

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 618 380**

51 Int. Cl.:

A61K 39/42 (2006.01)

C07K 16/10 (2006.01)

A61P 31/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.09.2011 PCT/US2011/052933**

87 Fecha y número de publicación internacional: **29.03.2012 WO2012040562**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.09.2011 E 11827599 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.12.2016 EP 2618843**

54 Título: **Novedosos anticuerpos con amplio poder neutralizante de VIH-1**

30 Prioridad:

24.09.2010 US 386211 P
05.08.2011 US 201161515528 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
21.06.2017

73 Titular/es:

INTERNATIONAL AIDS VACCINE INITIATIVE (33.3%)
125 Broad Street, 9th Floor
New York, NY 10004, US;
THE SCRIPPS RESEARCH INSTITUTE (33.3%) y
NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH (33.3%)

72 Inventor/es:

MASCOLA, JOHN;
BURTON, DENNIS R.;
KOFF, WAYNE;
KWONG, PETER;
NABEL, GARY;
PHOGAT, SANJAY K.;
POIGNARD, PASCAL RAYMOND GEORGES;
SIMEK-LEMONS, MELISSA DANIELLE DE JEAN DE
ST.MARCEL;
WU, XUELING;
YANG, ZHI-YONG y
ZHOU, TONGQING

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 618 380 T3

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

Novedosos anticuerpos con amplio poder neutralizante de VIH-1.

Campo de la invención

5 La presente solicitud se refiere a anticuerpos monoclonales neutralizantes humanos específicos de VIH-1, tales como anticuerpos monoclonales con una amplia y potente actividad neutralizante específicas de VIH-1 y a su fabricación y uso. Un amplio poder neutralizante sugiere que los anticuerpos pueden neutralizar aislados de VIH-1 procedentes de diferentes individuos. Dichos anticuerpos son útiles en composiciones farmacéuticas para la prevención y el tratamiento del VIH, y para el diagnóstico y vigilancia de la infección por VIH y para el diseño de inmunógenos de vacunas de VIH.

Antecedentes de la invención

10 El SIDA, o síndrome de inmunodeficiencia adquirida, está producido por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y se caracteriza por algunas características clínicas que incluyen síndromes consuntivos, degeneración del sistema nervioso central e inmunosupresión profunda que da como resultado infecciones y neoplasias oportunistas. VIH es un miembro de la familia de los lentivirus de los retrovirus animales, que incluye el virus visna de ovejas y los virus de la inmunodeficiencia de bovinos, felinos, y simios (VIS). Dos tipos de VIH estrechamente relacionados, designados VIH-1 y VIH-2, se han identificado hasta el momento, de los que el VIH-1 es con mucho la causa más común de SIDA. Sin embargo, VIH-2, que difiere en la estructura genómica y la antigenicidad, produce un síndrome clínico similar.

15 Una partícula de VIH infecciosa consiste en dos hebras idénticas de ARN, cada una aproximadamente de 9,2 kb de longitud, empaquetadas en el interior de un núcleo de partículas víricas. Esta estructura nuclear está rodeada por una envoltura de bicapa de fosfolípidos derivada de la membrana de la célula hospedadora que incluye también las proteínas de membrana codificadas víricamente (Abbas y col., Cellular and Molecular Immunology, 4ª edición, W.B. Saunders Company, 2000, p. 454). El genoma de VIH tiene la organización 5'-LTR-Gag-Pol-Env-LTR-3' característica de la familia de los retrovirus. Las repeticiones terminales largas (LTR) en cada extremo del genoma vírico sirven como sitios de unión para las proteínas reguladoras de la transcripción procedentes del hospedador y regulan la integración vírica en el genoma del hospedador, la expresión génica vírica, y la replicación vírica.

20 El genoma de VIH codifica varias proteínas estructurales. El gen gag codifica proteínas estructurales del núcleo de la nucleocápsida y la matriz. El gen pol codifica las enzimas transcriptasa inversa (TI), la integrasa (IN), y la proteasa (PR) vírica requeridas para la replicación vírica. El gen tat codifica una proteína que se requiere para el alargamiento de los transcritos víricos. El gen rev codifica una proteína que promueve la exportación nuclear de los ARN víricos cortados y pegados de manera incompleta o no cortados y pegados. El producto del gen vif aumenta la infectividad de las partículas víricas. El producto del gen vpr promueve la importación nuclear del ADN vírico y regula la detención del ciclo celular en G2. Los genes vpu y nef codifican proteínas que regulan por defecto la expresión de los linfocitos CD4 en el hospedador y potencian la liberación del virus de las células infectadas. El gen env codifica la glicoproteína de la envoltura vírica que se traduce como un precursor de 160 kilodalton (kDa) (gp160) y se escinde por una proteasa celular para dar como resultado la glicoproteína de la envoltura externa de 120 kDa (gp120) y la glicoproteína de la envoltura transmembrana de 41 kDa (gp41), que se requiere para la infección de las células (Abbas y col., Cellular and Molecular Immunology, 4ª edición, W.B. Saunders Company, 2000, pp. 454-456). gp140 es una forma modificada de la glicoproteína Env, que contiene la porción de la glicoproteína de la envoltura externa de 120 kDa y la parte extracelular de la porción gp41 de Env y tiene las características de gp120 y gp41. El gen nef se conserva entre los lentivirus de primates y es uno de los primeros genes víricos que se transcribe tras la infección. In vitro, se han descrito algunas funciones, incluyendo la regulación por defecto de CD4 y la expresión superficial de MHC de clase I, la señalización y la activación alteradas de los linfocitos T, y la infectividad vírica potenciada. El documento WO 2010/107939 A2 se refiere a anticuerpos neutralizantes de la inmunodeficiencia humana (VIH) y a su uso en el tratamiento, diagnóstico y vigilancia de la infección por VIH.

30 La infección por VIH se inicia con gp120 sobre la unión de la partícula vírica a los linfocitos CD4 y a las moléculas receptoras de quimioquinas (por ejemplo, CXCR4, CCR5) sobre la membrana celular de las células diana tales como linfocitos T CD4+, macrófagos y células dendríticas. Los virus unidos se fusionan con la célula diana y transcriben de forma inversa el genoma de ARN. El ADN vírico resultante se integra en el genoma celular, donde dirige la producción de nuevo ADN vírico, y por tanto proteínas víricas y nuevos viriones. Estos viriones se desprenden de la membrana de la célula infectada y establecen infecciones productivas en otras células. Este procedimiento destruye también la célula originalmente infectada. El VIH puede también destruir células indirectamente debido a que el receptor CD4 de los linfocitos T sin infectar tiene una fuerte afinidad por gp 120 expresado sobre la superficie de las células infectadas. En este caso, las células sin infectar se unen mediante la interacción con el receptor CD4-gp120, a las células infectadas y se fusionan para formar un sincitio, que no puede sobrevivir. La destrucción de linfocitos T CD4+, que son críticos para la defensa inmunitaria, es la causa principal de la disfunción inmunitaria progresiva que es la señal de identidad de la progresión de la enfermedad del SIDA. La pérdida de linfocitos T CD4+ deteriora gravemente la capacidad del cuerpo para hacer frente a la mayoría de invasores, pero tiene un impacto particularmente grave sobre las defensas contra los virus, hongos, parásitos y determinadas bacterias, incluyendo micobacterias.

La investigación sobre la glicoproteína Env ha mostrado que el virus tiene muchos mecanismos protectores eficaces con pocas vulnerabilidades (Wyatt & Sodroski, Science, 19 de junio de 1998:280(5371):1884-8). Para la fusión con sus células diana, el VIH-1 utiliza un complejo Env trimérico que contiene subunidades gp120 y gp41 (Burton y col., Nat Immunol. marzo de 2004;5(3):233-6). La fusión potencial del complejo Env se estimula por la implicación del receptor CD4 y un correceptor, normalmente CCR5 o CXCR4. Los anticuerpos neutralizantes parecen trabajar tanto uniéndose al trómero maduro sobre la superficie del virión y evitando los acontecimientos iniciales de implicación del receptor, o uniéndose tras la unión del virión e inhibiendo el procedimiento de fusión (Parren & Burton, Adv Immunol. 2001; 77:195-262). En el último caso, los anticuerpos neutralizantes pueden unirse a epítomos cuya exposición está potenciada o estimulada por la unión del receptor. Sin embargo, dados los efectos antivíricos potenciales de los anticuerpos neutralizantes, no es inesperado que en VIH-1 hayan evolucionado múltiples mecanismos para protegerle de la unión de anticuerpos (Johnson & Desrosiers, Annu Rev Med. 2002:53:499-518).

La mayoría de vacunas contra VIH-1 experimentales ensayadas en seres humanos y/o primates no humanos sugiere que una vacuna satisfactoria incorporará inmunógenos que estimulen anticuerpos con un amplio poder neutralizante (bNab) y una sólida inmunidad mediada por células. La glicoproteína de la envoltura de VIH-1 (Env) es la principal proteína vírica implicada en la entrada del virus y es también la diana principal de los anticuerpos neutralizantes, pero debido a las estrategias inmunitarias de evasión y a la extrema variabilidad de la secuencia de las Env, la generación de bNab ha sido una tarea desalentadora (Phogat S, Wyatt R. Curr Pharm Des. 2007; 13:213-27, Phogat S, y col. J Intern Med. 2007 262:26-43, Karlsson Hedestam GB, y col Nat Rev Microbiol. 2008 6:143-55).

La capacidad de estimular anticuerpos con una amplia y potente actividad neutralizante es un desafío mayor en el desarrollo de una vacuna de VIH-1. Concretamente, VIH-1 ha hecho evolucionar una gama impresionante de estrategias para evadir la neutralización mediada por anticuerpos. Los bNAb se desarrollan con el tiempo en una proporción de individuos infectados con VIH-1, y se han aislado un puñado de anticuerpos monoclonales con amplio poder neutralizante a partir de donantes infectados con el clado B. Estos anticuerpos tienden a presentar menos amplitud y potencia contra los virus que no son del clado B, y reconocen epítomos sobre el virus que hasta el momento han fracasado en estimular respuestas con un amplio poder neutralizante cuando se incorporan en una gama diversa de inmunógenos.

De forma reciente, utilizando una selección sensible de sobrenadantes de microneutralización de alto rendimiento de IgG de aproximadamente 30.000 + linfocitos B con memoria procedentes de un donante africano infectado con el clado A de VIH-1, se identificaron dos nuevos anticuerpos, PG9 y PG16 con un amplio poder neutralizante que son anticuerpos con una amplia y excepcionalmente potente actividad neutralizante (Walker L, Phogat S, y col. Science, 2009; 326:285-9. Epub 3 de septiembre de 2009). Estos anticuerpos reconocen una nueva diana de vacuna conservada, todavía accesible, (que consiste en elementos conservados sobre los bucles 2 y 3 variables) sobre el Env y muestran una unión preferente al trómero Env de VIH (modelo de los epítomos PG9 y 16 sobre el trómero de VIH-1). Cuando se ensayan para la unión, estos anticuerpos no muestran unión a muchos trómeros Env de VIH diseñados empíricamente solubles (Env gp140) aunque imitan el extremo de Env de VIH-1 natural, sugiriendo que bien estos diseños de Env son incorrectos o se fijan en una forma no reconocida por PG9 y PG16.

Se han identificado también otros anticuerpos monoclonales con un amplio poder neutralizante que se unen al sitio de unión a CD4 (Wu y col, Science 329; 856 (2010) y Zhou y col., Science, 13 de agosto de 2010; 329 (5993):811-7. Epub 8 de julio de 2010).

La cita o identificación de cualquier documento en esta solicitud no es una admisión de que dicho documento está disponible como técnica anterior a la presente invención.

Sumario de la invención

La presente invención está basada, en parte, en novedosos anticuerpos monoclonales identificados a partir de estructuras de la envoltura (Env) de VIH-1, en particular, las estructuras de Env con núcleos estabilizados resurgidos (RSC) que contienen glicoproteínas antigénicamente resurgidas específicas de un sitio de unión estructuralmente conservado del receptor de CD4.

La invención abarca anticuerpos que tienen una cadena pesada con tres CDR que comprenden una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en las secuencias de aminoácidos de VRC-PG-04 de la FIG. 8, y una cadena ligera con tres CDR que incluyen una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en las secuencias de aminoácidos de VRC-PG-04 de la FIG. 8.

La invención abarca además composiciones que pueden comprender los anticuerpos anti-VIH aislados o que no se producen naturalmente de la presente invención. La solicitud se refiere también a moléculas de ácido nucleico que pueden codificar los anticuerpos anti-VIH de la presente invención, o uno de sus fragmentos, los vectores que pueden comprender las moléculas de ácido nucleico que pueden codificar los anticuerpos anti-VIH de la presente invención, o uno de sus fragmentos, y las células que pueden comprender vectores que pueden comprender las moléculas de ácido nucleico que pueden codificar los anticuerpos anti-VIH de la presente invención, o uno de sus fragmentos.

La presente invención se refiere también a los procedimientos para inmunizar o reducir el efecto de una infección por VIH o una enfermedad relacionada con VIH que puede comprender identificar un paciente que necesita dicho tratamiento, y administrar a dicho paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un anticuerpo de la presente invención. El procedimiento puede comprender adicionalmente la administración de un segundo agente terapéutico. El segundo agente terapéutico puede ser un agente antivírico.

La presente invención se refiere también a los procedimientos de inmunizar o reducir el efecto de una infección por VIH o una enfermedad relacionada con VIH que puede comprender identificar un paciente que necesita dicho tratamiento y administrar a dicho paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de: un primer anticuerpo de la presente invención, o uno de sus fragmentos, específico de un primer epítipo que se une a dicho primer anticuerpo y un segundo anticuerpo de la presente invención, o uno de sus fragmentos, específico para un segundo epítipo que se une a dicho segundo anticuerpo.

De acuerdo con ello, es un objeto de la invención no abarcar en la invención ningún producto anteriormente conocido, procedimiento de preparación del producto, o procedimiento de uso del producto de tal manera que los solicitantes se reservan el derecho y por la presente declinan cualquier responsabilidad relacionada con cualquier producto, procedimiento, o procedimiento anteriormente conocido. Se destaca además que la invención no pretende abarcar en el alcance de la invención ningún producto, procedimiento, o preparación del producto o procedimiento de utilizar el producto, que no cumpla con la descripción escrita y los requisitos de habilitación de la USPTO (Artículo 112 de la Ley 35 del USC, primer párrafo) o la EPO (Artículo 83 del CEP), de tal manera que los solicitantes se reservan el derecho y de esta manera declinan cualquier responsabilidad relacionada con cualquier producto, procedimiento de preparación del producto, o procedimiento de utilizar el producto descritos anteriormente.

Se destaca que en esta divulgación y, particularmente, en las reivindicaciones y/o párrafos, términos tales como "comprende", "comprendido", "que comprende" y similares pueden tener el significado atribuido en la Ley de Patentes de los EE.UU.; por ejemplo, pueden significar "incluye", "incluido", "incluyendo", y similares; y que términos tales como "que consiste esencialmente de" y "consiste esencialmente de" tienen el significado que se les atribuye en la Ley de Patentes de los EE.UU., por ejemplo, permiten que los elementos no se enumeren explícitamente, pero excluye elementos que se encuentran en la técnica anterior o que influyen sobre una característica básica o novedosa de la invención.

Estas y otras realizaciones se divulgan o son obvias y quedan abarcadas por, la siguiente Descripción Detallada.

Breve descripción de los dibujos

La siguiente descripción detallada, que se proporciona a modo de ejemplo, pero que no se pretende que limite la invención únicamente a las realizaciones específicas descritas, puede entenderse mejor junto con los dibujos acompañantes, en los que:

La Fig. 1 representa gráficamente la competición de proteínas que muestra que el suero 27-374 tiene anticuerpos con actividad neutralizante contra CD4bs.

La Fig. 2 representa gráficamente una clasificación de células únicas para los linfocitos B reactivos con RSC3.

La Fig. 3 representa gráficamente la unión a ELISA de VRC-PG-04 y VRC-PG-05 a algunas versiones mutantes de YU2 gp120 y a las proteínas nucleares estabilizadas resurgidas (RSC3) y a su mutante inactivado genéticamente Δ RSC3.

La Fig. 4 representa gráficamente la unión de VRC-PG-04 y VRC-PG-05 a proteínas basadas en YU2 gp120, HBX2 con el núcleo nuevo 8b y Du156 gp120 WT mediante ELISA.

La Fig. 5 representa gráficamente un ensayo ELISA competitivo demostrando que VRC-PG-04 se dirige contra CD4bs.

La Fig. 6 representa gráficamente un ensayo ELISA competitivo que demuestra que VRC-PG-04, pero no VRC-PG-05, compite en cruzado según los ELISA de los anticuerpos CD4bs realizados con RSC3 en placas.

La Fig. 7 representa gráficamente un ensayo ELISA usando el clado B AC10.29 gp1120 en placas y que VRC-PG-05 no bloquea en cruzado los mAb dirigidos contra CD4bs.

La Fig. 8 representa gráficamente las alineaciones de secuencias de los anticuerpos VRC-PG.

La Fig. 9 representa gráficamente las propiedades de unión a antígeno de PGV04. (A) Unión de PGV04 a RSC3 (líneas sólidas) y Δ RSC3 (líneas punteadas), y (B) JRFL gp120 como se determina mediante ELISA. Los antígenos se revistieron directamente sobre placas ELISA. La DO, densidad óptica (absorbancia a 405 nm) de VRC01, VRC03, b12, y 2G12 se utilizaron como controles para la unión a los antígenos.

La Fig. 10 representa gráficamente la cartografía del epítipo de unión PGV04. (A) Los ELISA competitivos de PGV04 con los mAb dirigidos contra CD4bs b12 y VRC01, CD4-IgG; (B) los mAb CD4i 17b y X5; y (C) la unión a glicano de mAb 2G12 y la unión al bucle V3 de mAb F425. JRFL gp120 se revistió sobre placas ELISA y se añadieron diluciones en serie de los mAb indicados en la parte superior de la gráfica durante 30 min a TA. Los mAb biotinilados relacionados en la leyenda se añadieron a continuación durante 1 h a TA a una concentración CE50 constante. (D) Ensayo ELISA competitivo inverso con diluciones en serie por unión a placas ELISA revestidas con JRFL gp120 unidas a PGV04 y a continuación la adición de una concentración CE50 constante de los mAb biotinilados relacionados en la leyenda. Todos los experimentos se llevaron a cabo por duplicado, y los datos son un experimento representativo en el que se representa gráficamente la SEM.

La Fig. 11 representa gráficamente la actividad de neutralización de PGV04 en un panel de 162 virus y en un panel de 97 virus. (A) Potencia de neutralización. Los recuadros están codificados por colores como sigue: naranja, potencia media entre 0,2 y 2,0 $\mu\text{g/ml}$; y rojo, potencia media $< 0,2 \mu\text{g/ml}$. CRF07_BC, CRF08_BC, y los virus AC no se incluyeron en el análisis del clado, pero se hizo el recuento del número total de virus neutralizados en el panel de 162 virus debido a que solo se ensayó un virus para cada uno de estos clados. Los virus de los clados D y E no se incluyeron en el análisis de los clados, pero se hizo el recuento del virus neutralizado en el panel de 97 virus debido a que solo se ensayaron 2 y 3 virus respectivamente para estos clados. (B) Intervalo de neutralización. Los recuadros se colorearon de la siguiente manera: naranja, 61-90 % de virus neutralizados; rojo, 91-100 % de virus neutralizados. Como en (A), CRF07_BC, CRF08_BC, los virus AC, D y E no se incluyeron en el análisis del clado, pero se hizo el recuento del número total de virus neutralizados para el panel respectivo. (C) Dependencia de NT_{50} sérico sobre PGV04. Se llevó a cabo la correlación de Spearman comparando la CI_{50} del mAb y la NT_{50} sérica del donante para los 162 virus ensayados. Se calculó el coeficiente de correlación de la ordenación de Spearman como $\sim 0,71$ y la correlación fue significativa con un valor $P < 0,0001$. La CI_{50} y NT_{50} de los virus que no se neutralizan se introdujeron en el límite del ensayo como 50 $\mu\text{g/ml}$ para el mAb o 100 (1/dilución) para el suero.

La Fig. 12 representa gráficamente la inducción del sitio de unión del correceptor sobre gp120 y los trómeros expresados sobre la superficie celular. Se añadieron cantidades saturantes de los mAb relacionados en la leyenda tanto a JRFL como a placas ELISA revestidas con YU2 gp120. Tras 30 min de incubación a TA, se añadió una curva de dilución de productos biotinilados (A) 17bor(b)X5 biotinilado se añadió durante 1 h a TA. Se detectó la unión con estreptavidina-AP y se leyó la absorbancia a 405 nm. Se midió la capacidad de PGV04 de inducir el sitio de unión del correceptor sobre los trómeros de la superficie celular (C). Se añadieron cantidades saturantes de los mAb relacionados en la leyenda a linfocitos 293T que expresaban la envoltura de VIH sobre su superficie durante 30 min. Se añadieron tanto mAb 2G12 17b como mAb 2G12 del control (D) biotinilados a las células. Se usó un mAb de estreptavidina conjugado con PE para la detección y se midió la unión utilizando citometría de flujo.

La Fig. 13 representa gráficamente la neutralización de MAb y la unión a R-CSF gp120 que contiene sustituciones de alanina únicas. (A) neutralización con PGV04 de pseudovirus JR-CSF que contienen sustituciones de alanina únicas en la proteína gp120. Se midió la entrada en células TMZ-bl utilizando un luminómetro en unidades relativas de luz (URL). Se calculó la potencia de neutralización con respecto a WT utilizando la siguiente ecuación: $(\text{CI}_{50_WT})/(\text{CI}_{50_mutante}) * 100$. (B) Se aisló la unión de PGV04 a JR-CSF gp120 a partir de pseudovirus y que contienen sustituciones de alanina únicas. La numeración de los aminoácidos se basa en la secuencia de VIH-1HXB2. Los recuadros están codificados por colores como sigue: azul, 0-5 % de neutralización con respecto al tipo natural; verde, 6-40 % de neutralización con respecto al tipo natural; y amarillo, 250-1.000 % de neutralización con respecto al tipo natural.

La Fig. 14 representa gráficamente la capacidad de PGV04 de unirse a Endo-H y BaL gp120 tratado con Endo-F. La unión de mAb a (A) gp120 tratado de forma simulada o (B) Endo-H y gp120 tratados con Endo-F.

La Fig. 15 representa gráficamente (A) la actividad de neutralización de los mAb contra un panel de 162 pseudovirus de clado cruzado. (B) Actividad de neutralización de los mAb contra un panel de 97 pseudovirus de clado cruzado.

La Fig. 16 representa gráficamente el ensayo ELISA de polirreactividad. Se ensayó PGV04 para determinar la reactividad de ELISA frente a un panel de antígenos. Se incluyeron también los mAb amplios b12 y 4E10 para comparación.

La Fig. 17 representa gráficamente la identificación y caracterización de los mAb de los donantes infectados con VIH-1 74 y 0219. (A) Análisis de RSC3 de suero. Se analizaron doce sueros de la cohorte G del Protocolo JAVI (donantes 17-74) y un suero de la cohorte CHAVI 001 (donante 0219) para la reducción de RSC3 en la neutralización del suero en cepas JR-FL, PVO.4, YU2 y ZA12.29 de VIH-1. Las barras azules muestran la reducción media de suero en la CI_{50} de neutralización resultante de RSC3 frente a la competición con ΔRSC3 . Los sueros con mayor reducción se analizaron adicionalmente en cepas Q168.a2, RW020.2, Du156.12 y ZM 109.4 de VIH-1. Las barras rojas muestran la reducción media de los ocho virus. (B) Identificación por citometría de flujo de linfocitos B IgG+ reactivos a RSC3 de los donantes 74 y 0219. Se indican la clasificación y el porcentaje de linfocitos B IgG+ de interés ($\text{RSC3}+\Delta\text{RSC3}$ -), clasificando los linfocitos B individuales 40 y 26 de los donantes 74 y 0219 respectivamente. (C) Secuencias de proteínas de las regiones variables de la cadena pesada y ligera de los mAb VRC-PG04 y VRC-PG04b, aisladas del donante 74, y los mAb VRC-CH30-34 aislados del donante 0219. Las secuencias se alinearon con los presuntos genes antecesores de la línea germinal y se identificaron previamente los anticuerpos de amplio poder neutralizante VRC01, VRC02 y VRC03 de VIH-1. Las regiones marco (FR) y regiones determinantes de la complementariedad (CDR) se basan en la nomenclatura de Kabat (E. A. Kabat, T. T. Wu, K. S. Gottesman, C. Foeller, Sequences of Proteins of Immunological Interest. 5ª Edición (1991)). (D) Dendogramas de neutralización. Se ensayaron VRC-PG04 y VRC-CH31 frente a pseudovirus Env genéticamente diversos que representan los clados principales de VIH-1. Los árboles de unión cercanos presentan la distancia de las proteínas de las secuencias gp160 de los aislados 178 VIH-1 ensayados frente a VRC-PG04 y un subconjunto (80 aislados) ensayado frente a VRC-CH31. Una escala de barras denota una distancia del 1 % en la secuencia de aminoácidos. Se colorearon tres ramas mediante las potencias de neutralización de VRC-PG04 y VRC-CH31 frente a cada virus concreto.

La Fig. 18 representa gráficamente la estructura de anticuerpos VRC-PG04 y VRC03 en el complejo con VIH-1 gp120. (A) Estructuras globales. Se representan gráficamente el complejo del ligando para el anticuerpo Fabof de VRC-PG04 procedente del donante 74 y la glicoproteína de la envoltura de VIH-1 gp120 procedente del aislado 93TH057 con las estructuras polipeptídicas en la representación en cinta en la imagen de la izquierda. El complejo de Fab VRC03 procedente del donante 45 se representa gráficamente en la imagen de la derecha, con

superficies de todos los restos de dominios variables entre VRC03 y VRC-PG04 coloreados de acuerdo con sus características químicas. (B y C) Cercanía de interacción. Se muestran las interacciones críticas entre el bucle de unión a CD4 de gp120 (púrpura) y la región CDR H2 de los mAb con amplio poder neutralizante, VRC03 y VRC-PG04 (notificados aquí) y VRC01 (notificado anteriormente (T. Zhou y col., Structural basis for broad and potent neutralization of HIV-1 by antibody VRC01. Science, 329, 811-817 (2010))), representándose los enlaces de hidrógeno como líneas punteadas. Las estructuras de resolución de 1,9 y 2,1 Å de VRC03 y VRC-PG04, respectivamente, fueron suficientes para definir el agua interfacial que se muestra en (C), que estaban poco claras en la estructura de 2,9 Å de VRC01. La orientación que se muestra en (C) está girada ~180° alrededor del eje vertical con respecto a la orientación que se muestra en (B).

La Fig. 19 representa gráficamente la evolución centrada en los anticuerpos de tipo VRC01. (A) Convergencia de anticuerpos. Las porciones gp120 de los complejos de ligandos con VRC01, VRC03 y VRC-PG04 se superpusieron para determinar la desviación de C α promedio por resto de anticuerpo, y se calculó la interacción hidrofóbica por resto (Δ 'G) (E. Krissinel, K. Henrick, Inference of macromolecular assemblies from crystalline state. J Mol Biol 372,774-797 (2007)). Se encontró que estas dos cantidades estaban correlacionadas (valor P = 0,0427), con restos de anticuerpos que contenían fuertes interacciones hidrófobas (por ejemplo, en las posiciones 53 y 55 en la cadena pesada, y 91 y 97 en la cadena ligera, numeración relativa a VRC-PG04) que presentaban una elevada conservación estructural. Esta correlación se visualizó en VRC-PG04 en la imagen izquierda, donde el espesor de la cinta es proporcional a la desviación de C α por resto correspondiente y la superficie del paratópo está coloreada de acuerdo con la hidrofobicidad, de blanco (bajo) a rojo (alto); de forma notable, los parches superficiales de color rojo corresponden a cintas delgadas. (B) Convergencia de epítomos. La superficie de gp120 de VIH-1 implicada en la unión con CD4 contiene regiones conformacionalmente invariantes (por ejemplo, asociadas con el dominio externo) y regiones conformacionalmente variables (por ejemplo, asociadas con la hoja del acoplamiento). Los solicitantes habían teorizado anteriormente que el contacto con el dominio externo conformacionalmente invariante para CD4 representa un sitio de vulnerabilidad (T. Zhou y col., Structural basis for broad and potent neutralization of HIV-1 by antibody VRC01. Science, 329, 811-817 (2010)). Los solicitantes analizaron la precisión del reconocimiento del ligando por el sitio de unión a CD4 (eje vertical) frente a la amplitud de neutralización de la CI80 (eje horizontal) y a la correlación significativa observada (R^2 =0,6, valor P=0,040). (C) Divergencias en la secuencia y convergencias en el reconocimiento. El desarrollo de anticuerpos análogos a VRC01 implica una cadena pesada derivada del alelo IGHV1-2*02 y una cadena ligera seleccionada derivada de los alelos Vk. La imagen más a la izquierda representa gráficamente un modelo representativo de cinta de un anticuerpo de una presunta línea germinal. La hipermutación somática durante el procedimiento de maduración por afinidad conduce a una divergencia en la secuencia, dando como resultado además el reconocimiento convergente de epítomos similares. La intersección de las superficies del epítomo reconocidas por VRC01, VRC03 y VRC-PG04 (imagen más a la derecha), desvela una similitud remarcable en el sitio de la vulnerabilidad. La divergencia primaria de esta intersección procedente del sitio de vulnerabilidad teorizado se produce en la región de VIH-1 gp120 reconocida por la cadena ligera de los anticuerpos análogos a VRC01. Aunque los epítomos separados en gp120 muestran diferencias en la superficie de reconocimiento, estas implican principalmente la región de la lámina de acoplamiento, que es probable que adopte una conformación diferente en el extremo vírico funcional antes de vincularse con CD4.

La Fig. 20 representa gráficamente la secuenciación en profundidad de las cadenas pesada y ligera de los donantes 45 y 74. (A) Complementación de la cadena pesada y la cadena ligera. Los perfiles de neutralización de VRC01 y VRC03 (donante 45), VRC-PG04 (donante 74), y VRCCH31 (donante 0219) y sus permutas químicas de la cadena pesada y la cadena ligera se representan gráficamente con los dendogramas de neutralización de 20 aislados. En la tabla S13 se proporcionan las neutralizaciones explícitas de las CI50. (B) Repertorio de secuencias de la cadena pesada procedentes del donante 45 (muestra 2008) y el donante 74 (muestra 2008). Se representaron gráficamente las secuencias de la cadena pesada como función de la identidad de secuencia con la cadena pesada de VRC01 (izquierda), VRC03 (intermedio) y VRC-PG04 (derecha) y de la divergencia de secuencias de los presuntos alelos genómicos V_H: las gráficas de las hileras superiores muestran las secuencias del presunto origen alélico IGHV1-2*02; las gráficas de las hileras inferiores muestran las secuencias de otros orígenes alélicos. La codificación por colores indica el número de secuencias. (C) Repertorio de secuencias de la cadena ligera expresadas procedentes del donante 45 (muestra 2001). Se representaron gráficamente las secuencias de la cadena ligera como función de la identidad de secuencias con las cadenas ligeras VRC01 (izquierda) y VRC03 (derecha), y de la divergencia de secuencias de los presuntos alelos del gen V genómicos. Las secuencias con deleciones en el resto 2 en la región CDR LI (que se observa en VRC01 y VRC03) se muestran como puntos negros. Dos secuencias de cadena ligera, con un 92,0 % de identidad con VRC01 (secuencia ID 181371) y con un 90,3 % de identidad con VRC03 (secuencia ID 223454) se resaltan con triángulos rojos. (D) Evaluación funcional de las secuencias de cadena ligera identificadas mediante la secuenciación en profundidad. Se representan gráficamente los perfiles de neutralización de la secuencia 181371 reconstituida con la cadena pesada VRC01 (denominada gVRC-L1_{d45}) y de la secuencia 223454 reconstituida con la cadena pesada VRC03 (denominada gVRC-L2_{d45}) con los dendogramas de neutralización de 20 aislados; en la tabla S22 se proporcionan las neutralizaciones explícitas de las CI₅₀S. (E) Evaluación funcional de las secuencias de cadena pesada identificadas mediante la secuenciación en profundidad. Las secuencias de cadena pesada de los donantes 45 y 74 se sintetizaron y expresaron tanto con la cadena ligera VRC01 o VRC03 (para el donante 45) o la cadena ligera VRC-PG04 (para el donante 74) y se evaluaron para la neutralización. Las secuencias con actividad neutralizante se muestran como estrellas rojas y se marcaron. gVRC-H(n)_{d74} se refiere a las cadenas pesadas con neutralización confirmada cuando se reconstituyen con la cadena ligera de VRC-PG04, con controles. Los solicitantes evaluaron

también secuencias derivadas de 454 para la compatibilidad estructural con VRC01, VRC03, y las estructuras cristalinas del complejo VRC-PG04 gp120 utilizando un algoritmo de formación de hebra que evaluó la compatibilidad estructural utilizando el potencial estadístico DFIRE (H. Zhou, Y. Zhou, Distance-scaled, finite ideal-gas reference state improves structure-derived potentials of mean force for structure selection and stability prediction. *Protein Sci* 11,2714-2726 (2002)). Ninguna de las diez secuencias con puntuaciones DFIRE óptimas, ni aquellas con una elevada divergencia en la línea germinal de origen genómico no de IGHV1-2*02 presentó neutralización cuando se reconstituyó con la cadena ligera de VRC01 (Fig. 4E). De esta manera, la similitud de la secuencia, el origen de IGHV1-2*02, y la divergencia se correlacionan todos con el potencial de neutralización, pero otros factores tales como la compatibilidad estructural prevista fracasaron en identificar los anticuerpos análogos a VRC01.

La Fig. 21, que representa gráficamente las similitudes de maduración de los anticuerpos análogos a VRC01 en diferentes donantes que se desvelaron mediante el análisis filogenético cruzado de los donantes. (A) Árboles con una probabilidad máxima de secuencias de cadenas pesadas del origen de IGHV1-2*02 procedentes del donante 45 (izquierda) y el donante 74 (derecha). El subconjunto de secuencias que se muestra se seleccionó basándose en la divergencia de líneas germinales como se describe en SOM. El árbol del donante 45 se basa en el presunto antecesor no mutado revertido de la cadena pesada de VRC01, e incluye también secuencias con actividad neutralizante específicas procedentes del donante 74 y 0219 (se muestran en rojo). De manera similar, el árbol del donante 74 se basa en el presunto antecesor no mutado revertido de la cadena pesada de VRC-PG04, y las secuencias del donante 45 y del donante 0219 se incluyeron en el análisis filogenético de donantes cruzados. Se muestran las barras que representan 0,1 cambios por sitio de nucleótido. Los recuadros muestran las asignaciones de la cadena J para todas las secuencias del subárbol neutralizante identificado por un árbol de uniones próximas iterativo como se describe en SOM. (B) Intermedios de maduración filogenéticamente inferidos. Se muestran representaciones de la estructura en cinta para VIH-1 gp120 (rojo) y los dominios variables de la cadena pesada (verde). Los intermedios críticos inferidos del árbol filogenético en (A) se marcaron con I_{d45} , II_{d45} , III_{d45} , I_{d74} e II_{d74} . Se proporciona el número de mutaciones del gen V_H (por ejemplo, para las 23 mutaciones asociadas con la primera intermediación del donante 45, " I_{d45} : 23"), y la localización de estos se destacó en la representación superficial y se coloreó de acuerdo con su química.

La Fig. 22 representa gráficamente un análisis del conjunto completo de anticuerpos de la cadena pesada del donante 74 y la identificación de las cadenas pesadas con actividad neutralizante de VIH-1. El análisis de rejilla de identidad/divergencia, el análisis filogenético de donantes cruzados, y el análisis de CDR H3 se acoplaron a la caracterización funcional de las secuencias de cadena pesada seleccionadas. Esto proporciona un medio para identificar novedosas cadenas pesadas con actividad neutralizante de VIH-1. (A) Análisis de rejilla de identidad/divergencia. Se muestra la localización de 63 cadenas pesadas de IGHV1-2*02 sintetizadas procedentes del donante 74, incluyendo secuencias neutralizantes (estrellas rojas) y secuencias no neutralizantes (estrellas negras). (B) Análisis filogenético de donantes cruzados y análisis de linajes CDR H3. Un árbol de probabilidad máxima de las 70 secuencias de cadena pesada sintetizadas (incluyendo 7 secuencias no IGHV1-2*02) se basó en el presunto antecesor no mutado revertido de VRC-PG04. Se muestran los anticuerpos VRC-PG y VRC-CH identificados mediante sonda en texto rojo junto con las 24 secuencias de cadena pesada identificadas genómicamente, gVRC-H(1-24)_{d74}, que se encontraron que neutralizaban VIH-1 cuando se reconstituyeron con la cadena ligera de VRC-PG04. Se especifican las localizaciones de la rejilla y las clases CDR H3 para secuencias neutralizantes y no neutralizantes. En cada clase CDR H3, todas las secuencias con CDR H3 idénticas están resaltadas en naranja en las rejillas más a la derecha (mostrándose el número de secuencias totales correspondientes a cada clase CDR H3). (C) Niveles de expresión de las cadenas pesadas seleccionadas reconstituidas con la cadena ligera de VRC-PG04 frente a la amplitud de neutralización. (D) Potencia de neutralización de los anticuerpos previstos por la filogenia de los donantes cruzados reconstituidos de siete aislados de VIH-1. (E) Análisis de CDR H3 de 74 donantes de secuencias de cadena pesada. Para cada una de las 110.386 secuencias derivadas del alelo IGHV1-2*02, como se muestra, se determinó la CDR H3 y se determinó por colores su porcentaje de identidad con el de la cadena pesada de VRC-PG04, y se representó gráficamente. Las secuencias con una elevada identidad de CDR H3 con VRC-PG04 residen en regiones con una elevada identidad global de la secuencia de la cadena pesada, incluso para las secuencias con una baja divergencia de IGHV1-2*02.

Descripción detallada

La presente divulgación proporciona un novedoso procedimiento para aislar novedosos anticuerpos monoclonales con una amplia y potente actividad neutralizante contra VIH. En particular, la investigación comenzó con un estudio clínico patrocinado por IAVI denominado Protocolo G, una búsqueda global de nuevos anticuerpos con amplio poder neutralizante contra VIH. Se recogieron muestras de sangre de más de 1.800 personas positivas para VIH en todo el mundo. El procedimiento implica la selección de un donante de PBMC con un título de anticuerpos de elevada neutralización en el plasma. Se seleccionaron linfocitos B por su actividad de neutralización antes del rescate de anticuerpos. Un procedimiento que preveía de forma más fiable si se desarrollaba una muestra dada que contenía anticuerpos con un amplio poder neutralizante y se puntuaron las muestras en términos de cuántos tipos de VIH neutralizaban, y el 10 % de la parte superior se separó para un estudio adicional. Se obtuvieron novedosos anticuerpos neutralizantes enfatizando la neutralización como la selección inicial (véase, por ejemplo, Walker L, Phogat S, y col. *Science*, 2009; 326:285-9. Epub 3 de septiembre de 2009).

En una realización ventajosa, el rescate recombinante de los anticuerpos monoclonales implica el uso de una clasificación de linfocitos B específica de antígenos como se describe por Wu y col (Science 329; 856 (2010)). Para aislar mAb dirigidos contra CD4bs, los solicitantes utilizaron un procedimiento de clasificación de linfocitos B con memoria específicos de antígenos recientemente descrito (Scheid y col., Nature 458, 636 (2009)), junto con la PCR de una única célula, para amplificar los genes de la cadena pesada y la cadena ligera de IgG a procedentes del ADNc de linfocitos B individuales (Scheid y col., Nature 458, 636 (2009), Wrarmert y col., Nature 453, 667 (2008)). RSC3 y Δ RSC3 se expresaron con una secuencia de aminoácidos etiquetada que permitía el marcado de la biotina (Wu y col., Science 329; 856 (2010)). Las dos proteínas se distinguirían de esta manera mediante análisis FACS tras el marcado con estreptavidina (SA) conjugada con los fluorocromos alofocianina (SA-APC) o ficoeritrina (SA-PE), respectivamente. Se incubaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) con RSC3 SA-APC y Δ RSC3 SA-PE, y los linfocitos B con memoria específicos de antígenos individuales se clasificaron en los pocillos de una placa de microvaloración después de seleccionar los linfocitos B (CD19+, CD20+, IgG+) que se unen a la sonda RSC3, pero no a la sonda Δ RSC3. Los linfocitos B con memoria específicos de RSC3 se clasificaron, y los genes de la cadena pesada y la cadena ligera correspondientes a partir de 12 células se amplificaron. Tras clonarse en los vectores de expresión de IgG1 que se reconstituyeron con las regiones constantes de la cadena pesada y la cadena ligera, se expresaron los mAb de IgG completa.

En otra realización, el rescate recombinante de los anticuerpos monoclonales implica el uso de un sistema de cultivo de linfocitos B como se describe en Weitcamp J-H y col., J. Immunol. 171:4680-4688 (2003). Se puede emplear también cualquier otro procedimiento de rescate de clones de linfocitos B individuales conocido en la técnica tal como la inmortalización de linfocitos B mediante VEB (Traggiai E., y col., Nat. Med. 10(8):871-875 (2004)), electrofusión (Buchacher, A., y col., 1994. AIDS Res. Hum. Retroviruses 10:359-369), e hibridoma de linfocitos B (Karpas A. y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98:1799-1804 (2001)).

En algunas realizaciones, se rescataron anticuerpos monoclonales a partir de cultivos de linfocitos B utilizando la RT-PCR específica de genes de cadena variable, y se seleccionaron transfectantes con combinaciones de clones de la cadena H y la cadena L de nuevo para la neutralización y las actividades de unión a un antígeno de VIH. Se seleccionaron mAb con propiedades de neutralización para caracterización adicional.

Los anticuerpos de la presente invención que se identificaron de acuerdo con estos procedimientos se divulgan por Wu y col, Science 329; 856 (2010). Estos anticuerpos se aislaron a partir de una muestra humana obtenida a través del Protocolo G de IAVI, y estos anticuerpos que neutralizan VIH in vitro se denominan VCR-PG-04.

La invención se basa en novedosos anticuerpos monoclonales y fragmentos de anticuerpos que neutralizan la infección por VIH. En algunas realizaciones, estos anticuerpos monoclonales y fragmentos de anticuerpos tienen concretamente una alta potencia para neutralizar la infección por VIH in vitro a través de múltiples clados. Dichos anticuerpos son deseables; ya que solo se requieren bajas concentraciones a fin de neutralizar una cantidad dada de virus. Esto facilita unos mayores niveles de protección a la vez que se administran bajas cantidades de anticuerpos. Los anticuerpos monoclonales humanos que secretan dichos anticuerpos se incluyen también en el alcance de la invención.

La invención se refiere también a diversos procedimientos y usos que implican los anticuerpos de la invención y los epítotos a los cuales se pueden unir.

La invención proporciona novedosos anticuerpos monoclonales o recombinantes que tienen concretamente una alta potencia en la neutralización de VIH. La invención proporciona también fragmentos de estos anticuerpos recombinantes o monoclonales, particularmente fragmentos que retienen la actividad de unión a antígeno de estos anticuerpos, que retienen, por ejemplo, al menos una región determinante de la complementariedad (CDR) específica de proteínas VIH. En esta memoria descriptiva, por "alta potencia en la neutralización de VIH" se entiende que una molécula de anticuerpo de la invención neutraliza VIH en un ensayo normalizado a una concentración menor que los anticuerpos conocidos en la técnica.

La molécula de anticuerpo de la presente invención puede tener concentraciones de menos de aproximadamente 1 μ g/ml, entre aproximadamente 1-10 μ g/ml o más de aproximadamente 10 μ g/ml para conseguir un 50 % u 80 % de neutralización. En una realización ilustrativa, la molécula de anticuerpo de la presente invención puede tener las concentraciones de la Tabla 4 que representan la concentración del anticuerpo monoclonal requerida para conseguir una neutralización del 50 % (Tabla 4A) u 80 % (Tabla 4B).

En otra realización, la molécula de anticuerpo de la presente invención puede neutralizar una concentración de 0,16 μ g/ml o inferior (es decir, 0,15, 0,125, 0,1, 0,075, 0,05, 0,025, 0,02, 0,016, 0,015, 0,0125, 0,01, 0,0075, 0,005, 0,004 o inferior), preferentemente 0,016 μ g/ml o inferior (una concentración de anticuerpos de 10⁻⁸ M o inferior, preferentemente 10⁻⁹ M o inferior, preferentemente 10⁻¹⁰ M o inferior, es decir, 10⁻¹¹ M, 10⁻¹² M, 10⁻¹³ M o inferior). Esto significa que solo se requieren concentraciones muy bajas de anticuerpo para una neutralización del 50 % de un aislado clínico de VIH in vitro. La potencia puede medirse utilizando un ensayo de neutralización normalizado como se describe en la técnica.

Los anticuerpos de la invención son capaces de neutralizar el VIH. Se pueden producir anticuerpos monoclonales mediante procedimientos conocidos, por ejemplo, como se describe por R. Kennet y col. en "Monoclonal Antibodies and Functional Cell Lines; Progress and Applications". Plenum Press (Nueva York), 1984. Los materiales y procedimientos adicionales se basan en procedimientos conocidos, por ejemplo, tal como se describe en J. Virol. 67:6642-6647, 1993.

Estos anticuerpos se pueden usar como agentes profilácticos o terapéuticos tras la formulación adecuada, o como una herramienta diagnóstica.

Un "anticuerpo con actividad neutralizante" es aquel que puede neutralizar la capacidad de este patógeno para iniciar y/o perpetuar una infección en un hospedador y/o en células diana in vitro. La invención proporciona un anticuerpo humano monoclonal neutralizante, en el que el anticuerpo reconoce un antígeno procedente de VIH.

Preferentemente, un anticuerpo de acuerdo con la invención es un novedoso anticuerpo monoclonal denominado en el presente documento VRC-PG-04. Estos anticuerpos se aislaron inicialmente de muestras humanas obtenidas según el Protocolo G de IAVI. Estos anticuerpos han mostrado neutralizar VIH in vitro.

Las CDR de las cadenas pesadas del anticuerpo se denominan CDRH1, CDRH2 y CDRH3, respectivamente. De manera similar, Las CDR de las cadenas ligeras del anticuerpo se denominan CDRL1, CDRL2 y CDRL3, respectivamente. La posición de los aminoácidos CDR se define de acuerdo con el sistema de numeración IMGT como: CDR1-IMGT posiciones 27 a 38, CDR2-IMGT posiciones 56 a 65 y CDR3-IMGT posiciones 105 a 117. (Lefranc, M P. y col. 2003 IMGT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor variable domains and Ig superfamily V-like domains. DevComp Immunol. 27(1):55-77; Lefranc, M P. 1997. Unique database numbering system for immunogenetic analysis. Immunology Today, 18:509; Lefranc, M P. 1999. The IMGT unique numbering for immunoglobulins, T cell receptors and Ig-like domains. The Immunologist, 7:132-136).

Las secuencias de aminoácidos de las regiones CDR3 de las cadenas ligera y pesada de los anticuerpos se muestran en la FIG. 8.

Como se usa en el presente documento, un anticuerpo con actividad neutralizante puede inhibir la entrada del virus VIH-1 con un índice de neutralización $>1,5$ o $>2,0$. Los anticuerpos con amplia y potente actividad neutralizante pueden neutralizar más de aproximadamente el 50 % de virus VIH-1 (de diversos clados y diferentes cepas en un clado) en un ensayo de neutralización.

Se conocen en la técnica ensayos para seleccionar anticuerpos con actividad neutralizante. Se ha descrito anteriormente un enfoque de ensayo de neutralización (Binley JM, y col., (2004). Comprehensive Cross-Clade Neutralization Analysis of a Panel of Anti-Human Immunodeficiency Virus Type 1 Monoclonal Antibodies. J. Virol. 78: 13232-13252). Pueden generarse virus pseudotipados transfectando simultáneamente células con al menos dos plásmidos que codifican el ADN de Env soluble de la presente invención y el resto del genoma del VIH por separado. En el vector que codifica el genoma de VIH, el gen Env puede estar sustituido por el gen de la luciferasa. Los sobrenadantes transfectantes que contienen el virus pseudotipado pueden incubarse simultáneamente durante la noche con sobrenadantes de los linfocitos B derivados de la activación de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) primaria de un donante infectado. Se pueden añadir a la mezcla células transfectadas de manera estable y que expresan CD4 más los correceptores de CCR5 y CXCR4 e incubarse durante 3 días a 37 °C. Las células infectadas se pueden cuantificar mediante luminometría.

El índice de neutralización puede expresarse como la relación de unidades de luminiscencia relativas normalizadas (ULR) de la cepa vírica de ensayo a la de un virus del control derivado del mismo sobrenadante del cultivo de linfocitos B. Los valores de corte utilizados para distinguir éxitos de neutralización pueden determinarse mediante el índice de neutralización de un gran número de "pocillos control negativos" que contienen sobrenadantes de cultivos de linfocitos B derivados de donantes sanos. Dicho procedimiento era satisfactorio para el aislamiento y caracterización de PG9 y PG16.

El procedimiento de la patente de Estados Unidos n.º 7.386.232 se puede usar también para seleccionar anticuerpos con un amplio poder neutralizante. Puede construirse una proteína de fusión envoltura-enzima uniendo una enzima al final del extremo C de una proteína de la envoltura. Las partículas víricas que comprenden la proteína de fusión y la glicoproteína de la envoltura natural y/o soluble pueden generarse y utilizarse para infectar células diana en el suero de un paciente. Las actividades enzimáticas medidas en dichas células infectadas son medidas de la unión y la entrada del virus a las células diana que están mediadas por la proteína de la envoltura vírica natural. Los ejemplos de enzimas que se pueden usar para generar la proteína de fusión incluyen, pero no de forma limitativa, luciferasa, fosfatasa alcalina bacteriana o placentaria, β -galactosidasa, y proteínas fluorescentes tales como proteína fluorescente verde o toxinas. El ensayo, por lo general, puede llevarse a cabo en una placa de 96 pocillos. Las actividades enzimáticas disminuidas en presencia del suero indican que existen anticuerpos con actividad neutralizante en el suero.

En una realización ventajosa, se aislaron VRC-PG-04 y VRC-PG-05 utilizando la clasificación de linfocitos B específica de antígenos y la amplificación mediante la PCR de los genes de la cadena pesada y ligera como se describe en Wu y col (Science 329; 856 (2010)). Se utilizaron sondas de proteínas específicas de epitopos (RSC3) y mutantes inactivados genéticamente (delta RSC3) como se describe en Wu y col (Science 329; 856 (2010)).

- En otra realización, para aislar los mAb dirigidos a CD4bs, se prefiere un procedimiento de clasificación de linfocitos B con memoria específicos de antígenos (Wu y col (Science 329; 856 (2010))), junto con la PCR de una única célula, para amplificar los genes de la cadena pesada y la cadena ligera de IgG procedentes del ADNc de linfocitos B individuales (J. F. Scheid y col., Broad diversity of neutralizing antibodies isolated from memory B cells in HIV-infected individuals. Nature 458, 636 (2009) y J. Wrarmert y col., Nature 453, 667 (2008)). Las sondas de Env mutante se expresan con una secuencia de aminoácidos etiquetada que permite el marcado de la biotina para distinguirla mediante el análisis FACS tras marcar con estreptavidina (SA) conjugada a los fluorocromos alofococianina (SA-APC) o ficoeritrina (SA-PE), respectivamente. Se incubaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) procedentes de un donante y se incubaron con las sondas de Env mutante marcadas, y se clasificaron linfocitos B con memoria específicos de antígenos individuales en los pocillos de una placa de microvaloración después de seleccionar los linfocitos B (CD19+, CD20+, IgG+) que se unen a la sonda de referencia. Se clasificaron los linfocitos B con memoria específicos de sonda de referencia y se amplificaron los genes de la cadena pesada y la cadena ligera correspondientes. Tras clonarse en los vectores de expresión de IgG1 que reconstituyen las regiones constantes de la cadena pesada y la cadena ligera, se expresaron los mAb de IgG completa.
- La etapa de clonación para separar clones de individuales de la mezcla de células positivas puede llevarse a cabo utilizando una dilución limitante, micromanipulación, una deposición de células individuales mediante clasificación celular u otro procedimiento conocido en la técnica. Preferentemente, la clonación se lleva a cabo utilizando dilución limitante.
- Los clones de linfocitos B inmortalizados de la invención se pueden usar de diversas maneras, por ejemplo, como fuente de anticuerpos monoclonales, como fuente de ácido nucleico (ADN o ARNm) que codifica un anticuerpo monoclonal de interés, para la investigación, etc.
- Los epítomos reconocidos por estos anticuerpos pueden tener numerosos usos. Los epítomos y mimotopos en forma purificada o sistémica se pueden usar para aumentar la respuesta inmunitaria (es decir, como una vacuna, o para la producción de anticuerpos para otros usos) o para seleccionar el suero de un paciente para los anticuerpos que inmunorreaccionan con los epítomos o mimotopos. Preferentemente, dicho epítomo o mimotopo, o antígeno que comprende dicho epítomo o mimotopo se usa como una vacuna para suscitar una respuesta inmunitaria. Los anticuerpos de la invención se pueden usar también en un procedimiento para vigilar la calidad de las vacunas, en particular para controlar que el antígeno de una vacuna contiene el epítomo inmunógeno correcto en la conformación correcta.
- Los epítomos pueden ser también útiles en la selección de ligandos que se unen a los mencionados epítomos. Dichos ligandos bloquean preferentemente los epítomos y de esta manera evitan la infección.
- Los compuestos que tienen una estructura química seleccionada según la invención, en los que dichos compuestos son aglutinantes de anticuerpos con actividad neutralizante, forman un aspecto adicional de la invención; y, dichos compuestos pueden utilizarse en procedimientos de tratamientos médicos, tales como para el diagnóstico, prevención o tratamiento de VIH o para estimular anticuerpos para el diagnóstico de VIH, incluyendo el uso en vacunas. Adicionalmente, dichos compuestos pueden utilizarse en la preparación de medicamentos para los mencionados tratamientos o la prevención, o en composiciones para fines diagnósticos. Los compuestos pueden emplearse solos o en combinación con otros tratamientos, vacunas o preventivos; y, los compuestos pueden usarse en la preparación de medicamentos combinados para dichos tratamiento o prevención, o en kits que contienen el compuesto y el otro tratamiento o preventivo.
- Los términos "proteína", péptido, "polipéptido", y "secuencia de aminoácidos" se usan de manera indistinta en el presente documento para referirse a polímeros de restos de aminoácidos de cualquier longitud. El polímero puede ser lineal o ramificado, puede comprender aminoácidos modificados o análogos de aminoácidos, y puede interrumpirse por restos químicos diferentes de los aminoácidos. Los términos abarcan también un polímero de aminoácidos que se ha modificado naturalmente o mediante intervención; por ejemplo, formación de enlaces disulfuro, glicosilación, lipidación, acetilación, fosforilación, o cualquier otra manipulación o modificación, tal como conjugación con una marca o componente bioactivo.
- Como se usa en el presente documento, los términos "antígeno" o "inmunógeno" se usan de manera indistinta para referirse a una sustancia, normalmente una proteína, que es capaz de inducir una respuesta inmunitaria en un sujeto. El término se refiere también a proteínas que son inmunológicamente activas en el sentido que una vez administradas a un sujeto (tanto de forma directa como administrando al sujeto una secuencia o vector de nucleótidos que codifica la proteína) es capaz de evocar una respuesta inmunitaria del tipo humoral y/o celular dirigida contra la proteína.
- El término "anticuerpo" incluye moléculas intactas, así como sus fragmentos, tales como Fab, F(ab')₂, Fv y scFv que son capaces de unirse al epítomo determinante. Estos fragmentos de anticuerpos retienen alguna capacidad de unirse selectivamente con su antígeno o receptor e incluyen, por ejemplo:
- (i) Fab, el fragmento que contiene un fragmento de unión a antígeno monovalente de una molécula de anticuerpo puede producirse mediante digestión del anticuerpo completo con la enzima papaína para dar como resultado una cadena ligera intacta y una porción de una cadena pesada;

(ii) Fab', el fragmento de una molécula de anticuerpo se puede obtener tratando el anticuerpo completo con pepsina, seguido por reducción, para dar como resultado una cadena ligera intacta y una porción de la cadena pesada; se obtienen dos fragmentos Fab' por molécula de anticuerpo;

5 (iii) F(ab')₂, el fragmento del anticuerpo puede obtenerse tratando el anticuerpo completo con la enzima pepsina sin la subsiguiente reducción; F(ab')₂ es un dímero de dos fragmentos Fab' unidos entre sí por dos enlaces disulfuro;

(iv) scFv, que incluye un fragmento diseñado mediante ingeniería genética que contiene la región variable de una cadena pesada y una cadena ligera como una molécula de una única cadena fusionada.

10 Se conocen en la técnica los procedimientos generales de preparación de estos fragmentos. (Véase, por ejemplo, Flarlow y Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York (1988).

15 Un "anticuerpo con actividad neutralizante" puede inhibir la entrada del virus VIH-1, por ejemplo, SF162 y/o JRCSF con un índice de neutralización >1,5 o >2,0. Los anticuerpos con amplia y potente actividad neutralizante pueden neutralizar más de aproximadamente el 50 % de virus VIH-1 (de diversos clados y diferentes cepas en un clado) en un ensayo de neutralización. La concentración inhibidora del anticuerpo monoclonal puede ser menor de aproximadamente 25 mg/ml para neutralizar aproximadamente el 50 % de entrada del virus en el ensayo de neutralización.

20 Un "anticuerpo aislado" o "anticuerpo de origen no natural" es aquel que se ha separado y/o recuperado de un componente de su entorno natural. Los componentes contaminantes de su ambiente natural son materiales que podrían interferir con los usos diagnósticos o terapéuticos del anticuerpo, y pueden incluir enzimas, hormonas, y otros solutos proteínicos o no proteínicos. En realizaciones preferidas, el anticuerpo se purifica: (1) hasta más de un 95 % en peso de anticuerpo según se determina mediante el procedimiento de Lowry, y lo más preferente más de un 99 % en peso; (2) hasta un grado suficiente para obtener al menos 15 restos en el extremo N o la secuencia interna de aminoácidos mediante el uso de un secuenciador de copa rotatoria; o (3) hasta la homogeneidad mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras o no reductoras usando azul de Coomassie o, preferentemente, tinción de plata. El anticuerpo aislado incluye el anticuerpo *in situ* en el interior de células recombinantes ya que al menos un componente del entorno natural del anticuerpo no estará presente. Ordinariamente, sin embargo, el anticuerpo aislado se preparará mediante al menos una etapa de purificación.

30 El término "anticuerpo monoclonal" tal como se usa en el presente documento se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos salvo por posibles mutaciones que se producen naturalmente que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son muy específicos, dirigiéndose contra un único sitio antigénico. Además, en contraste con las preparaciones de anticuerpos monoclonales que incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítopos), cada anticuerpo monoclonal se dirige contra un único determinante en el antígeno. Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales son ventajosos por que pueden sintetizarse sin estar contaminados por otros anticuerpos. No debe considerarse que el modificador "monoclonal" se prepare requiriendo la producción del anticuerpo mediante cualquier procedimiento concreto. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales útiles en la presente invención pueden prepararse mediante la metodología del hibridoma descrita en primer lugar por Kohler y col., *Nature*, 256:495 (1975), o se pueden preparar utilizando procedimientos de ADN recombinante en células bacterianas, animales o vegetales eucariotas (véase, *por ejemplo*, patente de Estados Unidos N.º 4.816.567). Se pueden aislar también "anticuerpos monoclonales" de bibliotecas de anticuerpos contra fagos utilizando las técnicas descritas en Clackson y col., *Nature*, 352:624-628 (1991) y Marks y col., *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991), por ejemplo.

45 Un "fragmento de anticuerpo" comprende una porción de un anticuerpo intacto, preferentemente la región de unión a antígeno o variable del anticuerpo intacto. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂, y Fv; diacuerpos; anticuerpos lineales (véase la patente de EE.UU. N.º 5.641.870; Zapata y col., *Protein Eng.* 8(10): 1057-1062 [1995]); moléculas de anticuerpos monocatenarios; y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo.

50 Debe entenderse que las proteínas, incluyendo los anticuerpos de la invención, pueden diferir de las secuencias exactas ilustradas y descritas en el presente documento. De esta manera, la invención contempla delecciones, adiciones y sustituciones de las secuencias que se muestran, siempre que las secuencias funciones de acuerdo con los procedimientos de la invención. En este sentido, las sustituciones particularmente preferidas serán generalmente de tipo conservativo, es decir, aquellas sustituciones que tienen lugar en una familia de aminoácidos. Por ejemplo, los aminoácidos se dividen generalmente en cuatro familias: (1) ácidos-aspartato y glutamato; (2) básicos-lisina, arginina, histidina; (3) no polares-alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano; y (4) polares no cargados-glicina, asparagina, glutamina, cisteína, serina, treonina, tirosina. Fenilalanina, triptófano, y tirosina se clasifican algunas veces como aminoácidos aromáticos. Es razonablemente previsible que una sustitución aislada o de origen no natural, de leucina con isoleucina o valina, o viceversa; de un aspartato con un glutamato o viceversa; de una treonina con una serina o viceversa; o una sustitución conservativa similar de un aminoácido con un aminoácido estructuralmente relacionado, no tenga un efecto importante sobre la actividad biológica. Las proteínas que tienen sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos que las secuencias ilustradas y descritas, pero que poseen sustituciones de aminoácidos poco importantes que no alteran sustancialmente la inmunogenicidad de la proteína

están, por lo tanto, comprendidas en el alcance de la invención.

Como se usa en el presente documento, los términos "secuencias de nucleótidos" y "secuencias de ácidos nucleicos" se refieren a secuencias de ácido desoxirribonucleico (ADN) o de ácido ribonucleico (ARN), incluidos, sin limitación, ARN mensajero (ARNm), híbridos de ADN/ARN, o ácidos nucleicos sintéticos. El ácido nucleico puede ser monocatenario, o parcial o completamente bicatenario (duplete). Los ácidos nucleicos duplete pueden ser homoduplete o heteroduplete.

Como se usa en el presente documento, el término "transgén" puede utilizarse para referirse a secuencias de nucleótidos "recombinantes" que se pueden derivar de cualquiera de las secuencias de nucleótidos que codifican las proteínas de la presente invención. El término "recombinante" significa una secuencia de nucleótidos que ha sido manipulada "por el hombre" y que no se produce en la naturaleza, o que está unida a otra secuencia de nucleótidos o que se encuentra en una disposición diferente en la naturaleza. Se entiende que manipulada "por el hombre" significa manipulada por algunos medios artificiales, incluyendo mediante el uso de máquinas, optimización de codones, enzimas de restricción, etc.

Por ejemplo, las secuencias de nucleótidos pueden estar mutadas de tal manera que la actividad de las proteínas codificadas in vivo queda suprimida. Las secuencias de nucleótidos pueden estar optimizadas según el codón, por ejemplo, los codones pueden optimizarse para uso humano. En las realizaciones preferidas, las secuencias de nucleótidos están mutadas para suprimir la función normal in vivo de las proteínas codificadas, y optimizadas para el codón de uso humano. Por ejemplo, cada uno de Gag, Pol, Env, Nef, RT, y las secuencias Int de la invención pueden estar alteradas de esta manera.

Con respecto a la optimización según el codón, las moléculas de ácidos nucleicos tienen una secuencia de nucleótidos que codifica los antígenos de la invención y que se puede diseñar para emplear codones que se usan en los genes del sujeto en el que se va a producir el antígeno. Muchos virus, incluyendo VIH y otros lentivirus, utilizan un gran número de codones raros y, alterando estos codones para que correspondan a los codones comúnmente utilizados en el sujeto deseado, se puede conseguir la expresión potenciada de los antígenos. Los codones utilizados son codones "humanizados", es decir, los codones son aquellos que aparecen frecuentemente en genes humanos muy expresados (Andre y col., J. Virol. 72:1497-1503,1998) en vez de aquellos codones que se usan frecuentemente por el VIH. Dicha utilización del codón proporciona una expresión eficaz de las proteínas de VIH transgénicas en células humanas. Se puede usar cualquier procedimiento adecuado de optimización según el codón. Dichos procedimientos, y la selección de dichos procedimientos, son bien conocidos por los expertos en la materia. Además, existen algunas empresas que optimizarán los codones de las secuencias, tales como Geneart (geneart.com). De esta manera, las secuencias de nucleótidos pueden optimizarse fácilmente según los codones.

La divulgación abarca además secuencias de nucleótidos que codifican variantes y derivados funcionales y/o antigénicamente equivalentes de los antígenos de la invención y sus fragmentos funcionalmente equivalentes. Estas variantes, derivados, y fragmentos funcionalmente equivalentes presentan la capacidad de retener la actividad antigénica. Por ejemplo, cambios en una secuencia de ADN que no cambian la secuencia de aminoácidos codificada, así como aquellos que dan como resultado sustituciones conservativas de restos de aminoácidos, una o unas pocas deleciones o adiciones, y sustituciones de restos de aminoácidos por análogos de aminoácidos son aquellas que no influyen significativamente sobre las propiedades del polipéptido codificado. Las sustituciones de aminoácidos conservativas son glicina/alanina; valina/isoleucina/leucina; asparagina/glutamina; ácido aspártico/ácido glutámico; serina/treonina/metionina; lisina/arginina; y fenilalanina/tirosina/triptófano. En una realización, las variantes tienen al menos un 50 %, al menos un 55 %, al menos un 60 %, al menos un 65 %, al menos un 70 %, al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 86 %, al menos un 87 %, al menos un 88 %, al menos un 89 %, al menos un 90 %, al menos un 91 %, al menos un 92 %, al menos un 93 %, al menos un 94 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 % o al menos un 99 % de homología o identidad con el antígeno, epítipo, inmunógeno, péptido o polipéptido de interés.

Para los fines de la presente divulgación, la identidad u homología de la secuencia se determina comparando las secuencias cuando se alinean con el fin de maximizar el solapamiento y la identidad minimizando a la vez los vacíos de secuencia. En particular, la identidad de la secuencia puede determinarse utilizando cualquiera de numerosos algoritmos. Un ejemplo no limitante de un algoritmo matemático utilizado para la comparación de dos secuencias es el algoritmo de Karlin & Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1990; 87: 2264-2268, modificado según Karlin & Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1993:90: 5873-5877.

Otro ejemplo de un algoritmo matemático utilizado para la comparación de secuencias es el algoritmo de Myers & Miller, CABIOS 1988;4: 11-17. Dicho algoritmo se incorpora en el programa ALIGN (versión 2.0) que es parte del paquete del programa informático de alineación de secuencias GCG. Cuando se utiliza el programa ALIGN para comparar secuencias de aminoácidos, se puede utilizar una tabla de restos PAM120 en peso, una penalización por longitud de hueco de 12, y una penalización por hueco de 4. Otro algoritmo útil adicional para identificar regiones de similitud de secuencias local es el algoritmo FASTA que se describe en Pearson & Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1988; 85: 2444-2448.

Ventajoso para el uso de acuerdo con la presente invención es el programa informático WLT-BLAST (Washington

University BLAST) versión 2.0. Se pueden descargar programas WLT-BLAST versión 2.0 ejecutables para varias plataformas UNIX de <ftp://blast.wustl.edu/blast/executables>. Este programa se basa en la versión 1.4 de WLT-BLAST, que a su vez se basa en el dominio público NCBI-BLAST versión 1.4 (Altschul & Gish, 1996, Local alignment statistics, Doolittle ed., Methods in Enzymology 266:460-480; Altschul y col., Journal of Molecular Biology 1990; 215:403-410; Gish & States, 1993; Nature Genetics 3: 266-272; Karlin & Altschul, 1993; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 5873-5877).

Las diversas secuencias de nucleótidos recombinantes y anticuerpos de la invención se preparan utilizando ADN recombinante normalizado y técnicas de clonación. Dichas técnicas son bien conocidas de los expertos en la materia. Véase, por ejemplo, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", segunda edición (Sambrook y col. 1989).

Las secuencias de nucleótidos pueden insertarse en "vectores". El término "vector" es ampliamente usado y entendido por los expertos en la materia, y como se utiliza en el presente documento, el término "vector" se usa de forma coherente con su significado por los expertos en la materia. Por ejemplo, el término "vector" se usa comúnmente por los expertos en la materia para referirse a un vehículo que permite o facilita la transferencia de moléculas de ácido nucleico de un entorno a otro o que permite o facilita la manipulación de una molécula de ácido nucleico.

Cualquier vector que permita la expresión de los anticuerpos de la presente invención puede utilizarse de acuerdo con la presente invención. En determinadas realizaciones, los anticuerpos de la presente invención pueden utilizarse in vitro (tal como utilizando sistemas de expresión exentos de células) y/o en células cultivadas que crecen in vitro a fin de producir los anticuerpos anti-VIH codificados, que se pueden usar a continuación en diversas aplicaciones tales como en la producción de vacunas proteínáceas. Para dichas aplicaciones, se puede usar cualquier vector que permita la expresión de los anticuerpos in vitro y/o en células cultivadas.

Para las aplicaciones donde se desea que los anticuerpos se expresen in vivo, por ejemplo, cuando los transgenes se usan en ADN o en vacunas que contienen ADN, se puede usar cualquier vector que permita la expresión de los anticuerpos de la presente invención y sea seguro para el uso in vivo. En las realizaciones preferidas los vectores utilizados son seguros para el uso en seres humanos, mamíferos y/o animales de laboratorio.

Para los anticuerpos de la presente invención que se van a expresar, la secuencia codificante de la proteína debe "unirse operativamente" a secuencias control reguladoras o de ácido nucleico que dirigen la transcripción y la traducción de la proteína. Como se usa en el presente documento, se dice que una secuencia de codificación y una secuencia control de ácido nucleico o promotor están "unidas operativamente" cuando están unidas covalentemente de tal manera que colocan la expresión o la transcripción y/o la traducción de la secuencia de codificación bajo la influencia o el control de la secuencia control de ácido nucleico. La "secuencia control de ácido nucleico" puede ser cualquier elemento de ácido nucleico, tales como, aunque no de forma limitativa a promotores, potenciadores, IRES, intrones, y otros elementos descritos en el presente documento que dirigen la expresión de una secuencia de ácido nucleico o secuencia de codificación que está unida operativamente al anterior. El término "promotor" se usará en el presente documento para referirse a un grupo de módulos de control de la transcripción que se agruparán alrededor del sitio de inicio de la ARN polimerasa I y que cuando se unen operativamente a las secuencias codificantes de la proteína de la invención conducen a la expresión de la proteína codificada. La expresión de los transgenes de la presente invención puede estar bajo el control de un promotor constitutivo o de un promotor inducible, que inicia la transcripción solo cuando se expone a algún estímulo externo concreto, tal como, sin limitación, antibióticos tales como tetraciclina, hormonas tales como ecdisona, o metales pesados. El promotor puede ser también específico de un tipo de célula, tejido u órgano concreto. Se conocen en la técnica muchos promotores y potenciadores adecuados, y cualquiera de dichos promotores o potenciadores adecuados se puede utilizar para la expresión de los transgenes de la invención. Por ejemplo, los promotores y/o potenciadores adecuados se pueden seleccionar de la Base de datos de promotores eucariotas (EPDB).

Los vectores utilizados de acuerdo con la presente invención deben seleccionarse típicamente de tal manera que contengan una región reguladora génica adecuada, tal como un promotor o potenciador, de tal manera que se pueden expresar los anticuerpos de la invención.

Por ejemplo, cuando el objetivo es expresar los anticuerpos de la invención in vitro, o en células cultivadas, o en cualquier sistema procarionta o eucariota a fin de producir la(s) proteína(s) codificadas por este anticuerpo, entonces se puede usar cualquier vector adecuado dependiendo de la aplicación. Por ejemplo, se pueden utilizar plásmidos, vectores víricos, vectores bacterianos, vectores protozoarios, vectores de insectos, vectores de expresión de baculovirus, vectores de levaduras, vectores de células de mamíferos, y similares. Los técnicos expertos pueden seleccionar los vectores adecuados teniendo en consideración las características del vector y los requisitos para expresar los anticuerpos en las circunstancias identificadas.

En una realización ventajosa, se pueden utilizar vectores de expresión IgG1 para reconstituir regiones constantes de la cadena pesada y ligera si se clonan los genes de la cadena pesada y ligera de los anticuerpos de la presente invención.

Cuando el objetivo es expresar los anticuerpos de la invención in vivo en un sujeto, por ejemplo, para generar una respuesta inmunitaria contra un antígeno de VIH-1 y/o una inmunidad protectora contra VIH-1, deben seleccionarse vectores de expresión que sean adecuados para la expresión en este sujeto, y que sean seguros para el uso in vivo.

Por ejemplo, en algunas realizaciones puede desearse expresar los anticuerpos de la invención en un animal de laboratorio, tal como para el ensayo preclínico de las composiciones inmunogénicas de VIH-1 y las vacunas de la invención. En otras realizaciones, será deseable expresar los anticuerpos de la invención en sujetos humanos, tales como en ensayos clínicos y para el uso clínico real de las composiciones inmunogénicas y la vacuna de la invención.

Se pueden emplear cualesquiera vectores que sean adecuados para dichos usos, y estará comprendido en las capacidades del técnico experto seleccionar un vector adecuado. En algunas realizaciones puede preferirse que los vectores utilizados para esto en aplicaciones in vivo estén atenuados en el vector de la amplificación en el sujeto. Por ejemplo, si se utilizan vectores plásmidos, preferentemente carecerán de un origen de replicación que actúe en el sujeto para potenciar la seguridad para el uso in vivo en el sujeto. Si se utilizan vectores víricos, preferentemente están atenuados o tienen una replicación defectiva en el sujeto, de nuevo, con el fin de potenciar la seguridad para el uso in vivo en el sujeto.

En realizaciones preferidas de la presente invención se usan vectores víricos. Los vectores de expresión víricos son bien conocidos por los expertos en la técnica e incluyen, por ejemplo, virus tales como adenovirus, virus adenoasociados (VAA), alfavirus, herpesvirus, retrovirus y poxvirus, incluyendo los virus de la viruela aviar, poxvirus atenuados, virus vaccinia, y, particularmente, el virus vaccinia Ankara modificado (MVA; n.º de registro de ATCC VR-1566). Dichos virus, cuando se usan como vectores de expresión no son patógenos de forma innata en los sujetos seleccionados tales como seres humanos o se han modificado para volverlos no patógenos en los sujetos seleccionados. Por ejemplo, son bien conocidos los adenovirus y alfavirus defectivos para la replicación y se pueden usar como vectores de administración de genes.

Las secuencias y vectores de nucleótidos se pueden administrar a células, por ejemplo, si el objetivo es expresar los antígenos de VIH-1 en células a fin de producir y aislar las proteínas expresadas, tal como a partir de células que crecen en el cultivo. Para expresar los anticuerpos en células se puede usar cualquier procedimiento de transfección, transformación o de administración génica adecuados. Dichos procedimientos son bien conocidas de los expertos en la técnica, y un experto en la técnica sería capaz de seleccionar con facilidad un procedimiento adecuado dependiendo de la naturaleza de las secuencias de nucleótidos, vectores, y tipos de células utilizados. Por ejemplo, se puede usar la transfección, transformación, microinyección, infección, electroporación, lipofección, o administración mediada por liposomas. La expresión de los anticuerpos podría llevarse a cabo en cualquier tipo adecuado de células hospedadoras, tales como células bacterianas, levaduras, células de insecto, y células de mamífero. Los anticuerpos de la invención pueden expresarse también utilizando sistemas que incluyen transcripción/traducción in vitro. Todos los procedimientos mencionados son bien conocidos de los expertos en la materia, y un experto en la técnica sería capaz de seleccionar con facilidad un procedimiento adecuado dependiendo de la naturaleza de las secuencias de nucleótidos, vectores, y tipos de células utilizados.

Las secuencias de nucleótidos o anticuerpos de la invención se administran in vivo, por ejemplo, cuando el objetivo es producir una respuesta inmunógena en un sujeto. Un "sujeto" en el contexto de la presente invención puede ser cualquier animal. Por ejemplo, en algunas realizaciones puede desearse expresar los transgenes en un animal de laboratorio, tal como para el ensayo preclínico de las composiciones inmunogénicas de VIH-1 y las vacunas de la invención. En otras realizaciones, será deseable expresar los anticuerpos de la invención en sujetos humanos, tales como en ensayos clínicos y para el uso clínico real de las composiciones inmunogénicas y la vacuna de la invención. En realizaciones preferidas el sujeto es un ser humano, por ejemplo, un ser humano que está infectado con, o está en riesgo de infección con, VIH-1.

El término "composición farmacéutica" se usa en el presente documento para definir una composición sólida o líquida en una forma, concentración y nivel de pureza adecuados para su administración a un paciente (por ejemplo, un paciente humano) que, tras cuya administración, puede estimular los cambios fisiológicos deseados. Los términos "composición inmunógena" y "composición inmunológica" y "composición inmunógena o inmunológica" abarcan cualquier composición que estimule una respuesta inmunitaria contra el patógeno dirigido, VIH. Términos tales como "composición de vacunación" y "vacuna" y "composición de vacuna" abarcan cualquier composición que induzca una respuesta inmunitaria protectora contra el patógeno dirigido o que proteja eficazmente contra el patógeno; por ejemplo, tras la administración o inyección, estimula una respuesta inmunitaria protectora contra el patógeno diana o proporciona una protección eficaz contra el patógeno. De acuerdo con ello, una composición inmunógena o inmunológica induce una respuesta inmunitaria que puede, pero no es necesario, que sea una respuesta inmunitaria protectora. Se puede usar una composición inmunógena o inmunológica en el tratamiento de individuos infectados con el patógeno, por ejemplo, para estimular una respuesta inmunitaria contra el patógeno, tal como estimular anticuerpos contra el patógeno. De esta manera, una composición inmunógena o inmunológica puede ser una composición farmacéutica. Además, cuando el texto habla de "inmunógeno, antígeno o epítipo", un inmunógeno puede ser un antígeno o epítipo de un antígeno. Una composición diagnóstica es una composición que contiene un compuesto o anticuerpo, por ejemplo, un compuesto o anticuerpo marcado, que se usa para detectar la presencia en una muestra, tal como una muestra biológica, por ejemplo, sangre, semen, fluido vaginal, etc., de un anticuerpo que se une al compuesto o a un inmunógeno, antígeno o epítipo que se une al anticuerpo; por ejemplo, un anticuerpo anti-VIH o un inmunógeno, antígeno o epítipo de VIH.

Para dichas aplicaciones in vivo, las secuencias de nucleótidos, anticuerpos de la invención se administran preferentemente como un componente de una composición inmunógena que comprende las secuencias de nucleótidos y/o los antígenos de la invención en premezcla con un transportador farmacéuticamente aceptable. Las

composiciones inmunogénicas de la invención son útiles para estimular una respuesta inmunitaria contra VIH-1 y se pueden usar como uno o más componentes de una vacuna profiláctica o terapéutica contra VIH-1 para la prevención, el alivio o el tratamiento del SIDA. Los ácidos nucleicos y vectores son particularmente útiles para proporcionar vacunas genéticas, es decir, vacunas para administrar los ácidos nucleicos que codifican los anticuerpos de la invención a un sujeto, tal como un ser humano, de tal manera que los anticuerpos se expresan a continuación en el sujeto para estimular una respuesta inmunitaria.

La presente divulgación se refiere también a los procedimientos para inmunizar o reducir el efecto de una infección por VIH o una enfermedad relacionada con VIH que puede comprender identificar un paciente que necesita dicho tratamiento, y administrar a dicho paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un anticuerpo de la presente invención. El procedimiento puede comprender adicionalmente la administración de un segundo agente terapéutico. El segundo agente terapéutico puede ser un agente antivírico. El agente antivírico puede ser Abacavir, Aciclovir, Adefovir, Amantadina, Amprenavir, Ampligen, Aplavir, Arbidol, Atazanavir, Atripla, Boceprevir, Cidofovir, Combivir, Darunavir, Delavirdina, Didanosina, Docosanol, Edoxudina, Efavirenz, Emtricitabina, Enfuvirtida, Entecavir, Inhibidores de la entrada, Famciclovir, Fomivirsén, Fosamprenavir, Foscarnet, Fosfonet, Inhibidores de la fusión, Ganciclovir, Ibacitabina, Imunovir, Idoxuridina, Imiquimod, Indinavir, Inosina, Inhibidores de la integrasa, Interferón (por ejemplo, de tipo I, II o III), Lamivudina, Lopinavir, Lovirida, Maraviroc, Moroxidina, Metisazona, Nelfinavir, Nevirapina, Nexavir, Análogos de nucleósidos, Oseltamivir (Tamiflu), Peginterferon alfa-2a, Penciclovir, Peramivir, Pleconaril, Podofilotoxina, Inhibidores de la proteasa, Raltegravir, Inhibidores de la transcriptasa inversa, Ribavirina, Rimantadina, Ritonavir, Piramidina, Saquinavir, Estavudina, Tenofovir, Tenofovir disoproxil, Tipranavir, Trifluridina, Trizivir, Tromantadina, Truvada, Valaciclovir (Valtrex), Valganciclovir, Vicriviroc, Vidarabina, Virmidina, Vicriviroc, Zalcitabina, Zanamivir (Relenza) o Zidovudina o una de sus combinaciones.

La presente divulgación se refiere también a los procedimientos de inmunizar o reducir el efecto de una infección por VIH o una enfermedad relacionada con VIH que puede comprender identificar un paciente que necesita dicho tratamiento y administrar a dicho paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de: un primer anticuerpo de la presente invención, o uno de sus fragmentos, específico de un primer epítipo que se une a dicho primer anticuerpo y un segundo anticuerpo de la presente invención, o uno de sus fragmentos, específico para un segundo epítipo que se une a dicho segundo anticuerpo. En una realización, el primer anticuerpo puede ser VRC-PG-04. En otra realización, el segundo anticuerpo puede ser VRC-PG-04. En otra realización adicional, el segundo anticuerpo puede ser VRC01, VRC02, VRC03, VRCCH30, VRCCH31, VRCCH32, VRCCH33 o VRCCH34.

Los expertos en la materia saben identificar a un paciente que necesita tratamiento para una infección por VIH o una enfermedad relacionada con VIH. Un paciente que necesita el tratamiento para una infección por VIH o una enfermedad relacionada con VIH puede identificarse también detectando el VIH. En particular, puede detectarse el VIH mediante una prueba de VIH tal como un anticuerpo (por ejemplo, ELISA o transferencia western) para VIH y/o una prueba de ácido nucleico (por ejemplo, RT-PCR). En general, la infección por VIH-1 se asocia con una disminución progresiva del recuento de linfocitos T CD4⁺ y un aumento en el nivel de VIH en sangre. La etapa de infección puede determinarse midiendo el recuento de linfocitos T CD4⁺ y la carga vírica.

Las composiciones de la invención pueden ser suspensiones inyectables, soluciones, pulverizaciones, polvos liofilizados, jarabes, elixires y similares. Se puede usar cualquier forma adecuada de composición. Para preparar dicha composición, un ácido nucleico o vector de la invención, que tiene al grado deseado de pureza, se mezcla con uno o más transportadores y/o excipientes farmacéuticamente aceptables. Los transportadores y excipientes deben ser "aceptables" en el sentido de ser compatibles con los otros ingredientes de la composición. Los transportadores, excipientes, o estabilizantes aceptables no son tóxicos para los receptores en las dosificaciones y concentraciones empleadas, e incluyen, pero no de forma limitativa, agua, solución salina, solución salina tamponada con fosfato, dextrosa, glicerol, etanol, o sus combinaciones, tampones tales como fosfato, citrato, y otros ácidos orgánicos; antioxidantes incluyendo ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencilamonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butílico o bencílico; alquil parabenos tales como metil o propil parabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 restos); proteínas, tales como albúmina de suero, gelatina, o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina, o lisina; monosacáridos, disacáridos, y otros carbohidratos incluyendo glucosa, manosa, o dextrinas; agentes quelantes, tales como EDTA; azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sales tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos de proteína-Zn); y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEENTM, PLLTRONICSTM o polietilenglicol (PEG).

Una composición inmunógena o inmunológica puede formularse también en forma de una emulsión de aceite en agua. La emulsión de aceite en agua puede estar basada, por ejemplo, en un aceite de parafina ligero líquido (tipo Farmacopea Europea); aceite isoprenoide tal como escualeno, escualeno, EICOSANETM o tetraetracontano; aceite resultante de la oligomerización de alqueno(s), *por ejemplo*, isobuteno o deceno; ésteres de ácidos o de alcoholes que contienen un grupo alquilo lineal, tal como aceites vegetales, oleato de etilo, di(caprilato/caprato) de propilenglicol, tri(caprilato/caprato) de glicerilo o dioleato de propilenglicol; ésteres de ácidos grasos o alcoholes ramificados, por ejemplo, ésteres de ácido isoesteárico. El aceite se usa ventajosamente en combinación con emulsionantes para formar la emulsión. Los emulsionantes pueden ser tensioactivos no iónicos, tales como ésteres de sorbitán, manida

(por ejemplo, oleato de anhidromanitol), glicerol, poliglicerol, propilenglicol, y ácido oleico, isoesteárico, ricinoleico, o hidroxisteárico, que se etoxilan opcionalmente, y copolímeros en bloque de polioxiopropileno-polioxi-etileno, tales como productos Pluronic®, por ejemplo, L121. El adyuvante puede ser una mezcla de emulsionante(s), agente formador de micelas, y un aceite tal como el que está comercialmente disponible con el nombre Provax® (IDEC Pharmaceuticals, San Diego, CA).

Las composiciones inmunogénicas de la invención pueden contener sustancias adicionales, tales como agentes humectantes o emulsionantes, agentes tamponantes, o adyuvantes para potenciar la eficacia de las vacunas (Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª edición, Mack Publishing Company, (ed.) 1980).

Se pueden incluir también adyuvantes. Los adyuvantes incluyen, pero no de forma limitativa, sales minerales (por ejemplo, $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2$, $\text{AlNa}(\text{SO}_4)_2$, $\text{AlNH}(\text{SO}_4)_2$, sílice, alum, $\text{Al}(\text{OH})_3$, $\text{Ca}_3(\text{PO}_3)_2$, caolín, o carbón), polinucleótidos con o sin complejos de inmunoestimulación (ISCOM) (por ejemplo, oligonucleótidos CpG, tales como los descritos en Chuang, T.H. y col, (2002) J. Leuk. Biol. 71(3): 538-44; Ahmad-Nejad, P. y col (2002) Eur. J. Immunol. 32(7): 1958-68; ácidos poli IC o poli AU, poliarginina con o sin CpG (conocido también en la técnica como IC31; véase Schellack, C. y col (2003) Proceedings of the 34th Annual Meeting of the German Society of Immunology; Lingnau, K. y col (2002) Vaccine 20(29-30): 3498-508), JuvaVax™ (patente de Estados Unidos n.º 6.693.086), determinadas sustancias naturales (por ejemplo, cera D de Mycobacterium tuberculosis, sustancias que se encuentra en Corynebacterium parvum, Bordetella pertussis, o miembros del género Brucella), flagelina (ligando del receptor 5 de tipo Toll; véase McSorley, S.J. y col (2002) J. Immunol. 169(7): 3914-9), saponinas tales como QS21, QS17, y QS7 (Patentes de EE.UU. con números 5.057.540; 5.650.398; 6.524.584; 6.645.495), monofosforil lípido A, en particular, monofosforil lípido A 3-de-O-acilado (3D-MPL), imiquimod (conocido también en la técnica como IQM y comercialmente disponible como Aldara®; Patentes de EE.UU. con números 4.689.338; 5.238.944; Zuber, A.K. y col (2004) 22(13-14): 1791-8), y el inhibidor CMPD167 de CCR5 (véase Veazey, R.S. y col (2003) J. Exp. Med. 198: 1551-1562).

Se usan habitualmente hidróxido o fosfato de aluminio (alum) en solución al 0,05 a 0,1 % en solución salina tamponada. Otros adyuvantes que se pueden usar, especialmente con vacunas de ADN, son la toxina del cólera, especialmente los CTA1-DD/ISCOM (véase Mowat, A.M. y col (2001) J. Immunol. 167(6): 3398-405), polifosfazenos (Allcock, H.R. (1998) App. Organometallic Chem. 12(10-11): 659-666; Payne, L.G. y col (1995) Pharm. Biotechnol. 6: 473-93), citoquinas tales como, pero no de forma limitativa, IL-2, IL-4, GM-CSF, IL-12, IL-15 IGF-1, IFN- α , IFN- β , e IFN- γ (Boyer y col., (2002) J. Liposome Res. 121:137-142; documento WO 01/095919; proteínas inmunorreguladoras tales como CD40L (ADX40; véanse, por ejemplo, documento WO 03/063899), y el CD1, un ligando de los linfocitos citotóxicos naturales (conocido también como CRONY o α -galactosil ceramida; véase Green, T.D. y col, (2003) J. Virol. 77(3): 2046-2055), proteínas de fusión inmunoestimuladoras tales como IL-2 fusionada al fragmento Fc de las inmunoglobulinas (Barouch y col., Science 290:486-492, 2000) y las moléculas coestimuladoras B7.1 y B7.2 (Boyer), todas las cuales se pueden administrar tanto como proteínas como en la forma de ADN, sobre los mismos vectores de expresión que los que codifican los antígenos de la invención o en vectores de expresión diferentes.

En una realización ventajosa, los adyuvantes pueden ser lecitina que se combina con un polímero acrílico (Adjuplex-LAP), lecitina revestida con gotículas de aceite en una emulsión de aceite en agua (Adjuplex-LE) o lecitina y un polímero acrílico en una emulsión de aceite en agua (Adjuplex-LAO) (Advanced BioAdjuvants (ABA)).

Las composiciones inmunogénicas pueden diseñarse para introducir los ácidos nucleicos o los vectores de expresión hasta un sitio de acción deseado y liberarse en este a una velocidad adecuada y controlable. Se conocen en la técnica procedimientos para preparar formulaciones de liberación controlada. Por ejemplo, pueden producirse preparaciones de liberación controlada mediante el uso de polímeros para complejar o absorber el inmunógeno y/o la composición inmunógena. Puede prepararse una formulación de liberación controlada utilizando macromoléculas adecuadas (por ejemplo, poliésteres, poliaminoácidos, polivinilo, pirrolidona, acetato de etilvinilo, metilcelulosa, carboximetilcelulosa, o sulfato de protamina) conocidos por proporcionar las características de liberación controlada o el perfil de liberación deseados. Otro posible procedimiento para controlar la duración de la acción mediante una preparación de liberación controlada es incorporar los principios activos en partículas de un material polimérico tal como, por ejemplo, poliésteres, poliaminoácidos, hidrogeles, ácido poliláctico, ácido poliglicólico, copolímeros de estos ácidos, o copolímeros de etileno acetato de vinilo. Como alternativa, en vez de incorporar estos principios activos en partículas poliméricas, es posible atrapar estos materiales en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o mediante polimerización interfacial, por ejemplo, microcápsulas de hidroximetilcelulosa o de gelatina y microcápsulas de poli(metacrilato de metilo), respectivamente, en sistemas de administración de fármaco en forma coloidal (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Se divulgan dichas técnicas en New Trends and Developments in Vaccines, Voller y col. (eds.), University Park Press, Baltimore, Md., 1978 and Remington's Pharmaceutical Sciences, 16ª edición.

Las dosificaciones adecuadas de los ácidos nucleicos y los vectores de expresión de la invención en la composición inmunógena de la invención pueden determinarse fácilmente por los expertos en la materia. Por ejemplo, la dosificación de los anticuerpos puede variar dependiendo de la ruta de administración y del tamaño del sujeto. Las dosis adecuadas pueden determinarse por una persona normalmente experta en la materia, midiendo, por ejemplo, la respuesta inmunitaria de un sujeto, tal como un animal de laboratorio, usando técnicas inmunológicas convencionales, y ajustando las dosificaciones según sea adecuado. Dichas técnicas para medir la respuesta inmunitaria del sujeto

incluyen, pero no de manera limitativa, ensayos de liberación de cromó, ensayos de unión a tetrámeros, ensayos ELISPOT de IFN- γ , ensayos ELISPOT de IL-2, ensayos de citoquinas intracelulares, y otros ensayos de detección inmunológica, por ejemplo, como se detalla en el texto "Antibodies: A Laboratory Manual" by Ed Harlow and David Lane.

5 Cuando se proporcionan profilácticamente, las composiciones inmunogénicas de la invención se administran idealmente a un sujeto antes de la infección por VIH, o de las evidencias de infección por VIH, o antes de cualquier síntoma debido a SIDA, especialmente en sujetos de alto riesgo. La administración profiláctica de las composiciones inmunogénicas puede servir para proporcionar inmunidad protectora a un sujeto frente a la infección por VIH-1 o para prevenir o atenuar la progresión del SIDA en un sujeto ya infectado con VIH-1. Cuando se proporciona
10 terapéuticamente, las composiciones inmunogénicas pueden servir para aliviar y tratar los síntomas del SIDA y se usan de forma ventajosa tan pronto como sea posible después de la infección, preferentemente antes de la aparición de cualquier síntoma de SIDA, pero también pueden utilizarse a (o después) del inicio de los síntomas de la enfermedad.

15 Las composiciones inmunogénicas pueden administrarse usando cualquier procedimiento de administración adecuado, incluyendo, pero no de forma limitativa, la administración intramuscular, intravenosa, intradérmica, mucosal, y tópica. Dichas técnicas son bien conocidas de los expertos en la materia. Ejemplos más específicos de procedimientos de administración son la inyección intramuscular, inyección intradérmica, e inyección subcutánea. Sin embargo, la necesidad de administración no se limita a los procedimientos de inyección. Adicionalmente, se ha conseguido la administración de ADN a tejido animal mediante liposomas catiónicos (Watanabe y col., (1994) Mol.
20 Reprod. Dev. 38:268-274; y documento WO 96/20013), inyección directa de ADN puro a tejido muscular animal (Robinson y col., (1993) Vaccine 11:957-960; Hoffman y col., (1994) Vaccine 12:1529-1533; Xiang y col., (1994) Virology 199:132-140; Webster y col., (1994) Vaccine 12: 1495-1498; Davis y col., (1994) Vaccine 12: 1503-1509; y Davis y col., (1993) Hum. Mol. Gen. 2: 1847-1851), o la inyección intradérmica de ADN utilizando tecnología de "pistola génica" (Johnston y col., (1994) Meth. Cell Biol. 43:353-365). Como alternativa, las rutas de administración pueden ser oral, intranasal o mediante cualquier otra ruta adecuada. La administración se puede llevar a cabo mediante una
25 superficie mucosal tal como la anal, vaginal o la mucosa oral.

Los calendarios de inmunización (o regímenes) son bien conocidos para los animales (incluyendo seres humanos) y se pueden determinar fácilmente para el sujeto y la composición inmunógena concretos. De este modo, los inmunógenos pueden administrarse una o más veces al sujeto. Preferentemente, existe un intervalo de tiempo
30 ajustado entre administraciones diferentes de la composición inmunógena. Aunque este intervalo varía para cada sujeto, normalmente oscila de 10 días a varias semanas, y es a menudo de 2, 4, 6 u 8 semanas. Para seres humanos, el intervalo es normalmente de 2 a 6 semanas. El régimen de inmunización tiene normalmente de 1 a 6 administraciones de la composición inmunógena, pero puede tener incluso solamente una o dos o cuatro. Los procedimientos de inducir una respuesta inmunitaria pueden incluir también la administración de un adyuvante con los
35 inmunógenos. En algunos casos, una inmunización de refuerzo anual, bianual u otro intervalo largo (5-10 años) puede suplementar el protocolo de inmunización inicial.

Los presentes procedimientos incluyen también una variedad de regímenes de estímulo-refuerzo, por ejemplo, regímenes de estímulo-refuerzo con ADN de Adenovirus. En estos procedimientos, una o más inmunizaciones de estímulo van seguidas por una o más inmunizaciones de refuerzo. La composición inmunógena real puede ser igual o
40 diferente para cada inmunización y el tipo de composición inmunógena (por ejemplo, conteniendo proteínas o vectores de expresión), puede variarse también la ruta, y la formulación de los inmunógenos. Por ejemplo, si se usa un vector de expresión para las etapas de estímulo y refuerzo, puede ser de un tipo tanto igual como diferente (por ejemplo, ADN o un vector de expresión bacteriana o vírica). Un régimen de estímulo-refuerzo útil proporciona dos inmunizaciones de estímulo, con una separación de cuatro semanas, seguido por dos inmunizaciones de refuerzo a las 4 y 8 semanas
45 después de la última inmunización de estímulo. Debe ser también fácilmente evidente para un experto en la técnica que existen algunas permutaciones y combinaciones que están incluidas usando el ADN, vectores de expresión bacterianos y víricos de la invención para proporcionar los regímenes de estímulo y cebado.

Una realización específica proporciona procedimientos para inducir una respuesta inmunitaria contra VIH en un sujeto administrando una composición inmunógena de la invención, que comprende preferentemente un vector de
50 adenovirus que contiene ADN que codifica uno o más de los anticuerpos de la invención, una o más veces a un sujeto en el que los epítomos se expresan en nivel suficiente para inducir una respuesta inmunitaria en el sujeto. Dichas inmunizaciones pueden repetirse múltiples veces a intervalos de tiempo de al menos 2, 4 o 6 semanas (o más) de acuerdo con un régimen de inmunización deseado.

Las composiciones inmunogénicas de la invención pueden administrarse solas, o se pueden administrar
55 simultáneamente, o administrarse secuencialmente, con otros inmunógenos de VIH y/o composiciones inmunogénicas de VIH, por ejemplo, con "otras" composiciones inmunológicas, antigénicas o de vacuna o terapéuticas proporcionando de esta forma composiciones multivalentes o un "cóctel" o combinación de la invención y los procedimientos de emplearlos. De nuevo, se pueden determinar los ingredientes y la manera (secuencial o administración simultánea) de administración, así como las dosificaciones teniendo en consideración dichos factores como la edad, sexo, peso, especie y dolencia del sujeto concreto, y la vía de administración.
60

Las composiciones inmunogénicas de la invención pueden administrarse solas, o se pueden administrar simultáneamente, o administrarse secuencialmente, con otros agentes terapéuticos, proporcionando por tanto composiciones multivalentes o un "cóctel" o combinación de la invención y los procedimientos para emplearlos. El agente terapéutico puede ser un agente antivírico. Los agentes antivíricos útiles incluyen, pero no de forma limitativa, análogos de nucleósidos, tales como zidovudina, aciclovir, gangciclovir, vidarabina, Idoxuridina, trifluridina, y ribavirina, así como asfoscarnet, amantadina; rimantadina, saquinavir, indinavir, ritonavir, y los interferones alfa. De nuevo, se pueden determinar los ingredientes y la manera de administración (secuencial o administración simultánea), así como las dosificaciones teniendo en consideración dichos factores como la edad, sexo, peso, especie y dolencia del sujeto concreto, y la vía de administración.

5 Cuando se usan en combinación, los otros inmunógenos de VIH se pueden administrar al mismo tiempo o en momentos diferentes como parte de un régimen de inmunización global, por ejemplo, como parte de un régimen de estímulo-refuerzo u otro protocolo de inmunización. En una realización ventajosa, el otro inmunógeno de VIH es env, preferentemente el trímico env de VIH.

10 Se conocen en la técnica muchos otros inmunógenos de VIH, Uno de dichos inmunógenos preferido es HIVA (descrito en el documento WO 01/47955), que puede administrarse como proteína, sobre un plásmido (por ejemplo, pThr.HIVA) o en un vector vírico (por ejemplo, MVA.HIVA). Otro de dichos inmunógenos de VIH es RENTA (descrito en el documento PCT/LTS2004/037699), que se puede administrar también como proteína, sobre un plásmido (por ejemplo, pThr.RENTA) o en un vector vírico (por ejemplo, MVA.RENTA).

15 Por ejemplo, un procedimiento de inducir una respuesta inmunitaria contra VIH en un sujeto humano comprende administrar al menos una dosis de estímulo de un inmunógeno de VIH y al menos una dosis de refuerzo de un inmunógeno de VIH, en el que el inmunógeno en cada dosis puede ser igual o diferente, con la condición de que al menos uno de los inmunógenos es un epítipo de la presente invención, un ácido nucleico que codifica un epítipo de la invención o un vector de expresión, preferentemente un vector VSV, que codifica un epítipo de la invención, y en el que los inmunógenos se administran en una cantidad o se expresan a un nivel suficiente para inducir una respuesta inmunitaria específica de VIH en el sujeto. La respuesta inmunitaria específica de VIH puede incluir una respuesta inmunitaria de los linfocitos T específica de VIH o una respuesta inmunitaria de los linfocitos B específica de VIH. Dichas inmunizaciones pueden llevarse a cabo a intervalos, preferentemente de al menos 2-6 o más semanas.

La invención se describirá ahora adicionalmente por medio de los siguientes ejemplos no limitantes.

Ejemplos

30 **Ejemplo 1: Uso de RSC3 y sondas mutantes de RSC3 para aislar dos nuevos anticuerpos monoclonales neutralizantes a partir de donantes de PBMC siguiendo el Protocolo G de IAVI**

El análisis del suero del Protocolo G y PBMC se llevó a cabo como sigue. Un conjunto de 12 sueros con amplio poder neutralizante se analizó en primer lugar mediante ELISA de núcleos estabilizados resurgidos (RSC3) para encontrar evidencias de anticuerpos dirigidos contra el sitio de unión a CDA4 (CD4bs). Se analizaron adicionalmente los sueros positivos en un ensayo de neutralización por competición utilizando RSC3 para bloquear la neutralización del suero. Esto demostró que los sueros tienen anticuerpos con actividad neutralizante (NAbs) para el CD4bs. Cuatro de doce sueros (4/12) tuvieron evidencias de neutralización dirigida contra CD4bs; se seleccionó uno para el aislamiento de mAb (el código de VRC era IAVIn^o2, que corresponde a la muestra n^o27-374 de IAVI).

35 Se llevó a cabo el procedimiento de aislamiento de anticuerpos monoclonales como sigue. El procedimiento utilizado fue esencialmente el mismo que se describe en Wu y col, Science 329; 856 (2010). Se incubaron las PBMC con RSC3 y ΔRSC3 para encontrar linfocitos B reactivos con RSC3 y sin ΔRSC3; Los linfocitos B individuales se clasificaron en placas de 96 pocillos. Los genes de la región variable de la cadena pesada y la cadena ligera del anticuerpo se amplificaron mediante la PCR y se clonaron en vectores de expresión (uno para la pesada y uno para la ligera) y se expresó IgG completa.

40 La Fig. 1 representa gráficamente la competición de proteínas que muestra que el suero 27-374 tiene anticuerpos con actividad neutralizante contra CD4bs. Se muestra sobre el eje x la neutralización del suero de 27-374 por IAVI frente a un panel de virus. Las barras muestran el % de reducción en la neutralización para cada virus cuando se añade la proteína RSC3 como un competidor. El ΔRSC3 es un mutante inactivado genéticamente. Los datos muestran que ~ 50 % de neutralización del suero contra cada virus podría bloquearse por RSC3 -indicando la presencia de anticuerpos con actividad neutralizante dirigidos contra CD4bs.

45 La Fig. 2 representa gráficamente una clasificación de células únicas para los linfocitos B reactivos con RSC3, en particular un perfil de clasificación de las PBMC del donante: 27-374. Esquema para aislar los linfocitos B específicos que produjeron VRC-PG-04 y VRC-PG-05. Se incubaron las PBMC del donante con la forma natural de la proteína cloak-2a y la proteína mutante Δ371. La proteína RSC3 es muy específica para los anticuerpos contra el sitio de unión de CD4; el mutante no se une a dichos anticuerpos. Ambas proteínas se marcan con biotina y, a continuación, se marcan con diferentes fluorocromos de color. Se llevó a cabo la citometría de flujo para aislar linfocitos B con memoria y para identificar adicionalmente linfocitos B que se unen a RSC3, y no al mutante Δ 371 (0,075 % de linfocitos B con memoria). Estos linfocitos B se depositaron como una única célula por pocillo, en placas de 96 pocillos.

La Fig. 3 representa gráficamente el ELISA de la unión de VRC-PG-04 y VRC-PG-05 a algunas versiones mutantes de YU2 gp120 y a las proteínas del núcleo estabilizado resurgido (RSC3) y su mutante inactivado genéticamente, ΔRSC3. Los datos de ELISA mostraron que VRC-PG04 se une bien a togp120 y a RSC3, con unión reducida a los mutantes CD4bs inactivados genéticamente de dichas dos proteínas. Por lo tanto, se dirige probablemente al CD4bs de gp120. VRC-PG-05 se une mejor a RSC3 que a gp120, de esta manera, su epítipo parece ser distinto de VRC-PG-04.

La Fig. 4 representa gráficamente la unión de VRC-PG-04 y VRC-PG-05 a proteínas basadas en YU2 gp120, el nuevo núcleo FIXB2 8b y Du156 gp120 WT mediante ELISA. VRC-PG-05 se une bien al nuevo núcleo FIXB2 (gráfica de la derecha) indicando que este epítipo se encuentra en el núcleo de gp 120, pero es diferente del mismo. VRC-PG-04 que se une fuertemente al clado C Du156 gp120 mientras que VRC-PG-05 se une solo débilmente.

La Fig. 5 representa gráficamente el ELISA de competición demostrando que VRC-PG-04 se dirige contra CD4bs. Los datos son los ELISA de competición tanto de YU2 gp120 (gráficas de la izquierda) como de FlxB2 gp120 (gráficas de la derecha). Las gráficas de la parte superior muestran la unión de CD4-Ig en presencia de algunas mAb de IgG diferentes. Las gráficas de la parte inferior muestran la unión de 17b en presencia de otros mAb. Se incluyen los mAb de VRC01 y VRC03 previamente publicados (Wu y col, Science 329; 856 (2010)). VRC-PG-04 compete en cruzado con CD4-Ig y con VRC01 -mostrando que está probablemente dirigido a los CD4bs de gp120. Las gráficas de la parte inferior muestran que VRC-PG-04 no potencia la unión de 17b respecto a YU2 gp120, aunque esto potencia suavemente la unión de 17b a HxB2 gp120.

La Fig. 6 representa gráficamente un ensayo ELISA competitivo que demuestra que VRC-PG-04, pero no VRC-PG-05, compete en cruzado según los ELISA de los anticuerpos CD4bs realizados con RSC3 en placas. ELISA de competición con la proteína RSC3 en placa. La gráfica de la parte superior muestra que VRC-PG-04 se bloquea en cruzado por otros mAb dirigidos a CD4bs. Por el contrario, VRC-PG-05 no se bloquea en cruzado por los mAb dirigidos al CD4bs, indicando que se dirige contra un epítipo diferente sobre la proteína nuclear de gp120. Se incluyeron los mAb VRC01, VRC02 y VRC03 anteriormente publicados (Wu y col, Science 329; 856 (2010)) para comparación.

La Fig. 7 representa gráficamente un ensayo ELISA usando el clado B AC10.29gp1120 en placas y que VRC-PG-05 no bloquea en cruzado los mAb dirigidos contra CD4bs. ELISA de competición con la cepa AC10.29 gp120 sobre placa. La gráfica de la parte superior muestra que CD4-Ig se bloquea en cruzado por sí misma, pero no por VRC-PG-05. La gráfica de la parte inferior muestra que VRC-PG-05 se bloquea por sí mismo, pero no por cualquiera de los otros mAb ensayados. De esta manera, VRC-PG-05 se une a un epítipo único sobre gp120. Se incluyeron los mAb VRC01, VRC02 y VRC03 anteriormente publicados (Wu y col, Science 329; 856 (2010)) para comparación.

La Tabla 1 representa gráficamente un análisis de la familia de genes de VRC-PG-04 y VRC-PG-05 en comparación con los mAb b12. VRC01, VRC02 y VRC03 de VIH-1. Se incluyeron los mAb VRC01, VRC02 y VRC03 anteriormente publicados (Wu y col, Science 329; 856 (2010)) para comparación. La tabla muestra la línea germinal V inferida, los genes D y J de la cadena pesada y los genes V y J de la cadena ligera kappa. VRC-PG-04 y VRC-PG-05 están fuertemente mutados a partir de la línea germinal.

Tabla 1: Análisis del repertorio y mutaciones de los mAb de VRC.

(Cadena pesada)					
	IGHV	IGHD	IGHJ	longitud de CDR3 (aminoácidos)	frecuencia de la mutación VH (nucleótidos)
VRC01	1-02*02	3-16*01 (o *02)	1*01	14	91/288 (32 %)
VRC02	1-02*02	3-16*01 (o *02)	1*01	14	92/288 (32 %)
familia 1-02*02 IIGHD3 de VRC03 1*01 16 85/288 (30 %)					
b12	1-03*01	3-10*02	6*03	20	39/288 (13 %)
VRC-PG-04	1-02*02	2-8*02	2*01	16	84/288(29 %)
VRC-PG-05	3-7*01	3-3*01	3*02	19	27/288 (9 %)

(continuación)

Cadena ligera					
	IGKV		IGKJ	longitud de CDR3 (aminoácidos)	frecuencia de la mutación VL (nucleótidos)
VRC01	3-11*01		2*01	5	45/264 (17 %)
VRC02	13-11-01		2*01	5	49/264(19 %)
VRC03	3-20*01		2*01	5	53/267 (20 %)
b12	3-20*01		2*01	9	35/267 (13 %)
VRC-PG-04	3-20*01		5*01	5	51/267(11 %)
IVRC-PG-05	4-1*01		2*03	8	21/297 (7 %)

5 La Fig. 8 representa gráficamente las alineaciones de secuencias de VRC-PG-04 y VRC-PG-05 en comparación con su secuencia de la línea germinal inferida. Se incluyeron los mA b VRC01, VRC02 y VRC03 anteriormente publicados (Wu y col, Science 329; 856 (2010)) para comparación.

Ejemplos 2: Aislamiento de VRC-PG-04

10 Se aisló un novedoso anticuerpo monoclonal, VRC-PG-04, a partir de un donante de VIH+ utilizando una sonda de glicoproteína gp120 estabilizada antigénicamente resurgida que era específica del sitio de unión a CD4. VRC-PG-04 compitió con CD4-IgG para la unión a gp120, demostrando que VRC-PG-04 se dirige contra CD4bs. Este anticuerpo es potente y con amplio poder neutralizante, teniendo una CI50 promedio de 0,172 µg/ml y siendo capaz de neutralizar una amplia gama de entradas de pseudovirus en células T2M-bl, incluyendo el pseudovirus del clado A - 87 % (n=24), B - 96 % (n=26), y C - 79 % (n=34).

15 Para caracterizar adicionalmente el Ab, se llevaron a cabo ensayos de neutralización de la entrada utilizando un panel de mutantes de alanina individuales JRCSF gp120 incorporado en pseudovirus. Los solicitantes descubrieron que la neutralización de la entrada por VRC-PG-04 se inactivaba genéticamente (definida por tener menos del 10 % de potencia de neutralización en comparación con el tipo natural) mediante una única mutación en el aa D279 (véase el diagrama de potencia de neutralización). Los solicitantes determinaron a continuación qué restos eran importantes para la unión de Ab a gp120. Los solicitantes descubrieron que la unión de VRC-PG-04 a diversas glicoproteínas gp120 aisladas de pseudovirus que transportaban el mutante JRCSF gp120s disminuyó drásticamente como se midió mediante ELISA. En particular, estos restos se encontraron en el tallo V1/V2 (N197), C2 (N276, D279, N280), C3 (1371), y C4 (T450, R456). En la selección preliminar de los solicitantes, parecen ser menos los restos implicados en la inactivación genética de la unión (definida por tener menos de un 10 % de afinidad aparente con gp120 en comparación con el tipo natural) de VRC-PG-04 a gp120 cuando se compara con el número de restos implicados en la inactivación genética de la unión a gp120 de b12 o CD4 (véase la Tabla 2, diagrama de unión).

Tabla 2: tabla de unión

Dominio	Mutante	Afinidad aparente			VRC-PG-04
		pub b12	pub CD4	2G12	
	E87A	7	114		53
	M95A	75	59		41
C1	K97A	134	50		98
	E102A	63	47		50
	W112A	2	67		76
	D113A	1	9	169	70
	V120A				79
	K121A	4	3		130
C1	L122A	27	62		96
(tallo V1/V2)	T123A	233	42		113
	L125A	383	23		93

ES 2 618 380 T3

Dominio	Mutante	Afinidad aparente			VRC-PG-04
		pub b12	pub CD4	2G12	
	V127A	62	26		22
	N156A				72
	N160K				390
	T162A				83
	I165A	20	57		139
	R166A	52	44		97
	D167A				97
	K168A				34
	K171A	118	26		78
	E172A	143	93		74
V2	F176A	2	19	400	104
	Y177A				87
	L179A				138
	D180A	1	31		52
	V182A				54
	I184A	0.6	27		27
	D185A	6	62		55
	T190A	21	187		42
	K194S				22
	N197A	25	3	318	10
C2	T198A	0,1	42		49
(tallo V1/V2)	S199A	123	4		78
	T202A	220	62		58
	K207A	2	5	100	31
	F210A	77	37		85
	I213A	20	31	114	28
	R252A	17	47		111
	S256A	13	47	108	37
	T257A	28	21	133	51
C2	N262A	6	5		17
	R273A	0,9	40		78
	N276A	225	27	169	1
	D279A	27	33		0
	N280A	75	44		0
	K282A	32	78		23
	T283A	55	53		85
Dominio	Mutant	pub b12	pub CD4	2G12	PGV04
	N295A				34
	T297S				115
V3 (base)	P299A				115
	N301A				43
	N302A				40
(V3 (tallo)	R304A				38
	K305A				51
	S306A				93

ES 2 618 380 T3

Dominio	Mutante	Afinidad aparente			VRC-PG-04
		pub b12	pub CD4	2G12	
	I307A				73
	H308A				50
	I309A				78
V3 (tip)	P313A				30
	R315A				73
	F317A				92
	Y318A				43
	T319A				53
	T320A				29
	E322A				22
V3 (base)	D325A				52
	N332A				68
	Q337A	83	122		155
	K343A	8	187		58
	R350A	6	43	133	43
	S365A	534	23	1800	21
	G366A	9	1		22
	G367A	1	2		16
	D368A	15	1		12
C3	P369A	129	117		70
	E370A	0.2	4	133	23
	I371A	26	7	114	9
	V372A	4	52		23
	M373A	13	80		48
	Y384A	2	40	114	49
	N386A	11	26	21	66
	T388A	8	19		50
V4	N392Q				69
	W395A	18	23		18
	R419A			25	50
	I420A				70
	K421A	7	44		107
	Q422A				51
	I423A				101
	I424A				104
	N425A	80	11		32
	M426A	0.2	0.2	133	
	W427A	21	9		38
	V430A	580	2		31
	K432A	7,5	50		38
Dominio	Mutante	pub b12	pub CD4	2G12	PGV04
	Y435A				128
C4	I439A	2	10	133	43
	T450A	7	16	108	8
	T455A	500	1		58

Dominio	Mutante	Afinidad aparente			VRC-PG-04
		pub b12	pub CD4	2G12	
	R456A	6	53		8
	D457A	5	2		
	G458A	300	2		
	G459A	54	37		61
	N461A	4	160		285
	E462A	21	32		178
	S463A	50	53		324
V5	I467A	63	3		
	R469A	1.4	8		
	P470A	1.3	13	100	
	G471A	37	89		137
	G472A	22	2	100	
	G473A	998	2		
	D474A	91	22		
C5	M475A	130	64		
	R476A	25	40	133	81
	D477A	2	187		44
	W479A	1.3	19	40	95
	R480A	37	73		
	Delta V1	35	44	133	
V1-V3	Delta V1/2	30	12	114	
	Delta V3	30	41		

Afinidad aparente respecto a WT (afinidad aparente para WT/afinidad aparente para el mutante) * 100

Nota: gráfico adaptado de Pantophlet y col., 2003,

Tabla 3: tabla de potencia de neutralización. Los mAb VRC01 y VRC03 anteriormente publicados (Wu y col., Science 329; 856 (2010)) se han incluido como comparación,

dominio gp120	mutación	Potencia de neutralización con respecto a WT (%)				VRC-PG-04
		CD4	b12	VRC01	VRC03	
C1	E87A	46	29	63	106	118
	M95A	17	48	56	79	107
	K97A	184	117	62	108	130
	E102A	60	83	98	112	146
	W112A	100	119	78	111	118
C1 (tallo V1/V2)	V120A	161	80	60	101	84
	K121A	28	30	24	69	78
	L122A	474	96	66	51	106
	T123A					121
	L125A	9532	1549	222	29	89
	N156A	>10000	2345	68	30	454
	N160K	99	173	296	173	176
V2	T162A	318	107	190	21	177
	I165A	434	41	42	10	61

ES 2 618 380 T3

		Potencia de neutralización con respecto a WT (%)				
dominio gp120	mutación	CD4	b12	VRC01	VRC03	VRC-PG-04
	R166A	22	41	42	31	51
	D167A	702	121	99	23	81
	K168A	106	80	50	50	67
	K171A	52	58	60	132	149
	E172A	259	55	161	34	59
	Y177A	>10000	2416	89	1	135
	L179A	1526	19	13	25	88
	V182A	128	45	60	76	68
	I184A	806	172	129	94	155
	D185A	96	4	34	88	120
	T190A	8	165	119	120	82
C2 (tallo V1/V2)	K194S	1502	4100	1538	906	236
	T198A	218	5	40	22	95
	S199A	2903	5973	724	145	707
	T202A	3831	569	30	3	61
C2	F210A	845	384	163	62	101
	I213A	102	178	174	186	185
	R252A	21	98	68	ND	86
	S256A	112	83	73	136	152
	T257A	5	107	253	86	148
	N262A	63	443	223	12	105
	R273A	132	109	48	72	120
	N276A	29	134	341	536	18
	D279A	2	92	3	0.5	0.4
	K282A	5	78	363	99	81
	T283A	5	717	346	99	225
V3 (base)	N295A	46	85	56	97	97
	T297S	17	47	50	137	179
	P299A	>10000	4882	80	0.50	115
	N301A	8163	1396	239	22	507
V3 (tallo) i	N302A	28	75	43	110	120
	R304A	4497	125	32	0.5	43
	K305A	>10000	3466	70	0.5	54
dominio gp120	mutante	CD4	b12	VRC01	VRC03	PGV04
V3 (punta)	S306A	246	94	76	7	130
	I307A	>10000	7399	119	1	20
	H308A	505	76	66	4	99
	I309A	>10000	3493	82	1	31
	P313A	3	13	130	55	111
	R315A	393	67	45	14	92
	F317A	>10000	4709	116	1	37
	Y318A	>10000	4846	109	1	27
	T319A	316	54	56	34	102
	T320A	>10000	1240	56	2	64
V3 (base)	E322A	293	76	110	26	83

ES 2 618 380 T3

dominio gp120	mutación	Potencia de neutralización con respecto a WT (%)				VRC-PG-04
		CD4	b12	VRC01	VRC03	
	D325A	444	154	53	26	112
	N332A	118	143	119	73	120
C3	Q337A	20	56	43	53	172
	K343A	34	65	45	92	117
	R350A	21	76	60	38	106
	S365A	32	70	114	85	155
	P369A	26	30	72	86	113
	V372A	12	12	74	20	125
	M373A	37	124	90	20	135
	Y384A					69
	N386A	50	392	212	79	120
	T388A	110	482	196	15	160
V4	N392Q	29	63	44	62	73
	W395A					95
C4	R419A	596	30	120	17	111
	I420A	1015	344	16	1	21
	K421A	>10000	1457	64	1	68
	Q422A	5369	657	47	14	98
	I423A	>10000	3412	19	1	24
	I424A	>10000	2301	26	1	142
	N425A	22	98	61	34	148
	V430A	>10000	4336	36	1	765
	K432A	147	61	55	30	101
	Y435A	3407	2034	31	1	73
	I439A	2854	656	162	1508	339
	T450A	31	126	84	115	135
	T455A	22	27	79	ND	142
	R456A	55	106	63	1	259
G459A	722	69	149	1	239	
V5	N461A	97	90	363	496	321
	E462A	38	49	46	106	116
	S463A	54	109	536	296	461
	G471A	10	70	25	96	92
C5	D474A	11	109	32	8	102
	M475A	61	59	68	55	140
	R476A	5	129	200	26	141
	D477A	10	158	68	10	107
	W479A	70	508	160	51	138
	R480A	53	150	200	51	113

azul = 1-10%
verde = 11-40%
amarillo = 250-10.000%
rojo > 10.000%

Ejemplo 3: Datos de neutralización de VRC-PG-04 y VRC-PG-05

Se llevó a cabo la neutralización con Env-pseudovirus utilizando células diana TZM-bl. Los valores de la Tabla 4 representan la concentración de mAAb requerida para conseguir un 50 % (Tabla 4A) o un 80 % (Tabla 4B) de neutralización.

- 5 Todos los anticuerpos monoclonales ensayados son IgG. CD4-Ig es una construcción IgG-CD4 quimérica 5 bivalente. VRC01, VRC02, y VRC03, b12, PG9 y PG16 se han publicado previamente y se muestran para comparación.

ES 2 618 380 T3

Nota: Los cálculos de amplitud y potencia excluyeron los virus Tercio 1 de los clados B y C. Se calculó la potencia usando virus que tienen un valor de CI50 o CI80 en el intervalo ensayado.

	VRC01	VRC02	VRC03	VRC-PG-04	VRC-PG-05	b12	CD4-Ig	PG9	PG16
Tercio 1 Clado B (n=7)	HXB2	0,034	0,042	0,048	0,025	13	0,007	1,62	>50
	MN.3	0,022	0,024	0,027	>50	>50	0,003	>50	>50
	SF162	0,139	0,112	0,033	0,024	6.84	0,070	>50	>50
	ADA	0,379	0,391	0,113	0,179	4.33	0,131	0,128	0,012
	BaL.01	0,055	0,053	20,1	0,034	0,258	0,093	0,033	0,993
	BaL.26	0,048	0,046	10,4	0,148	0,253	0,051	0,047	0,131
	SS1196.1	0,170	0,132	0,048	0,189	>50	0,840	0,074	0,020
Tercio 1 Clado C									
	MW965.26	0,056	0,057	>50	0,032	5,07	0,039	2,17	0,476
Clado A (n=24)	RW020.2	0,224	0,123	>50	0,165	>50	10,1	0,052	0,037
	UG037.8	0,079	0,082	12,1	0,109	>50	>50	0,020	0,010
	DJ263.8	0,080	0,055	>50	0,803	>50	0,812	0,218	8,21
	KER2018.11	0,652	0,516	0,389	1,08	>50	>50	0,010	0,004
	Q259.w6	0,170	0,147	0,055	0,028	7,03	>50	1,17	2,58
	Q769.h5	0,084	0,047	0,034	0,024	0,010	>50	0,009	0,009
	Q168.a2	0,115	0,092	3,38	0,032	9,92	>50	0,045	0,019
	Q23.17	0,085	0,071	0,065	0,084	>50	>50	0,005	0,002
	Q259.17	0,066	0,047	0,027	>50	>50	>50	0,041	0,030
	Q461.e2	0,492	0,463	>50	0,237	39,3	>50	25,4	1,47
Q842.d12	0,030	0,025	>50	0,017	5,12	>50	>50	0,019	0,009

	VRC01	VRC02	VRC03	VRC-PG-04	VRC-PG-05	b12	CD4-Ig	PG9	PG16
BB201.B42	0,223	0,164	7,93	0,081	23,6	0,358	14,1	0,011	0,002
MB201.A1	0,165	0,089	>50	0,049	12,9	>50	>50	0,054	0,021
MB201.B10	0,132	0,095	>50	0,042	9,24	>50	>50	0,052	0,020
BB539.2B13	0,069	0,059	8,58	0,398	>50	0,624	1,700	0,063	0,012
MB539.2D1	0,060	0,046	17	0,499	>50	0,476	12,1	0,035	0,009
MB539.2B7	0,531	0,383	>50	0,462	>50	11,6	7,91	0,094	0,032
BI369.9A	0,142	0,101	>50	0,039	9,35	28,9	10,5	0,023	0,010
MI369.A5	0,107	0,086	>50	0,046	16,4	4,05	4,35	0,035	0,012
BS208.B1	0,019	0,014	0,297	0,014	5,77	0,042	0,246	0,016	0,003
MS208.A1	0,101	0,074	>50	0,055	21,6	0,201	7,94	0,032	0,008
MS208.A3	0,050	0,037	>50	0,022	8,29	0,505	3,51	0,025	0,006
KER2008.12	0,379	0,265	0,403	0,236	>50	>50	0,649	0,017	0,008
KNH1209.18	0,087	0,095	45	0,058	13,6	0,227	5,95	0,167	0,283
JRCSF.JB	0,093	0,099	0,093	0,034	35	0,096	0,186	0,002	0,001
JRFL	0,031	0,024	0,009	0,063	3,09	0,022	0,247	>50	>50
YU2	0,126	0,115	0,037	0,084	35	2,18	0,102	1,73	0,114
89.6	0,511	0,444	0,187	0,061	18,8	0,14	0,242	>50	>50
6101.10	0,111	0,135	0,094	0,090	6,77	>50	2,7	>50	>50
7165	16,3	>50	>50	>50	>50	>50	2,85	>50	0,426
6535	0,599	0,733	0,438	0,687	>50	0,429	2,49	0,222	>50
QH0692.42	1,5	1,33	0,954	1,34	>50	0,97	0,603	>50	>50

Tercio 2
Clado B
(n=26)

	VRC01	VRC02	VRC03	VRC-PG-04	VRC-PG-05	b12	CD4-Ig	PG9	PG16
SC422661.8	0,076	0,084	0,036	0,038	12,8	0,44	5,19	0,325	19,1
PVO.4	0,216	0,168	0,328	0,235	>50	>50	20,1	8,7	12,0
TRO.11	0,207	0,208	0,055	0,131	>50	>50	>50	>50	0,136
AC10.0.29	2,2	2,48	>50	17,9	0,017	1,8	10,7	0,012	0,007
RHPA4259.7	0,060	0,086	1,13	0,038	9,6	0,12	1,09	10	0,334
THRO4156.18	2,25	3,43	>50	>50	>50	1,21	0,509	13,2	0,498
REJO4541.67	0,062	0,056	0,059	0,019	1,64	5,92	1,22	0,001	0,004
TRJO4551.58	0,083	0,115	0,043	0,069	>50	>50	22,1	1,85	2,7
WITO4160.33	0,148	0,115	>50	0,080	>50	8,54	2,17	0,005	0,002
CAAN5342.A2	0,824	0,899	8,32	1,13	0,005	>50	>50	14,4	25,0
BL01.DG	>50	>50	>50	>50	>50	1,650	0,100	>50	>50
BR07.DG	1,24	0,948	3,38	0,789	>50	0,096	0,046	>50	>50
HT593.1	0,334	0,542	0,235	0,177	0,389	0,117	0,323	0,214	0,056
R2	0,198	0,242	0,035	0,291	>50	1,170	0,016	>50	>50
BG1168.01	0,276	0,458	>50	0,509	>50	>50	13,4	>50	>50
QH0515.01	0,386	0,470	0,187	0,115	>50	0,300	1,83	>50	>50
5768	0,166	0,275	0,382	0,042	>50	0,249	0,756	0,031	0,008
3988	0,220	0,243	2,46	0,295	9,70	0,378	49,4	0,016	0,005
Dut123.6	18,2	16,1	>50	>50	>50	1,82	0,142	0,047	0,016
Dut151.2	3,16	4,83	34,6	0,059	0,128	3,79	1,36	0,012	0,004
Dut156.12	0,089	0,091	>50	0,034	7,58	0,656	14,5	0,035	0,002
Tercio 2 Clado C (n=34)									

	VRC01	VRC02	VRC03	VRC-PG-04	VRC-PG-05	b12	CD4-Ig	PG9	PG16
Du172.17	>50	>50	>50	0.314	28,5	0,300	0,26	0,240	0,023
Du422.1	>50	>50	>50	>50	3,7	0,464	11,5	0,178	0,042
ZM197M.PB7	0,36	0,408	2,13	1.14	>50	>50	28,3	0,287	0,765
ZM214M.PL15	0,44	0,75	18,8	0.249	>50	13,6	26,6	>50	>50
ZM233M.PB6	1,99	1,03	>50	7.67	>50	>50	3,36	0,001	0,001
ZM249M.PL1	0,048	0,062	8,59	0.051	12,7	3,81	11,1	0,023	0,007
ZM53M.PB12	1,31	1,4	10,3	1.51	0,145	32,6	8,58	0,092	0,009
ZM109F.PB4	0,128	0,127	>50	0.047	0,151	>50	0,028	0,235	9,8
ZM135M.PL10a	0,346	0,14	>50	41	>50	>50	0,296	>50	>50
CAP45.2.00.G3	2,29	5,68	>50	>50	>50	0,37	2,11	0,003	0,002
CAP210.2.00.E8	>50	>50	>50	>50	>50	27	1,48	0,08	0,021
CAP244.2.00.D3	0,428	0,688	47,1	0.301	>50	>50	2,56	0,082	0,014
ZA012.29	0,305	0,176	9,21	0.130	15,2	>50	5,39	4,59	0,414
BR025.9	0,115	0,208	>50	2.77	>50	>50	0,064	0,018	0,004
TV1.29	>50	>50	>50	>50	>50	>50	0,405	0,007	0,005
ZM215.8	0,095	0,149	>50	0.075	41,9	>50	1,16	0,025	>50
ZM106.9	0,489	0,378	0,150	0.206	38,4	>50	5,39	4,59	0,414
ZM55.28a	0,340	0,326	>50	0.390	>50	>50	>50	4,60	>50
ZM53.21	1,16	1,25	3,46	1.15	0,121	9,54	1,56	0,019	0,003
ZM55.4a	0,450	0,411	>50	0.457	>50	32,6	2,7	4,19	0,308
ZM106.10	0,566	0,341	0,154	0.125	48,4	>50	41,4	0,097	0,042

	VRC01	VRC02	VRC03	VRC-PG-04	VRC-PG-05	b12	CD4-Ig	PG9	PG16
ZM109.32	0,091	0,086	>50	0,055	0,151	>50	7,69	0,099	30
ZM135.8a	0,374	0,533	>50	>50	>50	>50	13,7	>50	>50
ZM146.7	0,333	0,396	1,04	0,403	>50	18	4,21	0,181	0,32
ZM176.66	0,055	0,036	0,033	0,140	>50	>50	0,212	0,011	0,002
ZM181.6	1,12	0,574	>50	11,6	>50	>50	4,9	0,005	0,001
SO18.18	0,069	0,071	0,083	0,067	19,8	13,9	9,86	0,031	0,004
286.4	0,188	0,193	1,77	0,090	>50	>50	7,3	0,084	0,012
288.4	0,992	0,749	0,342	0,390	>50	>50	0,459	0,610	0,083
TZA125.17	>50	>50	>50	>50	>50	>50	0,125	0,115	0,012
TZBD.02	0,109	0,074	1,27	0,067	4,1	>50	0,895	0,211	0,013
Clado D	0,156	0,103	>50	0,199	>50	>50	0,009	3,23	>50
57128	>50	>50	>50	>50	>50	0,169	0,112	0,136	0,076
Clado E	0,334	0,288	>50	0,068	4,90	>50	0,397	0,020	0,003
TH966.8	0,087	0,112	>50	0,046	7,48	>50	0,896	>50	>50
TH976.17	0,348	0,450	>50	0,219	0,046	>50	0,297	0,189	0,020
M02138	>50	>50	>50	>50	>50	>50	0,496	>50	>50
SIVmac251.30	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50
MuLV	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50
total n=89	82/89 (92%)	81/89 (91%)	49/89 (55%)	77/89 (87%)	44/89 (49%)	47/89 (53%)	82/89 (92%)	74/89 (83%)	72/89 (81%)
Clado A = 24	24/24 (100%)	24/24 (100%)	13/24 (54%)	23/24 (96%)	14/24 (58%)	12/24 (50%)	21/24 (88%)	24/24 (100%)	24/24 (100%)
Clado B = 26	25/26 (96%)	24/26 (92%)	20/26 (77%)	23/26 (88%)	12/26 (46%)	19/26 (73%)	24/26 (92%)	15/26 (58%)	16/26 (62%)
Clado C = 34	29/34 (85%)	29/34 (85%)	16/34 (47%)	27/34 (79%)	15/34 (44%)	15/34 (44%)	32/34 (94%)	31/34 (91%)	29/34 (85%)

	VRC01	VRC02	VRC03	VRC-PG-04	VRC-PG-05	b12	CD4-Ig	PG9	PG16
mediana de CI50	0,203	0,168	0,389	0,125	8,765	0,701	2,170	0,053	0,014
Potencia* media geométrica de CI50	0,243	0,218	0,617	0,172	3,576	1,105	1,652	0,084	0,034

Tabla 4B: Valores de Cl₈₀₀ (µg/ml)

	VRC01	VRC02	VRC03	VRC- PG-04	VRC- PG-05	b12	CD4-Ig	PG9	PG16
Tercio 1 Clado B (n=7)	HXB2	0,111	0,143	0,165	0,113	>50	0,016	>50	>50
	MN.3	0,082	0,071	0,073	>50	>50	0,007	>50	>50
	SF162	0,567	0,367	0,097	0,127	>50	0,270	>50	>50
	ADA	1,49	1,25	0,315	0,700	47.5	0,656	5.18	0,060
	BaL.01	0,214	0,178	>50	0,252	1.48	0,32	1,08	>50
	BaL.26	0,176	0,151	>50	2,74	1.61	0,155	0,112	>50
	SS1196.1	0,593	0,411	0,098	0,649	>50	4,02	2,86	0,179
Tercio 1 Clado C	MW965.26	0,167	0,173	>50	0,096	6,9	0,356	>50	>50
	RW020.2	0,883	0,492	>50	0,581	33,5	46,1	0,269	0,385
Clado A (n=24)	UG037.8	0,313	0,263	>50	0,280	>50	0,721	0,074	0,031
	DJ263.8	0,553	0,424	>50	>50	>50	0,557	2,62	>50
	KER2018.11	2,3	1,9	1,25	3,62	>50	15,9	0,033	0,011
	QZ59.w6	0,543	0,434	0,178	0,087	21.5	>50	2,83	>50

	VRC01	VRC02	VRC03	VRC-PG-04	VRC-PG-05	b12	CD4-Ig	PG9	PG16
Q769.h5	0,289	0,204	0,140	0,093	0,016	>50	5,74	0,033	0,067
Q168.a2	0,362	0,310	27,8	0,112	29,4	>50	>50	0,173	0,078
Q23.17	0,261	0,220	0,202	0,269	>50	>50	>50	0,012	0,005
Q259.17	0,233	0,137	0,085	>50	>50	>50	19,6	0,166	0,488
Q461.e2	1,61	1,44	>50	0,758	>50	>50	>50	10,9	>50
Q842.d12	0,096	0,074	>50	0,046	14,5	>50	>50	0,070	0,031
BB201.B42	0,894	0,675	>50	0,298	>50	2,47	>50	0,030	0,008
MB201.A1	0,634	0,310	>50	0,184	>50	>50	>50	0,193	0,108
MB201.B10	0,538	0,374	>50	0,132	>50	>50	>50	0,218	0,125
BB539.2B13	0,286	0,224	>50	28,6	>50	3,84	8,62	0,232	0,046
MB539.2D1	0,480	0,277	>50	9,61	>50	3,72	29,6	0,122	0,030
MB539.2B7	1,44	1,06	>50	1,85	>50	>50	45,9	0,292	0,272
BI369.9A	0,558	0,403	>50	0,132	>50	>50	38,5	0,086	0,045
MI369.A5	0,588	0,464	>50	0,183	>50	30,9	22,3	0,191	0,099
BS208.B1	0,078	0,050	2,58	0,049	17,2	0,224	20,8	0,046	0,012
MS208.A1	0,462	0,353	>50	0,221	>50	1,12	40,9	0,164	0,095
MS208.A3	0,192	0,133	>50	0,092	28,6	4,65	>50	0,086	0,020
KER2008.12	1,7	0,994	1,65	1,03	>50	>50	3,99	0,068	0,051
KNH1209.18	0,296	0,260	>50	0,201	>50	1,75	>50	19,1	>50
JRCSF.JB	0,544	0,475	0,517	0,178	>50	0,874	1,65	0,007	0,006
JRFL	0,093	0,075	0,025	0,287	11,8	0,075	0,967	>50	>50
Tercio 2 Clado B (n=26)									

	VRC01	VRC02	VRC03	VRC-PG-04	VRC-PG-05	b12	CD4-Ig	PG9	PG16
YU2	0,372	0,359	0,115	0,240	>50	7,79	0,314	13,4	1,27
89.6	2,32	1,46	0,589	0,221	>50	0,56	0,752	>50	>50
6101.10	0,315	0,384	0,184	0,247	29,1	>50	5,33	>50	>50
7165	>50	>50	>50	>50	>50	>50	33	>50	12,4
6535	2,74	3,76	2,4	4,2	>50	19,1	16,3	5,04	>50
QH0692.42	4,83	4,18	2,05	4,41	>50	2,67	2,63	>50	>50
SC422661.8	0,265	0,267	0,105	0,147	>50	1,69	>50	>50	>50
PVO.4	1,19	1,03	1,68	1,44	>50	>50	>50	>50	>50
TRO.11	0,832	0,876	0,342	0,744	>50	>50	>50	>50	>50
AC10.0.29	6,45	6,95	>50	>50	0,065	14,2	>50	0,073	0,023
RHPA4259.7	0,185	0,243	6,58	0,134	32,2	0,39	13,9	>50	3,49
THRO4156.18	23	21,7	>50	>50	>50	4,64	2,5	>50	50
REJO4541.67	0,251	0,24	0,196	0,050	28,4	>50	11,5	0,01	0,030
TRJO4551.58	0,207	0,284	0,098	0,183	>50	>50	>50	17,7	>50
WITO4160.33	0,412	0,35	>50	1,19	>50	41,4	13,2	0,009	0,006
CAAN5342.A2	2,77	3,13	47,6	5,83	0,012	>50	>50	>50	>50
BL01.DG	>50	>50	>50	>50	>50	>50	0,625	>50	>50
BR07.DG	5,15	4,21	12,8	5,5	>50	0,898	0,211	>50	>50
HT593.1	1,77	3,86	0,741	0,790	1,510	1,73	4,51	2,09	2,53
R2	0,931	1,21	0,126	1,490	>50	9,30	0,063	>50	>50
BG1168.01	1,52	1,97	>50	2,01	>50	>50	>50	>50	>50

	VRC01	VRC02	VRC03	VRC-PG-04	VRC-PG-05	b12	CD4-Ig	PG9	PG16
QH0515.01	2,94	2,48	0,668	1,650	>50	7,23	>50	>50	>50
	0,829	0,854	0,995	0,280	>50	14,5	>50	1,28	0,580
	1,220	0,881	12	1,12	>50	4,14	>50	0,062	0,022
Tercio 2 Clado C (n=34)	>50	>50	>50	>50	>50	9,16	0,938	0,247	0,168
	46,5	>50	>50	0,370	2,0	>50	6	0,054	0,016
	0,193	0,204	>50	0,095	22,8	2,76	>50	0,109	0,019
	>50	>50	>50	1,54	>50	2,62	1,77	0,952	0,147
	>50	>50	>50	>50	>50	1,83	>50	1,95	0,924
	1,61	2,04	9,23	7,03	>50	>50	>50	2,45	>50
	2,58	3,19	>50	2,08	>50	40,4	>50	>50	>50
	9,33	4,65	>50	>50	>50	>50	12,4	0,016	0,004
	0,232	0,297	>50	0,146	40,1	20,3	>50	0,149	0,031
	4,02	4,9	45,6	7,37	0,496	>50	32,2	0,33	0,031
	0,754	0,619	>50	0,174	0,602	>50	0,281	3,73	>50
	2,71	1,59	>50	>50	>50	>50	9,76	>50	>50
	>50	>50	>50	>50	>50	4,09	>50	0,014	0,007
	>50	>50	>50	>50	>50	>50	8,3	0,438	0,159
	2,65	2,08	>50	0,912	>50	>50	17,5	0,341	0,048
	1,02	0,654	>50	0,433	>50	>50	45,7	>50	>50
0,555	1,1	>50	>50	>50	>50	3,59	0,089	0,019	
>50	>50	>50	>50	>50	>50	1,04	0,036	0,147	

	VRC01	VRC02	VRC03	VRC-PG-04	VRC-PG-05	b12	CD4-Ig	PG9	PG16
ZM215.8	0,527	0,724	>50	0,298	>50	>50	>50	0,437	>50
ZM106.9	1,02	0,654	>50	0,564	>50	>50	>50	3,56	>50
ZM55.28a	1,2	1,03	>50	1,92	>50	>50	>50	>50	>50
ZM53.21	3,59	4,01	19,9	4,28	0,327	>50	7,43	0,071	0,009
ZM55.4a	1,5	1,6	>50	1,53	>50	>50	17,2	41,2	14,5
ZM106.10	1,37	0,883	0,452	0,421	>50	>50	>50	1,29	2,55
ZM109.32	0,422	0,324	>50	0,190	0,528	>50	>50	0,727	>50
ZM135.8a	2,05	2,43	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50
ZM146.7	1,28	1,39	4,48	3,27	>50	>50	>50	1,69	15,4
ZM176.66	0,258	0,154	0,15	16	>50	>50	35,4	0,036	0,006
ZM181.6	6,49	3,78	>50	>50	>50	>50	31,6	0,013	0,054
SO18.18	0,178	0,19	0,324	0,173	>50	>50	>50	0,106	0,057
286.4	0,839	0,868	18,4	0,836	>50	2,69	39,1	0,390	0,043
288.4	4	2,56	1,21	1,2	>50	>50	2,05	>50	22,5
TZA125.17	>50	>50	>50	>50	>50	>50	39,5	0,666	0,269
TZBD.02	0,328	0,225	22,1	0,246	48,6	>50	5,74	1,08	0,101
Clado D	0,674	0,619	>50	0,783	>50	>50	0,025	>50	>50
57128	>50	>50	>50	>50	>50	1,72	0,855	0,634	38,3
Clado E	1,43	1,16	>50	0,437	>50	>50	3,17	0,089	0,015
TH966.8	0,486	0,593	>50	0,148	>50	>50	40,8	>50	>50
TH976.17	1,57	1,99	>50	1,21	0,157	>50	2,78	1,02	0,553
M02138									

	VRC01	VRC02	VRC03	VRC-PG-04	VRC-PG-05	b12	CD4-Ig	PG9	PG16
No HIV	>50	>50	>50	>50	>50	>50	3,95	>50	>50
	MuLV								
Amplitud	total n=89	79/89 (89%)	78/89 (88%)	39/89 (44%)	22/89 (25%)	35/89 (39%)	56/89 (63%)	64/89 (72%)	58/89 (65%)
	clado A n=24	24/24 (100%)	24/24 (100%)	8/24 (33%)	6/24 (25%)	9/24 (38%)	15/24 (63%)	23/24 (96%)	20/24 (83%)
	clado B n=26	24/26 (92%)	24/26 (92%)	20/26 (77%)	7/26 (27%)	17/26 (65%)	16/26 (62%)	10/26 (38%)	11/26 (42%)
	clado C n=34	27/34 (79%)	26/34 (76%)	11/34 (32%)	8/34 (24%)	8/34 (24%)	20/34 (59%)	28/34 (82%)	24/34 (71%)
	Mediana CI50	0,832	0,665	0,868	0,433	###	3,720	6,715	0,192
Potencia*									
	Media geométrica CI50	0,882	0,739	1,118	0,576	2,934	5,177	0,256	0,112

Rojo: CI50 o CI80 < 1 µg/ml
 Amarillo: CI50 o CI80 entre 1 y 10 µg/ml
 Verde: CI50 o CI80 > 10 µg/ml

Ejemplo 4: Neutralización patente y amplia por un anticuerpo monoclonal dirigido al sitio de unión a CD4 de un donante de VIH-1 infectado con un virus recombinante ID del clado A1/D

- Se han aislado algunos anticuerpos monoclonales con actividad neutralizante (NAb) de una amplitud y potencia sin precedentes, incluyendo PG9/16 y VRC01, de donantes positivos de VIH-1. En este ejemplo, Los solicitantes caracterizan PGV04 (conocido también como VRC-PG04), un nuevo NAb que tiene una potencia y amplitud que rivaliza con PG9/16 y VRC01. Se aisló PGV04 mediante clasificación individual de linfocitos B con memoria utilizando un núcleo resurgido de gp120 (RSC3) como cebo. El anticuerpo compitió con CD4, b12 y VRC01 por la unión a gp120,

confirmando que se dirige al sitio de unión a CD4 (CD4bs). Cuando se seleccionó sobre un gran panel de virus, se distinguió PGV04 por su perfil neutralizante de CD4, b12 y VRC01 de VIH-1. A diferencia de VRC01, PGV04 no potencia la unión de 17b o X5 a sus epítomos en la región del correceptor sobre el monómero gp120, y ninguno de los anticuerpos monoclonales CD4bs (mAb) fue capaz de inducir el sitio del correceptor sobre el trímero funcional. Cuando se determinó la capacidad de PGV04 de neutralizar el pseudovirus que contiene sustituciones únicas de alanina, se desvelaron las diferencias en la dependencia de restos entre PGV04 y otros mAb de CD4bs. En particular, se descubrió que D279A, I420A e I423A suprimían la neutralización de PGV04. Los restos descubiertos como importantes en la neutralización de PGV04 tenían efectos variables sobre la capacidad del anticuerpo de unirse al monómero gp120 que contiene las mismas sustituciones. Los solicitantes concluyen que los CD4bs NAb con capacidad amplia y potente tienen diferencias sutiles en la manera que reconocen y acceden a los CD4bs en el extremo vírico.

Un estudio (Protocolo G) que seleccionó 1.800 donantes de VIH-1 infectados con virus de diferentes clados desveló que una fracción significativa de donantes desarrolló respuestas séricas con una actividad neutralizante amplia y potente de acuerdo con los estudios de varios laboratorios (Doria-Rose y col.; Gnanakaran y col.; Doria-Rose y col. 2009; Gray y col. 2009; Sather y col. 2009; Simek y col. 2009). El 1 % superior de donantes del Protocolo G que presentó las respuestas neutralizantes séricas más amplias y potentes se designaron "neutralizadores de élite". Los solicitantes habían cartografiado previamente las especificidades del suero en 19 donantes del Protocolo G que se clasificaron en el 5 % de donantes superiores seleccionados y se encontró que la amplia capacidad de neutralización en suero de la mayoría de los donantes estaba asociada con un único número o un pequeño número de especificidades (Walker y col. 2010). El aislamiento y la caracterización de anticuerpos con una amplia y potente actividad neutralizante procedentes de donantes del Protocolo G es de máxima prioridad ya que los epítomos dirigidos por estos anticuerpos facilitarán el diseño inmunógeno.

Existen actualmente cuatro regiones conocidas en el extremo vírico que son diana de potentes anticuerpos con amplio poder neutralizante (bNAb). El primero es una región conservada sobre el receptor de entrada primario del virus, CD4bs. Esta región se reconoce por los bNAb b12, HJ16, y los recientemente aislados bNAb, VRC01 y VRC03 (Corti y col.; Burton y col. 1991; Wu y col. 2010). Los bNAb 2F5 humanos 4E10 y Z13e1 reconocen la región externa proximal de la membrana (MPER) sobre la proteína gp41, otra región conservada localizada en el tallo del extremo vírico. Se cree que esta región es importante en la fusión vírica (Ofek y col. 2004; Cardoso y col. 2005; Nelson y col. 2007). El tercer epítomo está compuesto de una agrupación de glicanos con alto contenido en manosa en el extremo reconocido por 2G12, el único bNAb anti-VIH-1 que se une solamente a glicanos (Trkola y col. 1995; Sanders y col. 2002; Scanlan y col. 2002; Calarese y col. 2003). Por último, PG9 y PG16 reconocen unas regiones conservadas de los bucles V1/V2 y V3 en gp120 (Walker y col. 2009).

La CD4bs es de particular interés como una región conservada cuya accesibilidad, al menos a CD4, debe mantenerse. El primer bNAb potente en esta región, b12, se aisló de una biblioteca de expresión de fagos utilizando ARN procedente de linfocitos de médula ósea de un individuo seropositivo para VIH-1 (supuesto clado B) (Barbas y col. 1992). El bNAb neutraliza el 35 % de un panel de 162 virus de clados cruzados con una mediana de IC₅₀ de aproximadamente 3 mg/ml en un ensayo de pseudovirus (Walker y col. 2009). Sin embargo, b12 interactúa únicamente con gp120 a través de su cadena pesada (Zhou y col. 2007), y la incapacidad de aislar bNAb dirigidos contra CD4bs adicionales conduce a dudas de si dichos Ab podrían estimularse a través de la inmunización. Se consiguió un avance cuando un bNAb, HJ16, se aisló mediante inmortalización de linfocitos B con memoria a partir de un donante infectado con un clado C y que muestra una amplitud similar a la de b12 (Corti y col.). De forma más reciente y más significativa, los mAb VRC01 y VRC03 se aislaron de un donante infectado con un clado B (Wu y col. 2010). VRC01 neutralizó el 91 % de un panel de 190 pseudovirus, haciendo de este, junto con PG9 y PG16, los mAb de VIH-1 con capacidad más amplia y potente hasta la fecha.

En el presente Ejemplo, los solicitantes caracterizaron PGV04, un novedoso CD4bs mAb humano que se origina a partir de un neutralizador de élite. El anticuerpo se aisló de linfocitos B con memoria individuales en células mononucleares de sangre periférica (PBMC) utilizando la proteína RSC3 como cebo (Wu y col. 2011). La proteína RSC3 tiene la estructura antigénica de los CD4bs preservada con un 30 % de restos expuestos en superficie sustituidos con homólogos del virus de la inmunodeficiencia de simio (VIS) y otros restos que difieren de la secuencia de VIH-1. Los solicitantes confirmaron que OGV04 es un mAb dirigido contra CD4bs con capacidades de neutralización amplias y potentes que se corresponden con las de PG9 y VRC01. Además, la actividad neutralizante de PGV04 resume en última instancia el perfil de neutralización del correspondiente suero del donante. PGV04 se distinguió de CD4, VRC01 y b12 en su capacidad de neutralizar el pseudovirus JR-CSF que contiene sustituciones de alanina individuales. Además, a diferencia de VRC01, PGV04 no potencia la unión de los Ab inducidos por CD4 (CD4i), 17b o X5, a sus epítomos localizados simultáneamente en el sitio de unión del correceptor en el gp120 monomérico, y ninguno de los bNAb dirigidos contra CD4bs indujo el sitio CD4i sobre trímeros funcionales. Los solicitantes concluyen a partir de estos hallazgos que la región de gp120 que compone los CD4bs es capaz de inducir mAb con amplia y potente actividad neutralizante con huellas variables que se traducen en diferencias en sus perfiles neutralizantes.

Anticuerpos y antígenos. Los siguientes Ab y reactivos se recibieron del IAVI Neutralizing Antibody Consortium: 2G12 (Polymun Scientific, Viena, Austria), X5 y 17b (Strategic Biosolutions), CD4 soluble, CD4IgG, F425 (proporcionado por Lisa Cavacini, Beth Israel Deaconess Medical Center), JR-CSF gp120 y BaL gp120 (proporcionado por Guillaume Stewart-Jones, MRC Human Immunology Unit, Oxford), JR-FL gp120 (Progenies, Tarrytown, NY) y

YU2 gp120s (proporcionado por Robert Dorns, University of Pennsylvania). Richard Wyatt proporcionó amablemente las proteínas RSC3 y Δ RSC3 (Scripps, La Jolla, CA).

Donante. El donante a partir del cual se aisló PGV04 se seleccionó del estudio patrocinado por IAVI, Protocolo G (Simeky col. 2009). El alistamiento del Protocolo G se definió como un varón o una mujer de al menos 18 años de edad con infección por VIH documentada durante al menos tres años, asintomático clínicamente en el momento del alistamiento, y que no recibe actualmente tratamiento antirretrovírico. Se utilizaron algoritmos de selección analítica de alto rendimiento para seleccionar individuos para la generación de mAb, y este voluntario se identificó como un neutralizador de élite basándose en la amplia y potente actividad neutralizante del suero frente a un panel de pseudovirus de clados cruzados.

ELISA de unión. Las proteínas RSC3 y Δ RSC3 se diluyeron en PBS y se revistieron a 2,0 mg/ml y JR-FL gp120 se diluyó en PBS y se revistió a 5,0 mg/ml, 50 ml/pocillo en placas de ELISA de poliestireno de 96 pocillos Costar (3690) durante la noche a 4 °C. Las placas se lavaron 4x con PBS que contenía tween al 0,05 %, y se bloquearon con BSA al 3 % en PBS durante 1 h a 37 °C. Después, se añadieron diluciones en serie 5 veces de los mAb, en BSA al 1 % en PBS, a una concentración de partida de 10,0 mg/ml. Se incubaron las placas durante 1 h a 37 °C y a continuación se lavaron 4x antes de que el mAb secundario, anticuerpo de cabra dirigido contra IgG Fc humana conjugada con fosfatasa alcalina (Jackson) se añadiera con una dilución 1:1000 durante 1 h a 37 °C. Los pocillos se lavaron y se detectó la señal añadiendo un comprimido de 5,0 mg de sustrato de fosfatasa alcalina (Sigma) en 5 ml de tampón de tinción de fosfatasa alcalina (pH 9,8) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se leyó la densidad óptica a 405 nm en un lector de microplacas (Molecular Devices).

Para la unión de PGV04 a gp120 aislado del pseudovirus JR-CSF, se recogió pseudovirus 3 días después de la transfección, los sobrenadantes se centrifugaron a 300xg durante 5 minutos y se efectuó la lisis de los virus con NP-40 al 1,0 % a TA durante 30 minutos. Se revistieron las placas ELISA durante la noche a 4 °C con Ab D7324 dirigido contra gp120 (International Enzymes, Inc.) a una concentración de 5,0 mg/ml en PBS. Se lavaron las placas 4x y se añadió el virus lisado a 50 ml/pocillo y se incubó durante 2 h a 37 °C. Se lavaron las placas 4x y se bloquearon con BSA al 3 % en PBS durante 1 h a TA. Se añadieron PGV04 y 2G12 en diluciones en serie de 5 veces comenzando a 10,0 mg/ml. Se lavaron las placas 4x, y se añadió anticuerpo de cabra dirigido contra IgG F(ab')₂ conjugado con fosfatasa alcalina (Pierce) a una dilución 1:1000. El resto del experimento se llevó a cabo como se indicó anteriormente.

Para los ELISA de competición, se revistieron las placas con 5,0 mg/ml de JR-FL gp120 en PBS, 50 ml/pocillo durante la noche a 4 °C. Se lavaron las placas 4x, se bloquearon con 100 ml/pocillo de BSA al 3 % durante 1 h a TA. Después, se añadieron diluciones en serie 5 veces de un Ab competidor (50 ml/pocillo) a partir de 10,0-80,0 mg/ml dependiendo del mAb. Se incubaron las placas durante 30 minutos a TA y 50 ml del mAb competidor biotinilado se añadieron a continuación a la solución del pocillo a una concentración final eficaz del 50 % (CE₅₀). La CE₅₀ se define como la concentración a la cual el 50 % del mAb se une a la proteína. Se incubó la placa durante 1 h a TA y se lavó 4x. Se añadió estreptavidina-AP, 50 ml/pocillo, a una dilución 1:1000 durante 1 h a TA. Se lavaron las placas 4x y se detectó la señal utilizando comprimidos de sustrato de fosfatasa alcalina diluidos en tampón de tinción de fosfatasa como anteriormente.

Inducción del sitio de unión del correceptor sobre gp120. Se revistieron placas ELISA, 50 ml/pocillo, durante la noche a 4 °C con 5,0 mg/ml de JR-FL o proteína YU2 diluida en PBS. Se lavaron las placas 4x, y se bloquearon con BSA al 3 % durante 1 h a TA. Tras eliminar la solución de bloqueo, 10,0 mg/ml de PGV04, CD4IgG, b12, 2G12, VRC01 o VRC03 se añadieron durante 30 minutos a TA. A continuación, se añadieron diluciones en serie 5 veces de X5 o 17b biotinilado (50 ml/pocillo), comenzando a 50,0 mg/ml y 100,0 mg/ml respectivamente. Se lavó la placa 4x y se añadieron 50 ml/pocillo de estreptavidina conjugada con AP a 1:1000 durante 1 h. Se lavó la placa y se desarrolló como anteriormente.

Citometría de flujo. Se añadieron cantidades saturantes de PGV04, b12, 2G12, sCD4, VRC01, VRC03 o 17b a 20,0 mg/ml, se sembraron 50 ml/pocillo de células 293T transfectadas con JR-FL en placas con fondo de V de 96 pocillos (Cellstar), y se incubaron durante 30 minutos a 4 °C en un mezclador de placas. A continuación, se añadió una dilución en serie de 5 veces de 17b biotinilado comenzando a 20,0 mg/ml, 50 ml/pocillo, a cada pocillo que contenía el mAb competidor durante 1 h a 4 °C en un mezclador de placas. Se lavó la placa 2x y se tiñó con una dilución 1.200 de NeutrAvidin conjugado con R-ficoeritrina (PE) (Invitrogen). Se analizó la unión usando citometría de flujo, y se generaron las curvas de unión representando gráficamente la intensidad de la fluorescencia promedio de unión a antígeno como una función de la concentración de anticuerpos. Se usó un FACSCalibur (BD Biosciences) para el análisis de la citometría de flujo y el programa informático FlowJo para la interpretación de datos.

Ensayos de neutralización. Se llevaron a cabo ensayos de neutralización mediante mAb y sueros de pacientes por Monogram Biosciences como se ha descrito anteriormente utilizando un único ciclo de replicación del pseudovirus y midiendo la entrada en células U87 que expresaban tanto CCR5 como CXCR4 mediante la actividad de la luciferasa (Richman y col. 2003). En resumen, se produjeron pseudovirus mediante transfección simultánea de células HEK293 con un plásmido subgenómico, pHIV-1luc Δ u3, que incorpora un gen indicador de la luciferasa de luciérnaga y un segundo plásmido, pCXAS que expresa bibliotecas o clones de VIH-1 Env. Tras la transfección, se recogió el pseudovirus 3 días después y se usó para infectar células U87. Se produjo la lisis de las células 48 horas después de

la infección y se leyó la actividad luciferasa en un luminómetro. Se describe completamente en otra parte de este documento la generación de pseudovirus que incorporan sustituciones únicas de alanina en VIH-1 JR-CSF (Pantophlet y col. 2003). Se midió la actividad de neutralización de PGV04 frente al pseudovirus VIH-1 JR-CSF que contenía sustituciones únicas de alanina en la proteína Env utilizando un ensayo TZM-bl como se describe (Li y col. 2005).

Estadística. Se llevaron a cabo análisis estadísticos con Prism 5.0 for Mac (GraphPad, La Jolla, Ca).

Caracterización de PGV04 como un mAb dirigido contra CD4bs. Se aisló PGV04 a partir de los PBMC de un donante africano infectado con el clado A (Wu y col 2011). En resumen, se clasificaron linfocitos B con memoria específicos de antígenos empleando el RSC3 gp120 para la selección específica de los mAb que se dirigen al CD4bs. El Δ RSC3 gp120, en el que un aminoácido en la posición 371 se eliminó a fin de suprimir la unión de b12, se usó como un control negativo en la clasificación. Como era de esperar, la unión de PGV04 al RSC3gp120 fue fuerte y equivalente a la de VRC01, mostrando ambos mAb una drástica disminución de la unión a Δ RSC3, consistente con su identificación como mAb dirigido contra CD4bs (FIG. 9A). Similar a VRC01, PGV04 se une también con elevada afinidad a JRFL gp120 (FIG. 9B).

Los solicitantes llevaron a cabo a continuación varios ELISA de competición para verificar que PGV04 se dirigía contra el CD4bs. Diluciones en serie de los mAb b12, CD4-IgG, VRC01, 17b, X5, 2G12, o F425 se reunieron a placas ELISA revestidas con JRFL gp120 seguido por la adición de una concentración CE_{50} constante de mAb competidores biotinilados relacionados en la leyenda de cada gráfica (Figs. 10A-D). PGV04 compitió con b12, CD4-IgG y VRC01 para la unión a JRFL gp120 confirmando que PGV04 se dirige a CD4bs (FIG. 10A). PGV04 y b12 presentaron alguna competición parcial con los mAb CD4i, 17b y X5 (FIG. 10B). Sin embargo, PGV04 no compite con 2G12 o el mAb dirigido al bucle V3, F425/b4e8 (FIG. 10C). Experimentos de competición llevados a cabo de forma inversa, en los que diluciones en serie de PGV04 se unieron a placas revestidas de gp120 y las concentraciones de CE_{50} de los mAb competidores se añadieron posteriormente, proporcionaron resultados similares a los esperados para las interacciones de unión reversibles (Fig. 10D).

Amplitud y potencia de la neutralización por PGV04. Para determinar la amplitud y la potencia de neutralización por PGV04, se ensayó un panel multiclado de 162 pseudovirus en un ensayo de neutralización utilizando células U87 que expresaban tanto CCR5 como CXCR4 como la línea de células diana (FIGS. 11A-B). PGV04 neutralizó 142 virus del panel de 162-virus con una $CI_{50} < 50$ mg/ml y PG9 neutralizó 122 virus (FIG. 15A; Fig. 11A). La mediana de CI_{50} de los virus neutralizados a una $CI_{50} < 50$ mg/ml era comparable para PGV04 (0,20 mg/ml) y PG9 (0,27 mg/ml), indicando que PGV04 y PG9 tienen similar potencia. PGV04 neutralizó un 88 % de los virus en el panel mientras que PG9 neutralizó un 75 % de los virus en el panel, y esta diferencia es estadísticamente significativa (test exacto de Fisher, valor $P = 0.0063$) indicando que PGV04 es un mAb más amplio que PG9 (Fig. 11B). A resaltar, hubo 7 aislados víricos que fueron incapaces de neutralizar ambos mAb, pero se sabe que estos aislados están neutralizados por uno de los otros NAb existentes: PG16, b12, 4E10, 2G12 y 2F5 (Walker y col. 2009).

A continuación, Los solicitantes comprobaron la amplitud y potencia de PGV04, PG9 y VRC01 sobre un segundo panel de 97 pseudovirus que usó células TZM-bl como la línea de células diana (FIGS. 11A-B y la FIG. 16). Los resultados para los dos paneles de virus fueron similares, aunque en el último panel, la mediana de CI_{50} de los virus que se neutralizaron a < 50 mg/ml fue menor para PG9 que para VRC01 y PGV04, y esta diferencia era estadísticamente significativa (test de Mann-Whitney, valor $P < 0,0001$ y valor $P = 0,0137$ respectivamente) indicando que PG9 (0,06 mg/ml) es más potente en este panel que VRC01 (0,17 mg/ml) y PGV04 (0,12 mg/ml). PG9 neutralizó un 82 % de los virus del panel, PGV04 neutralizó un 87 % y VRC01 neutralizó un 93 % de virus del panel de 97. La diferencia entre PG9 y VRC01 era estadísticamente significativa (Test exacto de Fisher, valor $P 0,0479$), indicando que VRC01 es un anticuerpo más amplio que PG9.

La mediana de CI_{50} de los virus neutralizados con una $CI_{50} < 50$ mg/ml fue ligeramente menor para PGV04 (0,12 mg/ml) que VRC01 (0,17 mg/ml, test de Mann-Whitney, valor $P = 0,0324$) desvelando que PGV04 es marginalmente más potente que VRC01 en este panel. PGV04 fue ligeramente menos amplio en este panel que VRC01 (87 % de 97 virus frente a 93 %) pero esta diferencia no era estadísticamente significativa.

Los solicitantes investigaron a continuación la amplitud y potencia de PGV04 en comparación con el suero donante a partir del cual se aisló PGV04. La CI_{50} de PGV04 estaba muy correlacionada con el 50 % de los títulos de neutralización (TN_{50}) del suero donante (test de Mann-Whitney, valor $P < 0,0001$). Sin embargo, hubo determinados casos donde PGV04 no neutralizó el virus que el suero donante era capaz de neutralizar (5 de 162 virus o 3 % de los virus) (FIG. 15). En estos casos, los Ab distintos de PGV04 parecen ser responsables de la actividad neutralizante del suero. Sorprendentemente, en unos pocos casos, PGV04 neutralizó un aislado concreto con una $CI_{50} < 1$ mg/ml mientras que el suero donante no neutraliza este mismo aislado (7 de 162 o 4 % de los virus) Los motivos para esta última observación están poco claros.

Inducción del sitio de unión del correceptor sobre gp120 monomérico. Se ha mostrado anteriormente que CD4 soluble (sCD4) potencia la afinidad de unión del mAb, 17b, togp120 (Zhang y col. 1999; Zhang y col. 2001). De manera interesante, a diferencia de b12, VRC01 ha mostrado también potenciar la unión de 17b, aunque no en la misma extensión que CD4-IgG (Wu y col. 2010). Los solicitantes se interesaron en determinar si la unión de PGV04 a gp120

potenciaría de forma similar la unión de los mAb CD4i. Tal como se muestra en la Fig. 11B, los solicitantes no detectaron mejora en la unión del mAb CD4i en presencia de PGV04. Como alternativa a este experimento, los solicitantes añadieron cantidades saturantes de PGV04, CD4-IgG, b12, 2G12, VRC01, VRC03 o no mAb a los pocillos revestidos con gp120 monomérico y a continuación añadieron cantidades de valoración tanto a 17b como a X5 biotinilado (FIGS. 12A-B). De nuevo, PGV04 no potencia la unión de 17b o X5 tanto a JRFL como a YU2 gp120, aunque, CD4-IgG y VRC01 potenciaron la unión de ambos mAb CD4i. De manera interesante, consistente con los datos anteriormente publicados, b12 disminuyó la unión de 17b y X5 sugiriendo que compite parcialmente con los mAb CD4i (Moore y Sodroski 1996).

Inducción del sitio de unión del correceptor sobre trímeros funcionales. Los solicitantes investigaron a continuación si PGV04 podría permitir que 17b se uniera al trímero funcional. Se transfectaron simultáneamente células 293T con el ADN de JRFL Env y pSG3, un plásmido que contiene la estructura de VIH-1. Cuarenta y ocho horas después de la transfección, los mAb, b12, 2G12, PGV04, sCD4, VRC01, VRC03 o 17b se unieron previamente a concentraciones saturantes con los trímeros de Env expresados en la superficie. A continuación, se valoró 17b sobre el complejo unido previamente, y se detectó la unión usando citometría de flujo. Cuando sCD4 unido a gp120 en el contexto de la superficie celular expresó Env, creó un entorno estructural que permitió la unión de 17b (Fig. 12C). Sin embargo, ningún otro mAb permitió niveles detectables de 17b al unirse al trímero funcional. Como control, diluciones en serie de 2g12 biotinilado produjeron curvas de unión idénticas con cada uno de los mAb unidos previamente, demostrando que ninguno de los mAb dirigidos contra CD4bs indujo un grado significativo de desprendimiento de gp120 de los trímeros de la superficie celular (Fig. 12D). Estos resultados sugieren que existen restricciones estructurales en el trímero funcional que evitan la exposición del sitio del correceptor sobre gp120 tras la unión de los mAb dirigidos contra CD4bs que no existen en el monómero gp120.

Neutralización de PGV04 de pseudovirus JR-CSF que contienen sustituciones de alanina únicas. Para cartografiar el epítipo de PGV04, los solicitantes llevaron a cabo ensayos de neutralización con pseudovirus JR-CSF que contienen sustituciones de alanina únicas en la proteína gp120. Las sustituciones en D279, 1420 e I423 comprometieron mucho la neutralización de PGV04, disminuyendo la potencia de neutralización a 1 %, 3 % y 5 % de la del tipo natural respectivamente (Fig. 13A). D279A comprometió también mucho la potencia de neutralización de CD4 y VRC01, pero tuvo un efecto limitado sobre la actividad de b12. I420A e I423A disminuyeron igualmente la potencia de neutralización de VRC01, aunque no en la misma extensión que para PGV04. Además, estas dos sustituciones tuvieron el efecto opuesto sobre b12 y CD4-IgG, aumentando la potencia de neutralización de ambos mAb. De manera interesante, las isoleucinas que se encuentran en las posiciones 420 y 423 están muy conservadas entre los virus VIH-1 existentes en la base de datos de Los Alamos, encontrándose a una frecuencia de 0,97 y 0,88 respectivamente. El ácido aspártico que se encuentra en la posición 279 está menos conservado y se encuentra a una frecuencia de 0,45, encontrándose la asparagina en esta posición a una frecuencia de 0,51.

Otras sustituciones de alanina suprimen también la neutralización de PGV04, pero no en la misma extensión que los tres restos mencionados anteriormente. N276A disminuyó la potencia de neutralización de PGV04 a 13 % de la del tipo natural. De forma notable, se ha determinado previamente que la N-acetil-glucosamina procedente del glicano unido a N en este resto es parte del epítipo VRC01 mediante la resolución de la estructura cristalina de VRC01 unido a gp120 (Zhou y col.). Sorprendentemente, la eliminación de este glicano dio como resultado un aumento de 4 veces en la potencia de neutralización de VRC01 no teniendo a la vez impacto sobre la neutralización de CD4-IgG o b12. Adicionalmente, I307A, I309A, F317A, e Y318A disminuyeron la neutralización de PGV04 a 9-36 % del tipo natural. Estos restos se encuentran en la punta del bucle V3 y lo más probable es que sean importantes en el mantenimiento de la estructura local. De manera interesante, estos restos han mostrado ser importantes en el mantenimiento de la interacción entre gp120 y gp41 (Xiang y col.), y las sustituciones de alanina en estas posiciones han mostrado dar como resultado una sensibilidad global a la neutralización del suero (Walker y col. 2010). A diferencia de PGV04 y (VRC01), estas sustituciones aumentaron la neutralización de b12 y CD4.

Unión de PGV04 a sustituciones de alanina únicas que contienen JR-CSF gp120. Para cartografiar adicionalmente el epítipo de PGV04, Los solicitantes evaluaron la actividad de unión de PGV04 a un panel de proteínas gp120 que contenían sustituciones de alanina únicas que se capturaron a partir de pseudovirus JR-CSF lisados. Las variantes D279A (0 %), N280A (1 %), D457A (4 %), y R469A (3 %) gp 120 mostraron una importante disminución en la unión de PGV04 con respecto a gp120 de tipo natural, sugiriendo que los restos implicados son parte del epítipo de PGV04 (FIG. 13B). El resultado para D279A gp120 es coherente con los datos de neutralización descubiertos para la variante D279A del virus en la Fig. 13A. Adicionalmente, se añadieron tres restos potenciales a la cartografía del epítipo PGV04 que no se ensayarían en los experimentos de neutralización debido a que los valores de infectividad de la variante del virus correspondiente estaban por debajo del nivel de detección del ensayo. Una de las sustituciones, R469A, se encuentra en el bucle V5 y disminuye también la unión de 2G12. Por lo tanto, esta sustitución perturba más probablemente la estructura de gp120 y no es parte directa del epítipo de PGV04. La sustitución de D457A había mostrado previamente disminuir la unión por debajo del 10 % del tipo natural para b12 y CD4 (Pantophlet y col. 2003) y D368A que disminuye la unión de PGV04 a 12 %, ha mostrado previamente ser parte de los epítipos de CD4, b12 y VRC01, pero no al de HJ16 (Corti y col.; Zhou y col.; Walker y col. 2010).

Unión de PGV04 a BaL gp120 deglicosilado. En los estudios de barrido de alanina de los solicitantes, Los solicitantes encuentran determinados glicanos unidos a N afectados por la unión y la neutralización de PGV04. Por lo tanto, los solicitantes determinaron si la eliminación de glicanos por Endo H, Endo F1, Endo F2, y Endo F3 procedentes

de la proteína BaL gp120, producidos en células 293T, afectarían la unión de PGV04. PGV04 y los otros mAb dirigidos contra CD4bs, b12, VRC01, VRC03 y b6, retuvieron niveles similares de unión a las formas simuladas y deglicosiladas de la proteína sugiriendo que los mAb dirigidos contra CD4bs en general no tienen una fuerte dependencia sobre los glicanos para la unión de gp120 (Figs. 14A-B).

5 En este ejemplo, los solicitantes caracterizaron PGV04, un nuevo mAb con amplia y potente actividad neutralizante de VIH-1 dirigido contra CD4bs. PGV04 correspondió a la amplitud y potencia de PG9 y VRC01, dos potentes bNAb dirigidos contra VIH-1 anteriormente descritos. Se determinó la neutralización de PG9 y PGV04 sobre dos paneles de pseudovirus diferentes. Para un panel de 162 pseudovirus en células U87, PGV04 y PG9 tenían una potencia comprable, teniendo PGV04 mayor amplitud. Para un panel de 97 pseudovirus diferentes en células TZM-bl, se obtuvo
10 finalmente un resultado ligeramente diferente. PG9 era más potente que PGV04, y PG9 tenía una amplitud similar que PGV04. PG9 neutralizó los virus en el último panel con mayor potencia que los virus en el panel de 162 virus, aunque, PGV04 pareció tener similar potencia de neutralización sobre ambos paneles. Esto puede ser debido a los aislados seleccionados en ambos paneles y/o a la línea de células diana utilizada, U87 frente a células TZM-bl. PGV04 tenía mayor amplitud que PG9 en ambos paneles, aunque esta diferencia era estadísticamente significativa solo en el panel
15 de 162 virus.

En su conjunto, PG9/16, VRC01 y PGV04 neutralizaron más del 70 % de los virus en circulación con una potencia 10 veces mayor que los bNAb anti-VIH-1 anteriormente definidos, b12, 2G12, 2F5, y 4E10. De manera interesante, el virus del donante de PGV04 se subtipó como clado A1/D recombinante que difiere de los donantes asociados con los otros bNAb dirigidos contra CD4bs, VRC01 (clado B), HJ16 (clado C) y b12 (supuesto clado B). Por lo tanto, parece
20 que la estimulación de mAb dirigidos contra CD4bs con capacidad ampliamente neutralizante no es dependiente del clado del aislado infectante. A resaltar, el virus del donante de PGV04 no parece ser ninguna forma recombinante en circulación conocida (CRF) relacionada en las bases de datos de VIH de Los Alamos.

Los resultados de los solicitantes muestran significativas diferencias entre los bNAb dirigidos contra CD4bs en su modo de reconocimiento de la región CD4bs. Por ejemplo, CD4-IgG y VRC01 potencian la exposición al sitio de unión del correceptor sobre el gp120 monomérico, mientras que PGV04 y b12 no lo hacen. Además, VRC01, b12 y PGV04, a diferencia de CD4, no inducen el sitio del correceptor sobre trímeros funcionales. Estas observaciones sugieren que existen diferencias entre la presentación los CD4bs en gp120 recombinante frente a gp120 en el contexto del trímero funcional. Estas observaciones también destacan diferencias en el reconocimiento de VRC01 y PGV04 de los CD4bs, como se expone sobre el gp120 monomérico.

30 En los estudios de barrido de alanina de los solicitantes, algunas sustituciones de alanina influyeron sobre los mAb dirigidos contra CD4bs de forma diferente, ilustrando de nuevo que PGV04, VRC01, b12 y CD4-IgG reconocen los CD4bs de maneras algo diferentes. Por ejemplo, D279A, I420A e I423A disminuyeron mucho la neutralización de PGV04, pero variaron en sus efectos sobre VRC01, CD4-IgG y b12. La sustitución de D279A disminuyó la neutralización por VRC01 y CD4-IgG, pero no tuvo gran efecto sobre b12. Las sustituciones de I420A e I423A
35 disminuyeron la neutralización de VRC01, pero aumentaron la neutralización de CD4-IgG y b12. Además, determinadas sustituciones en el bucle V3 disminuyeron la neutralización por PGV04 y VRC01, pero aumentaron la neutralización por CD4 y b12. De forma importante, la naturaleza muy conservada de los restos importantes para el reconocimiento de PGV04 explica análogamente cómo PGV04 es capaz de conseguir una amplia neutralización. De hecho, será interesante determinar qué restos son importantes para el escape natural de PGV04.

40 Los resultados de este Ejemplo tienen implicaciones para el diseño de la vacuna. Considerando que una colección de anticuerpos con una amplia y potente actividad neutralizante dirigidos contra CD4bs se han aislado de donantes infectados de manera natural, y que se ha detectado actividad neutralizante de CD4bs en algunos sueros ampliamente neutralizantes (Li y col. 2007; Binley y col. 2008; Gray y col. 2009; Li y col., 2009; Sather y col. 2009), parece que esta región puede ser una diana de vacuna particularmente prometedora. También, los datos de los solicitantes muestran
45 que diferentes bNAb dirigidos contra CD4bs pueden dirigirse a epítomos ligeramente diferentes, que pueden tener implicaciones para el diseño de inmunógenos que se centran en la respuesta inmune sobre los CD4bs.

Barbas, C. F., 3rd, E. Bjorling, F. Chiodi, N. Dunlop, D. Cababa, T. M. Jones, S. L. Zebedee, M. A. Persson, P. L. Nara, E. Norrby and y col. (1992). "Recombinant human Fab fragments neutralize human type 1 immunodeficiency virus in vitro." *Proc Natl Acad Sci USA* 89(19): 9339-43.

50 Binley, J. M., E. A. Lybarger, E. T. Crooks, M. S. Seaman, E. Gray, K. L. Davis, J. M. Decker, D. Wycuff, L. Harris, N. Hawkins, B. Wood, C. Nathe, D. Richman, G. D. Tomaras, F. Bibollet-Ruche, J. E. Robinson, L. Morris, G.M. Shaw, D. C. Montefiori and J. R. Mascola (2008). "Profiling the specificity of neutralizing antibodies in a large panel of plasmas from patients chronically infected with human immunodeficiency virus type 1 subtypes B and C." *J Virol* 82(23): 11651-68.

55 Burton, D. R., C. F. Barbas, 3rd, M. A. Persson, S. Koenig, R. M. Chanock and R. A. Lerner (1991). "A large array of human monoclonal antibodies to type 1 human immunodeficiency virus from combinatorial libraries of asymptomatic seropositive individuals." *Proc Natl Acad Sci USA* 88(22): 10134-7.

- Calarese, D. A., C. N. Scanlan, M. B. Zwick, S. Deeckongkit, Y. Mimura, R. Kunert, P. Zhu, M. R. Wormald, R. L. Stanfield, K. H. Roux, J. W. Kelly, P. M. Rudd, R. A. Dwek, H. Katinger, D. R. Burton and I. A. Wilson (2003). "Antibody domain exchange is an immunological solution to carbohydrate cluster recognition." *Science* 300(5628): 2065-71.
- 5 Cardoso, R. M., M. B. Zwick, R. L. Stanfield, R. Kunert, J. M. Binley, H. Katinger, D. R. Burton and I. A. Wilson (2005). "Broadly neutralizing anti-HIV antibody 4E10 recognizes a helical conformation of a highly conserved fusion-associated motif in gp41." *Immunity* 22(2): 163-73.
- Corti, D., J. P. Langedijk, A. Hinz, M. S. Seaman, F. Vanzetta, B. M. Fernandez-Rodriguez, C. Silacci, D. Pinna, D. Jarrossay, S. Balla-Jhagjhoorsingh, B. Willems, M. J. Zekveld, H. Dreja, E. O'Sullivan, C. Pade, C. Orkin, S. A. Jeffs, D. C. Montefiori, D. Davis, W. Weissenhorn, A. McKnight, J. L. Heeney, F. Sallusto, Q. J. Sattentau, R. A. Weiss and A. Lanzavecchia "Analysis of memory B cell responses and isolation of novel monoclonal antibodies with neutralizing breadth from HIV-1-infected individuals." *PLoS One* 5(1): e8805.
- 10 Doria-Rose, N. A., R. M. Klein, M. G. Daniels, S. O'Dell, M. Nason, A. Lapedes, T. Bhattacharya, S. A. Migueles, R. T. Wyatt, B. T. Korber, J. R. Mascola and M. Connors "Breadth of human immunodeficiency virus-specific neutralizing activity in sera: clustering analysis and association with clinical variables." *J Virol* 84(3): 1631-6.
- 15 Doria-Rose, N. A., R. M. Klein, M. M. Manion, S. O'Dell, A. Phogat, B. Chakrabarti, C. W. Hallahan, S. A. Migueles, J. Wrammert, R. Ahmed, M. Nason, R. T. Wyatt, J. R. Mascola and M. Connors (2009). "Frequency and phenotype of human immunodeficiency virus envelope-specific B cells from patients with broadly cross-neutralizing antibodies." *J Virol* 83(1): 188-99.
- Gnanakaran, S., M. G. Daniels, T. Bhattacharya, A. S. Lapedes, A. Sethi, M. Li, H. Tang, K. Greene, H. Gao, A. F. Haynes, M. S. Cohen, G. M. Shaw, M. S. Seaman, A. Kumar, F. Gao, D. C. Montefiori and B. Korber "Genetic signatures in the envelope glycoproteins of HIV-1 that associate with broadly neutralizing antibodies." *PLoS Comput Biol* 6(10): e1000955.
- 20 Gray, E. S., N. Taylor, D. Wycuff, P. L. Moore, G. D. Tomaras, C. K. Wibmer, A. Puren, A. DeCamp, P. B. Gilbert, B. Wood, D. C. Montefiori, J. M. Binley, G. M. Shaw, B. F. Haynes, J. R. Mascola and L. Morris (2009). "Antibody specificities associated with neutralization breadth in plasma from human immunodeficiency virus type 1 subtype C-infected blood donors." *J Virol* 83(17): 8925-37.
- 25 Li, M., F. Gao, J. R. Mascola, L. Stamatatos, V. R. Polonis, M. Koutsoukos, G. Voss, P. Goepfert, P. Gilbert, K. M. Greene, M. Bilska, D. L. Kothe, J. F. Salazar-Gonzalez, X. Wei, J. M. Decker, B. H. Hahn and D. C. Montefiori (2005). "Human immunodeficiency virus type 1 env clones from acute and early subtype B infections for standardized assessments of vaccine-elicited neutralizing antibodies." *J Virol* 79(16): 10108-25.
- 30 Li, Y., S. A. Migueles, B. Welcher, K. Svehla, A. Phogat, M. K. Louder, X. Wu, G. M. Shaw, M. Connors, R. T. Wyatt and J. R. Mascola (2007). "Broad HIV-1 neutralization mediated by CD4-binding site antibodies." *Nat Med* 13(9): 1032-4.
- Li, Y., K. Svehla, M. K. Louder, D. Wycuff, S. Phogat, M. Tang, S. A. Migueles, X. Wu, A. Phogat, G. M. Shaw, M. Connors, J. Hoxie, J. R. Mascola and R. Wyatt (2009). "Analysis of neutralization specificities in polyclonal sera derived from human immunodeficiency virus type 1-infected individuals." *J Virol* 83(2): 1045-59.
- 35 Moore, J. P. and J. Sodroski (1996). "Antibody cross-competition analysis of the human immunodeficiency virus type 1 gp120 exterior envelope glycoprotein." *J Virol* 70(3): 1863-72.
- Nelson, J. D., F. M. Brunei, R. Jensen, E. T. Crooks, R. M. Cardoso, M. Wang, A. Hessel, I. A. Wilson, J. M. Binley, P. E. Dawson, D. R. Burton and M. B. Zwick (2007). "An affinity-enhanced neutralizing antibody against the membrane-proximal external region of human immunodeficiency virus type 1 gp41 recognizes an epitope between those of 2F5 and 4E10." *J Virol* 81(8): 4033-43.
- 40 Ofek, G., M. Tang, A. Sambor, H. Katinger, J. R. Mascola, R. Wyatt and P. D. Kwong (2004). "Structure and mechanistic analysis of the anti-human immunodeficiency virus type 1 antibody 2F5 in complex with its gp41 epitope." *J Virol* 78(19): 10724-37.
- 45 Pantophlet, R., E. Ollmann Saphire, P. Pognard, P. W. Parren, I. A. Wilson and D. R. Burton (2003). "Fine mapping of the interaction of neutralizing and non-neutralizing monoclonal antibodies with the CD4 binding site of human immunodeficiency virus type 1 gp120." *J Virol* 77(1): 642-58.
- Richman, D. D., T. Wrin, S. J. Little and C. J. Petropoulos (2003). "Rapid evolution of the neutralizing antibody response to HIV type 1 infection." *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(7): 4144-9.
- 50 Sanders, R. W., M. Venturi, L. Schiffner, R. Kalyanaraman, H. Katinger, K. O. Lloyd, P. D. Kwong and J. P. Moore (2002). "The mannose-dependent epitope for neutralizing antibody 2G12 on human immunodeficiency virus type 1 glycoprotein gp120." *J Virol* 76(14): 7293-305.

- Sather, D. N., J. Armann, L. K. Ching, A. Mavrantoni, G. Sellhorn, Z. Caldwell, X. Yu, B. Wood, S. Self, S. Kalams and L. Stamatatos (2009). "Factors associated with the development of cross-reactive neutralizing antibodies during human immunodeficiency virus type 1 infection." *J Virol* 83(2): 757-69.
- 5 Scanlan, C. N., R. Pantophlet, M. R. Wormald, E. Ollmann Saphire, R. Stanfield, I. A. Wilson, H. Katinger, R. A. Dwek, P. M. Rudd and D. R. Burton (2002). "The broadly neutralizing anti-human immunodeficiency virus type 1 antibody 2G12 recognizes a cluster of alpha1-->2 mannose residues on the outerface of gp120." *J Virol* 76(14): 7306-21.
- 10 Simek, M. D., W. Rida, F. H. Priddy, P. Pung, E. Carrow, D. S. Laufer, J. K. Lehrman, M. Boaz, T. Tarragona-Fiol, G. Miuro, J. Birungi, A. Pozniak, D. A. McPhee, O. Manigart, E. Karita, A. Inwoley, W. Jaoko, J. Dehovitz, L. G. Bekker, P. Pitisuttithum, R. Paris, L. M. Walker, P. Poignard, T. Wrin, P. E. Fast, D. R. Burton and W. C. Koff (2009). "Human immunodeficiency virus type 1 elite neutralizers: individuals with broad and potent neutralizing activity identified by using a high-throughput neutralization assay together with an analytical selection algorithm." *J Virol* 83(14): 7337-48.
- Trkola, A., A. B. Pomales, H. Yuan, B. Korber, P. J. Maddon, G. P. Allaway, H. Katinger, C. F. Barbas, 3rd, D. R. Burton, D. D. Ho and y col. (1995). "Cross-clade neutralization of primary isolates of human immunodeficiency virus type 1 by human monoclonal antibodies and tetrameric CD4-IgG." *J Virol* 69(11): 6609-17.
- 15 Walker, L. M., S. K. Phogat, P. Y. Chan-Hui, D. Wagner, P. Phung, J. L. Goss, T. Wrin, M. D. Simek, S. Fling, J. L. Mitcham, J. K. Lehrman, F. H. Priddy, O. A. Olsen, S. M. Frey, P. W. Hammond, S. Kaminsky, T. Zamb, M. Moyle, W. C. Koff, P. Poignard and D. R. Burton (2009). "Broad and potent neutralizing antibodies from an African donor reveal a new HIV-1 vaccine target." *Science* 326(5950): 285-9.
- 20 Walker, L. M., M. D. Simek, F. Priddy, J. S. Gach, D. Wagner, M. B. Zwick, S. K. Phogat, P. Poignard and D. R. Burton (2010). "A limited number of antibody specificities mediate broad and potent serum neutralization in selected HIV-1 infected individuals." *PLoS Pathog* 6(8).
- 25 Wu, X., Z. Y. Yang, Y. Li, C. M. Hogerkorp, W. R. Schief, M. S. Seaman, T. Zhou, S. D. Schmidt, L. Wu, L. Xu, N. S. Longo, K. McKee, S. O'Dell, M. K. Louder, D. L. Wycuff, Y. Feng, M. Nason, N. Doria-Rose, M. Connors, P. D. Kwong, M. Roederer, R. T. Wyatt, G. J. Nabel and J. R. Mascola (2010). "Rational design of envelope identifies broadly neutralizing human monoclonal antibodies to HIV-1." *Science* 329(5993): 856-61.
- Xiang, S. H., A. Finzi, B. Pacheco, K. Alexander, W. Yuan, C. Rizzuto, C. C. Huang, P. D. Kwong and J. Sodroski "A V3 loop-dependent gp120 element disrupted by CD4 binding stabilizes the human immunodeficiency virus envelope glycoprotein trimer." *J Virol* 84(7): 3147-61.
- 30 Zhang, W., G. Canziani, C. Plugariu, R. Wyatt, J. Sodroski, R. Sweet, P. Kwong, W. Hendrickson and I. Chaiken (1999). "Conformational changes of gp120 in epitopes near the CCR5 binding site are induced by CD4 and a CD4 miniprotein mimetic." *Biochemistry* 38(29): 9405-16.
- Zhang, W., A. P. Godillot, R. Wyatt, J. Sodroski and I. Chaiken (2001). "Antibody 17b binding at the coreceptor site weakens the kinetics of the interaction of envelope glycoprotein gp120 with CD4." *Biochemistry* 40(6): 1662-70.
- 35 Zhou, T., I. Georgiev, X. Wu, Z. Y. Yang, K. Dai, A. Finzi, Y. D. Kwon, J. F. Scheid, W. Shi, L. Xu, Y. Yang, J. Zhu, M. C. Nussenzweig, J. Sodroski, L. Shapiro, G. J. Nabel, J. R. Mascola and P. D. Kwong "Structural basis for broad and potent neutralization of HIV-1 by antibody VRC01." *Science* 329(5993): 811-7.
- Zhou, T., L. Xu, B. Dey, A. J. Hessel, D. Van Ryk, S. H. Xiang, X. Yang, M. Y. Zhang, M. B. Zwick, J. Arthos, D. R. Burton, D. S. Dimitrov, J. Sodroski, R. Wyatt, G. J. Nabel and P. D. Kwong (2007). "Structural definition of a conserved neutralization epitope on HIV-1 gp120." *Nature* 445(7129): 732-7.

40 **Ejemplo 5: Evolución centrada de anticuerpos con actividad neutralizante de VIH-1 desvelada por las estructuras cristalinas y la secuenciación en profundidad**

El anticuerpo VRC01 es una inmunoglobulina humana que neutraliza ~90 % de aislados de VIH-1. Para comprender cómo se desarrollan dichos anticuerpos con amplia capacidad neutralizante, los solicitantes utilizaron la cristalografía de rayos X y la pirosecuenciación 454 para caracterizar anticuerpos análogos a VRC01 adicionales a partir de individuos infectados con VIH. Las estructuras cristalinas desvelaron un modo convergente de unión para diversos anticuerpos al mismo epítipo del sitio de unión a CD4. El análisis genómico funcional de las cadenas pesada y ligera expresadas desveló rutas comunes de maduración de la cadena pesada del anticuerpo, confinadas al linaje IGHV1-2*02, implicando docenas de cambios somáticos, y capaces de emparejarse con diferentes cadenas ligeras. La amplia capacidad inmunizante de VIH-1 asociada con anticuerpos análogos a VRC01 implica de esta manera la evolución de los anticuerpos a un estado muy madurado por afinidad requerido para reconocer una estructura vírica invariante, con linajes definidos a partir de miles de secuencias que proporcionan mapas de ruta genéticos de su desarrollo.

El VIH-1 presenta extraordinaria diversidad genética y ha evolucionado múltiples mecanismos de resistencia para evadir la respuesta inmunitaria humoral (1-3). A pesar de estos obstáculos, un 10-25 %de individuos infectados con

VIH-1 desarrolla anticuerpos con actividad neutralizante reactivos en cruzado después de algunos años de infección (4-9). La estimulación de dichos anticuerpos formaría la base para una vacuna de VIH-1 eficaz, y un esfuerzo intenso se ha centrado en identificar anticuerpos responsables y delinear sus características. Se ha aislado una variedad de anticuerpos monoclonales (mAb) que reconocen una gama de epítomos sobre el extremo del virus VIH-1 funcional, que está compuesto por tres glicoproteínas de la envoltura exterior de gp120 muy glicosiladas y tres moléculas gp41 transmembrana. Algunos anticuerpos con actividad ampliamente neutralizante se dirigen contra la región externa próxima a la membrana de gp41 (10-11), pero la mayoría reconoce gp120. Estos incluyen los anticuerpos que prefieren estructuras cuaternarias PG9, PG16, y CH01-04 (12-13), los anticuerpos reactivos a glicano 2G12 y PGT121-144 (14-15), y los anticuerpos b12, HJ16, y VRC01-03, que se dirigen contra la región de VIH-1 gp120 implicada en el contacto inicial con el receptor CD4 (16-19).

Una característica inusual de todos estos anticuerpos con amplio poder neutralizante reactivos a gp120 es un alto nivel de mutación somática. Los anticuerpos acumulan normalmente 5-15 % de cambios en la secuencia de aminoácidos del dominio variable durante el procedimiento de maduración por afinidad (20), pero para estos anticuerpos con actividad neutralizante reactivos a gp120, el grado de mutación somática de la cadena pesada está marcadamente aumentado, variando desde el 19 % para los anticuerpos que prefieren la estructura cuaternaria (12), al 31 % para el anticuerpo 2G12 (21-22), y al 40-46 % para los anticuerpos dirigidos contra el sitio de unión a CD4, HJ16 (17), VRC01, VRC02, y VRC03 (18).

En el caso de VRC01, el anticuerpo maduro acumula aproximadamente 70 cambios totales en la secuencia de aminoácidos durante el procedimiento de maduración. El VRC01 maduro puede neutralizar ~90 % de los aislados de VIH-1 con una media geométrica de CI_{50} de 0,3 μ g/ml (18), y los estudios estructurales muestran que consigue esta neutralización reconociendo precisamente el sitio inicial de unión a CD4 sobre VIH-1 gp120 (19). En contraste, el antecesor de la línea germinal no mutado previsto de VRC01 tienen una débil afinidad por las cepas usuales de gp120 (~nM) (19). Además, con solo tres anticuerpos análogos a VRC01 identificados en un único individuo (donante 45), resulta poco claro si el modo de reconocimiento de VRC01, el origen genético, y la ruta de maduración por afinidad representan características generales de la respuesta de los linfocitos B al sitio de unión a CD4 de VIH-1 gp120. Aquí, los solicitantes exploran como neutralizar ampliamente la inmunidad de VIH-1 asociada con el desarrollo de anticuerpos análogos de VRC01, con un análisis de docenas de neutralizadores procedentes de donantes adicionales para responder a preguntas generales y para trazar rutas de maduración por afinidad con miles de secuencias de anticuerpos análogas a VRC01.

Aislamiento de anticuerpos con actividad neutralizante de los donantes 74 y 0219 con una sonda del sitio de unión a CD4. Los solicitantes utilizaron anteriormente un resurgido guiado por estructura para alterar las superficies antigénicas de VIH-1 gp120 preservando a la vez el sitio inicial de unión al receptor de CD4 (18). Con la sonda del núcleo 3 resurgido estabilizado (RSC3), se alteraron aproximadamente un 30 % de los restos en superficie del núcleo de gp120 y la conformación se estabilizó mediante la adición de enlaces disulfuro interdominio y mutaciones puntuales que rellenaban la cavidad (18). Los solicitantes utilizaron RSC3 y una versión mutante que contenía una única delección de aminoácido en el bucle de unión a CD4 (Δ RSC3) para interrogar un panel de 12 sueros con un amplio poder neutralizante derivados de la cohorte G del protocolo IAVI de individuos infectados con VIH-1 (6, 23) (Fig. 17A). Una sustancial fracción de neutralización de tres sueros se bloqueó específicamente por RSC3 en comparación con Δ RSC3, indicando la presencia de anticuerpos con actividad neutralizante dirigidos al sitio de unión a CD4. Los ensayos de competición para la neutralización de RSC3 confirmaron también la presencia de anticuerpos dirigidos al sitio de unión a CD4 en el suero de 0219 caracterizado anteriormente, identificado en la cohorte CHAVI 001 (8) (Fig. 17A). Se utilizaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) procedentes del donante 74 del protocolo G (infectado con A/D recombinante) y del donante 0219 de CHAVI (infectado con el clado A) para la clasificación de linfocitos B específicos de antígenos y el aislamiento de anticuerpos. Para el donante 74 y el 0219, respectivamente, se identificaron un total de 0,13 % y 0,15 % linfocitos B IgG⁺ (Fig. 17B). Los genes de la inmunoglobulina de la cadena pesada y ligera procedentes de linfocitos B individuales se amplificaron y clonaron en vectores de expresión de IgG1 que reconstituyeron la IgG completa (18, 24). Con respecto al donante 74, dos anticuerpos somáticamente relacionados denominados VRC-PG04 y VRC-PG04b demostraron una fuerte unión a algunas versiones de gp120 y a RSC3, pero >100 veces menos de unión a Δ RSC3. Con respecto al donante 0219, cinco anticuerpos somáticamente relacionados denominados VRC-CH30, 31, 32, 33 y 34 presentaron un modelo de reactividad similar al de RSC3/ Δ RSC3. El análisis de las secuencias de estos dos conjuntos de clones de anticuerpos (Fig. 17C) desveló que se originaron del mismo precursor variable de la cadena pesada de la inmunoglobulina inferida (IGHV) del alelo del gen IGHV1-2*02. A pesar de esta similitud en el origen del gen V de la cadena pesada, las dos secuencias de clones se originaron de diferentes genes del segmento J de la cadena pesada y contenían cadenas ligeras diferentes. Las cadenas ligeras de VRC-PG04 y las variantes somáticas de 04b se originaron a partir del alelo IGkV3 mientras que las variantes somáticas de VRC-CH30-34 se derivaron de un alelo IGkV1. A resaltar, los siete anticuerpos estaban madurados con una alta afinidad: VRC-PG04 y 04b presentaron una frecuencia de mutación génica V_H del 30 % con respecto al alelo IGHV1-2*02 de la línea germinal, un nivel de maduración por afinidad similar al previamente observado con VRC01-03; los anticuerpos VRC-CH30-34 estaban también madurados con una alta afinidad, con una frecuencia de mutación V_H del 23-25 %.

Para definir las reactividades de estos nuevos anticuerpos sobre gp120, Los solicitantes llevaron a cabo los ELISA de competición con un panel de mAb bien caracterizado. La unión en cada uno de los anticuerpos se sometió a competición por VRC01-03 por otros anticuerpos dirigidos contra el sitio de unión a CD4 y por CD4-Ig, pero no por los

anticuerpos conocidos que se unen a gp120 en otros sitios. A pesar de las similitudes en la reactividad de gp120 y el origen genómico de V_H, las similitudes de secuencias de las regiones de los genes de la cadena pesada y la cadena ligera no tienen en cuenta fácilmente su modo de reconocimiento de gp120. Finalmente, la evaluación de la neutralización de VRC-PG04 y VRC-CH31 sobre un panel de pseudovirus Env desveló su capacidad para neutralizar

Definición estructural del reconocimiento de gp120 por anticuerpos identificados RSC3 de diferentes donantes; una convergencia notable. Para definir el modo de reconocimiento de gp120 empleado por el donante 74 derivado de VRC-PG04, los solicitantes cristalizaron su fragmento de unión a antígeno (Fab) en un complejo con un núcleo de gp120 procedente del clado A/E recombinante 93TH057 que se había cristalizado previamente con VRC01 (19). Se recogieron los datos de difracción a una resolución de 2,1 Å a partir de cristales ortorrómbicos, y la estructura se resolvió mediante sustitución molecular y se refinó hasta un valor R cristalográfico de 19,0 % (Fig. 18A). La estructura de VRC-PG04 en complejo con HIV-1 gp120 mostró una sorprendente similitud con el complejo con VRC01 anteriormente determinado, a pesar de los diferentes orígenes del donante y solo un 50 % de identidad de aminoácidos en la región variable de la cadena pesada (Fig. 18). Cuando se superpusieron los gp120, las posiciones de la cadena pesada resultante de VRC-PG04 y VRC01 difirieron en el promedio de las desviaciones cuadráticas (rmsd) de 2,1 Å en átomos de Ca, con una alineación incluso más precisa de la región determinante de la complementariedad de la segunda cadena pesada (CDR H2) (1,5 Å rmsd). Las interacciones críticas tales como el puente salino de Asp368_{gp120} con Arg71_{VRC01} se mantuvieron en VRC-PG04 (Fig. 18B).

Los solicitantes cristalizaron también el complejo gp120-Fab del mAb VRC03 derivado del donante 45, cuyo aislamiento y la caracterización se habían descrito anteriormente (18). VRC03 y VRC-PG04 comparten solo un 51 % de identidad de la secuencia de proteínas variable de la cadena pesada, y la cadena pesada de VRC03 contiene una inserción inusual en la región 3 del marco (18). Se recogieron los datos de difracción a una resolución de 1,9 Å a partir de cristales ortorrómbicos, y la estructura se resolvió mediante sustitución molecular y se refinó hasta un valor R cristalográfico de 18,7 % (Fig. 18). VRC03 mostró también el reconocimiento de gp120 que fue sorprendentemente similar a los de VRC-PG04 y VRC01, con restos de interfaz similares y rmsds por parejas en átomos de Ca de 2,4 y 1,9 Å, respectivamente. En particular, las superficies interactivas con gp120 de CDR H2 y CDR L3 mostraron un reconocimiento similar (Ca-rmsd por parejas de estas regiones de los anticuerpos variaron de 0.5-1.4 Å tras la superposición de gp120).

En general, el repertorio de posibles productos de la inmunoglobulina es muy grande y se esperaba que se produjeran modos muy similares de reconocimiento de anticuerpos de forma infrecuente (25). Para evaluar como era de atípica la convergencia del anticuerpo análogo a VRC01, los solicitantes analizaron otras familias de anticuerpos específicos de VIH-1 que comparten orígenes comunes de genes IGHV (26-29), incluyendo los anticuerpos inducidos por CD4, 17b, 412d y X5, todos los cuales derivan de un alelo IGHV1-69 común. El análisis del reconocimiento de gp120 por estos anticuerpos indicó una sustancial variación, con una diferencia angular en la orientación de la cadena pesada entre 17b, 412d y X5 de más de 90°, o aproximadamente 10 veces mayor que entre los anticuerpos análogos a VRC01. Asimismo, se puede seleccionar la sonda RSC3 para un modo concreto de reconocimiento, de esta manera, los solicitantes analizaron otros anticuerpos dirigidos contra el sitio de unión a CD4 que se unen fuertemente a la sonda RSC3, incluyendo los anticuerpos b12 y b13 (16, 30); estos otros anticuerpos reactivos a RSC3 mostraron también diferencias drásticas en la orientación de la cadena pesada con respecto a los anticuerpos análogos a VRC01.

La convergencia notable en el reconocimiento observada con VRC01, VRC03, y VRC-PG04 sugirió un modo común de reconocimiento de VIH-1 gp120, conservado entre donantes infectados con un clado B (donante 45) o un clado A/D (donante 74) de una cepa de VIH-1. La precisión requerida para este modo de reconocimiento surge probablemente como consecuencia de los múltiples mecanismos de evasión inmunitaria que protegen el sitio de unión a CD4 sobre VIH-1 gp120 (30). Los solicitantes analizaron las propiedades superficiales del paratopo y encontraron que la energía promedio de las interacciones hidrófobas (ΔG) del anticuerpo estaban correlacionadas con la convergencia en el reconocimiento del anticuerpo ($P=0,0427$) (Fig. 19A) (31). De esta manera, aunque se requiere un enlace de H preciso para este modo de reconocimiento (Fig. 18C), la convergencia en la estructura parece optimizar regiones con interacciones hidrófobas. Otra importante característica de este modo de reconocimiento es su capacidad de centrarse precisamente sobre el sitio inicial de unión al receptor de CD4 (19, 32). De hecho, la amplitud de la neutralización de VIH-1 entre ligandos del sitio de unión a CD4 estaba correlacionada con el direccionamiento sobre este sitio ($P=0,0405$) (Fig. 19B).

Esta convergencia en el reconocimiento del epítipo se acompañó por una divergencia en la identidad de la secuencia del anticuerpo (Figs. 17C y 19C). Los diez anticuerpos aislados por la unión de RSC3 utilizan la línea germinal IGH V1-2*02 y acumulan 70-90 cambios de nucleótidos. A pesar de esta similitud en el epítipo reconocido por estos anticuerpos maduros, solo dos restos de la línea germinal del alelo IGHV1-2*02 maduran en los mismos aminoácidos (FIG. 17C). Ambos de estos cambios se producen en un contacto hidrófobo en la región de la CDR H2 crítica (56: Gly → Ala y 57: Thr → Val). Las cadenas ligeras de los anticuerpos donantes 45 y 74 surgen de cualquier IGHVκ3-11*01 o IGHVκ3-20*01, mientras que las cadenas ligeras de los anticuerpos donantes 0219 se derivan de IGHVκ1-33*01. Para estas cadenas ligeras, ningún cambio madurativo es idéntico. A pesar de esta diversidad en la maduración, la comparación de los paratopos VRC01, VRC03, y VRC-PG04 muestra que muchos de estos cambios son de carácter químico conservado (FIG. 19C); se preservó, por ejemplo, un parche hidrófobo en la CDR L3. Estas observaciones sugieren que cambios de aminoácidos divergentes entre anticuerpos análogos a VRC01 dan como resultado, sin

embargo, un reconocimiento convergente cuando se guían mediante maduración por afinidad.

Complementación funcional de las cadenas pesada y ligera entre anticuerpos análogos a VRC01.

Aunque la identificación y la clasificación de linfocitos B específicos de antígenos con sondas resurgidas han dado como resultado el aislamiento de algunos anticuerpos con amplia capacidad neutralizante, el análisis genómico de bibliotecas de ADNc de linfocitos B proporciona miles de secuencias para el análisis. Estas secuencias especifican el 'antibodioma', el repertorio de secuencias de la cadena pesada y la cadena ligera del anticuerpo expresado en cada individuo. Los procedimientos de secuenciación de alto rendimiento proporcionan secuencias de la cadena pesada y la cadena ligera, pero no retienen información acerca de los emparejamientos. Para los anticuerpos análogos a VRC01, la convergencia estructural desvelada por el análisis cristalográfico indicó una solución potencial: las diferentes cadenas pesadas y ligeras deberían conseguir la complementación funcional con esta familia de anticuerpos.

Quimeras de la cadena pesada y la cadena ligera de VRC01, VRC03, VRC-PG04 y VRC-CH31 se produjeron mediante transfección transitoria y se ensayaron para la neutralización del VIH-1. Las cadenas ligeras VRC01 (donante 45) y VRC-PG04 (donante 74) fueron funcionalmente compatibles con las cadenas pesadas de VRC01, VRC03 y VRC-PG04, aunque la cadena ligera de VRC03 solamente fue compatible con la cadena pesada de VRC03 (Fig. 20A). De manera similar, a pesar de ~50 % de diferencias en la identidad de la secuencia, las cadenas pesada y ligera de VRC-CH31 (donante 0219) fueron capaces de complementar funcionalmente la mayoría de los otros anticuerpos (Fig. 20A).

Identificación de anticuerpos análogos a VRC01 mediante secuenciación en profundidad de los donantes 45 y 74.

Para estudiar el repertorio de anticuerpos en estos individuos, los solicitantes llevaron a cabo la secuenciación en profundidad del ADN procedente de la PBMC del donante 45 (33). Como las regiones variables de las cadenas pesada y ligera tienen aproximadamente 400 nucleótidos de longitud, se utilizaron 454 procedimientos de pirosecuenciación, que permitieron leer longitudes de 500 nucleótidos, para la secuenciación en profundidad. Los solicitantes evaluaron en primer lugar las secuencias de la cadena pesada de una muestra de una muestra de PBMC de 2008 procedente del donante 45, el mismo punto temporal a partir del cual se aislaron anticuerpos VRC01, VRC02, y VRC03 mediante el sondeo de RSC3 de la población de linfocitos B con memoria (18). Se utilizó el ARNm de 5 millones de PBMC como el molde para la PCR para amplificar preferentemente los genes de la IgG e IgM de la familia IGHV1. La pirosecuenciación de 454 proporcionó 221.104 secuencias de las cuales 33.386 codificaban los dominios variables de la cadena pesada que abarcaron la región V(D)J completa (Apéndice 1). Para clasificar la información de la secuencia de la cadena pesada del donante 45, los solicitantes seleccionaron características concretas de las cadenas pesadas de VRC01 y VRC03 como filtros: (i) identidad de la secuencia, (ii) origen del alelo del gen IGVH, y (iii) divergencia de la secuencia de la línea germinal del gen IGVH como resultado de la maduración por afinidad (Fig. 20B). Específicamente, los solicitantes dividieron las secuencias por el origen alélico IGHV1-2*02 (4.597 secuencias) y origen no de IGHV1-2*02 (28.789 secuencias), y analizaron la divergencia de los genes de la línea germinal inferida, y la identidad de la secuencia con los anticuerpos VRC01 y VRC03 del molde (Fig. 20B). De manera interesante, no se encontró una identidad de secuencias mayor del 75 % con la cadena pesada de VRC01 o VRC02 (Fig. 20B), aunque se encontraron más de 109 secuencias de más de un 90 % de identidad de la secuencia con VRC03 y todas eran de origen IGHV1-2*02. Estas secuencias de la cadena pesada formaron una agrupación bien segregada sobre una gráfica de contorno (Fig. 20B, panel intermedio superior). Los solicitantes evaluaron a continuación la función biológica de dos secuencias de cadena pesada seleccionadas aleatoriamente procedentes de esta agrupación. Se prepararon anticuerpos quiméricos emparejando cada una de las dos secuencias de la cadena pesada con la cadena ligera de VRC03. En ambos casos, se observó una potente neutralización, con una neutralización similar al anticuerpo VRC03 original (FIG. 20E) (34).

Se llevó a cabo un análisis similar por secuenciación en profundidad de la cadena pesada con las PBMC del donante 74 procedente del mismo punto temporal de 2008 a partir del cual se aislaron VRC-PG04 y VRC-PG04B. En el análisis inicial, a pesar de obtener 263.764 secuencias, de las cuales 85.851 abarcaron las regiones V(D)J completas de la cadena pesada y 93.112 fueron únicas, no se encontraron secuencias que tuvieran más de un 75 % de identidad de nucleótidos con VRC-PG04. Como el número de ARNm de cadenas pesadas únicas presente en la muestra de PBMC era probablemente mucho más grande que el número de secuencias únicas obtenido en el análisis inicial, los solicitantes repitieron la secuenciación en profundidad de esta muestra con un número aumentado de lecturas de la pirosecuenciación de 454 y con protocolos que optimizaron la longitud de la lectura. En este análisis, se descubrió que 110.386 secuencias de origen IGHV1-2*02 y 606.047 secuencias de origen no de IGHV1-2*02 abarcaban la región V(D)J de la cadena pesada, un aumento de 10 veces en la profundidad de la secuenciación. Entre estas secuencias, 4.920 presentaron más de un 75 % de identidad de nucleótidos con VRC-PG04 (Fig. 20B). Las secuencias de la cadena pesada del origen alélico IGHV1-2*02 se segregaron en varias agrupaciones, una a una divergencia de ~25 % y una identidad de ~85 con la cadena pesada de VRC-PG04, y varias a una divergencia del 25-35 % y una identidad del 65 %, 85 %, y 95 % con VRC-PG04 (FIG. 20B, panel superior derecho). Para evaluar la función biológica de estas numerosas secuencias de la cadena pesada identificadas mediante el procedimiento 454, Los solicitantes seleccionaron 56 secuencias representativas procedentes del cuadrante definido por una alta divergencia (16-38 %) y una elevada similitud de secuencias (60-100 %) con VRC-PG04. Las 56 secuencias se sintetizaron y expresaron con la cadena ligera de VRC-PG04. De forma notable, muchos de estos anticuerpos presentaron una potente neutralización de VIH-1 (35), confirmando que eran cadenas pesadas funcionales análogas a VRC-PG04 (FIG. 20E).

Los solicitantes llevaron a cabo a continuación un análisis similar de la cadena ligera del anticuerpo. Como VRC01-03 y VRC-PG04 derivan de los alelos IGkV3, los solicitantes usaron cebadores diseñados para amplificar la familia de genes IGkV3. Los solicitantes seleccionaron un donante 45 en el punto temporal del 2001 para maximizar la probabilidad de obtener secuencias de la cadena ligera capaces de complementación funcional (36). Se determinaron un total de 305.475 secuencias de las cuales 87.658 secuencias abarcaban la región V-J de la cadena ligera (Apéndice 4). Para clasificar las secuencias de la cadena ligera del donante 45 en subconjuntos útiles, los solicitantes seleccionaron de nuevo características biológicamente específicas: Una delección de 2 aminoácidos distintivos en CDR L1 y maduración por alta afinidad (17 % y 19 % para VRC01 y VRC-PG04, respectivamente). Se identificaron dos de dichas secuencias con ~90 % de identidad de la secuencia con las cadenas ligeras VRC01 y VRC03, respectivamente (Fig. 20C). Los solicitantes evaluaron la función biológica de estas dos cadenas ligeras tras la síntesis y expresión en combinación con las cadenas pesadas de VRC01, VRC03, y VRC-PG04. Cuando se emparejaron con su respectiva cadena pesada natural correspondiente para producir una IgG completa, Ambos anticuerpos quiméricos presentaron actividades de neutralización similares a las del anticuerpo natural (Fig. 20D).

Similitudes de maduración de anticuerpos análogos a VRC01 en diferentes donantes desveladas por herramientas filogenéticas. La convergencia estructural en el reconocimiento de gp120 y la complementación funcional entre anticuerpos análogos a VRC01 de diferentes donantes sugirió similitudes en sus procedimientos de maduración. De esta forma, los solicitantes utilizaron herramientas filogenéticas bien establecidas para evaluar la relación evolutiva entre secuencias derivadas del gen de la misma línea germinal precursora (36). Los solicitantes teorizaron que, si se añadían las secuencias análogas a VRC01 conocidas de un donante al análisis de secuencias de otro donante, el análisis 'filogenético de donantes cruzados' resultante puede desvelar similitudes en las rutas de maduración de los anticuerpos. Específicamente, con dicho análisis, podría esperarse que las secuencias exógenas se interpusieran entre las ramas del dendograma que contienen anticuerpos análogos a VRC01 procedentes del conjunto completo de anticuerpos del donante original. Los solicitantes llevaron a cabo el análisis con cadenas pesadas, ya que todos los anticuerpos análogos a VRC01 identificados con sonda derivaban del alelo IGHV1-2*02 de la misma cadena pesada. Los solicitantes añadieron VRC-PG04 y 4b derivados del donante 74 y las secuencias de la cadena pesada de VRC-CH30-32 derivadas de 0219 con las secuencias de la cadena pesada del donante 45 del origen genómico IGHV1-2*02 y construyeron un árbol enraizado en el antecesor de la línea germinal no mutada de la VRC01 prevista (18). Este análisis desveló que las secuencias con elevada identidad con VRC03 se agrupaban en un subárbol con un nodo común que era también el progenitor de las secuencias de la cadena pesada análoga a VRC01 del donante 74 y el donante 0219 (Fig. 21 A, izquierda). Se mostró que dos secuencias del donante 45 seleccionadas al azar procedentes del subárbol derivado de este nodo común neutralizaban VIH-1, mientras que 11 secuencias de la cadena pesada del exterior de este nodo no lo neutralizan ($P < 0,0001$).

Los solicitantes evaluaron también las secuencias de la cadena pesada IGHV1-2*02 derivadas del donante 74 incluyendo anticuerpos análogos a VRC01 identificados mediante sonda procedentes del donante 45 y del donante 0219 en el análisis filogenético de donantes cruzados. En el árbol enraizado en el antecesor de la línea germinal no mutada de VRC-PG04 prevista, se segregaron 5.047 secuencias comprendidas en el subárbol identificado con el donante 45 y el donante 0219 (Fig. 21A, derecha). Este subárbol incluyó el VRC-PG04 real y las secuencias de la cadena pesada 04b, 4.693 de secuencias con una identidad >85 % con VRC-PG04, y algunos cientos de secuencias con identidades tan bajas con 68 % con VRC-PG04. Para ensayar la actividad funcional de las secuencias de la cadena pesada identificadas por este análisis, Los solicitantes evaluaron en primer lugar la localización en el árbol de las 56 secuencias de la cadena pesada que se identificaron y se expresaron a partir de la rejilla de identidad/divergencia anteriormente descrita (Fig. 22A). A estas 56 secuencias, los solicitantes añadieron 7 secuencias adicionales procedentes de árbol del donante 74 y 7 secuencias no de IGHV1-2*02 para potenciar la cubierta de las secuencias segregadas por el donante cruzado (Fig. 22B). Estas 70 secuencias se sintetizaron y expresaron con la cadena ligera de VRC-PG04 (Fig. 22C). Entre estas 70 secuencias de cadena pesada sintetizadas, 25 no se expresaron. De los restantes 45 anticuerpos reconstituidos, 24 fueron capaces de neutralizar VIH-1 (Fig. 22B). De forma notable, todas las secuencias con actividad neutralizante se segregaron en el subárbol identificado por los anticuerpos análogos a VRC01 del donante 45 y el donante 0219 añadidos exógenamente (valor $P=0,0067$) (Fig. 22D).

Los solicitantes aplicaron también este procedimiento de segregación de donantes cruzados a las cadenas ligeras del conjunto completo de anticuerpos del donante 45. Las cadenas ligeras de los donantes 74 y 0219 no se segregan con las cadenas ligeras análogas a VRC01 conocidas procedentes del donante 45, probablemente porque estas tres cadenas ligeras no surgen de las mismas secuencias inferidas de la línea germinal. Esta diferencia puede reflejar también las disimilitudes en la maduración focalizada de las dos cadenas (véase la Fig. 19A): en la cadena pesada, la maduración focalizada se produce en la región CDR H2 (abarcada únicamente en el gen V_H de IGHV1-2*02 a partir del cual derivan todas las cadenas pesadas análogas a VRC01) y, en la cadena ligera, las presiones de selección se producen en la región CDR L3 (que es un producto de diferentes tipos de recombinación V-J).

Análisis del linaje CDR H3. Las 37 secuencias de la cadena pesada que se segregaron en el subárbol con capacidad neutralizante de VRC01 y se expresaron cuando se reconstituyeron con la cadena ligera de VRC-PG04 se pudieron agrupar en 9 clases de CDR H3 (Fig. 22B), conteniendo las secuencias en cada clase no más de 5 diferencias de nucleótidos en CDR H3 de otras secuencias en la misma clase. Un análisis detallado de la vinculación entre los orígenes de la recombinación V(D)J de estas clases sugirió que 8 de las 9 clases surgen por acontecimientos de recombinación diferentes; dos de las clases (7 y 8) difirieron principalmente en una única inserción/delección de tres

restos, Arg-Tyr-Ser, y pueden haber surgido de un único acontecimiento de recombinación V(D)J. Tres de estas clases (CDR H3-1, 2, y 9) se representaban solamente por anticuerpos sin actividad neutralizante, tres por un único anticuerpo con actividad neutralizante (CDR H3-4, 5 y 6 del estudio), y tres por mezclas de anticuerpos con actividad neutralizante y sin actividad neutralizante (CDR H3-3, 7 y 8) (38). Aunque no resultó claro si las secuencias de cadena pesada sin actividad neutralizante carecían verdaderamente de función de neutralización o si este fenotipo era debido a incompatibilidades en el emparejamiento de cadenas ligeras, los solicitantes seleccionaron analizar las clases CDR H3 solo para aquellas en las que se había confirmado la neutralización.

Los solicitantes analizaron además las secuencias de la cadena pesada IGHV1-2*02 del donante 74 para proporcionar una visión general de la diversidad de CDR H3 con respecto a la identidad y divergencia de la secuencia (Fig. 22E) y para identificar aquellas con secuencias CDR H3 idénticas a las CDR H3 en cada una de las clases con actividad neutralizante. Este análisis identificó cuatro linajes clonales (CDR H3-clases 3, 6, 7 y 8 del estudio), con secuencias que se extendían al 15 % o menos de maduración por afinidad. La clase 7 de CDR H3 incluía los anticuerpos identificados con sonda, VRC-PG04 y 04b (FIG. 22B). En cada caso, una acumulación estacionaria de cambios en las regiones marco y CDR condujo a una creciente actividad de neutralización (39), y cambios en las posiciones 48, 52, 58, 69, 74, 82 y 94 en el gen V, entre otros, parecieron seleccionarse en varios linajes. En su conjunto, más de 1.500 secuencias únicas se pudieron clasificar en estos cuatro linajes de CDR H3. Aunque estos linajes de CDR H3 se infirieron a partir de un único punto temporal, proporcionan igualmente una visión de las rutas de maduración específicas por las cuales las cadenas pesadas de anticuerpos análogos a VRC01 evolucionan a partir de un anticuerpo recombinante no mutado inicial hasta un anticuerpo con amplia capacidad neutralizante.

Análisis de la cadena J y complejidades de maduración. Entre las secuencias análogas a VRC01 de la cadena pesada identificador en donantes 45 y 74, se observó una significativa desviación de la utilización de la cadena J (Fig. 21 A): en el donante 45, aproximadamente el 87 % de las secuencias segregadas por donantes cruzados utilizan el alelo IGHJ1*01, y en el donante 74, un 99 % de las secuencias segregadas utilizan el alelo IGHJ2*01. Esta utilización preferente de la cadena J pesada no parece ser un requerimiento para la especificidad de la unión; de hecho, el uso del alelo J1 en VRC01, el alelo J2 en VRC-PG04, y el alelo J4 en VRC-CF131 proporciona ejemplos de la compatibilidad funcional de al menos tres alelos IGHJ diferentes en los anticuerpos análogos a VRC01. Además del uso preferente de la cadena J, podrían inferirse otras complejidades del procedimiento de maduración a partir de similitudes en los genes de la cadena pesada madura y diferencias en la secuencia CDR H3. En ausencia de información sobre el emparejamiento natural de las cadenas pesada y ligera, los procedimientos de maduración de anticuerpos sobre los que subyacen estas complejidades son difíciles de inferir. Sin embargo, los datos de secuenciación en profundidad, con miles de intermedios de maduración definidos por CDR H3, que proporcionan suficiente información para sugerir que el procedimiento de maduración puede implicar la revisión de la cadena pesada u otros mecanismos de diversificación de linfocitos B (40, 41).

Genómica de anticuerpos, inmunidad de VIH-1 e implicaciones de la vacuna. La maduración por afinidad que se centra en desarrollar un anticuerpo en un sitio conservado de vulnerabilidad de VIH-1 proporciona un mecanismo para conseguir un amplio reconocimiento de VIH-1 gp120. Dicha evolución focalizada puede ser común a anticuerpos con un amplio poder neutralizante que tienen éxito en superar la evasión inmunitaria que protege VIH-1 gp120 del reconocimiento humoral; las múltiples capas de evasión pueden limitar o focalizar el desarrollo de anticuerpos nascentes a rutas concretas durante la maduración.

El enfoque genómico basado en estructura descrito proporciona herramientas para comprender la maduración del anticuerpo. Los solicitantes muestran cómo se puede utilizar la secuenciación en profundidad para determinar el repertorio de familias específicas de secuencias de la cadena pesada y ligera en individuos infectado con VIH-1. Estos antibodiomas parciales se pueden interrogar posteriormente según propiedades inusuales de la secuencia, o en la maduración, para identificar anticuerpos para caracterización funcional. Los solicitantes demuestran tres medios de cribar una gran base de datos de secuencias de anticuerpos: 1) por identidad con una secuencia de un mA b conocido y por divergencia de una presunta línea germinal (análisis de rejilla de identidad/divergencia), 2) por el análisis filogenético de donantes cruzados de las relaciones de las rutas de maduración, y 3) por el análisis del linaje CDR H3. Estos tres medios de cribado se pueden aplicar de forma iterativa o combinada (Fig. 22). Un aspecto importante de los análisis de los solicitantes era la caracterización funcional de las secuencias seleccionadas conseguido a través de la expresión y la reconstitución con cadenas pesadas o ligeras análogas a VRC01, aunque son posibles otros medios de emparejamiento tales como mediante el análisis de frecuencias (42). Aunque se ha evaluado la neutralización en menos de 100 anticuerpos reconstituidos, los miles de secuencias de cadenas pesadas y cadenas ligeras identificadas proporcionan un gran conjunto de datos para el análisis, que debe potenciar la comprensión de los solicitantes de las características críticas de los anticuerpos análogos a VRC01. Por ejemplo, la correlación de la variación de la secuencia en posiciones concretas con la neutralización debe proporcionar una visión de la diversidad permitida y de los elementos requeridos de neutralización de esta familia de anticuerpos.

La secuenciación en profundidad y las metodologías bioinformáticas estructurales presentadas aquí facilitan el análisis del antibodioma. Esta tecnología genómica permite la interrogación de las respuestas del anticuerpo procedente de donantes infectados, individuos sin infectar, o incluso receptores de vacunas y tiene diversas implicaciones. Por ejemplo, un análisis enraizado genómico del conjunto completo de anticuerpos VRC01 con herramientas filogenéticas normalizadas puede desvelar la ruta general de maduración de los linfocitos B para la producción de anticuerpos análogos a VRC01. De hecho, el análisis filogenético de donantes cruzados (Fig. 21B) sugiere que los intermedios de

maduración comunes con 20-30 cambios de maduración por afinidad procedentes del precursor genómico IGHV1-2*02 se encuentran en diferentes individuos. Estos intermedios proporcionan anticuerpos análogos a VRC01 con amplia capacidad neutralizante, que tienen aproximadamente 70-90 cambios procedentes de precursor IGHV1-2*02 (Fig. 21B). Si los gp120 modificados con afinidad por los intermedios de maduración representados por los nodos del árbol se estimularan la fabricación de estos intermedios, entonces el análisis presentado aquí podría ayudar a guiar la activación inducida por la vacuna de anticuerpos análogos a VRC01. La secuenciación profunda no solo proporciona un procedimiento para identificar dichos intermedios, sino también un medio para facilitar su detección. En su conjunto, la aplicación de las tecnologías genómicas al análisis de anticuerpos facilita a la vez una retroalimentación muy sensible y una oportunidad sin precedentes para comprender la respuesta del antibodioma a la infección y la vacunación.

Referencias y notas de este Ejemplo:

1. D. R. Burton y col., HIV vaccine design and the neutralizing antibody problem. *Nat Immunol* 5, 233-236 (2004).
2. R. Pantophlet, D. R. Burton, GP120: target for neutralizing HIV-1 antibodies. *Annu Rev Immunol* 24, 739-769 (2006).
3. P. D. Kwong y col., HIV-1 evades antibody-mediated neutralization through conformational masking of receptor binding sites. *Nature* 420, 678-682 (2002).
4. L. Stamatatos, L. Morris, D. R. Burton, J. R. Mascola, Neutralizing antibodies generated during natural HIV-1 infection: good news for an HIV-1 vaccine? *Nat Med* 15, 866-870 (2009).
5. D. N. Sather y col., Factors associated with the development of cross-reactive neutralizing antibodies during human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol* 83, 757-769 (2009).
6. M. D. Simek y col., Human immunodeficiency virus type 1 elite neutralizers: individuals with broad and potent neutralizing activity identified by using a high-throughput neutralization assay together with an analytical selection algorithm. *J Virol* 83, 7337-7348 (2009).
7. N. A. Doria-Rose y col., Breadth of human immunodeficiency virus-specific neutralizing activity in sera: clustering analysis and association with clinical variables. *J Virol* 84, 1631-1636 (2010).
8. S. Gnanakaran y col., Genetic signatures in the envelope glycoproteins of HIV-1 that associate with broadly neutralizing antibodies. *PLoS Comput Biol* 6, e1000955 (2010).
9. E. S. Gray y col., Antibody specificities associated with neutralization breadth in plasma from human immunodeficiency virus type 1 subtype C-infected blood donors. *J Virol* 83, 8925-8937 (2009).
10. T. Muster y col., A conserved neutralizing epitope on gp41 of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 67, 6642-6647 (1993).
11. M. B. Zwick y col., Broadly neutralizing antibodies targeted to the membrane-proximal external region of human immunodeficiency virus type 1 glycoprotein gp41. *J Virol* 75, 10892-10905 (2001).
12. L. M. Walker y col., Broad and potent neutralizing antibodies from an African donor reveal a new HIV-1 vaccine target. *Science* 326, 285-289 (2009).
13. M. Bonsignori y col., Immunoregulation of HIV-1 broadly neutralizing antibody responses: deciphering maturation paths for antibody induction. *AIDS Res Hum Retroviruses* 26, A153 (2010).
14. A. Trkola y col., Human monoclonal antibody 2G12 defines a distinctive neutralization epitope on the gp120 glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 70, 1100-1108. (1996).
15. L. M. Walker, y col., High through-put functional screening of activated B cells from 4 African elite neutralizers yields a panel of novel broadly neutralizing antibodies. *AIDS Res Hum Retroviruses* 26, A32 (2010).
16. D. R. Burton y col., Efficient neutralization of primary isolates of HIV-1 by a recombinant human monoclonal antibody. *Science* 266, 1024-1027 (1994).
17. D. Corti y col., Analysis of memory B cell responses and isolation of novel monoclonal antibodies with neutralizing breadth from HIV-1-infected individuals. *PLoS One* 5, e8805 (2010).
18. X. Wu y col., Rational design of envelope identifies broadly neutralizing human monoclonal antibodies to HIV-1 *Science* 329, 856-861 (2010).
19. T. Zhou y col., Structural basis for broad and potent neutralization of HIV-1 by antibody VRC01. *Science* 329, 811-817 (2010).
20. J. Wrammert y col., Broadly cross-reactive antibodies dominate the human B cell response against 2009 pandemic H1N1 influenza virus infection. *J Exp Med* 208, 181-193 (2011).
21. M. Huber y col., Very few substitutions in a germ line antibody are required to initiate significant domain exchange. *J Virol* 84, 10700-10707 (2010).
22. X. Xiao y col., Germline-like predecessors of broadly neutralizing antibodies lack measurable binding to HIV-1 envelope glycoproteins: implications for evasion of immune responses and design of vaccine immunogens. *Biochem Biophys Res Commun* 390, 404-409 (2009).
23. Materials and Methods are available as Supporting Material on Science Online.
24. J. F. Scheid y col., Broad diversity of neutralizing antibodies isolated from memory B cells in HIV-infected individuals. *Nature* 458, 636-640 (2009).
25. R. A. Lerner, Rare antibodies from combinatorial libraries suggests an S.O.S. component of the human immunological repertoire. *Mol Biosyst* 7, 1004-1012 (2011).
26. C. C. Huang y col., Structural basis of tyrosine sulfation and VH-gene usage in antibodies that recognize the HIV type 1 coreceptor-binding site on gp120. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 2706-2711 (2004).
27. C. Sabin y col., Crystal structure and size-dependent neutralization properties of HK20, a human monoclonal

antibody binding to the highly conserved heptad repeat 1 of gp41. *PLoS Pathog* 6, e1001195 (2010).

28. F. Breden y col., Comparison of antibody repertoires produced by HIV-1 infection, other chronic and acute infections, and systemic autoimmune disease. *PLoS One* 6, e16857 (2011).

29. M. K. Gorny y col., Preferential use of the VH5-51 gene segment by the human immune response to code for antibodies against the V3 domain of HIV-1. *Mol Immunol* 46, 917-926 (2009).

30. L. Chen y col., Structural basis of immune evasion at the site of CD4 attachment on HIV-1 gp120. *Science* 326, 1123-1127 (2009).

31. Significant correlations were observed between rmsd of VRCOI-like antibody interaction with gp120 and size of CDR interaction but not of surface area in general.

32. T. Zhou y col., Structural definition of a conserved neutralization epitope on HIV-1 gp120. *Nature* 445, 732-737 (2007).

33. El ARNm se extrajo de 20 millones de PBMC, se transcribió de forma inversa con el oligo (dT)12-18, y un cuarto del ADNc resultante (equivalente a la transcripción de 5 millones de PBMC) se usó como molde de PCR para amplificar preferentemente la familia del gen IGHV1 a partir de células que expresaban tanto IgG como IgM. Los productos de la PCR se purificaron en gel y se analizaron mediante pirosecuenciación de 454.

34. Los solicitantes evaluaron también secuencias derivadas de 454 para la compatibilidad estructural con VRC01, VRC03, y las estructuras cristalinas del complejo VRC-PG04 gp120 utilizando un algoritmo de formación de hebra que evaluó la compatibilidad estructural utilizando el potencial estadístico DFIRE (43). Ninguna de las diez secuencias con puntuaciones DFIRE óptimas, ni aquellas con una elevada divergencia en la línea germinal de origen genómico no de IGHV1-2*02 presentó neutralización cuando se reconstituyó con la cadena ligera de VRC01 (Fig. 20E). De esta manera, la similitud de la secuencia, el origen de IGHV1-2*02, y la divergencia se correlacionan todos con el potencial de neutralización, pero otros factores tales como la compatibilidad estructural prevista fracasaron en identificar los anticuerpos análogos a VRC01.

35. Seis de los anticuerpos reconstituidos muestran un valor medio de la CI_{50} de $\sim 0,1$ $\mu\text{g/ml}$, un nivel de potencia similar al observado con los anticuerpos originales VRC-PG04 identificados mediante sonda.

36. VRC03L no se complementa bien con otras cadenas pesadas; 2) VRC03 H se encontró rápidamente entre las secuencias del donante 45 2008; 3) VRC01 y VRC02 H no se encontraron entre las secuencias del donante 45 2008; 4) VRC01-03 se aislaron de la población de linfocitos B con memoria. Los resultados 1-4 sugieren que VRC03 procede de VRC01; Los solicitantes seleccionaron, por tanto, un punto temporal anterior a 2008 para maximizar la probabilidad de obtener cadenas ligeras que permitieran la complementación funcional con cadenas pesadas VRC01 conocidas.

37. Aunque el análisis filogenético se usa frecuentemente para estudiar la evolución de una familia de secuencias y para comprender las relaciones entre secuencias antecesoras y sus descendientes, los solicitantes apreciaron que existen varios aspectos únicos de la evolución de anticuerpos. Debido a la naturaleza de la actividad de la citidina desaminasa (AID) inducida por activación, los anticuerpos acumulan mutaciones en los puntos calientes (CDR) y, por tanto, no se producen de manera aleatoria en todo el genoma del anticuerpo. También, el procedimiento de recombinación de VDJ introduce inserciones y deleciones de nucleótidos que alteran la secuencia de la línea germinal de ADN. El objetivo de los inventores en el presente documento era elucidar la ontogenia de las secuencias de anticuerpos recombinadas para identificar secuencias intermedias relacionadas con los anticuerpos con actividad neutralizante maduros. Por tanto, los solicitantes usaron algoritmos establecidos de máxima probabilidad filogenética para analizar los datos de la secuencia del anticuerpo y para construir árboles enraizados en secuencias de anticuerpos derivados de un antecesor común (es decir, misma línea germinal VH).

38. Algunas de las secuencias de la cadena pesada sin actividad neutralizante mostradas en la distribución de CDR H3 de la Fig. 22 son probablemente el resultado del cambio de molde de la PCR. La única cadena pesada representada gráficamente en el gráfico de contornos de las clases 1 de CDR H3 contiene un único CDR H3, pero con un gen V que presenta una elevada similitud con las secuencias de la clase 3. La misma observación se realiza para las dos secuencias del gráfico de contornos de la clase 2. También, la secuencia fuertemente divergente (y externa) del gráfico de distribución de la clase 9 de CDR H3 contiene el mismo CDR H3 que las otras 9 secuencias de la clase 140, pero con un gen V que se acerca mucho a las secuencias encontradas en la clase 8. Como solamente unas pocas de más de 1.500 secuencias únicas identificadas mediante el análisis de CDR H3 mostraron genes V similares, y todas ellas aparecen como doblemente externas, el cambio de molde puede suceder, pero es raro. Esta rareza también se sugiere por el análisis de 606.047 no de IGHV1-2*02 del donante 74 para secuencias de CDR H3 identificadas en la Fig. 22B, que localiza menos de 100 secuencias, de las que la mayoría corresponde a la agrupación probablemente asignada de forma incorrecta a la secuencia no de IGHV1-2*02 del donante 45 de la Fig. 20, como se describe en la notl (44).

39. Una acumulación similar de mutaciones somáticas se mostró (45) con los anticuerpos de amplio poder neutralizante PG9 y PG16 que se correlaciona con un aumento en la amplitud de la neutralización y en la potencia.

40. D. Nemazee, M. Weigert, Revising B cell receptors. *J Exp Med* 191, 1813-1817 (2000).

41. E. Edry, D. Melamed, Receptor editing in positive and negative selection of B lymphopoiesis. *J Immunol* 173, 4265-4271 (2004).

42. J. Glanville y col., Precise determination of the diversity of a combinatorial antibody library gives insight into the human immunoglobulin repertoire. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 20216-20221 (2009).

43. H. Zhou, Y. Zhou, Distance-scaled, finite ideal-gas reference state improves structure-derived potentials of mean force for structure selection and stability prediction. *Protein Sci* 11, 2714-2726 (2002).

44. El pico a una divergencia de ~ 25 % de IGHV1-2*02 y una identidad del 88 % también se observó en la gráfica de secuencias para las secuencias no de origen IGHV1-2*02. Los análisis de donante cruzado y CDR H3 muestran

que estas secuencias no derivadas de IGHV1-2*02 se segregan de los anticuerpos de tipo VRC01 en los dendogramas y tienen CDR H3 que son idénticas a los anticuerpos de tipo VRC01 confirmados, lo que indica que las secuencias no incluidas en la agrupación IGHV1-2*02 estén probablemente incorrectamente asignadas y sean realmente de origen IGHV1-2*02.

- 5 45. M. Pancera y col., Crystal structure of PG16 and chimeric dissection with somatically related PG9: structure-function analysis of two quaternary-specific antibodies that effectively neutralize HIV-1. *J Virol* 84,8098-8110 (2010).
46. E. A. Kabat, T. T. Wu, K. S. Gottesman, C. Foeller, Sequences of Proteins of Immunological Interest. 5ª Edición (1991).
- 10 47. E. Krissinel, K. Henrick, Inference of macromolecular assemblies from crystalline state. *J Mol Biol* 372, 774-797 (2007).
48. Y. Li y col., Broad HIV-1 neutralization mediated by CD4-binding site antibodies. *Nat Med* 13,1032-1034 (2007).
- 15 49. L. M. Walker y col., A limited number of antibody specificities mediate broad and potent serum neutralization in selected HIV-1 infected individuals. *PLoS Pathog* 6 (2010).
50. Y. Li y col., Analysis of neutralization specificities in polyclonal sera derived from human immunodeficiency virus type 1-infected individuals. *J Virol* 83, 1045-1059 (2009).
51. D. H. Barouch, G. J. Nabel, Adenovirus vector-based vaccines for human immunodeficiency virus type 1. *Hum Gene Ther* 16, 149-156 (2005).
- 20 52. T. Tiller y col., Efficient generation of monoclonal antibodies from single human B cells by single cell RT-PCR and expression vector cloning. *J Immunol Methods* 329, 112-124 (2008).
53. M. M. Souto-Carneiro, N. S. Longo, D. E. Russ, H. W. Sun, P. E. Lipsky, Characterization of the human Ig heavy chain antigen binding complementarity determining region 3 using a newly developed software algorithm, JOIN-SOLVER. *J Immunol* 172, 6790-6802 (2004).
- 25 54. X. Brochet, M. P. Lefranc, V. Giudicelli, IMGTA/QUEST: the highly customized and integrated system for IG and TR standardized V-J and V-D-J sequence analysis. *Nucleic Acids Res* 36, W503-508 (2008).
55. S. Malcolm y col., Localization of Human Immunoglobulin κ Light Chain Variable Region Genes to the ShortArm of Chromosome 2 by in situ Hybridization. *Proc Natl Acad Sci USA* 79, 4957-4961 (1982).
- 30 56. M. Li y col., Human Immunodeficiency Virus Type 1 env Clones from Acute and Early Subtype B Infections for Standardized Assessments of Vaccine-Elicited Neutralizing Antibodies. *J Virol* 79, 10108-10125 (2005).
57. M. S. Seaman y col., Tiered categorization of a diverse panel of HIV-1 Env pseudoviruses for neutralizing antibody assessment. *J Virol* 84, 1439-1452 (2010).
58. X. Wu y col., Mechanism of human immunodeficiency virus type 1 resistance to monoclonal antibody B12 that effectively targets the site of CD4 attachment. *J Virol* 83, 10892-10907 (2009).
- 35 59. R. C. Edgar, MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. *BMC Bioinformatics* 5, 113 (2004).
60. R. C. Edgar, MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *NucleicAcids Res* 32, 1792-1797 (2004).
61. D. T. Jones, W. R. Taylor, J. M. Thornton, The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. *ComputAppl Biosci* 8, 275-282 (1992).
- 40 62. M. K. Kuhner, J. Felsenstein, A simulation comparison of phytogeny algorithms under equal and unequal evolutionary rates. *Mol Biol Evol* 11,459-468 (1994).
63. D. H. Huson y col., Dendroscope: An interactive viewer for large phylogenetic trees. *BMC Bioinformatics* 8,460 (2007).
- 45 64. Z. Otwinowski, W. Minor, Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. *Methods in Enzymology* 276, 307-326 (1997).
65. A. J. McCoy y col., Phaser crystallographic software. *J Appl Crystallogr* 40, 658-674 (2007).
66. N. Collaborative Computational Project, The CCP4 suite: programs for protein crystallography. *Acta Crystallographica Section D* 50, 760-763 (1994).
- 50 67. P. D. Adams y col., PHENIX: building new software for automated crystallographic structure determination. *Acta Crystallographica Section D* 58, 1948-1954 (2002).
68. D. E. McRee, Xta1View/Xfit-A versatile program for manipulating atomic coordinates and electron density. *J Struct Biol* 125, 156-165 (1999).
69. P. Emsley, K. Cowtan, Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallographica Section D* 60, 2126-2132 (2004).
- 55 70. I. W. Davis y col., MolProbity: all-atom contacts and structure validation for proteins and nucleic acids. *Nucleic Acids Res* 35, W375-383 (2007).
71. T. Lutteke, C. W. von der Lieth, pdb-care (PDB carbohydrate residue check): a program to support annotation of complex carbohydrate structures in PDB files. *BMC Bioinformatics* 5, 69 (2004).
- 60 72. A. Nicholls, K. A. Sharp, B. Honig, Protein folding and association: insights from the interfacial and thermodynamic properties of hydrocarbons. *Proteins* 11,281-296 (1991).
73. N. A. Baker, D. Sept, S. Joseph, M. J. Holst, J. A. McCammon, Electrostatics of nanosystems: application to microtubules and the ribosome. *Proc Natl Acad Sci USA* 98, 10037-10041 (2001).
74. W. L. DeLano, The PyMOL MolecularGraphics System. DeLano Scientific, San Carlos, CA, USA, <http://www.pymol.org> (2002).
- 65 75. W. Brockman y col., Quality scores and SNP detection in sequencing-by-synthesis systems. *Gnome Res* 18,

763-770 (2008).

76. M. A. Larkin y col., Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23, 2947-2948 (2007).

77. D. Petreyetal., Using multiple structure alignments, fast model building, and energetic analysis in fold recognition and homology modeling. *Proteins* 53 Suppl 6, 430-435 (2003).

5 78. R. Chenna y col., Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs. *Nucleic Acids Res* 31, 3497-3500 (2003).

79. S. F. Altschul y col., Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *NucleicAcids Res* 25, 3389-3402 (1997).

10 80. S. Munshaw, T. B. Kepler, SoDA2: a Hidden Markov Model approach for identification of immunoglobulin rearrangements. *Bioinformatics* 26, 867-872 (2010).

81. G. E. Crooks, G. Hon, J. M. Chandonia, S. E. Brenner, WebLogo: a sequence logo generator. *Genome Res* 14, 1188-1190 (2004).

82. J. Zhu, H. Fan, Refining homology models by combining replica-exchange molecular dynamics and statistical potentials. *Proteins* 72, 1171-1188 (2008).

15 La financiación de este ejemplo fue proporcionada por el Intramural Research Program del Vaccine Research Center, National Institute of Allergy and Infectious Diseases y el National Human Genome Research Institute, National Institutes of Health, y mediante becas de la International AIDS Vaccine Initiative's Neutralizing Antibody Consortium y del Centerfor HIV AIDS Vaccine Immunology, Beca AI 5U19 AI 067854-06, del National Institutes from Health. El uso del sector 22 (Southeast Region Collaborative Access team) del Advanced Photon Source recibió financiación del US
20 Department of Energy, Basic Energy Sciences, Office of Science, mediante el contrato número W-31-109-Eng-38. Los factores de estructura y la coordinación de los anticuerpos VRC03 y VRC-PG04 en su complejo con VIH-1 gp120 se depositaron en el Protein Data Bank con los códigos de registro 3SE8 y 3SE9, respectivamente. Los solicitantes también han depositado los datos de secuenciación profunda de los donantes 45 y 74 usados en este Ejemplo en la NCBI Short Reads Archives (SFtA) con el número de registro SRP006992, las secuencias de las regiones variables de
25 la cadena pesada y ligera de los anticuerpos identificados mediante sonda VRC-PG04 and VRC-PG04b (números de registro GenBank JN159464-JN159467), VRC-CH30, VRC-CH31 y VRC-CH32 (JN159434 -JN159439), y VRC-CH33 y VRC-CH34 (JN159470 -159473), así como las secuencias de los neutralizadores identificados genómicamente: 24 cadenas pesadas del donante 74, 2008 (JN159440 - JN159463), 2 cadenas pesadas del donante 45, 2008 (JN159474 - JN159475), 2 cadenas ligeras del donante 45, 2001 (JN159468 - JN159469), y 1.561 secuencias únicas asociadas
30 con las distribuciones de CDR H3 con actividad neutralizante con al menos un miembro de baja divergencia (JN157873-JN159433).

Habiendo descrito de esta forma las realizaciones preferidas detalladas de la presente invención, se entenderá que la invención definida por los párrafos anteriores no está limitada a los detalles concretos definidos en la descripción anterior.

35

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo anti-VIH aislado o de origen no natural, en el que dicho anticuerpo tiene:

(i) una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos VRC-PG-04 definida en la Fig. 8A:

```

-----FR1-----__CDR1__-----FR2-----__CDR2__-----
QVQLVQSGSGVKKPGASVRVSCWTSSEDI FERTELIHVVRQAPGQGLEWIGWVKTVTGAVNFGSPDFRQR
-----FR3-----__CDR3__-----FR4-----
VSLTR.....DRDLFTAIIMDIRGLTQGD TATYFCARQK FYTGGQGWYFD    LWGRGTLIVVSS
    
```

5 y

(ii) una cadena ligera que incluye la secuencia de aminoácidos VRC-PG-04 definida en la Fig. 8B:

```

-----FR1-----__CDR1__-----FR2-----__CDR2__-----
EIVLTQSPGTLSPGETASLSCTAASYGH..MTWYQKKPGQPPKLLIFATSKRASGI
-----FR3-----__CDR3__-----FR4-----
PDRFSGSQFGKQYTLTITRMEPEDFARYYCQQ    LEFFGQGTR..LEIR
    
```

10 2. Un procedimiento *in vitro* para el seguimiento de la calidad de las vacunas anti-VIH, que comprende el uso del anticuerpo de la reivindicación 1, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, para determinar que un antígeno de la vacuna anti-VIH contiene un epítipo en una conformación para desencadenar una respuesta inmunitaria.

3. Una composición diagnóstica que comprende un anticuerpo marcado de la reivindicación 1, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, para detectar la presencia de un VIH inmunógeno en una muestra.

4. La composición de la reivindicación 3, en la que la muestra es una muestra biológica.

5. La composición de la reivindicación 4, en la que la muestra biológica es sangre, semen o fluido vaginal.

15 6. Una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo de la reivindicación 1, para su uso en un procedimiento para inmunizar o reducir el efecto de una infección por VIH o una enfermedad relacionada con el VIH en un paciente que necesita dicho tratamiento.

7. El anticuerpo para su uso en el procedimiento de la reivindicación 6, que comprende además administrar un segundo agente terapéutico.

20 8. El anticuerpo para su uso en el procedimiento de la reivindicación 7, en el que el segundo agente terapéutico es un agente antivírico.

9. Una cantidad terapéuticamente eficaz de:

un primer anticuerpo como se define en la reivindicación 1, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, específico de un primer epítipo, y un segundo anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en:

25 - el anticuerpo VRC01 que tiene una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos definida en la Fig. 8A:

```

-----FR1-----__CDR1__-----FR2-----__CDR2__-----
QVQLVQSGGQMKKPGESMRISCRASGYEF.IDCTLNWIRLAPGKRPEWWMGWLKPRGGAVNY.ARPLQGR
-----FR3-----__CDR3__-----FR4-----
VTMTR.....DVYSDTAFLELRSLTVDDTAVYFCTRGKNC DYNW    DFEHWGRGTPVIVSS
    
```

y una cadena ligera que incluye la secuencia de aminoácidos definida en la Fig. 8B:

```

-----FR1----- _CDR1_ -----FR2----- _CDR2-----
EIVLTQSPGTLSLSPGETAIISCRTSQYGS . .LAWYQQRPGQAPRLVIYSGSTRAAGI
-----FR3----- _CDR3_ -----FR4-----
PDRFSGSRWGPDPYNLTISNLESGDFGVYYCQQ YEFFQGGTKVQVDIK

```

o

- el anticuerpo VRC02 que tiene una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos definida en la Fig. 8A:

```

-----FR1----- _CDR1_ -----FR2----- _CDR2_ -----
QVQLVQSGGQMKKPGESMRISQASGYEF . IDCTLNWVRLAPGRRPEWMGWLKPRGGAVNY . ARPLQGR
-----FR3----- _CDR3_ -----FR4-----
VTMTR . . . . .DVYSDTAFLELRSLTADDTAVYYCTRGKNCDYNW DFEHWGRGTPVTVSS

```

5

y una cadena ligera que incluye la secuencia de aminoácidos definida en la Fig. 8B:

```

-----FR1----- _CDR1_ -----FR2----- _CDR2-----
EIVLTQSPGTLSLSPGETAIISCRTSQYGS . .LAWYQQRPGQAPRLVIYSGSTRAAGI
-----FR3----- _CDR3_ -----FR4-----
PDRFSGSRWGPDPYNLTIRNLESGDFGLYYCQQ YEFFQGGTKVQVDIK

```

o

- el anticuerpo VRC03 que tiene una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos definida en la Fig. 8A:

10

```

-----FR1----- _CDR1_ -----FR2----- _CDR2_ -----
QVQLVQSGAVIKTPGSSVKISCRASGYNF . RDYSIHWVRLIPDKGFEWIGWIKPLWGAVSY . ARQLQGR
-----FR3----- _CDR3_ -----FR4-----
VSMTRQLSQDPDDPDWGVAYMEFSGLTPADTAEYFCVRRGSCDYCGDFPWQ YWQGTVVVVSS

```

y una cadena ligera que incluye la secuencia de aminoácidos definida en la Fig. 8B:

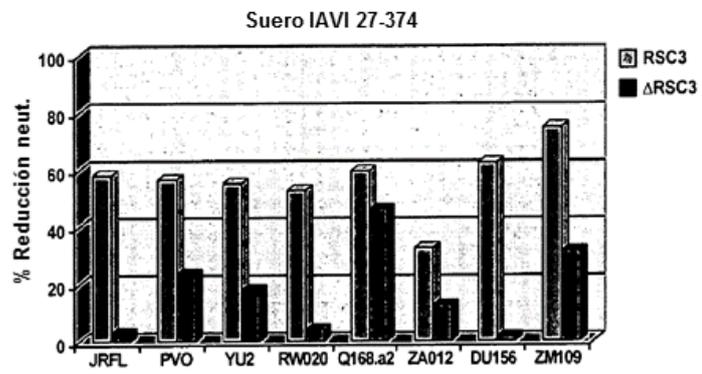
```

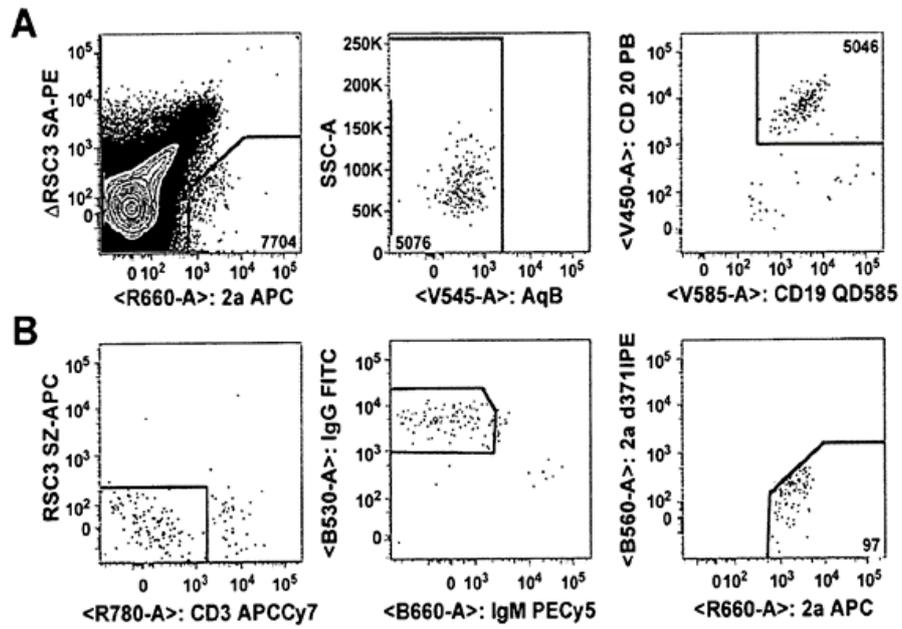
-----FR1----- _CDR1_ -----FR2----- _CDR2-----
EIVLTQSPG ILSLSPGETATLFCKASQGGNA . .MTWYQKRRGQVPRLLIYDTSRRASGV
-----FR3----- _CDR3_ -----FR4-----
PDRFVSGSGTDFFLTINKLDREDFAVYYCQQ FEFFGLGSE . .LEVH

```

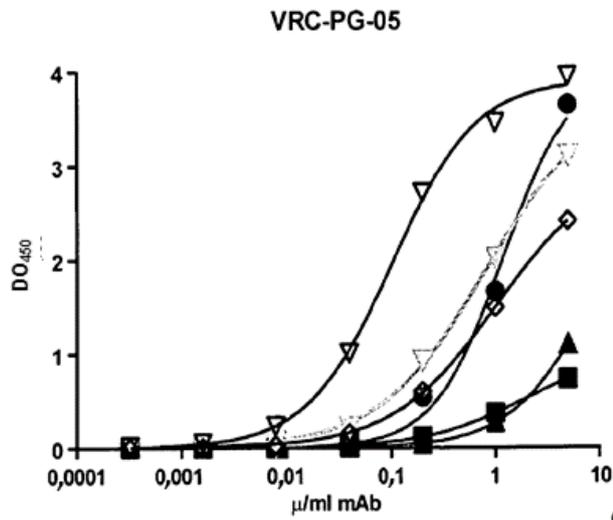
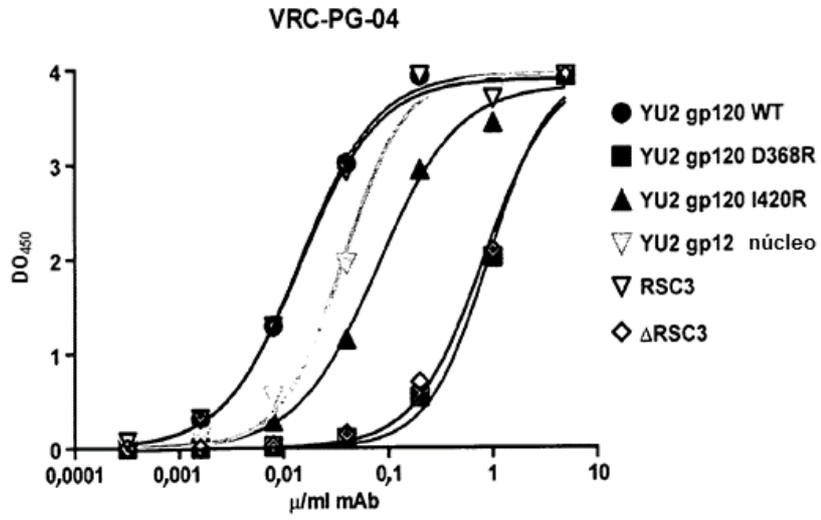
15

o un fragmento de unión a antígeno del mismo, específico de un segundo epítipo para su uso en un procedimiento para inmunizar o reducir el efecto de una infección por VIH o una enfermedad relacionada con el VIH en un paciente que necesita dicho tratamiento.

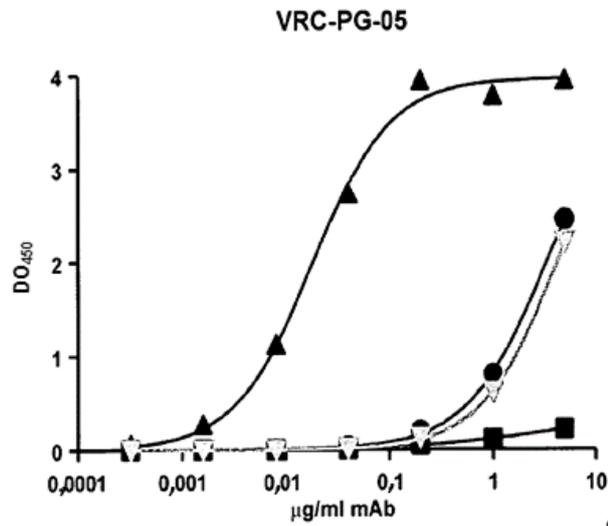
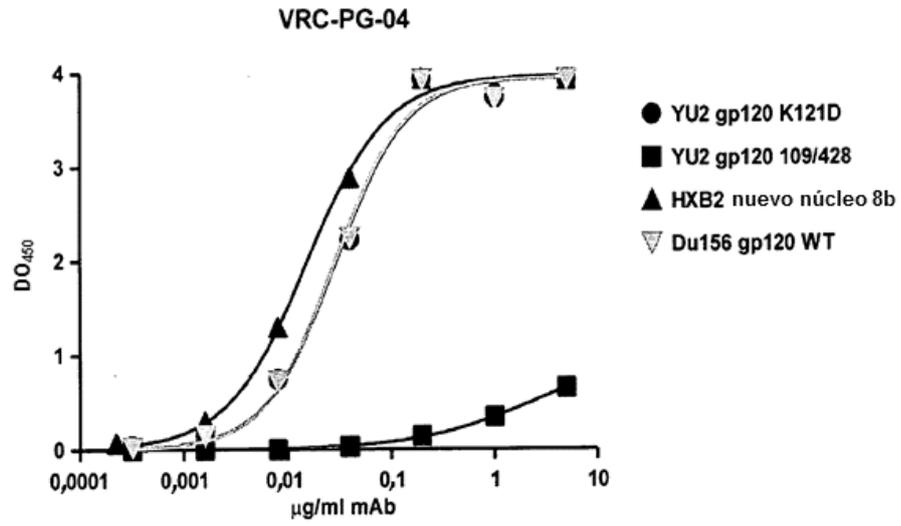




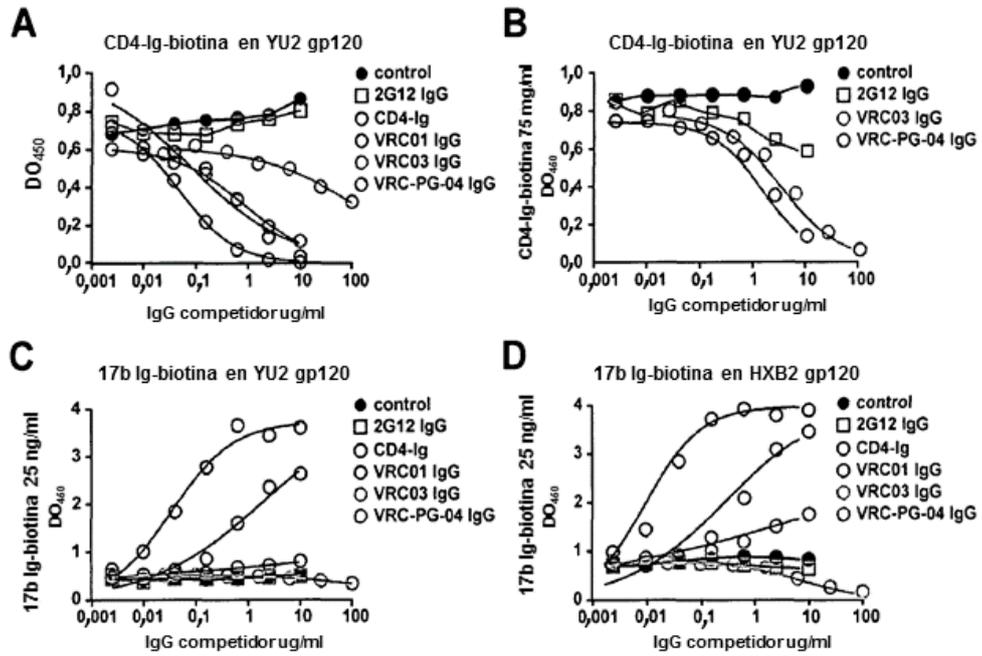
1. Se necesitan gráficos que sean editables para conseguir una figura más limpia
2. Tampoco está claro cómo marcar esta figura

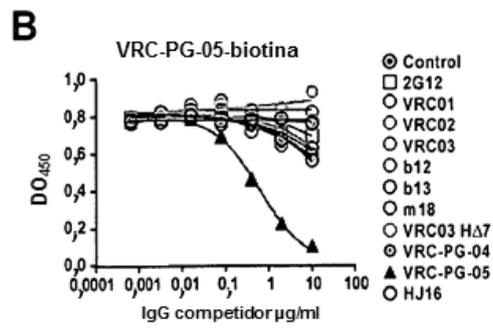
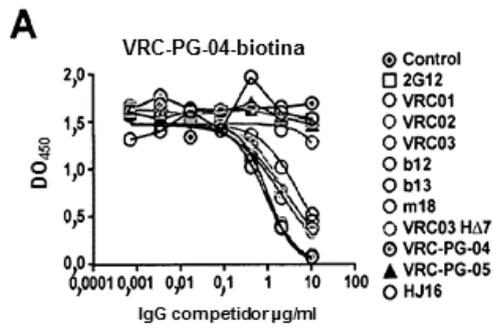


CVL0917.011
Resultados 9 abril 2010



CVL0917.011
Resultados 9 abril 2010





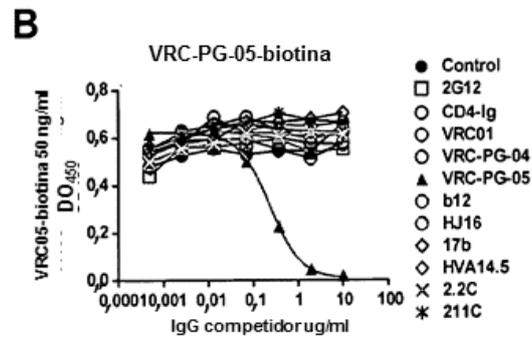
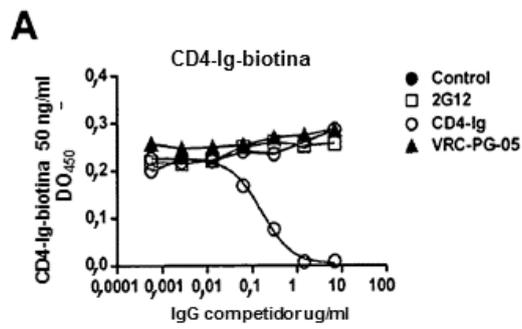


Figura 8

A. Cadena pesada

```

-----FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2-----FR3-----FR4-----
IGHV1-02*02 QVQLVQSGAEVKKRQGGKSLVIVKVCASQSGTFR TGYTHMMRROAQGGLLEMKGINTNSGDTNVA AQKHGGKRVYVTR . . . . . DTSISTAAVHLSLSDDDAVYYCAR DYNV AYEDVHGGGLVTVSS
VRC01 QVQLVQSGAEVKKRQGGKSLVIVKVCASQSGTFR IDCTLNHTPLRABGR PERMAGLTKRGGAVNY ABLPQGRVYVTR . . . . . DVSVDNLSLSLTVDDDAVYYCARGRKNDYNN DPEHKGSGFTVTVSS
VRC02 QVQLVQSGAEVKKRQGGKSLVIVKVCASQSGTFR IDCTLNHTPLRABGR PERMAGLTKRGGAVNY ABLPQGRVYVTR . . . . . DVSVDNLSLSLTVDDDAVYYCARGRKNDYNN YKGGQTVYTVSS
VRC03 QVQLVQSGAVIKTPOSSVRIKSCASQGINF NDSIIMVRLIIPKGFEMIGWIKFIMQAVSI ABLPQGRVYVTR . . . . . DDLFTAHKDDIROLVQGDVYVYFCARLQKQFTTCCQGMVTFD LMGKGLLVVSS
VRC-FG-04 QVQLVQSGGVKRFKASVHVSQWTSDDLEERTELLIHVYRQVQGLLEMLGMWYVYVGVAVHVSFDRQVSLTR . . . . . DDLFTAHKDDIROLVQGDVYVYFCARLQKQFTTCCQGMVTFD
-----FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2-----FR3-----FR4-----
IGHV3-7*01 EVQLVDSGGGLVQPGGSLRLSQAASGFTFSYVMKSMVYKQAPGKGLLEWVANI KQDGSSEKYVDVSVKGRFTI SRDNANSLYLQNSLSAEDDAVYYCAR CDR3
VRC-FG-05 EVQLVDSGGGLVQPGGSLRLSQAASGFTFSYVMKSMVYKQAPGKGLLEWVANI KQDGSSEKYVDVSVKGRFTI SRDNANSLYLQNSLSAEDDAVYYCARLIRQVSRKYLQHYPCVTEKMQGGMVTVSS
-----FR1-----FR2-----FR3-----FR4-----

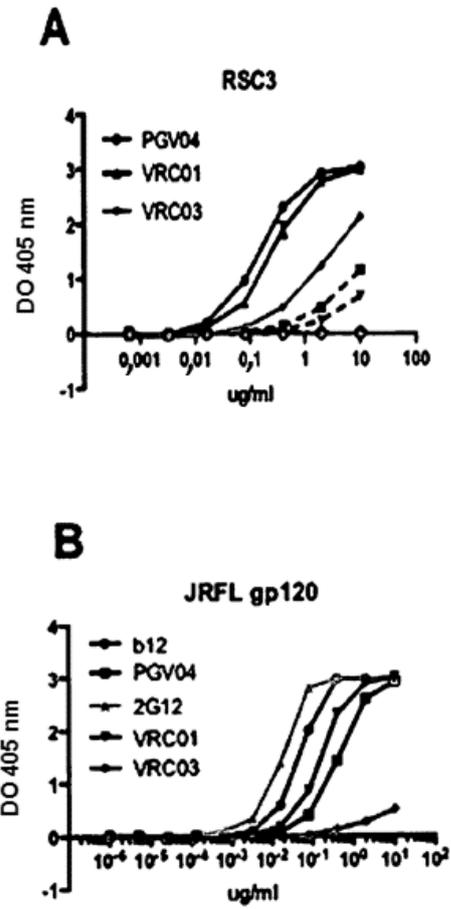
```

B. Cadena ligera

```

-----FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2-----FR3-----FR4-----
IGHV3-11*01 EYVLTQSPRATISLSPGGRARTESCRASQGVSR SYLAVYQQRPGQAPRLIYDASIRARNGI PARPSGSGSGNDPTIATISLSEPPDFAVYYCAR VTSGGGTR LEIK JK2*01
VRC01 EYVLTQSPRATISLSPGGRARTESCRASQGVSR LAMVYQQRPGQAPRLIYDASIRARNGI PARPSGSGSGNDPTIATISLSEPPDFAVYYCAR YSEFQQGTRKVVQYDIK
VRC02 EYVLTQSPRATISLSPGGRARTESCRASQGVSR LAMVYQQRPGQAPRLIYDASIRARNGI PARPSGSGSGNDPTIATISLSEPPDFAVYYCAR YSEFQQGTRKVVQYDIK
IGHV3-20*01 EYVLTQSPRATISLSPGGRARTESCRASQGVSSSYLAVYQQRPGQAPRLIYDASIRARNGI PARPSGSGSGNDPTIATISLSEPPDFAVYYCAR YSEFQQGTRKVVQYDIK
VRC03 EYVLTQSPGILISRGTATLFCASQGVGNA . . . . . MIVYQKRRQGVPRLLIYDTSIRASGVDPQRFVGSQGDPTFTLNKLDREDFAVYYCAR LEFFQGGTR . . . . . LEIK
VRC-FG-04 EYVLTQSPRATISLSPGGRARTESCRASQGVSR LAMVYQQRPGQAPRLIYDASIRARNGI PARPSGSGSGNDPTIATISLSEPPDFAVYYCAR LEFFQGGTR . . . . . LEIK
-----FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2-----FR3-----FR4-----
IGHV4-1*01 DIYMTQSPDSIVSLSPGGRATINCKSSQSVLVSSNNRNYLAVYQQRPGQAPRLIYDASIRARNGI PARPSGSGSGNDPTIATISLSEPPDFAVYYCAR YSEFQQGTRKVVQYDIK
VRC-FG-05 DIYMTQSPDSIVSLSPGGRATINCKSSQSVLVSSNNRNYLAVYQQRPGQAPRLIYDASIRARNGI PARPSGSGSGNDPTIATISLSEPPDFAVYYCAR YSEFQQGTRKVVQYDIK
-----FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2-----FR3-----FR4-----

```



Figuras 9A-B

A

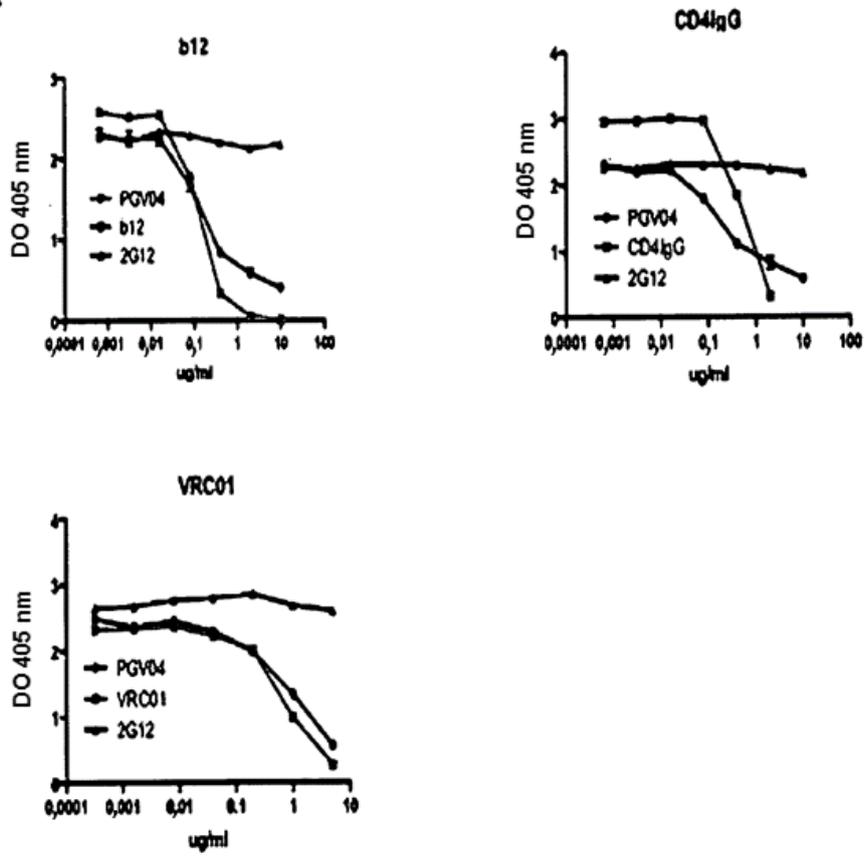
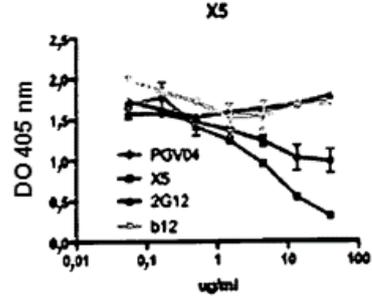
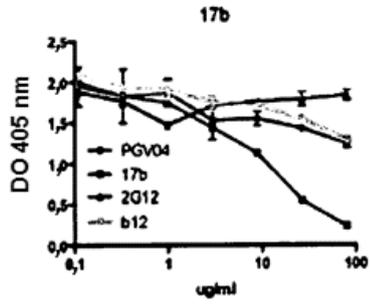
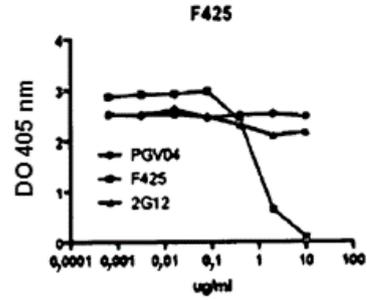
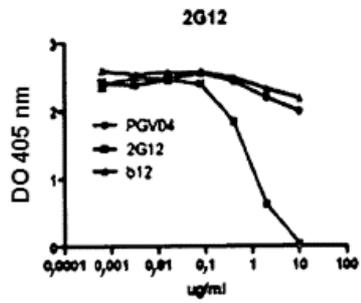


Figura 10A

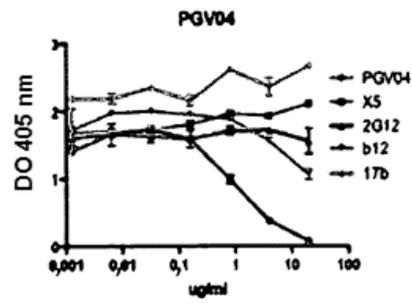
B



C



D



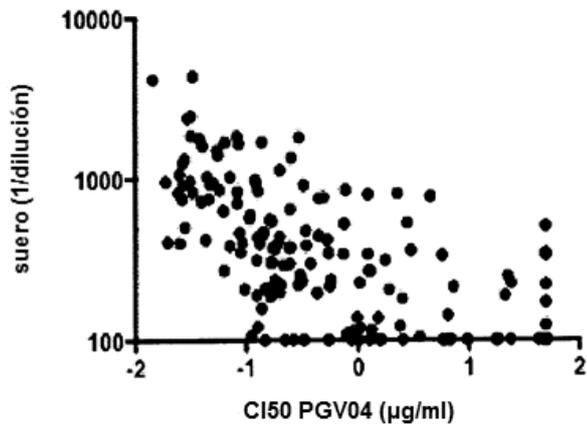
Figuras 10B-D

Figura 11A-B

A		CI ₅₀ promedio (µg/ml) frente a virus neutralizados con una CI ₅₀ < 50 µg/ml para mAb o < 100 (1/dil.) para suero								
		Panel virus 162			Panel virus 97					
Clado	N.º de virus	PGV04	PG9	Donante n.º 74	Clado	N.º de virus	PGV04	PG9	VRC01	
A	26			469	A	24				
AE	10	1,24		251						
AG	10			763						
B	31		0,96	617	B	33				
C	27	0,79	0,39	317	C	35	0,25		0,36	
D	25	0,44	0,21	313						
F	15			388						
G	15		1,13	730						
TOTAL	162	0,2	0,27	414	TOTAL	97				
B		Porcentaje de virus neutralizado								
Clado	N.º de virus	PGV04	PG9	Donante n.º 74	Clado	N.º de virus	PGV04	PG9	VRC01	
A	26		85	88	A	24				
AE	10	90		80						
AG	10		60	80						
B	31		71	84	B	33	88	61		
C	27	70	74	70	C	35	80	86	86	
D	25	76	76	64						
F	15		67	80						
G	15	87	80	80						
TOTAL	162	88	75	78	TOTAL	97	87	82	93	

Figura 11C

C



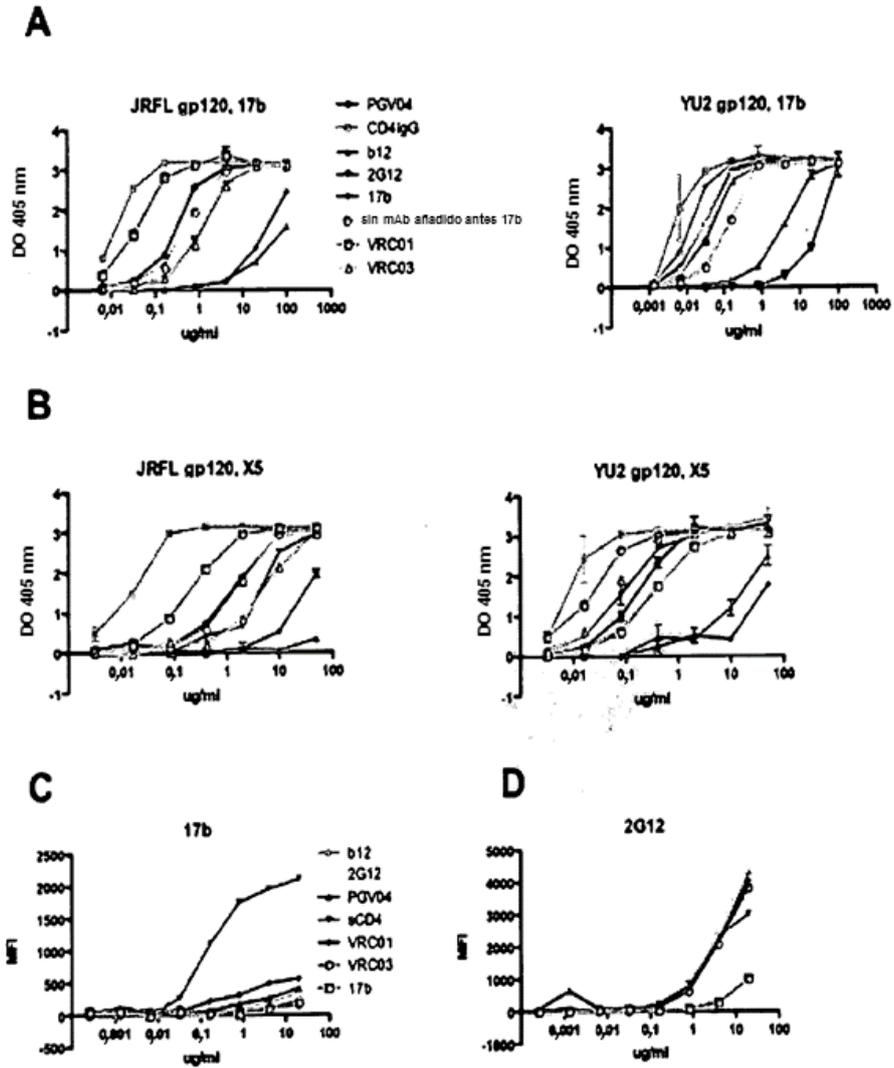


Figura 12A-D

Figura 13A

Potencia de neutralización con respecto a WT (%)					
dominio gp120	mutación	PGV04	VRC01	CD4-IgG	b12
C1	E87A	118			
	M95A	107			
	K97A	130			
	E102A	146			
	W112A	118			
C1 (tallo V1/V2)	V120A	84			
	K121A	78			
	L122A	106			
	T123A	121			
	L125A	89			
	N156A	73			
	N160K	176			
V2	T162A	177			
	I165A	61			
	R166A	51			
	D167A	81			
	K168A	67			
	K171A	149			
	E172A	59			
	Y177A	135			
	L179A	88			
	V182A	68			
	I184A	135			
	D185A	120			
	T189A	240			
C2 (tallo V1/V2)	K194S	236			
	T198A	95			
	S199A	>1000	>1000	>1000	>1000
	T202A	61			
C2	F210A	101			
	I213A	185			
	R252A	86			
	S256A	152			
	T257A	148			
	N262A	105			

Figura 13B

	R273A	120			
	N276A	13	400	123	106
	D279A	1,0	4	1	61
	K282A	81			
	T283A	225			
V3 (base)	N295A	97			
	T297S	179			
	P299A	84			
	N301A	85			
V3 (stem)	N302A	120			
	R304A	43			
	K305A	54			
V3 (punta)	S306A	130			
	I307A	9	36	>1000	>1000
	H308A	99			
	I309A	31	39	>1000	>1000
	P313A	111			
	R315A	92			
	F317A	36	42	>1000	>1000
	Y318A	35	42	>1000	>1000
	T319A	102			
V3 (base)	T320A	64			
	E322A	83			
	D325A	112			
C3	N332A	120			
	D337A	172			
	K343A	117			
	R350A	106			
	S365A	155			
	P369A	113			
	V372A	125			
	M373A	135			
	Y384A	69			
	N386A	120			
V4	T388A	160			
	N392D	73			
C4	W395A	95			
	R419A	111			
	I420A	3	15	>1000	731

Figura 13C

	K421A	68			
	Q422A	98			
	I423A	5	34	>1000	>1000
	I424A	142			
	N425A	148			
	V430A	82			
	K432A	101			
	Y435A	73			
	I439A	88			
	T450A	135			
	T455A	142			
	R456A	55			
	G459A	239			
V5	N461A	509	321	129	233
	E462A	116			
	S463A	252	340	243	152
	G471A	92			
C5	D474A	102			
	M475A	140			
	R476A	141			
	D477A	107			
	W479A	138			
	R480A	113			

Figura 13D

Afinidad de unión aparente			
Dominio	Mutante	PGV04	2G12
C1	E87A	53	88
	M95A	41	66
	K97A	98	103
	E102A	36	47
	W112A	76	80
	D113A	70	91
C1 (Tallo V1/V2)	V120A	79	93
	K121A	130	129
	L122A	96	83
	T123A	113	106
	L125A	93	134
	V127A	36	37
	N156A	72	98
	N160K	390	183
V2	T162A	87	103
	I165A	139	125
	R166A	97	100
	D167A	97	90
	K168A	87	108
	K171A	84	103
	E172A	103	86
	F176A	104	102
	Y177A	120	131
	L179A	138	122
	D180A	46	57
	V182A	54	96
	I184A	17	45
	D185A	55	78
	T190A	110	94
C2 (Tallo V1/V2)	K194S	27	33
	N197A	29	46
	T198A	49	81
	S199A	78	92
	T202A	58	94

Figura 13E

C2	K207A	31	201
	F210A	85	80
	I213A	81	83
	R252A	111	99
	S256A	35	39
	T257A	51	73
	N262A	22	66
	R273A	78	78
	N276A	0	102
	D279A	0	107
	N280A	1	38
	K282A	23	80
	T283A	85	129
	V3 (base)	N295A	34
T297S		115	86
P299A		115	99
N301A		72	94
V3 (tallo)	N302A	40	86
	R304A	44	88
	K305A	51	91
V3 (punta)	S306A	93	112
	I307A	67	126
	H308A	29	98
	I309A	78	127
	P313A	31	52
	R315A	90	96
	F317A	92	107
	Y318A	62	95
	T319A	52	88
	T320A	29	84
V3 (base)	E322A	22	83
	D325A	42	56
	N332A	68	1

Figura 13F

C3	Q337A	155	138
	K343A	124	80
	R350A	84	97
	S365A	21	48
	G366A	14	40
	G367A	15	56
	D368A	12	96
	P369A	70	112
	E370A	26	84
	I371A	11	38
	V372A	30	102
	M373A	77	106
	Y384A	42	105
	N386A	61	32
	T388A	31	70
	V4	N392Q	69
W395A		18	7
	R419A	97	96
	I420A	119	110
	K421A	69	97
	Q422A	78	103
	I423A	83	164
	I424A	110	96
	N425A	95	101
	M426A	67	107
	W427A	131	108
	V430A	108	97
	K432A	85	141
	C4	Y435A	115
I439A		118	109
T450A		16	40
T455A		58	83
R456A		21	71
D457A		4	108
G458A		13	38
G459A		48	91

Figura 13G

V5	N461A	264	144
	E462A	140	101
	S463A	276	108
	I467A	8	27
	R469A	3	40
	P470A	19	100
	G471A	114	123
C5	G472A	23	103
	G473A	18	78
	D474A	28	92
	M475A	75	93
	R476A	91	73
	D477A	36	87
	W479A	82	70
	R480A	100	100
V1-V3	Delta V1	39	43
	Delta V1/2	35	35
	Delta V3	70	90

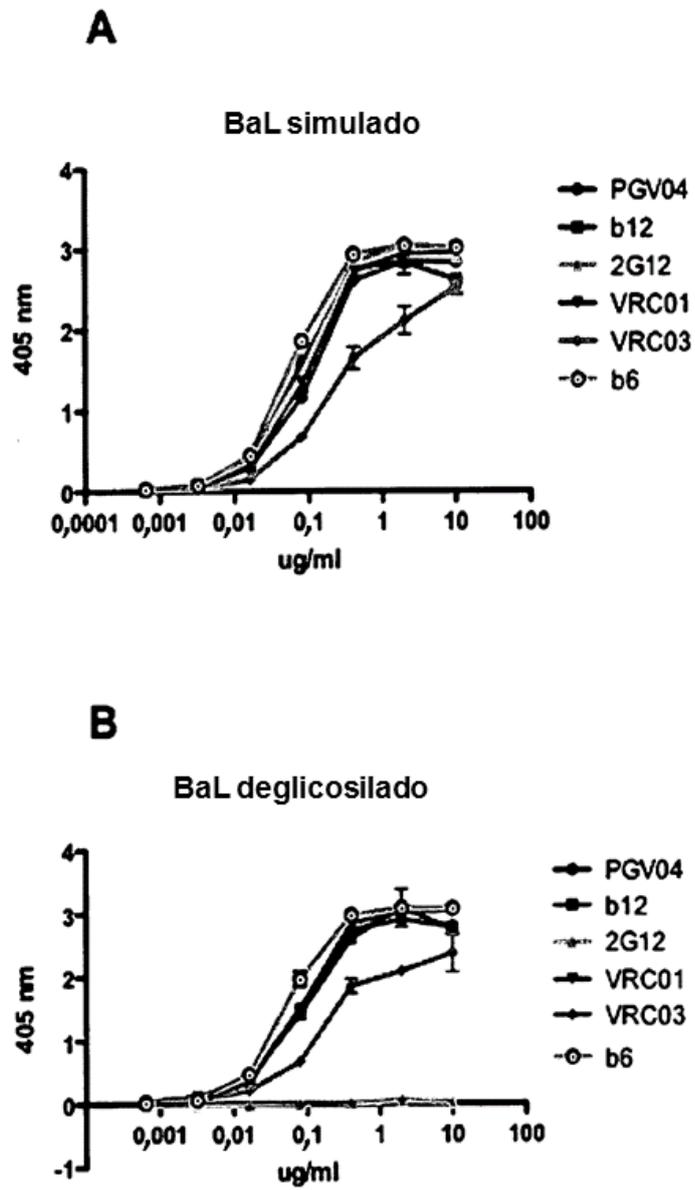


Figura 14A-B

Figura 15A

	Subtipo	CI50 (µg/ml)		NT50
		PGV04	PG9(suero donante
92RW008	A	0,0144	0,0056	4129
92RW009	A	0,1088	0,0498	570
92RW020	A	0,0550	0,1410	1498
92RW021	A	0,0881	0,0274	1785
92RW024	A	0,3097	0,2578	255
92RW026	A	0,1404	0,1640	1679
92UG031	A	4,4681	3,6047	779
92UG037	A	0,1458	0,0186	459
93RW029	A	0,5401	0,6895	420
93UG077	A	0,0881	>50	1827
94UG103	A	0,2020	0,3400	1129
MGRM-A-001	A	6,7811	>50	<100
MGRM-A-002	A	0,0926	0,0195	402
MGRM-A-003	A	0,1278	1,9421	121
MGRM-A-004	A	0,1750	0,0200	374
MGRM-A-005	A	0,1386	0,7501	367
MGRM-A-006	A	0,2440	>50	376
MGRM-A-007	A	7,2182	1,0608	218
MGRM-A-008	A	0,5545	>50	<100
MGRM-A-009	A	0,0884	0,0282	4937
MGRM-A-010	A	0,2054	0,0216	221
MGRM-A-011	A	0,0895	0,0880	351
MGRM-A-012	A	0,2246	19,2841	<100
MGRM-A-013	A	0,0868	0,1215	1607
MGRM-A-014	A	0,1715	1,2486	304
VLGA1	A	0,0244	0,0692	824
94KE105	AC	2,9808	37,8750	359
92TH021	AE	1,2885	0,0536	268
CMU02	AE	1,2875	>50	268
MGRM-AE-001	AE	0,0681	20,5858	272
MGRM-AE-002	AE	0,5686	0,0404	216
MGRM-AE-003	AE	6,4007	0,0442	142
MGRM-AE-004	AE	0,1825	0,0086	285
MGRM-AE-005	AE	0,0508	0,2820	842
MGRM-AE-006	AE	>50	0,0627	<100
MGRM-AE-007	AE	6,7528	0,1800	<100

Figura 15B

MGRM-AE-008	AE	1,5134	31,4817	137
MGRM-AG-001	AG	0,2177	17,1248	292
MGRM-AG-002	AG	0,8794	0,0760	<100
MGRM-AG-003	AG	0,0577	>50	856
MGRM-AG-005	AG	0,0270	>50	912
MGRM-AG-006	AG	1,2296	>50	800
MGRM-AG-008	AG	2,4839	0,0134	180
MGRM-AG-009	AG	0,1476	>50	<100
MGRM-AG-011	AG	0,0714	0,0068	386
MGRM-AG-012	AG	0,0398	22,8451	725
MGRM-AG-013	AG	0,0298	0,2589	2374
6535.3	B	0,7572	1,0528	525
92BR020	B	0,2502	>50	650
93TH305	B	0,2549	8,1239	375
APV_13	B	1,2266	>50	341
APV_17	B	0,3085	34,7782	237
APV_6	B	24,1871	0,1805	224
CAAN.A2	B	2,2618	19,2666	811
JRFL	B	0,0319	>50	2450
MGRM-Chronic-B-001	B	0,0478	>50	918
MGRM-Chronic-B-002	B	0,1424	3,4389	453
MGRM-Chronic-B-003	B	0,2575	>50	1354
MGRM-Chronic-B-004	B	0,0466	0,5326	755
MGRM-Chronic-B-008	B	0,1661	8,7835	186
MGRM-Chronic-B-010	B	0,7440	0,0044	342
MGRM-Chronic-B-011	B	0,4972	>50	765
MGRM-Chronic-B-012	B	>50	0,1997	123
MGRM-Chronic-B-017	B	0,1287	0,6878	841
MGRM-Chronic-B-018	B	0,1642	0,2161	557
MGRM-Chronic-B-020	B	1,2617	>50	<100
MGRM-Chronic-B-023	B	0,1392	0,0266	157
MGRM-Chronic-B-024	B	2,5174	0,2224	<100
PVO.4	B	0,4542	24,7517	444
QH0692.42	B	1,9042	>50	205
SC422661.8	B	0,1097	1,4772	600
SF162	B	0,0281	>50	1333
THR0.18	B	>50	26,3785	<100
TRJ04551.58	B	0,0282	0,8577	502
TRO.11	B	0,1211	16,8652	985
VLGCB3	B	0,0446	0,0222	1030

Figura 15C

93IN905	C	0,3922	0,0845	914
93MW959	C	>50	0,0539	343
97ZA012	C	0,0405	3,3939	1600
98IN022	C	5,6925	0,0091	286
MGRM-C-001	C	>50	>50	<100
MGRM-C-002	C	>50	>50	503
MGRM-C-004	C	0,8992	2,0105	113
MGRM-C-005	C	23,8979	8,7420	<100
MGRM-C-006	C	>50	0,4269	<100
MGRM-C-007	C	>50	0,0637	220
MGRM-C-008	C	0,7905	>50	109
MGRM-C-009	C	1,0421	>50	116
MGRM-C-010	C	0,2936	>50	220
MGRM-C-012	C	0,0253	0,6100	402
MGRM-C-013	C	>50	>50	<100
MGRM-C-014	C	21,1904	1,0994	189
MGRM-C-015	C	0,9829	0,4271	137
MGRM-C-017	C	0,3825	2,6881	293
MGRM-C-019	C	0,6913	0,0053	<100
MGRM-C-020	C	0,1120	>50	107
MGRM-C-022	C	18,2330	0,3457	<100
MGRM-C-023	C	0,1278	0,6139	493
MGRM-C-024	C	>50	0,2265	<100
MGRM-C-025	C	>50	0,1483	<100
MGRM-C-026	C	0,3029	0,0593	1759
MGRM-C-027	C	2,7624	5,3577	503
MGRM-C-028	C	0,1489	0,0657	203
98CN009	CRF07_BC	0,1243	0,2769	929
98CN006	CRF08_BC	1,3196	>50	115
92UG001	D	0,5329	>50	307
92UG005	D	0,4993	>50	193
92UG024	D	0,2014	1,8614	497
92UG046	D	22,3613	1,8610	239
94UG114	D	0,4611	40,6033	753
MGRM-D-001	D	>50	>50	<100
MGRM-D-002	D	0,3221	0,0205	232
MGRM-D-003	D	>50	0,0823	171
MGRM-D-004	D	43,1993	0,0604	<100
MGRM-D-005	D	>50	1,3013	<100

Figura 15D

MGRM-D-008	D	3,5638	11,4537	104
MGRM-D-011	D	0,0251	0,0707	1064
MGRM-D-012	D	0,1248	16,1817	313
MGRM-D-013	D	0,0878	0,2102	462
MGRM-D-014	D	0,1944	0,0232	398
MGRM-D-016	D	0,2013	0,0979	198
MGRM-D-018	D	17,5284	0,0250	<100
MGRM-D-019	D	0,3503	0,0375	475
MGRM-D-020	D	0,0974	1,6647	207
MGRM-D-021	D	>50	>50	<100
MGRM-D-022	D	>50	>50	<100
MGRM-D-024	D	>50	0,0384	<100
MGRM-D-026	D	1,7611	23,6635	313
MGRM-D-028	D	1,0079	20,2338	<100
MGRM-D-029	D	1,5567	>50	<100
MGRM-F1-004	F	0,5799	0,1752	235
MGRM-F1-006	F	>50	7,2494	<100
MGRM-F1-008	F	1,0312	>50	227
MGRM-F1-010	F	0,1836	0,0120	370
MGRM-F1-012	F	0,2497	0,0232	297
MGRM-F1-013	F	0,0840	1,2533	834
MGRM-F1-014	F	0,0196	0,0199	407
MGRM-F1-015	F	0,1789	>50	217
MGRM-F1-016	F	0,2678	0,5175	<100
MGRM-F1-017	F	2,3826	>50	122
MGRM-F1-018	F	0,0269	0,0189	1252
MGRM-F1-020	F	5,9865	6,3957	<100
MGRM-F1-021	F	0,0313	>50	968
MGRM-F1-022	F	0,0718	0,0275	1024
MGRM-F1-023	F	0,1711	>50	547
MGRM-G-001	G	>50	0,1663	336
MGRM-G-004	G	>50	>50	<100
MGRM-G-006	G	0,0834	1,9826	709
MGRM-G-009	G	0,0433	10,7039	421
MGRM-G-011	G	0,7802	0,3352	853
MGRM-G-013	G	0,1684	>50	303
MGRM-G-014	G	0,0559	16,4784	1404
MGRM-G-015	G	0,3333	6,5988	<100
MGRM-G-016	G	0,0188	1,3634	960
MGRM-G-017	G	0,0645	0,1035	1685

Figura 15E

MGRM-G-019	G	0,0267	14,5587	751
MGRM-G-024	G	0,0332	0,1633	829
MGRM-G-025	G	1,6079	>50	<100
MGRM-G-027	G	0,1251	0,0065	190
MGRM-G-028	G	0,3524	0,8910	387
NL43		0,0434	>50	1589
NL43		0,0451	34,6465	1628
NL43		0,0309	11,1569	1630
NL43		0,0240	19,2334	1928
NL43		0,0310	9,7351	2083
NL43		0,0304	7,9936	1663
NL43		0,0269	3,3719	2137
NL43		0,0284	4,6467	1836
NL43		0,0335	18,7168	2079
NL43		0,0278	12,6701	1927
JRCSF		0,0782	0,0027	632
JRCSF		0,0806	0,0035	689
JRCSF		0,0634	0,0030	592
JRCSF		0,0658	0,0030	468
JRCSF		0,0542	0,0030	577
JRCSF		0,0520	0,0031	541
JRCSF		0,0574	0,0025	671
JRCSF		0,0479	0,0028	704
JRCSF		0,0464	0,0028	782
JRCSF		0,0764	0,0018	680
aMLV		>50	>50	<100
aMLV		>50	>50	<100
aMLV		>50	>50	<100
aMLV		>50	>50	<100
aMLV		>50	>50	<100
aMLV		>50	>50	<100
aMLV		>50	>50	<100
aMLV		>50	>50	<100
aMLV		>50	>50	<100
aMLV		>50	>50	<100

Figura 15F

		Valores CI50 ($\mu\text{g/ml}$)		
		VRC01 IgG	PGV04	PG9 IgG
Tercio 1 clado B (n=7)	HXB2	0,034	0,025	1,62
	MN.3	0,022	>50	>50
	SF162	0,139	0,024	>50
	ADA	0,379	0,179	0,128
	BaL.01	0,055	0,034	0,033
	BaL.26	0,048	0,148	0,019
	SS1196.1	0,170	0,189	0,074
Tercio 1 clado C	MW965.26	0,056	0,032	2,17
Clado A (n = 24)	RW020.2	0,224	0,165	0,052
	UG037.8	0,079	0,109	0,020
	DJ263.8	0,080	0,80285	0,218
	KER2018.11	0,652	1,08	0,010
	Q259.w6	0,170	0,028	1,17
	Q769.h5	0,084	0,024	0,009
	Q168.a2	0,115	0,032	0,045
	Q23.17	0,085	0,084	0,005
	Q259.17	0,066	>50	0,041
	Q461.e2	0,492	0,237	1,47
	Q842.d12	0,030	0,017	0,019
	BB201.B42	0,223	0,081	0,011
	MB201.A1	0,165	0,049	0,054
	MB201.B10	0,132	0,042	0,052
	BB539.2B13	0,069	0,398	0,063
	MB539.2D1	0,060	0,499	0,035
	MB539.2B7	0,531	0,462	0,094
	BI369.9A	0,142	0,039	0,023
	MI369.A5	0,107	0,046	0,035
	BS208.B1	0,019	0,014	0,016
	MS208.A1	0,101	0,055	0,032
	MS208.A3	0,050	0,022	0,025

Figura 15G

	KER2008.12	0,379	0,236	0,017
	KNH1209.18	0,087	0,0579	0,167
Tercio 2 clado B (n=26)	JRCSF.JB	0,093	0,034	0,002
	JRFL	0,031	0,063	>50
	YU2	0,126	0,084	1,73
	89.6	0,511	0,061	>50
	6101.10	0,111	0,090	>50
	7165.18	16,3	>50	>50
	6535.3	0,539	0,687	0,222
	QH0692.42	1,5	1,34	>50
	SC422661.8	0,076	0,038	0,325
	PVO.4	0,216	0,235	8,7
	TRO.11	0,207	0,131	>50
	AC10.0.29	2,2	17,9	0,012
	RHPA4259.7	0,060	0,038	10
	THRO4156.18	2,25	>50	13,2
	REJO4541.67	0,062	0,019	0,001
	TRJO4551.58	0,083	0,069	1,85
	WITO4160.33	0,148	0,080	0,005
	CAAN5342.A2	0,824	1,13	14,4
	BL01.DG	>50	>50	>50
	BR07.DG	1,24	0,789	>50
	HT593.1	0,334	0,177	0,214
	R2	0,198	0,291	>50
	BG1168.01	0,276	0,509	>50
	QH0515.01	0,386	0,115	>50
	5768.04	0,166	0,042	0,031
	3988.25	0,220	0,295	0,016
Tercio 2 clado C (n=34)	Du123.6	18,2	>50	0,047
	Du151.2	3,16	0,059	0,012
	Du156.12	0,089	0,034	0,035
	Du172.17	>50	0,314	0,240

Figura 15H

	Du422.1	>50	>50	0,178
	ZM197M.PB7	0,36	1,14	0,287
	ZM214M.PL15	0,44	0,249	>50
	ZM233M.PB6	1,99	7,67	0,001
	ZM249M.PL1	0,048	0,051	0,023
	ZM53M.PB12	1,31	1,51	0,092
	ZM109F.PB4	0,128	0,047	0,235
	ZM135M.PL10a	0,346	41	>50
	CAP45.2.00.G3	2,29	>50	0,003
	CAP210.2.00.E8	>50	>50	0,08
	CAP244.2.00.D3	0,428	0,301	0,082
	ZA012.29	0,305	0,130	4,59
	BR025.9	0,115	2,77	0,018
	TV1.29	>50	>50	0,007
	ZM215.8	0,095	0,075	0,025
	ZM106.9	0,489	0,206	4,59
	ZM55.28a	0,340	0,390	4,60
	ZM53.21	1,16	1,15	0,019
	ZM55.4a	0,450	0,457	4,19
	ZM106.10	0,566	0,1252	0,097
	ZM109.32	0,091	0,055	0,099
	ZM135.8a	0,374	>50	>50
	ZM146.7	0,333	0,403	0,181
	ZM176.66	0,055	0,140	0,011
	ZM181.6	1,12	11,6	0,005
	SO18.18	0,069	0,067	0,031
	286.36	0,188	0,090	0,084
	288.38	0,992	0,390	0,610
	TZA125.17	>50	>50	0,115
	TZBD.02	0,109	0,067	0,211
Clado D	UG024.2	0,156	0,199	3,23
	57128.02	>50	>50	0,136

Figura 15I

Clado E	TH966.8	0,334	0,068	0,020
	TH976.17	0,087	0,046	>50
	M02138	0,348	0,219	0,189
No VIH	SIVmac251.30	>50	>50	>50
	MuLV	>50	>50	>50
HIV-2	7312A.V434M	>50		
	7312A.V434M+sCD4	>50		
	7312A.C1.Y720S	>50		
	7312A.Y720S	>50		

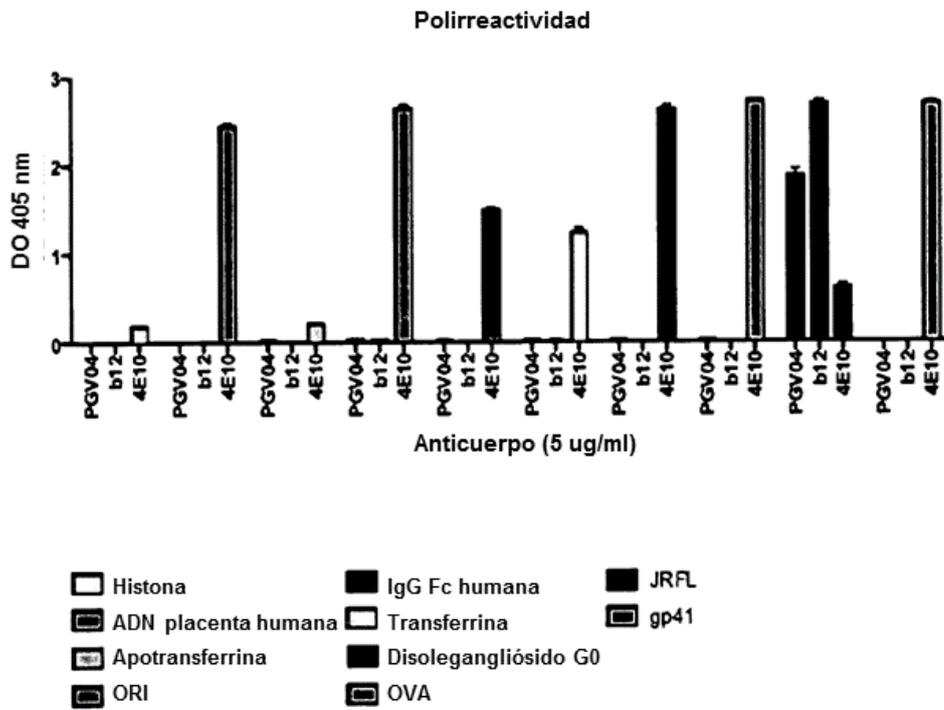
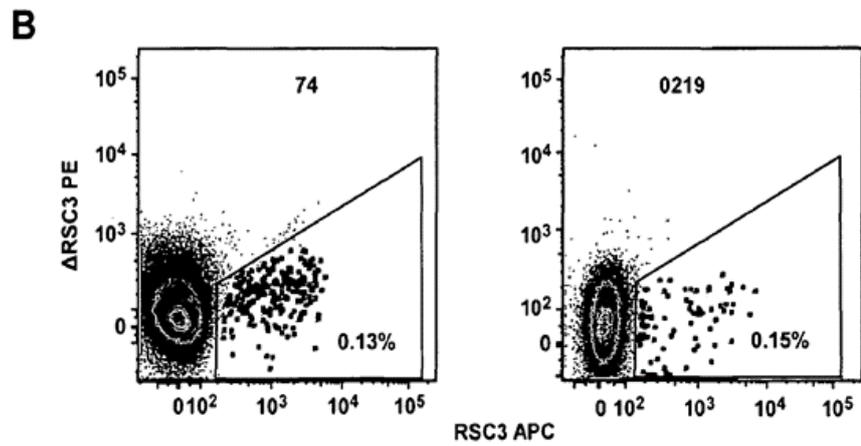
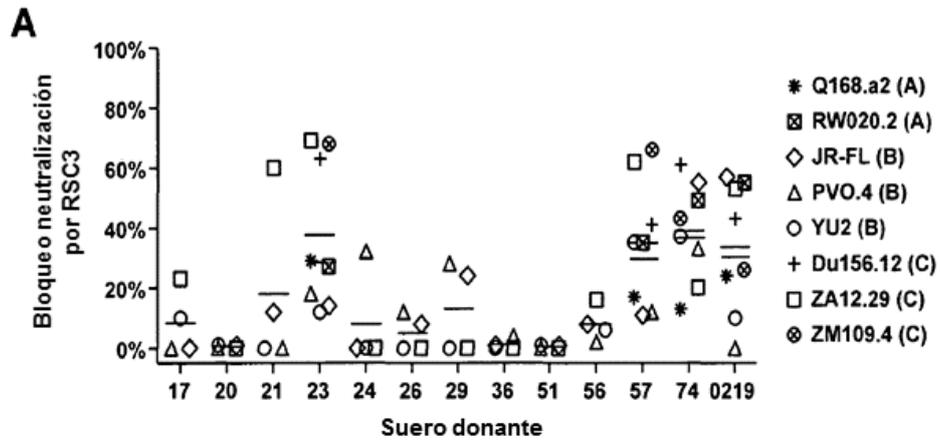


Figura 16



```

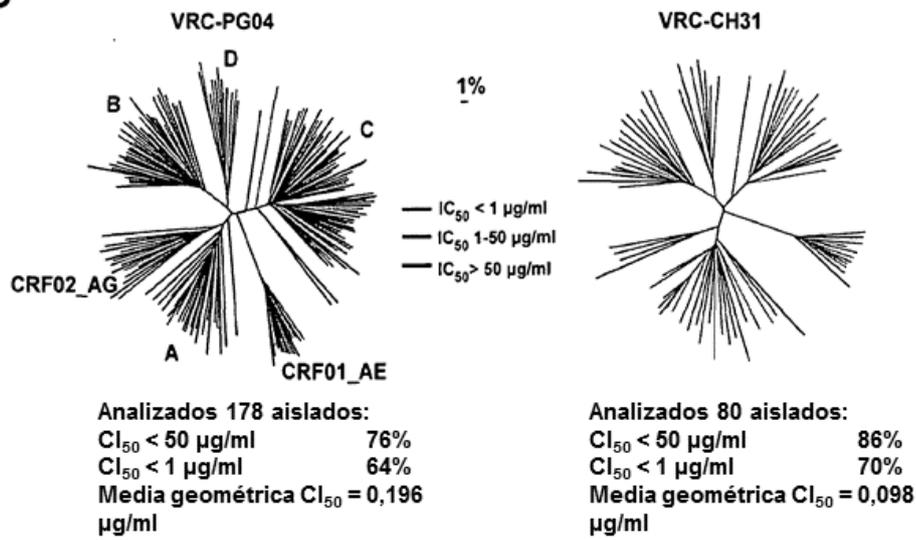
Heavy chain
IGHV1-02*02 -----FR1-----FR2-----FR3-----FR4-----
QVQIVQSGALVKKKSGAVVUSCKASGTFPG.....CDR1.....YDMMVWRQAPQGLLPMKGIINRSGEIVY AGRVGRVTVTR.....DTSIETAKVSELSRISDDTAVYVCAK.....CDR3-----FR4-----
VRC01 QVQIVQSGGGVKKKSGESNEMISCKASGTFPD.....CTIAPVRLALSGPRRPMKGLIKRGLAVNY ARIIDGGRVTVTR.....DIVSDPAFLIARLSITADDTAVYVCRGRKNCYKMDP.EIHKGGGPIVTVSS
VRC02 QVQIVQSGGGVKKKSGESNEMISCKASGTFPD.....CTIAPVRLALSGPRRPMKGLIKRGLAVNY ARIIDGGRVTVTR.....DIVSDPAFLIARLSITADDTAVYVCRGRKNCYKMDP.EIHKGGGPIVTVSS
VRC03 QVQIVQSGAVYITITGSSVPLTSCNAGSDFVFRD.....SIIHMRPLIIPPKQTFMGMITKRIAGAVNY ANGLDGRVTVTR.....DSDSPTAFIARLSITADDTAVYVCRGRKNCYKMDP.EIHKGGGPIVTVSS
VRC-PG04 QVQIVQSGGCVKPKFMSVYVSCRTSEDI FFR.....TELIHMRQAPQGLLPMKGIINRSGEIVY AGRVGRVTVTR.....DSDSPTAFIARLSITADDTAVYVCRGRKNCYKMDP.EIHKGGGPIVTVSS
VRC-PG04B QVQIVQSGGAVKPKFMSVYVSCRTSEDI FFR.....TELIHMRQAPQGLLPMKGIINRSGEIVY AGRVGRVTVTR.....DSDSPTAFIARLSITADDTAVYVCRGRKNCYKMDP.EIHKGGGPIVTVSS
VRC-CH30 QVQIVQSGAVVKKRFGMSVYVSCRTFADDDTSPHMVNPALPHEIHFILRQAPQGLLPMKGIINRSGEIVY AGRVGRVTVTR.....DSDSPTAFIARLSITADDTAVYVCRGRKNCYKMDP.EIHKGGGPIVTVSS
VRC-CH31 QVQIVQSGAVVKKRFGMSVYVSCRTFADDDTSPHMVNPALPHEIHFILRQAPQGLLPMKGIINRSGEIVY AGRVGRVTVTR.....DSDSPTAFIARLSITADDTAVYVCRGRKNCYKMDP.EIHKGGGPIVTVSS
VRC-CH32 QVQIVQSGAAVVRKFGMSVYVSCRTFADDDTSPHMVNPALPHEIHFILRQAPQGLLPMKGIINRSGEIVY AGRVGRVTVTR.....DSDSPTAFIARLSITADDTAVYVCRGRKNCYKMDP.EIHKGGGPIVTVSS
VRC-CH33 QVQIVQSGAAVVRKFGMSVYVSCRTFADDDTSPHMVNPALPHEIHFILRQAPQGLLPMKGIINRSGEIVY AGRVGRVTVTR.....DSDSPTAFIARLSITADDTAVYVCRGRKNCYKMDP.EIHKGGGPIVTVSS
VRC-CH34 QVQIVQSGAAVVRKFGMSVYVSCRTFADDDTSPHMVNPALPHEIHFILRQAPQGLLPMKGIINRSGEIVY AGRVGRVTVTR.....DSDSPTAFIARLSITADDTAVYVCRGRKNCYKMDP.EIHKGGGPIVTVSS

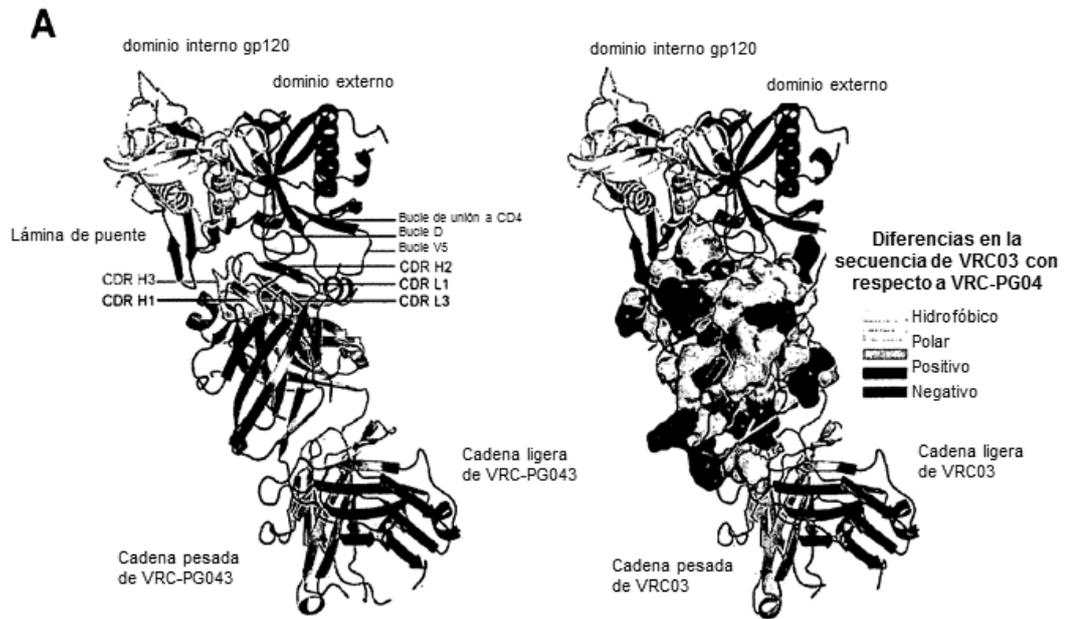
Light chain
IGHV3-11*01 -----FR1-----FR2-----FR3-----FR4-----
EIVLTQSPATLSLSPGERATLISCRNASGVS STLAWYQQKPGQAPRLIIVDASNRATGIPANFSGSGSGDFTLTISLSLQPEDFAVYVCOQ
VRC01 EIVLTQSPGTLISLSPGERTAIISCRTSQYGS..LAWYQQKPGQAPRLIIVDASNRATGIPANFSGSGSGDFTLTISLSLQPEDFAVYVCOQ
VRC02 EIVLTQSPGTLISLSPGERTAIISCRTSQYGS..LAWYQQKPGQAPRLIIVDASNRATGIPANFSGSGSGDFTLTISLSLQPEDFAVYVCOQ
IGHV3-20*01
EIVLTQSPGTLISLSPGERATLISCRNASGVSSTLAWYQQKPGQAPRLIIVDASNRATGIPANFSGSGSGDFTLTISLSLQPEDFAVYVCOQ
VRC03 EIVLTQSPGTLISLSPGERATLISCRNASGVSSTLAWYQQKPGQAPRLIIVDASNRATGIPANFSGSGSGDFTLTISLSLQPEDFAVYVCOQ
VRC-PG04 EIVLTQSPGTLISLSPGERATLISCRNASGVSSTLAWYQQKPGQAPRLIIVDASNRATGIPANFSGSGSGDFTLTISLSLQPEDFAVYVCOQ
VRC-PG04B EIVLTQSPGTLISLSPGERATLISCRNASGVSSTLAWYQQKPGQAPRLIIVDASNRATGIPANFSGSGSGDFTLTISLSLQPEDFAVYVCOQ
IGHV1-33*01
DIQMTQSPSSLSASVGRVITITCOASQDINSY LMMYQQKPKPKAPLLIIVDASNLETVGVSRFSRSGSGDFTLTISLSLQPEDFAVYVCOQ
VRC-CH30 DIQMTQSPSSLSASVGRVITITCOASRIGICD LMMYQQKPKPKAPLLIIVDASNLETVGVSRFSRSGSGDFTLTISLSLQPEDFAVYVCOQ
VRC-CH31 DIQMTQSPSSLSASVGRVITITCOASRIGICD LMMYQQKPKPKAPLLIIVDASNLETVGVSRFSRSGSGDFTLTISLSLQPEDFAVYVCOQ
VRC-CH32 DIQMTQSPSSLSASVGRVITITCOASRIGICD LMMYQQKPKPKAPLLIIVDASNLETVGVSRFSRSGSGDFTLTISLSLQPEDFAVYVCOQ
VRC-CH33 DIQMTQSPSSLSASVGRVITITCOASRIGICD LMMYQQKPKPKAPLLIIVDASNLETVGVSRFSRSGSGDFTLTISLSLQPEDFAVYVCOQ
VRC-CH34 DIQMTQSPSSLSASVGRVITITCOASRIGICD LMMYQQKPKPKAPLLIIVDASNLETVGVSRFSRSGSGDFTLTISLSLQPEDFAVYVCOQ

```

Figura 17C

D





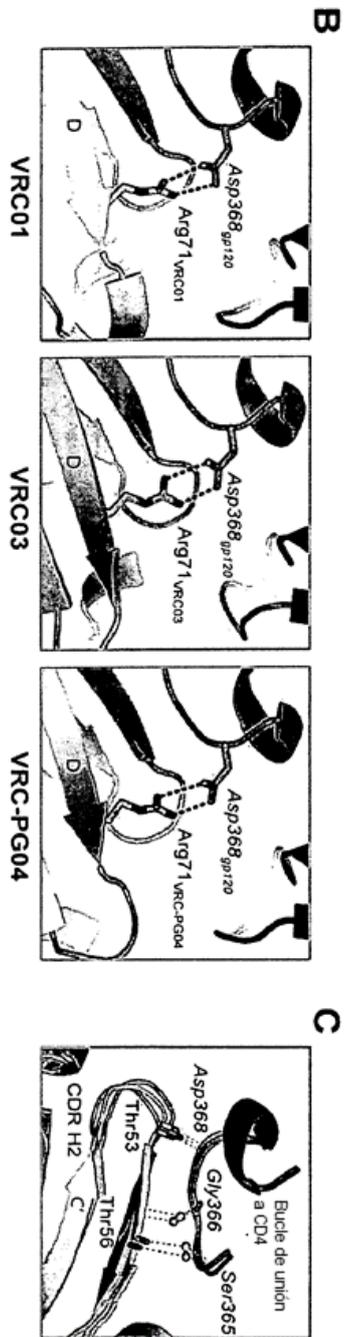
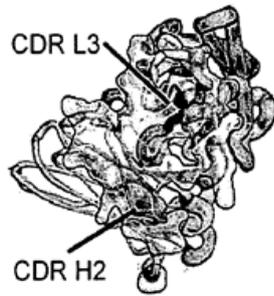
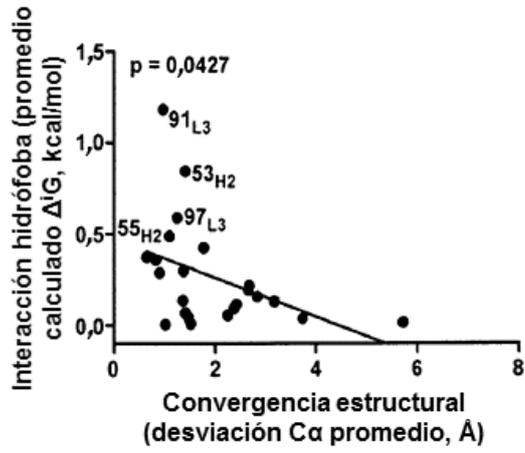


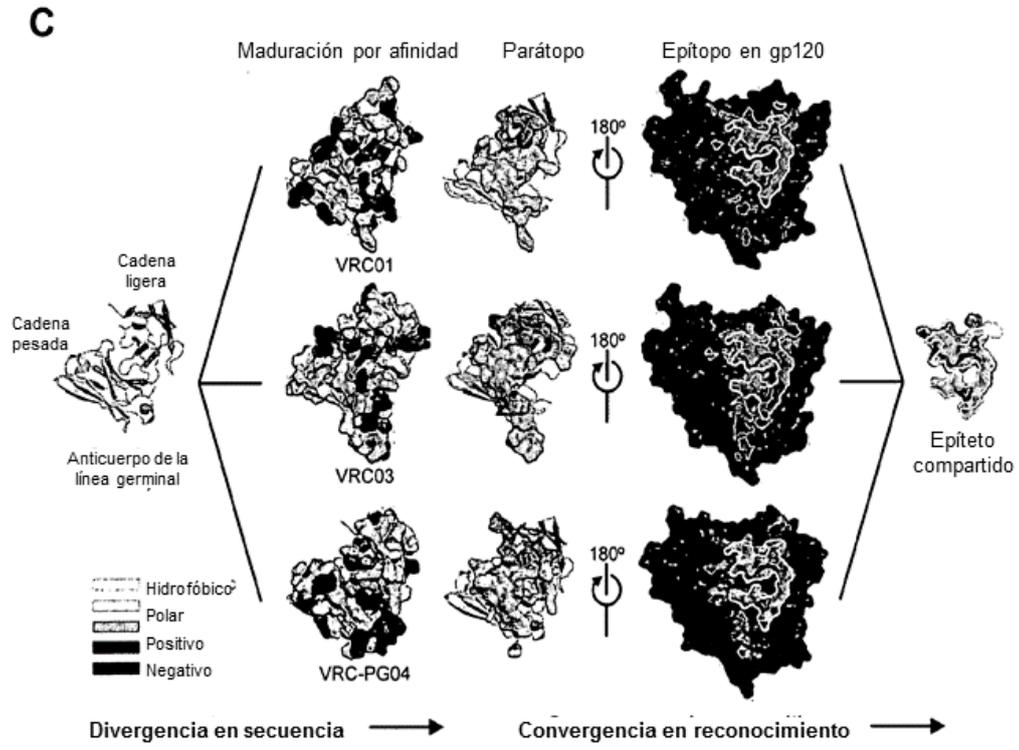
Figura 189 B-C

A Parátopo

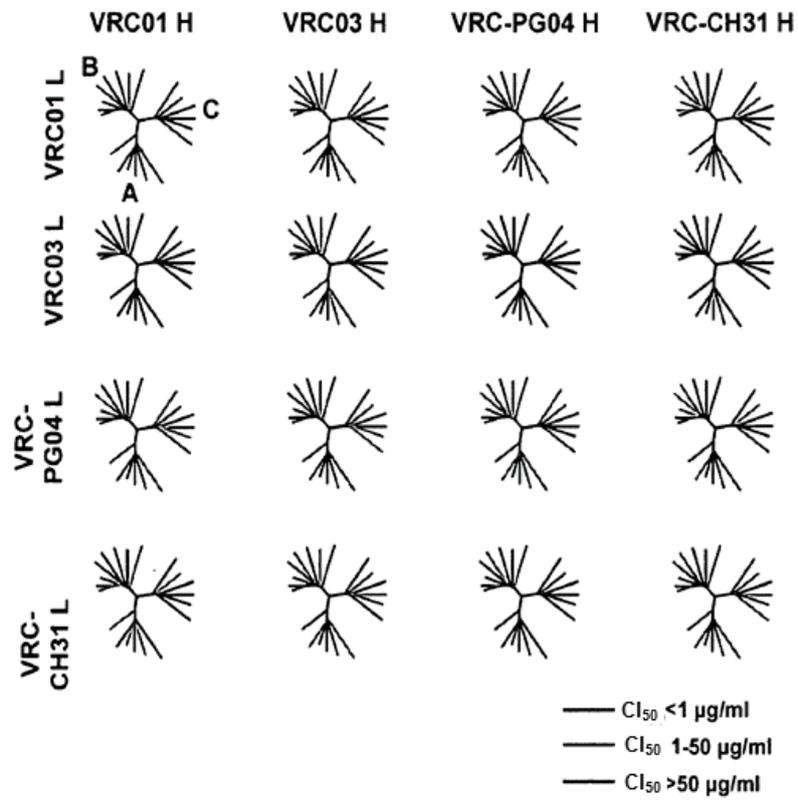


Anticuerpos tipo VRC01



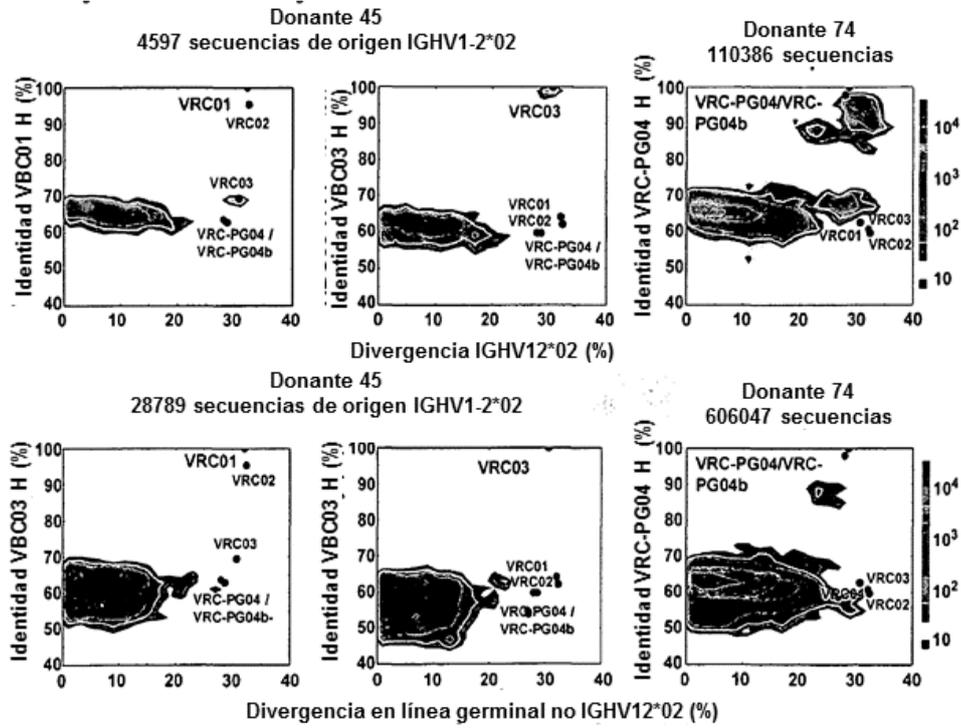


A
Complementación cadena ligera/pesada

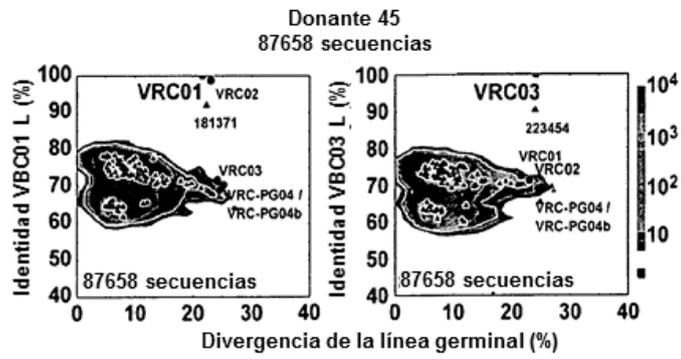


B

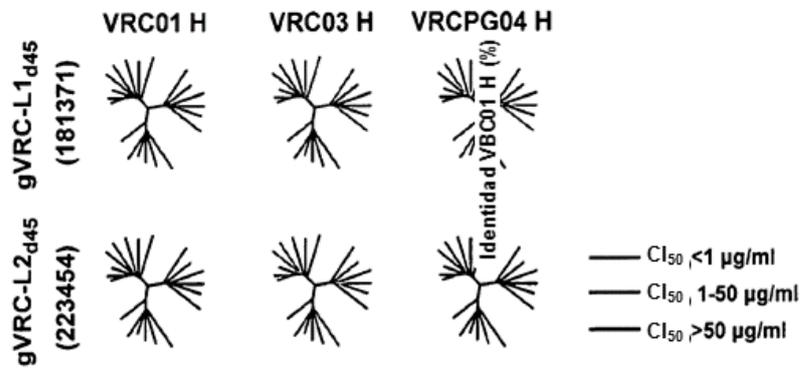
Antibodioma cadena pesada



C Antibioma cadena ligera

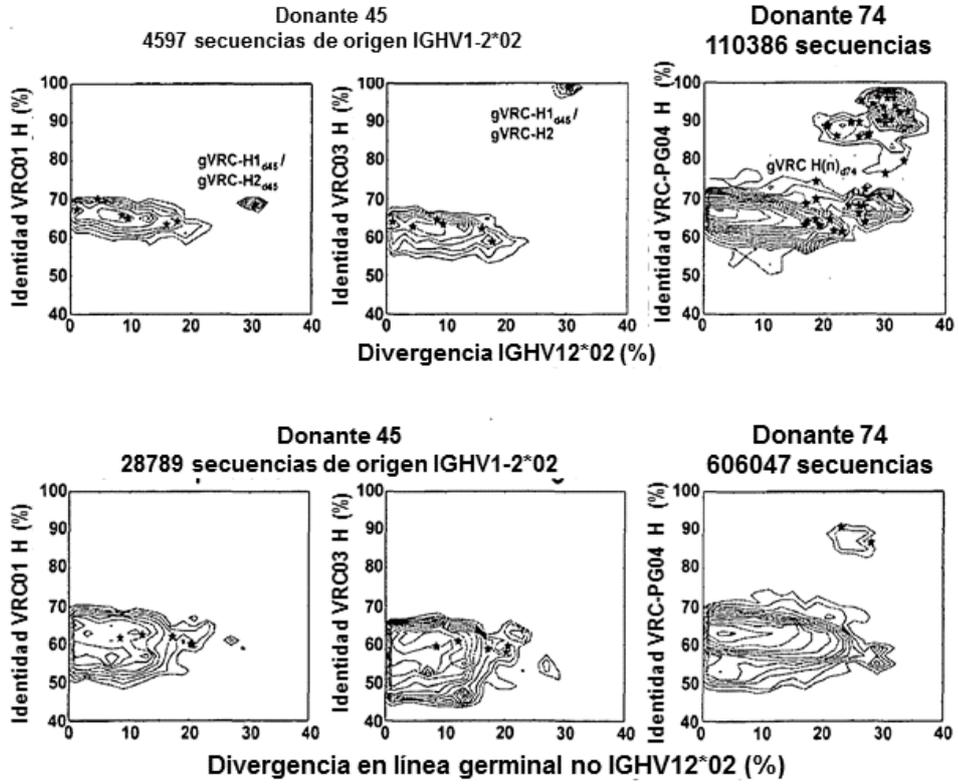


D Neutralización cadena ligera



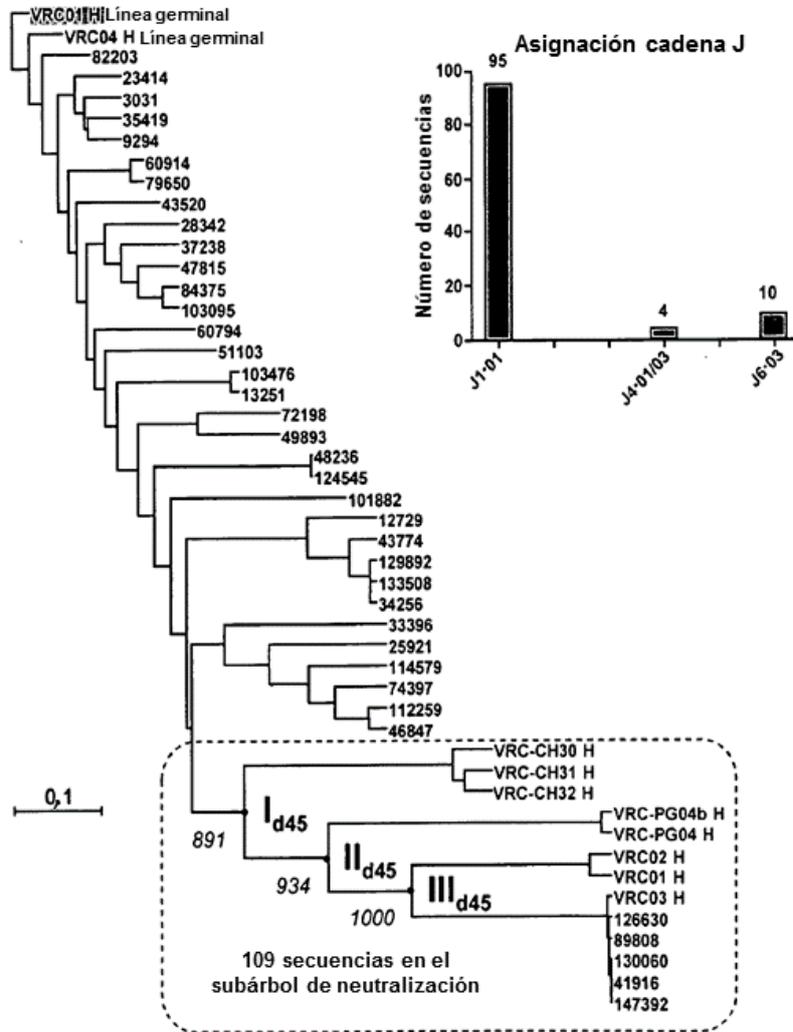
E

Neutralización cadena pesada



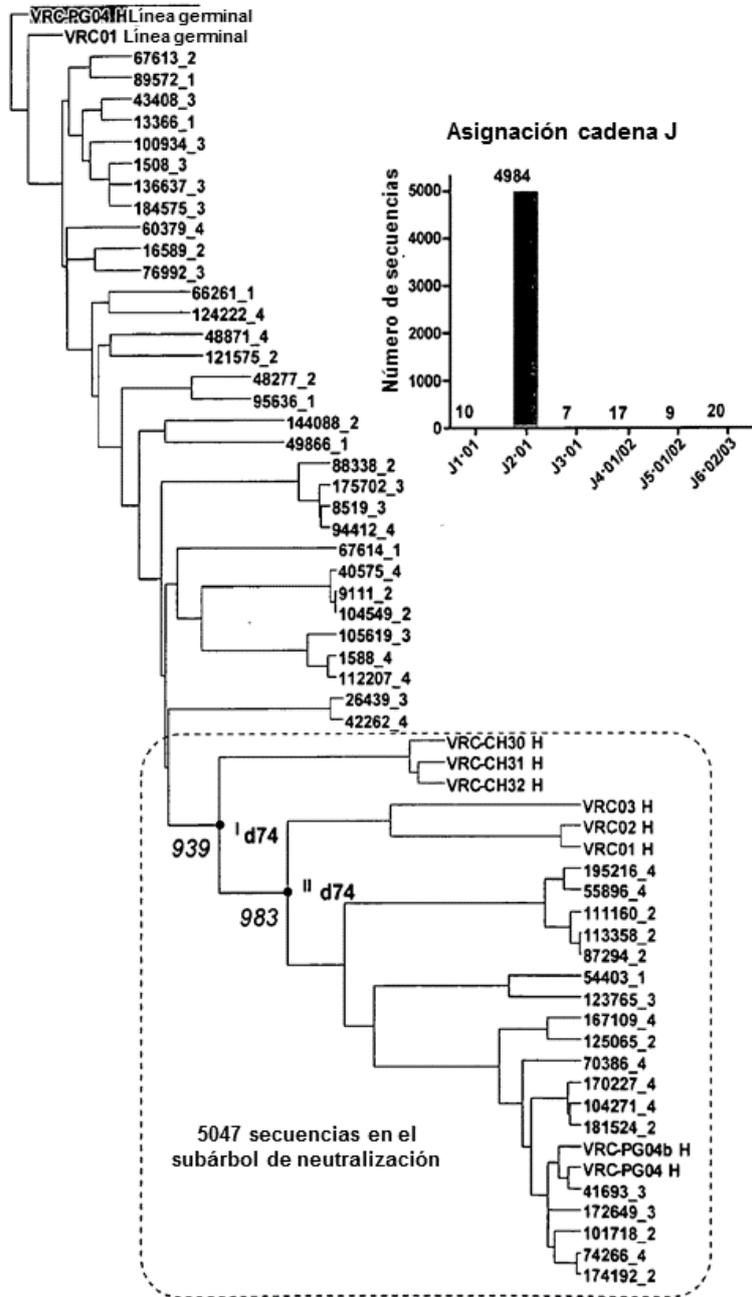
A

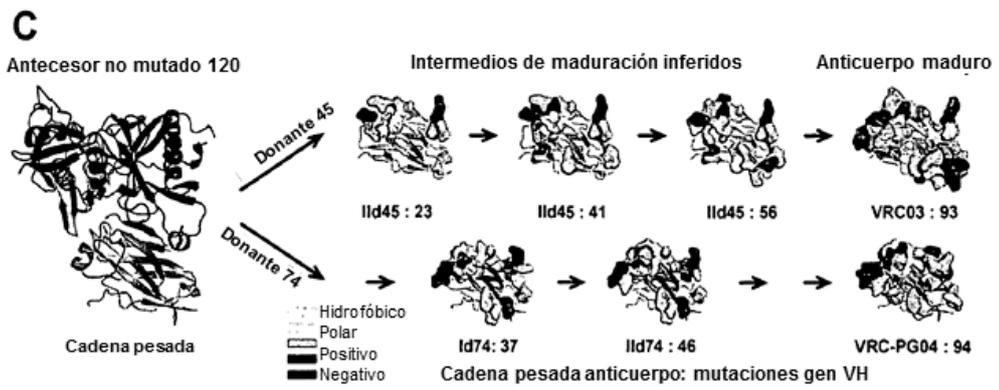
Donante 45 H 2008-4597 secuencias de origen IGHV1-2*02



B

Donante 74 H 2008-110.386 secuencias de origen IGHV1-2*02





A

Antibodioma de la cadena pesada
de IGHV1-2*02 con valoración por
rejilla de neutralización

Donante 74 – 1.110.386 secuencias

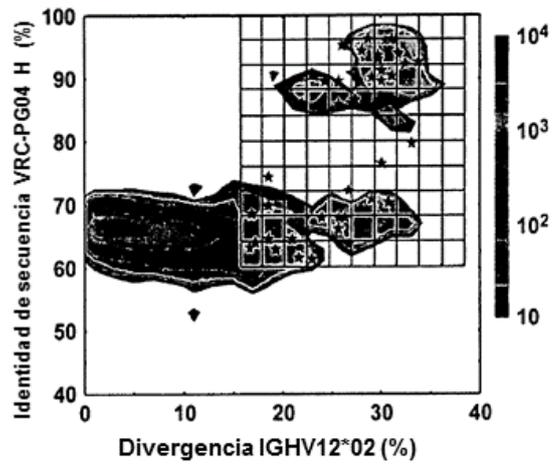


Figura 22B

