of disease progression to derive directives for the development of future treatment and vaccine strategies.

The first aim of my studies was to develop a novel assay system that allows an accurate quantification of the pool of infectious virus particles in patient plasma. Previously rescue of infectious particles from plasma has proven to be extremely ineffective and failed often completely despite the presence of relatively high viral RNA copy numbers. Because of the very short viral half-life time in this compartment, virions in the plasma represent the most recently produced quasispecies. Therefore the analyses of this virus pool regarding its infectivity, sensitivity to entry inhibitors, and the characterization and evolution of their quasispecies is of particular interest. In the first part of my thesis I developed an assay that allows the efficient and sensitive quantification of the infectious viral load of patient plasma and the isolation of the plasma virus. The commonly used direct coculturing of patient plasma to infect cells has proven to be rather insensitive and hampered by cytostatic effects of the plasma on the target cells in in vitro culture. In the newly developed assay plasma virions are coupled to platelets as carrier membranes using the polycation Polybrene that crosslinks negatively charged molecules expressed on the viral and cell membranes. This crosslinking of HIV particles to platelets allows an easy and rapid capture of HIV from plasma. Consecutively the HIV loaded platelets are used to infect receptive target cells. The coupling of HIV to carrier membranes allows the cultivation of the virus in absence of plasma thus preventing its toxic effects in culture. Moreover, I found that HIV-1 immobilized to platelets has a 1-3 logs higher infectivity than free virus particles, contributing to the boosted sensitivity of this new method.

After evaluating the assay concerning its sensitivity, reproducibility and discrimination for viral phenotypes, I evaluated the infectivity of the plasma virus from 52 chronic patients. At viral loads between 1000 – 10 000 RNA copies/ml 18%, at 10 000 – 50 000 RNA copies/ml 73%, at 50 000 - 100 000 RNA copies/ml 90% and above 100 000 RNA copies/ml 96% of virus isolations and titrations from plasma were positive. The mean tissue culture infectious dose (TCID<sub>50</sub>) ranged from <2.29 to 417 per ml plasma. I found a strong correlation between the infectivity of the plasma and the viral load ( $r^2 = 0.4041$ ,  $P < 0.0001$ ) and the CD4 cell count ( $r^2 = 0.2694$ ,  $P < 0.0001$ ).

I next defined the biological phenotype regarding the replication pattern and coreceptor usage of these plasma derived viruses. Furthermore, the envelope sequence of quasispecies from plasma derived viruses was determined to define the spectrum of clones represented at a specific time point. These quasispecies sequences were then compared with the quasispecies repertoire of cell-associated virions derived from PBMC of the same patients. We found that viruses in plasma and cell-associated virus are related but that the latter as previously shown are more heterogenous. Altogether, I could

prove that the newly developed assay is highly sensitive and provides a new interesting tool to obtain insight in the interplay of antiviral molecules and HIV-1 in the plasma.

In the second part of my thesis I continued to characterize patient viruses derived at different disease stages this time with the emphasis on characterizing their sensitivity to entry inhibitors. Treatment strategies that include the newly developed class of entry inhibitors will likely shape HIV therapies of coming years. To best optimize the use of entry inhibitors, to evaluate their potency but also to estimate potential risks and failure, it is crucial to examine their effect on viruses derived both during early and later disease stages. In this project aim I studied the effect of entry inhibitors on viruses derived during acute and chronic infection. Members of all types of inhibitors currently identified – compounds interfering with viral binding to CD4, the coreceptor and the fusion process as well as neutralizing antibodies targeting the viral envelope – were included. The aim was to validate these inhibitors and to probe if viruses at early and chronic disease stages exhibit general differences in the interaction with entry receptors. I evaluated nine entry inhibitors directed against different targets of the viral entry process for their potency to inhibit 58 HIV-1 viruses isolated during chronic and acute disease stages. The inhibitors I included were (i) two agents that block gp120 binding to CD4 (CD4-IgG2 and monoclonal antibody (MAbs) IgG1b12), (ii) three compounds that block the interaction with CCR5 (the chemokine RANTES/CCL5, the small-molecule inhibitor AD101, and the anti-CCR5 antibody PRO 140), (iii) the fusion inhibitor enfuvirtide (T-20), and (iv) neutralizing antibodies directed against gp120 (MAb 2G12) and gp41 (MAbs 2F5 and 4E10). Overall the tested inhibitors were highly active and no differences between viruses from acute and chronic disease in the susceptibility to entry inhibitors targeting the CD4 binding site, CCR5, fusion or to the antibody 2G12 were apparent. The notable exception were anti-gp41 antibodies 2F5 and 4E10, which inhibited approximately 90% viruses from both groups but were more potent in inhibiting viruses from acute infection. Interestingly potencies of CCR5 inhibitors showed a considerable degree of similarity despite their differential modes of action which could imply that these inhibitors will be affected by similar changes in the virus envelope and resistance to these inhibitors could therefore emerge in parallel. No such association was seen for the inhibitors targeting the CD4 binding site. In summary these data are very promising and show that viruses from chronic disease stages are not more resistant to inhibition than viruses at earlier stages and therefore treatment with entry inhibitors appears feasible across disease stages.

## 1.2 Zusammenfassung

Der Kernpunkt meiner Dissertation war die Erforschung der infektiösen, aus dem Plasma oder aus den CD4 T-Lymphocyten stammenden HI-Viren von HIV-Patienten. Das Ziel dabei war die Beschreibung der speziellen Eigenschaften von Viren während den verschiedenen Krankheitsstadien einer HIV Infektion in Hinblick auf die Entwicklung weiterer Behandlungsmöglichkeiten von Impfstoffen gegen die HIV Infektion.

Im Rahmen meines ersten Projekts habe ich eine Methode entwickelt, welche die Quantifizierung der Infektiosität von HIV im Patientenplasma erlaubt, was mit den herkömmlichen Methoden trotz der normalerweise hohen Anzahl viraler RNA im Blut nur selten gelingt. Aufgrund ihrer kurzen Halbwertszeit repräsentieren die aus dem Plasma stammende Viren die Population der aktuell replizierenden Quasispecies. Dies macht die Plasmaviren zu einem interessanten Forschungsobjekt, anhand dessen der momentane Status der Infektiosität, Sensitivität gegen antivirale Medikamente und die virale Evolution erforscht werden kann.

Herkömmliche Methoden, wie das direkte kultivieren von Zellen mit Plasma zur Bestimmung von dessen Infektiosität, scheitern gewöhnlich an der Toxizität des Plasmas in Zellkulturen. Der Vorteil der hier präsentierten, neuen Methode beruht auf der durch Polybrene induzierten Bindung von Virionen an Thrombocyten. Das positiv geladene Polymer Polybrene erzeugt eine effiziente elektrostatische Bindung zwischen der negativ geladenen viralen Membran und der Zelloberfläche von Thrombocyten. Durch einen einfachen Zentrifugationsschritt kann das so an Thrombocyten gebundene Virus vom Plasma abgetrennt und dessen toxischer Effekt während der nachfolgenden Kultivierung von HIV-1 vermieden werden. Ausserdem ist die Infektiosität von an Thrombocyten gebundenem HIV-1 gegenüber freiem Virus 10-1000 mal erhöht, was die Sensitivität dieses Verfahrens zusätzlich steigert. Nachdem die Methode auf ihre Reproduzierbarkeit, ihre Anwendbarkeit für R5- und X4- Viren und auf ihre Sensitivität evaluiert wurde, quantifizierte ich die Infektiosität des Plasmas von 53 chronisch infizierten Patienten. Zwischen einer Viruslast von 1000 – 10 000 RNA Kopien/ml waren 18%, zwischen 10 000 – 50 000 RNA Kopien/ml 73%, zwischen 50 000 - 100 000 RNA Kopien/ml 90% und über 100 000 RNA Kopien/ml waren 96% der Virus Isolationen erfolgreich. Die Infektiosität oder "tissue culture infectious dose" (TCID<sub>50</sub>) variierte von <2.29 bis 417 pro ml Plasma. Ausserdem beobachteten wir eine starke Korrelation zwischen der Infektiosität des Plasmas und der Viruslast ( $r^2 = 0.40$ ,  $P < 0.0001$ ) oder der Anzahl der CD4 T-Zellen ( $r^2 = 0.27$ ,  $P < 0.0001$ ) in HIV infizierten Patienten. Danach wurde der biologische Phänotyp hinsichtlich der Replikationskapazität und des Korezeptor Tropismus der verschiedenen Plasmavirus-Isolate bestimmt. Ausserdem wurde die Heterogenität der für das virale Hüllprotein kodierenden Sequenzen der Quasispecies aus dem Plasma mit jenen aus CD4 T-Lymphocyten verglichen. Dabei stellte sich heraus dass die aus den Zellen stammenden Viren mit jenen aus dem Plasma eng verwandt waren aber eine höhere Diversität aufwiesen.

Zusammenfassend kann man sagen, dass diese neue Methode, im Vergleich zu herkömmlichen Verfahren, äusserst sensitiv ist und ein vielseitiges Werkzeug darstellt um das Wechselspiel zwischen HIV-1 und den antiviralen Molekülen im Plasma zu erforschen.

## Chapter 1

Im zweiten Teil meiner Dissertation arbeite ich wiederum mit HIV-1 Isolaten aus Patienten während verschiedenen Krankheitsstadien, nun aber bezüglich ihrer Sensitivität gegen Medikamente, die den Eintrittsprozess des Virus in die Zelle inhibieren, sog. „Entry-Inhibitoren“. Diese neue, vielversprechende Medikamentenklasse wird in Zukunft bestehende Behandlungsmöglichkeiten von HIV-1 ergänzen und verbessern. Damit Entry-Inhibitoren optimal eingesetzt werden können, ist es wichtig deren Wirksamkeit gegen HIV-1 während frühen und späten Krankheitsphasen zu kennen und zu vergleichen.

Im Verlaufe dieses Projekts testete ich die Wirksamkeit von neun Entry-Inhibitoren gegen 58 HIV-1 Virus Isolate aus Patienten in der akuten oder chronischen Phase einer HIV-1 Infektion. Die Auswahl der Entry-Inhibitoren beinhaltet mindestens einen Vertreter jedes Inhibitorentyps und gegen jeden möglichen Angriffspunkt des viralen Eintrittsprozesses in die Zelle: (i) zwei Substanzen die das Binden von gp120 an CD4 verhindern (CD4-IgG2 und der monoclonale Antikörper (MAb) IgG1b12), (ii) Drei Wirkstoffen welche die Interaktion mit CCR5 blockieren (das Chemokin RANTES/CCL5, der „small-molecule inhibitor“ AD101 und der anti-CCR5 Antikörper PRO 140), (iii) der Fusionprozess-Hemmer Enfuvirtide (T-20), und (iv) neutralisierende Antikörper gegen gp120 (MAb 2G12) und gp41 (MAbs 2F5 and 4E10).

Die getesteten Inhibitoren zeigten eine hohe Wirksamkeit und keine signifikanten Unterschiede gegen HIV-1 Isolate aus verschiedenen Krankheitsstadien. Eine mit Ausnahme stellten die Anti-gp41 Antikörper 2F5 und 4E10 dar, welche zwar 90% der Viren aus beiden Gruppen inhibierten aber eine signifikant höhere Wirksamkeit gegen Virus Isolate aus der akuten Krankheitsphase aufwiesen. Interessanterweise korrelierten, trotz ihrer verschiedenen Wirkungsmechanismen, die antiretrovirale Effekte der drei CCR5 blockierenden Substanzen untereinander. Offensichtlich beeinflussen Änderungen in der Virushülle die Sensitivität von HIV-1 gegenüber allen drei Inhibitoren gemeinsam, was das Vorkommen von Kreuzresistenzen gegenüber CCR5-Inhibitoren wahrscheinlich macht. Solche Zusammenhänge wurden zwischen den CD4-Bindungsstelle blockierenden Substanzen nicht gefunden. Insgesamt sind diese Resultate ermutigend in Hinblick auf die klinische Anwendung von Entry-Inhibitoren und es wurden keine generellen Unterschiede in der Sensitivität zwischen HIV-1 Isolaten aus akut und chronisch infizierten Patienten gemessen, was den Einsatz dieser Medikamente unberücksichtigt der Krankheitsphase möglich macht.