

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 631 608**

51 Int. Cl.:

C07K 14/16 (2006.01)

C12N 7/00 (2006.01)

A61K 39/21 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.06.2013** **E 13003261 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.04.2017** **EP 2679596**

54 Título: **Variante de la glicoproteína Env del VIH-1**

30 Prioridad:

27.06.2012 US 201261664990 P

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

01.09.2017

73 Titular/es:

**INTERNATIONAL AIDS VACCINE INITIATIVE
(100.0%)
125 Broad Street, 9th Floor
New York, NY 10004, US**

72 Inventor/es:

**HOFFENBERG, SIMON;
PARKS, CHRIS y
CARPOV, ALEXEI**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 631 608 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

Variante de la glicoproteína Env del VIH-1

Campo de la invención

5 Esta memoria descriptiva se refiere a una nueva glicoproteína de la envoltura del VIH-1 que puede utilizarse como un inmunógeno de la vacuna del VIH-1, como mimético del trímero de la Env nativa, para la identificación de moléculas pequeñas para su uso como inmunógeno que se une a anticuerpos neutralizantes de amplio espectro del VIH-1 específicos, para la identificación de moléculas pequeñas para su uso como un compuesto antiviral que se une a monómeros y/o trímeros de la glicoproteína de la envoltura del VIH-1 específicos, como antígenos para cristalización y para la identificación de anticuerpos neutralizantes de amplio espectro.

Antecedentes de la invención

10 El SIDA, o Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida, está causado por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y se caracteriza por varias características clínicas incluyendo síndrome consuntivo, degeneración del sistema nervioso central e inmunosupresión profunda que es el resultado de infecciones oportunistas y neoplasias malignas. El VIH es un miembro de la familia de los lentivirus de retrovirus animales, que incluyen el virus visna de ovejas y los virus de la inmunodeficiencia bovina, felina y de simio (SIV). Hasta el momento se han identificado dos tipos estrechamente relacionados del VIH, denominados VIH-1 y VIH-2, de los cuales el VIH-1 es con mucho la causa más común de SIDA. Sin embargo, el VIH-2, que difiere en su estructura genómica y antigenicidad, causa un síndrome clínico similar.

15 Una partícula infecciosa del VIH consiste en dos hebras idénticas de ARN, cada una de aproximadamente 9,2 kb de longitud, empaquetadas dentro de un núcleo de proteínas virales. Esta estructura de núcleo está rodeada por una envoltura de dos capas de fosfolípidos derivada de la membrana de la célula hospedadora que también incluye proteínas de membrana codificadas por el virus (Abbas et al., Cellular and Molecular Immunology, 4^a edición, W.B. Saunders Company, 2000, pág. 454). El genoma del 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 viral sirven como sitios de unión para las proteínas reguladoras transcripcionales del hospedador y regulan la integración viral en el genoma del hospedador, la expresión génica viral y la replicación viral.

20 El genoma del VIH codifica varias proteínas estructurales. El gen *gag* codifica proteínas estructurales de la nucleocápside, del núcleo y de la matriz. El gen *pol* codifica las enzimas transcriptasa inversa (RT), integrasa (IN) y proteasa viral (PR) necesarias para la replicación viral. El gen *tat* codifica una proteína que se requiere para la elongación de los transcritos virales. El gen *rev* codifica una proteína que promueve la exportación nuclear de ARN virales cortados y empalmados incompletos o no cortados y empalmados. El producto del gen *vif* aumenta la infectividad de las partículas virales. El producto del gen *vpr* promueve la importación nuclear de ADN viral y regula la detención del ciclo celular G2. Los genes *vpu* y *nef* codifican proteínas que regulan a la baja la expresión de la célula hospedadora CD4 y mejoran la liberación del virus de las células infectadas. El gen *env* codifica la glicoproteína de la envoltura viral que se traduce como un precursor de 160 kilodaltons (gp160) y que se escinde por una proteasa celular para producir la glicoproteína externa de la envoltura de 120 kDa (gp120) y la glicoproteína transmembrana de la envoltura de 41 kDa (gp41), las cuales son necesarias para la infección de las células (Abbas et al., Cellular and Molecular Immunology, 4^a edición, W.B. Saunders Company, 2000, págs. 454-456). gp140 es una forma modificada de la glicoproteína Env, que contiene la porción de la glicoproteína de la envoltura de 120 kDa externa y la parte extracelular de la porción gp41 de Env y tiene características tanto de gp120 como de gp41. El gen *nef* está conservado entre los lentivirus de los primates y es uno de los primeros genes virales que se transcribe tras la infección. *In vitro* se han descrito varias funciones, incluyendo la regulación a la baja de la expresión en la superficie de CD4 y de MHC de clase I, la alteración de la señalización y activación de linfocitos T y la potenciación de la infectividad viral.

25 La infección por el VIH se inicia con la unión de gp120 de la partícula viral a las moléculas receptoras de CD4 y quimiocina (por ejemplo, CXCR4, CCR5) de la membrana celular de células diana tales como los linfocitos T CD4⁺, macrófagos y células dendríticas. El virus unido se fusiona con la célula diana y se transcribe inversamente el genoma del ARN. El ADN viral resultante se integra en el genoma celular, donde dirige la producción de nuevo ARN vírico y con ello proteínas virales y nuevos viriones. Estos viriones brotan de la membrana celular infectada y establecen infecciones productivas en otras células. Este proceso también destruye a la célula originalmente infectada. El VIH también puede destruir células indirectamente porque el receptor CD4 de los linfocitos T no infectados tiene una fuerte afinidad por gp120 expresada en la superficie de las células infectadas. En este caso, las células no infectadas se unen, a través de la interacción receptor de CD4-gp120, a las células infectadas y se fusionan para formar un sincitio, el cual no puede sobrevivir. La destrucción de los linfocitos T CD4⁺, que son críticos para la defensa inmunitaria, son una causa importante de la disfunción inmunitaria progresiva que es el sello distintivo de la progresión de la enfermedad del SIDA. La pérdida de linfocitos T CD4⁺ perjudica seriamente la capacidad del cuerpo para combatir a la mayoría de los invasores, pero tiene un impacto particularmente grave en las defensas contra virus, hongos, parásitos y ciertas bacterias, incluyendo micobacterias.

La investigación sobre la glicoproteína Env ha demostrado que el virus tiene muchos mecanismos protectores eficaces con pocas vulnerabilidades (Wyatt y Sodroski, *Science*. 1998 Jun 19; 280(5371):1884-8). Para la fusión con sus células diana, el VIH-1 utiliza un complejo de Env trimérico que contiene las subunidades gp120 y gp41 (Burton et al., *Nat Immunol*. 2004 Mar; 5(3):233-6). El potencial de fusión del complejo Env es desencadenado por el acoplamiento del receptor CD4 y un co-receptor, habitualmente CCR5 o CXCR4. Los anticuerpos neutralizantes parecen funcionar bien mediante la unión al trímero maduro en la superficie del virión y evitando eventos iniciales de compromiso del receptor, o por unión después de la unión del virión e inhibición del procedimiento de fusión (Parren y Burton, *Adv Immunol*. 2001;77: 195-262). En este último caso, los anticuerpos neutralizantes pueden unirse a epítopos cuya exposición aumenta o se desencadena mediante la unión al receptor. Sin embargo, dados los potenciales efectos antivíricos de los anticuerpos neutralizantes, no es inesperado que el VIH-1 haya desarrollado múltiples mecanismos para protegerse de la unión al anticuerpo (Johnson & Desrosiers, *Annu Rev Med*. 2002; 53:499-518).

La mayoría de las vacunas experimentales del VIH-1 ensayadas en primates humanos y/o no humanos sugieren que una vacuna exitosa incorporará inmunógenos que provocan anticuerpos neutralizantes de amplio espectro (bNab) y una inmunidad celular robusta. La glicoproteína de la envoltura del VIH-1 (Env) es la principal proteína viral implicada en la entrada del virus y también es la diana primaria para neutralizar los anticuerpos, pero debido a las estrategias de evasión inmunitaria y a la variabilidad extrema 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, et al. *J Intern Med*. 2007 262:26-43, Karlsson Hedestam GB, et al *Nat Rev Microbiol*. 2008 6:143-55).

La capacidad de obtener anticuerpos neutralizantes de amplio espectro y potentes es un reto importante en el desarrollo de una vacuna del VIH-1. Concretamente, el VIH-1 ha desarrollado una serie impresionante de estrategias para evadir la neutralización mediada por anticuerpos, los bNab se desarrollan con el tiempo en una proporción de individuos infectados por el VIH-1 y un puñado de anticuerpos monoclonales neutralizantes de amplio espectro se han aislado de donantes infectados con el clado B. Estos anticuerpos tienden a mostrar un menor espectro de neutralización y potencia frente a los virus que no son del clado B y reconocen epítopos sobre el virus que hasta el momento no han logrado provocar respuestas neutralizantes de amplio espectro cuando se incorporan en una amplia gama de inmunógenos. Presumiblemente, debido a la capacidad de estos bNab para reconocer dianas escondidas conservadas en Env del VIH que son inaccesibles por anticuerpos provocados o difíciles de rediseñar con precisión y presentar al sistema inmunitario.

Recientemente, utilizando una selección de micro-neutralización sensible de alto rendimiento de sobrenadantes de aproximadamente 30.000 linfocitos B de memoria IgG+ de un donante africano infectado con el clado A del VIH-1, los solicitantes identificaron dos nuevos bNab PG9 y PG16 que son anticuerpos neutralizantes de amplio espectro y excepcionalmente potentes (Walker L, Phogat S, et al. *Science*. 2009;326:285-9. Epub 2009 Sep 3). Estos anticuerpos reconocen una nueva diana de vacuna conservada, pero accesible, (que consta de elementos conservados en los bucles variables 2 y 3) de Env y que muestran una unión preferente al trímero del VIH (Modelo de epítopos PG9 y 16 en el trímero del VIH-1). Cuando se ensayó la unión, estos anticuerpos no mostraron unión a muchos trimeros de Env del VIH solubles diseñados empíricamente (Env gp140) y que se cree que imitan a las espículas de la Env del VIH-1, lo que sugiere que estos diseños de la Env son incorrectos o se unen en una forma no reconocida por PG9 y PG 16.

El documento WO 2011/109511 A2 trata de la identificación de las isoformas de la envoltura del VIH-1.

Finzi et al., *J. Virol. Meth*. 2010, Vol. 168, No. 1-2, pp. 155-161 describe la caracterización conformacional de dímeros de gp120 del VIH-1 unidos por puentes disulfuros aberrantes secretados por células que presentan sobreexpresión.

Sumario de la invención

Basándose en la propiedad de unión y amplitud/potencia de los nuevos anticuerpos para neutralizar > 75 % de los virus probados, los solicitantes postulan que PG9, PG16 y ciertos anticuerpos específicos del sitio de unión a CD4 reconocen una diana de vacuna relevante en la Env nativa en la superficie del virus y la identificación de las glicoproteínas de la envoltura de VIH-1 que presentan estas dianas en formas solubles de la envoltura de del VIH-1 serían buenas vacunas candidatas del VIH-1 para provocar anticuerpos similares a PG9 y PG16 y también para usarse como reactivos para cartografía y estudios de cristalización.

Las glicoproteínas de la envoltura identificadas como parte de la presente invención muestran una unión significativamente mejor con los nuevos anticuerpos neutralizantes de amplio espectro identificados PG9 y/o PG16. Estas son las únicas formas solubles de la envoltura identificadas que muestran una unión tan notable a PG9 y PG16. Las glicoproteínas de la envoltura Env tienen valor (a) como reactivos para la detección de anticuerpos neutralizantes de amplio espectro, tales como, pero sin limitarse a, PG9 y PG16, (b) como reactivos para la detección de moléculas pequeñas que compiten por la unión de anticuerpos neutralizantes de amplio espectro, tales como pero sin limitarse a, PG9 y PG16, (c) como monómero y trímero de la envoltura nativa para estudios de cristalización y (d) como inmunógenos en diferentes formas para usar como componentes de vacuna del VIH-1, por ejemplo, para obtener anticuerpos neutralizantes de amplio espectro.

- Las glicoproteínas de la envoltura solubles pueden aislarse a partir de virus del Clado A del VIH-1, virus del Clado B del VIH-1, virus del Clado C del VIH-1, pseudovirus del Clado A del VIH-1, pseudovirus del Clado B del VIH-1 o pseudovirus del Clado C del VIH-1. Las glicoproteínas de la envoltura solubles pueden aislarse del virus 6535, del virus 13095, del virus 16055, del virus 25710, del virus 25925, del virus CAAN o del virus Zm109F. Las secuencias de estos virus están disponibles en la base de datos del NCBI y los solicitantes las han usado para generar proteínas Env recombinantes con secuencias únicas en las que los solicitantes han modificado la secuencia líder, añadido His-tag y terminado la secuencia antes del sitio de escisión para gp120 y antes de la transmembrana para gp140. Las secuencias de ADN son únicas ya que están optimizadas dado que los codones están basados en codones de mamífero para la expresión en células de mamífero.
- Dentro de la presente memoria descriptiva, las glicoproteínas de la envoltura solubles tienen secuencias sustancialmente similares a las secuencias de proteínas representadas en las Figs. 2A-2J. Dentro de la presente memoria descriptiva, la glicoproteína de la envoltura soluble tiene una secuencia de consenso sustancialmente similar a la secuencia consenso representada en las FIGS. 2A-2J.
- De acuerdo con la presente invención, la glicoproteína de la envoltura soluble puede aislarse de un virus BG505 y tener una mutación L111A y opcionalmente T332N.
- La presente memoria descriptiva también abarca un mimético del trímero de la glicoproteína de la envoltura del VIH-1 soluble estable.
- La presente invención implica el uso del monómero de gp120 de Env identificado para la selección de moléculas pequeñas que se unen a PG9 y anticuerpos que se unen a sitios CD4 y pueden usarse como inmunógenos.
- Otra realización abarca el uso del monómero de gp120 de Env identificado para la selección de moléculas pequeñas que se unen al sitio de unión a PG9 o al sitio de unión de anticuerpos que se unen a sitios CD4 sobre el monómero e inactivan el virus VIH-1 de manera similar a como lo hacen el anticuerpo PG9 y los anticuerpos que se unen a sitios CD4.
- Una realización adicional implica el uso del mimético del trímero de Env gp140 descubierto para la selección de moléculas pequeñas que se unen a anticuerpos PG9, PG16 y anticuerpos que se unen a sitios de unión a CD4 y pueden usarse como inmunógeno.
- Una realización adicional implica el uso del monómero y del trímero para cartografiar la especificidad de PG9 y PG16 en sueros humanos y animales.
- Otra realización incluye la identificación de anticuerpos similares a PG9 y PG16 usando el monómero y trímero de Env del VIH-1 identificados.
- Estas y otras realizaciones se desvelan o son obvias y se incluyen en la siguiente descripción detallada.

Breve descripción de los dibujos

- La siguiente descripción detallada, proporcionada como ejemplo, pero que no se pretende que limite la invención solamente a las realizaciones específicas descritas, puede entenderse mejor junto con los dibujos adjuntos, en los que:
- La Figura 1 representa la unión mediante ELISA de la glicoproteína de la envoltura gp120 recombinante BG505 del VIH-1 del clado A y el árbol filogenético. El ELISA mostró una unión significativa de los anticuerpos PG9, PG16 y b12 a gp120 BG505. La secuencia de la proteína BG505 se seleccionó mediante una estrategia bioinformática que identificó la secuencia progenitora próxima a Env del clado del VIH-1 en la base de datos de proteína Env. Las secuencias de Env del VIH-1 del clado A del donante (V1_011) que dieron lugar a los anticuerpos PG9 y PG16 se usaron para buscar en la base de datos de la proteína Env de VIH-1.
- Las Figuras 2A-9J representan la alineación de las secuencias gp120 de la proteína ENV de VIH-1 de ligantes de PG9 buenos (letras rojas), moderados (verdes) y no ligantes y se sometidas a análisis de logs en la web. Los restos importantes para la unión de PG9 y PG16 están incluidos en unos cuadros formando columnas verticales situadas en el tallo de los bucles variables V1/V2, bucle V2 y V3. Los restos (numeración HxBC2) en las posiciones 156, 158, 159, 160, 162 en el tallo V1/V2, 168, 176, 181 en V2 y 299, 305, 307, 309, 317, 318 en el bucle V3 están altamente conservados y se encuentran en todas las Env independientemente de su neutralización o unión por anticuerpos PG. La Fig. 9J representa el de logs en la web de las secuencias Env del VIH-1 en el bucle variable 1, 2 y 3 alineadas en las Figs. 2A-2I, el tamaño del resto representa la conservación. Todos los restos implicados en la unión de PG9 y PG16 se indican con “*”.
- La Figura 3 representa un mutante L111A de BG505 que tiene una agregación menor que la proteína original. Las muestras en forma no reducida (NR) o reducida (Red) se separaron por SDS-PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida). Cada muestra contiene 5 µg de proteína. Los solicitantes intentaron la purificación de la gp120 BG505 pero se encontraron con una proteína que estaba muy agregada y de baja actividad. Se preparó un mutante de la BG505 con un patrón de agregación inferior pronosticado (Finzi A et al., J Virol Methods. 2010

Sep; 168(1-2):155-61) y se expresó en células HEK 293S y 293T.

La Figura 4 representa la unión a gp120 BG505 L111A en sobrenadantes de cultivo celular. La unión del anticuerpo a gp120 BG505 L111A secretada en medio de cultivo celular se midió mediante ensayo inmunoenzimático ligado a enzimas (ELISA) en microplacas de 96 pocillos. El conjunto de anticuerpos utilizados para caracterizar la antigenicidad incluía anticuerpos específicos del trímero (PG9, PG16), anticuerpos específicos de unión a CD4 (CD4bs) (b6, b12, VRC01, VRC04/PGV04) y la serie PGT (PGT121-130).

La Figura 5 representa la purificación de BG505 en columnas de lectina y His-Trap. La proteína modificada puede purificarse por dos procedimientos de cromatografía de afinidad diferentes sin dañarse y conservar su capacidad antigénica. El ensayo se realizó mediante inmunotransferencia Western con anticuerpo neutralizante anti-His, IgG específica de manosa de amplio espectro, 2G12 y un grupo de inmunoglobulinas de individuos VIH-positivos (HIVIG). SDS-PAGE: tinción de proteínas (5 microgramos de proteína por pocillo) y transferencia Western (0,5 microgramos de proteína por pocillo) -detección de HIVIG, 2G12 y anti-His. La gp120 BG505 L111A era de células 293S.

La Figura 6 representa un perfil de antigenicidad por ELISA de BG505 L111A purificada mediante 2 métodos cromatográficos diferentes. La unión subsiguiente de los anticuerpos no se pudo distinguir por ELISA.

La Figura 7 representa la unión del anticuerpo a la proteína gp120 BG505 L111A purificada. Las proteínas que portaban la mutación L111A se purificaron con éxito tanto a partir de células 293S como 293T mediante columna GNL y conservaron su antigenicidad que fue confirmada por ELISA de proteínas purificadas. Con la excepción de algunos anticuerpos PGT, los anticuerpos más neutralizantes se unen a gp120 BG505 L111A. PGT135, 136 y 141 no se unen a la gp120 BG505.

La Figura 8 representa la unión del anticuerpo específica del cebador y específica de CD4bs al trímero BG505 recombinante. Debido a que las proteínas nativas de la envoltura del VIH existen como una espícula en forma de trímero en la superficie del virus, los solicitantes fabricaron trímeros recombinantes para probar el efecto de la mutación. Esta figura muestra que BG505 L111A conserva la capacidad de unir anticuerpos anti-gp120 en una conformación de trímero. El trímero se preparó añadiendo el motivo de trimerización GCN4 a la molécula gp140 BG505 L111A.

La Figura 9 representa los anticuerpos PGT que se unen al trímero BG505 L111A gp140 GCN4L4. Una observación similar fue válida para un grupo de anticuerpos neutralizantes PGT de amplio espectro.

La Figura 10 representa un ensayo de neutralización (comparación de los pseudovirus BG505 WT y BG505 L111A). El ensayo de neutralización se realizó con pseudovirus BG505 WT y L111A y un panel de anticuerpos neutralizantes humanos de amplio espectro. La mayoría de los anticuerpos neutralizan ambas formas de virus en la misma medida. Esta es una clara indicación de que la mutación L111A no pone en peligro la gp160 totalmente funcional.

La Figura 11 representa los perfiles de unión específicos de clados y mutantes por citofluorimetría. Se realizó otro ensayo de la integridad de la proteína de la envoltura gp160 con la mutación L111A con gp160 expresada en células HEK 293T mediante transfección transitoria con un ADN plasmídico. En este estudio se midió la unión de un panel de anticuerpos neutralizantes usando citofluorimetría (FACS). BG505 tenía el patrón de unión más amplio comparado con el Clado B (JR-FL) y el Clado C (16055). El patrón de unión a BG505WT y L111A fue similar.

La Figura 12 representa un ensayo de Neutralización con sueros de conejos inmunizados con gp120 BG505 L111A. Este estudio se realizó mediante la inmunización de conejos utilizando la estrategia de sensibilización-refuerzo. En este experimento los solicitantes usaron dos inmunizaciones de ADN (sensibilización 2X) y un refuerzo con proteínas con gp120 BG505 L111A. Los antisueros de los conejos del experimento se diluyeron y se aplicaron en el ensayo de neutralización de pseudovirus. Los resultados se muestran como títulos de IC50. Los conejos que fueron sensibilizados con ADN y reforzados con proteína desarrollaron actividad de neutralización frente a los pseudovirus del Clado A, B y C.

La Figura 13 representa la unión a gp120 BG505 L111A. La unión del anticuerpo a gp120 BG505 L111A secretada en medio de cultivo celular se midió mediante ensayo inmunoenzimático ligado a enzimas (ELISA) en microplacas de 96 pocillos. El conjunto de anticuerpos utilizados para caracterizar la antigenicidad incluía anticuerpos específicos del trímero (PG9, PG16), anticuerpos específicos del sitio de unión a CD4 (CD4bs) (b6, b12, VRC01, VRC04/PGV04) y la serie PGT (PGT121-136). Los anticuerpos que demostraron diferencia en las propiedades de unión se muestran en rojo.

Descripción detallada

Se usaron anticuerpos neutralizantes de amplio espectro PG9 y PG16 para cribar y seleccionar cepas aisladas de VIH-1 de un panel consistente en sesenta y cuatro aislados virales del clado B y C de VIH-1 por su capacidad para neutralizar y unir la forma soluble de la glicoproteína de la envoltura del VIH-1. Los solicitantes identificaron nueve envolturas del VIH-1 que fueron neutralizadas y mostraron unión por los bNab PG9 y/o PG16. Dos de las env del VIH-1 solubles DU422 (clado C) e YU2 (clado B) ya estaban identificados y descritas (Walker L, Phogat S, et al. *Sciencie*. 2009; 326:285-9. Epub 2009 Sep 3). Como parte de la presente invención, los Solicitantes identificaron tres nuevos Env solubles del VIH-1 cada uno de aislados del virus del clado B y del clado C del VIH-1 que muestran unión al bNab PG9. Además, los solicitantes identificaron una Env soluble del clado C del VIH-1 que mostró unión a ambos bNab, PG9 y PG16. Las Env identificadas como parte de la presente invención muestran una unión significativamente mejor a los bNabs PG9 y PG16 en comparación con las env DU422 y YU2. Estas Env recién identificadas son las únicas formas solubles de Env identificadas hasta la fecha que muestran una unión tan notable

a PG9 y/o PG16. Además de la identificación de gp120 soluble que muestra una unión significativa a PG9, los solicitantes identificaron un mimético de las moléculas del trímero de la envoltura nativo gp140, que muestra unión significativa tanto a PG9 como a PG 16.

Estas Env pueden tener las siguientes utilidades:

- 5 Reactivos para la detección de nuevos anticuerpos neutralizantes de amplio espectro como PG9 y PG16, cartografía de sueros humanos con amplia actividad sérica neutralizante y sueros animales después de estudios de inmunización
 Para la detección de moléculas pequeñas que compiten por la unión de anticuerpos neutralizantes de amplio espectro, tales como PG9 y PG16. La molécula pequeña identificada podría ser utilizada como inmunógeno o compuestos antivirales
- 10 Los estudios de cristalización con PG9 y PG16 unido a monómero para determinar la superficie molecular exacta en la que PG9 y PG16 se unen para diseñar nuevos inmunógenos del VIH-1
 Los estudios de cristalización con el trímero unido a PG9 y PG16 y cualquier otro ligando para determinar la estructura exacta de un trímero Env nativo
- 15 Inmunógenos en diferentes formas para utilizar como componentes de la vacuna del VIH-1 para provocar la producción de bNab. Las diferentes formas de la envoltura del VIH-1 se utilizarán en una sensibilización, como ADN/vector que expresa la proteína/proteína y como un refuerzo como proteína. Las envolturas también podrían usarse como inmunógeno particulado por reticulación con partículas virales tales como Qbeta, virus del mosaico del caupí, CRM, HPV, HBsAg, etc.

- 20 Las glicoproteínas de la envoltura solubles pueden aislarse a partir de virus del Clado A del VIH-1, virus del Clado B del VIH-1, virus del Clado C del VIH-1, pseudovirus del Clado A del VIH-1, pseudovirus del Clado B del VIH-1 o pseudovirus del Clado C del VIH-1. Las glicoproteínas de la envoltura solubles se pueden aislar del virus 6535, del virus 13095, del virus 16055, del virus 25710, del virus 25925, del virus CAAN o del virus Zm109F. Los solicitantes han generado proteínas Env recombinantes con secuencias únicas en las que los solicitantes han modificado el líder, añadido His-tag y terminado la secuencia antes del sitio de escisión para gp120 y antes de la transmembrana para gp140. Las secuencias de ADN son únicas ya que están optimizadas respecto a los codones.
- 25 En una realización particularmente ventajosa, las glicoproteínas de la envoltura de la presente invención se aíslan a partir del virus BG505.

- 30 Como se muestra en la presente solicitud, las glicoproteínas de la envoltura solubles tienen secuencias sustancialmente similares a las secuencias de las proteínas representadas en las Figs. 2A-2J. Concretamente, la glicoproteína de la envoltura soluble tiene una secuencia de consenso sustancialmente similar a la secuencia de consenso representada en las FIGS. 2A-2J.

- 35 En una realización, la Env soluble de la presente invención puede utilizarse como reactivos para detectar e identificar nuevos anticuerpos neutralizantes de amplio espectro, tales como PG9 y PG16. Tal como se utiliza en el presente documento, un anticuerpo neutralizante puede inhibir la entrada del virus VIH-1 con un índice de neutralización > 1,5 o > 2,0. Los potentes anticuerpos neutralizantes de amplio espectro pueden neutralizar más de aproximadamente 50 % de virus VIH-1 (de clados diversos y diferentes cepas dentro de un clado) en un ensayo de neutralización. La concentración inhibitoria del anticuerpo monoclonal puede ser inferior a aproximadamente 25 mg/ml para neutralizar aproximadamente el 50 % del virus de entrada en el ensayo de neutralización.

- 40 La presente divulgación abarca un procedimiento para identificar nuevas proteínas de la envoltura del VIH que se unen a anticuerpos PG9 y PG16 usando una combinación de un enfoque bioinformático basado en las secuencias de la envoltura del virus en los pacientes y el ensayo de unión de las proteínas homólogas. La proximidad evolutiva de estas proteínas a las proteínas de la envoltura de los pacientes puede mejorar la generación de anticuerpos neutralizantes de amplio espectro administrados solos o en combinación con otras proteínas de unión a PG9 y PG16. La presente solicitud también abarca proteínas identificadas por este procedimiento, tales como, por ejemplo, gp120 BG505 del clado A.
- 45

- 50 Esencialmente, el enfoque será generar la secuencia de Env del VIH-1 del donante que da lugar a cualquier anticuerpo neutralizante de amplio espectro (nuevo o existente). Hasta ahora, en todos los casos, los solicitantes han encontrado que la secuencia Env en sueros donantes escapa a la neutralización por los anticuerpos neutralizantes de amplio espectro aislados del donante. Como resultado, la secuencia aislada no es buena para su uso como inmunógeno. El nuevo enfoque utiliza la secuencia de Env del VIH-1 aislada del donante, las secuencias se utilizan para identificar a su progenitor cercano, la alineación de secuencias se realiza con todas las secuencias Env utilizando programas como clustalW y luego el árbol filogenético se genera para determinar las secuencias de Env que están estrechamente relacionadas y tienen menos distancias genéticas. Estos homólogos más cercanos se someten entonces a un ensayo de unión para identificar un nuevo inmunógeno que se une a anticuerpos neutralizantes de amplio espectro y son candidatos potenciales para provocar una respuesta neutralizante.
- 55

En particular, tal procedimiento se ejemplifica en la FIG. 1, La Figura 1 representa la unión mediante ELISA de la glicoproteína de la envoltura gp120 recombinante BG505 del VIH-1 del clado A y el árbol filogenético. El ELISA

mostró una unión significativa de los anticuerpos PG9, PG16 y b12 a gp120 BG505. La secuencia de la proteína BG505 se seleccionó mediante una estrategia bioinformática que identificó la secuencia progenitora próxima a Env del clado del VIH-1 en la base de datos de proteína Env. Las secuencias de Env del VIH-1 del clado A del donante (V1_011) que dieron lugar a los anticuerpos PG9 y PG16 se usaron para buscar en la base de datos de la proteína Env de VIH-1.

El procedimiento de la patente US-7.386.232 también se puede utilizar para la detección de anticuerpos neutralizantes de amplio espectro. Se puede construir una proteína de fusión de la envoltura-enzima uniendo una enzima al extremo C-terminal de una proteína de la envoltura. Las partículas de virus que comprenden la proteína de fusión y la glicoproteína de la envoltura de tipo silvestre y/o soluble se pueden generar y utilizar para infectar células diana en presencia de sueros de pacientes. Las actividades de la enzima medidas en tales células infectadas son medidas de unión al virus y de entrada a las células diana que están mediadas por la proteína de la envoltura viral de tipo silvestre. Ejemplos de enzimas que pueden usarse para generar la proteína de fusión incluyen, pero no se limitan a, luciferasa, fosfatasa alcalina bacteriana o placentaria, β -galactosidasa y proteínas fluorescentes tales como proteína fluorescente verde o toxinas. El ensayo, en general, también se puede llevar a cabo en placas de 96 pocillos. Las actividades enzimáticas disminuidas en presencia de los sueros indican que hay anticuerpos neutralizantes en el suero.

Las glicoproteínas de la envoltura solubles pueden cristalizarse en la combinación con PG9 o PG16 o con cualquier otro anticuerpo neutralizante, incluyendo los identificados por los procedimientos anteriores, para determinar la superficie molecular exacta en la que la glicoproteína de la envoltura soluble se une con el anticuerpo neutralizante para diseñar nuevas moléculas de inmunógenos del VIH-1.

Los cristales se pueden obtener por medios convencionales como son bien conocidos en la técnica de la cristalografía de proteínas, incluyendo los procedimientos por lotes, puente líquido, diálisis, difusión de vapor y gota colgante (ver, p.ej., Johnson et al., *Biochemistry*. 1982 Sep 28;21(20):4839-43; Brayer & McPherson, *J Biol Chem*. 1982 Apr 10;257(7):3359-61; McPherson & Weickmann, *J Biomol Struct Dyn*. 1990 Apr;7(5):1053-60; and Koszelak et al., *J Mol Biol*. 1989 Sep 20;209(2):323-5; Weber et al., *Acta Crystallogr B*. 1991 Feb 1;47 (Pt 1):116-27 and Weber, *Methods Enzymol*. 1991;202:727-41).

Generalmente, los cristales se hacen crecer disolviendo un anticuerpo neutralizante sustancialmente puro, tal como PG9 o PG16 y la glicoproteína de la envoltura soluble en un tampón acuoso que contiene un precipitante a una concentración justo por debajo de la necesaria para precipitar la proteína. El agua se elimina por evaporación controlada para producir condiciones de precipitación, las cuales se mantienen hasta que cesa el crecimiento del cristal.

Los cristales, y particularmente las coordenadas de estructura atómica obtenidos a partir de los mismos, tienen una amplia variedad de usos. Los cristales y las coordenadas de estructura son particularmente útiles para identificar compuestos que se unen a un anticuerpo neutralizante, tales como PG9 o PG16 y, por lo tanto, son útiles para provocar anticuerpos anti-VIH. Tales compuestos pueden ser útiles en la obtención de anticuerpos anti-VIH del clado B y C, sin embargo las variantes pueden ser útiles para obtener anticuerpos anti-VIH del clado A, D o E.

Las coordenadas de la estructura pueden utilizarse como modelos de fase para determinar las estructuras cristalinas de un anticuerpo neutralizador sintético o mutado, tales como PG9 o PG16, dominios, así como las estructuras de co-cristales de dichos dominios con ligandos.

La disposición de la estructura cristalina de un anticuerpo neutralizante, tal como PG9 o PG16, formando un complejo con una glicoproteína de la envoltura soluble, proporciona al experto en la materia una visión detallada de los mecanismos de acción de un anticuerpo neutralizante, tales como PG9 o PG16. Esta visión proporciona un medio para diseñar compuestos que se unen a un anticuerpo neutralizante, tal como PG9 o PG16 y, por lo tanto, a ciertos anticuerpos anti-VIH y, por lo tanto compuestos que provocan anticuerpos anti-VIH, que son útiles en el diagnóstico, tratamiento o prevención del VIH en un individuo que lo necesita.

La provisión de la estructura cristalina de un anticuerpo neutralizante, tal como PG9 o PG16, formando un complejo con una glicoproteína de la envoltura soluble, permite un nuevo enfoque para el descubrimiento, identificación y diseño de un fármaco o compuesto para compuestos que se unen a un anticuerpo neutralizante, tal como PG9 o PG16 y, por lo tanto, a anticuerpos anti-VIH, y por lo tanto compuestos que provocan anticuerpos anti-VIH, que son útiles en el diagnóstico, tratamiento o prevención del VIH en un individuo que lo necesite. Por consiguiente, la memoria descriptiva proporciona un procedimiento informatizado de diseño o identificación racional de un fármaco o compuesto que comprende: proporcionar la estructura de un anticuerpo neutralizante, tal como PG9 o PG16, formando un complejo tal como se define por las coordenadas o la las coordenadas de identificación, proporcionar una estructura de un compuesto candidato y ajustar la estructura del candidato a la estructura de un anticuerpo neutralizante, tal como PG9 o PG16.

En un aspecto alternativo, el procedimiento puede usar las coordenadas de átomos de interés de un anticuerpo neutralizante, tales como PG9 o PG16, que están en las proximidades del sitio activo o región de unión con el fin de modelar la cavidad en la que el sustrato o ligando se une. Estas coordenadas pueden usarse para definir un espacio

que se proyecta entonces *“in silico”* frente a una molécula candidata. Por lo tanto, la divulgación proporciona un procedimiento informatizado de diseño o identificación racional de un fármaco o compuesto que comprende: proporcionar las coordenadas de al menos las coordenadas seleccionadas; proporcionar la estructura de un compuesto candidato y ajustar la estructura del candidato a las coordenadas seleccionadas.

- 5 En la práctica, puede ser deseable modelar un número suficiente de átomos de un anticuerpo neutralizante, tal como PG9 o PG16, como se define por sus coordenadas que representan el sitio activo o región de unión. De este modo, se pueden proporcionar las coordenadas de al menos 5, ventajosamente al menos 10, más ventajosamente al menos 50 e incluso más ventajosamente al menos 100 átomos de la estructura.

- 10 Por consiguiente, los procedimientos pueden emplear un sub-dominio de interés de un anticuerpo neutralizante, tal como PG9 o PG16, que está en la proximidad del sitio activo o región de unión y la aplicación puede proporcionar un procedimiento informatizado para identificar o racionalmente diseñar un compuesto o fármaco que comprende: proporcionar las coordenadas de al menos un subdominio de; proporcionar la estructura de un modulador o inhibidor candidato de un anticuerpo neutralizante, tal como PG9 o PG16 y ajustar la estructura del candidato a las coordenadas del sub-dominio proporcionado.

- 15 Estos procedimientos pueden incluir opcionalmente sintetizar el candidato y opcionalmente pueden incluir además poner en contacto el candidato con un anticuerpo neutralizante, tal como PG9 o PG16, para analizar si hay unión y/o inhibición y/o administrar el compuesto a un animal capaz de desarrollar anticuerpos y analizar si el compuesto provoca anticuerpos anti-VIH. Los compuestos que provocan anticuerpos anti-VIH son útiles para propósitos de diagnóstico, así como para composiciones inmunógenas, inmunológicas o incluso vacunales, así como composiciones farmacéuticas.

- 20 La “adaptación” puede significar la determinación, por medios automáticos o semiautomáticos, de interacciones entre al menos un átomo del candidato y al menos un átomo de un anticuerpo neutralizante, tal como PG9 o PG16 y calcular el grado en que dicha interacción es estable. Las interacciones pueden incluir atracción, repulsión, provocada por la carga, consideraciones estéricas y similares. Un “sub-dominio” puede significar al menos uno, por ejemplo, uno, dos, tres o cuatro elementos completos de la estructura secundaria.

- 25 La etapa de proporcionar la estructura de una molécula candidata puede implicar la selección del compuesto mediante la selección computacional de una base de datos de compuestos para la interacción con el sitio activo. Por ejemplo, se puede derivar un descriptor 3-D para el modulador potencial, incluyendo el descriptor restricciones geométricas y funcionales derivadas de la arquitectura y naturaleza química del sitio activo. El descriptor puede usarse entonces para buscar en la base de datos de compuestos, siendo un modulador potencial un compuesto que tiene una buena concordancia con las características del descriptor. En efecto, el descriptor puede ser un tipo de farmacóforo virtual.

- 30 En cualquier caso, la determinación de la estructura tridimensional de un anticuerpo neutralizante, tal como PG9 o PG16, formando complejo, proporciona una base para el diseño de compuestos nuevos y específicos que se unen a un anticuerpo neutralizante, tal como PG9 o PG16, y son útiles para provocar una respuesta inmunitaria. Por ejemplo, a partir del conocimiento de la estructura tridimensional de un anticuerpo neutralizante, tal como PG9 o PG16, formando un complejo, se pueden usar programas de modelado informático para diseñar o identificar diferentes moléculas que se espera que interactúen con sitios activos posibles o confirmados, tales como sitios de unión u otras características estructurales o funcionales de un anticuerpo neutralizante, tal como PG9 o PG16.

- 35 Más específicamente, un compuesto que potencialmente se une (“ligante”) a un anticuerpo neutralizante, tal como PG9 o PG16, puede analizarse en cuanto a su actividad mediante el uso de modelado por ordenador usando un programa de acoplamiento tal como GRAM, DOCK o AUTODOCK (ver Walters et al. Drug Discovery Today, vol. 3, no. 4 (1998), 160-178 y Dunbrack et al. Folding and Design 2 (1997), 27-42). Este procedimiento puede incluir el ajuste por ordenador de ligantes potenciales a un anticuerpo neutralizante, tal como PG9 o PG16, para determinar hasta qué punto la forma y la estructura química del ligante potencial se unirá al anticuerpo.

- 40 También se puede realizar un examen manual asistido por ordenador del sitio activo o sitio de unión de un anticuerpo neutralizante, tal como PG9 o PG16. También pueden usarse programas como GRID (P. Goodford, J. Med. Chem, 1985, 28, 849-57), programa que determina sitios de interacción probables entre moléculas con diversos grupos funcionales y el anticuerpo, para analizar el sitio activo o sitio de unión para predecir estructuras parciales de compuestos de unión.

- 45 Se pueden emplear programas informáticos para estimar la atracción, repulsión o impedimento estérico de los dos componentes de la unión, por ejemplo, un anticuerpo neutralizante, tal como PG9 o PG16 y un enlazante candidato. Generalmente, cuanto más ajustado sea el ajuste, menos obstáculos estéricos existan y mayores sean las fuerzas atractivas, más potente será el ligante potencial, ya que estas propiedades son consistentes con una constante de unión más estrecha. Además, cuanto más específico sea el diseño de un adhesivo candidato, más probable es que no interactúe con otras proteínas también.

50 En un aspecto adicional, la memoria descriptiva proporciona un procedimiento para determinar la estructura de un ligante de un anticuerpo neutralizante, tal como PG9 o PG16, unido a un anticuerpo neutralizante, tal como PG9 o

5 PG16, comprendiendo dicho procedimiento: (a) proporcionar un cristal de un anticuerpo neutralizante, tal como PG9 o PG16, (b) empapar el cristal u otro cristal con dicho ligante y (c) determinar la estructura de dicho complejo anticuerpo neutralizante-ligante. Este otro cristal puede tener esencialmente las mismas coordenadas descritas en la presente memoria, sin embargo debido a alteraciones menores en el polipéptido o secuencia, el cristal puede formarse en un grupo espacial diferente.

10 La divulgación implica además, en lugar de o además de procedimientos *in silicio*, la detección de alto rendimiento de compuestos para seleccionar compuestos con actividad de unión. Aquellos compuestos que muestran actividad de unión pueden seleccionarse como posibles ligantes candidatos y cristalizarse adicionalmente con un anticuerpo neutralizante, tal como PG9 o PG16, por ejemplo, por co-cristalización o remojo, para análisis de rayos X. La estructura de rayos X resultante se puede comparar con coordenadas conocidas para una variedad de propósitos. Por ejemplo, cuando los contactos establecidos por tales compuestos se solapan con los establecidos por un anticuerpo neutralizante, tales como PG9 o PG16, se pueden proporcionar nuevas moléculas que comprenden residuos que contienen contactos de un anticuerpo neutralizante, tales como PG9 o PG16, y otros compuestos.

15 Habiendo diseñado, identificado o seleccionado los posibles ligantes candidatos de unión determinando aquellos que tienen propiedades de ajuste favorables, por ejemplo, atracción fuerte entre un anticuerpo candidato y un anticuerpo neutralizante, tal como PG9 o PG16, estos pueden ser seleccionados en cuanto a su actividad. En consecuencia, la solicitud implica además: obtener o sintetizar el modulador o inhibidor candidato y poner en contacto el ligante candidato con un anticuerpo neutralizante, tal como PG9 o PG16, para determinar la capacidad del candidato para unirse con un anticuerpo neutralizante, tal como PG9 o PG16. En la última etapa, el candidato se pone en contacto ventajosamente con un anticuerpo neutralizante, tal como PG9 o PG16, en condiciones para determinar su función. En lugar de, o además de realizar dicho ensayo, la solicitud puede comprender: obtener o sintetizar el modulador candidato, formar un complejo de un anticuerpo neutralizante, tal como PG9 o PG16, y el candidato, y analizar el complejo, por ejemplo, por difracción de rayos X o RMN u otros medios, para determinar la capacidad del candidato para interactuar con un anticuerpo neutralizante, tal como PG9 o PG16. Puede obtenerse información estructural detallada sobre la unión del candidato a un anticuerpo neutralizante, tal como PG9 o PG16, y a la luz de esta información, pueden hacerse ajustes en la estructura o funcionalidad del modulador potencial, por ejemplo para mejorar su unión a un anticuerpo neutralizante, tal como PG9 o PG16. Estas etapas pueden repetirse cuantas veces sea necesario. Como alternativa o adicionalmente, se pueden administrar ligantes potenciales a un animal capaz de provocar una respuesta de anticuerpos, para determinar si el ligante potencial provoca anticuerpos anti-VIH.

20 25 30 Una vez alineada la secuencia de aminoácidos de los polipéptidos con estructuras conocidas y desconocidas, las estructuras de los aminoácidos conservados en una representación informática del polipéptido con estructura conocida se transfieren a los correspondientes aminoácidos del polipéptido cuya estructura es desconocida. Por ejemplo, una tirosina en la secuencia de aminoácidos de estructura conocida puede ser reemplazada por una fenilalanina, el correspondiente aminoácido homólogo en la secuencia de aminoácidos de estructura desconocida. Las estructuras de aminoácidos situadas en regiones no conservadas pueden asignarse manualmente utilizando geometrías peptídicas estándar o mediante técnicas de simulación molecular, tales como dinámica molecular. El refinado de toda la estructura puede ser por dinámica molecular y/o minimización de energía.

35 40 45 Los aspectos de la invención que emplean el anticuerpo neutralizante, tal como la estructura *in silico* de PG9 o PG16 pueden aplicarse igualmente a modelos homólogos de un anticuerpo neutralizante, tal como PG9 o PG16, obtenidos por el aspecto anterior de la invención y esto constituye otra realización de la invención. Por lo tanto, después de haber determinado una conformación de un anticuerpo neutralizante, tal como PG9 o PG16, mediante los procedimientos descritos en el presente documento, dicha conformación se puede usar en un procedimiento informatizado de diseño o identificación racional de un fármaco o compuesto como se describe en la presente memoria.

50 La memoria descriptiva proporciona además un procedimiento para determinar la estructura de un ligante de un anticuerpo neutralizante, tal como PG9 o PG16, unido a un anticuerpo neutralizante, tal como PG9 o PG16, que comprende: proporcionar un cristal de un anticuerpo neutralizante, tal como PG9 o PG16, remojando el cristal con el ligante y determinando la estructura del complejo anticuerpo neutralizante-ligante. Como alternativa o adicionalmente, el anticuerpo neutralizante, tal como PG9 o PG16, y el ligante pueden co-cristalizarse.

55 60 La divulgación proporciona además sistemas, tales como sistemas informáticos, destinados a generar estructuras y/o realizar un diseño racional de un fármaco o un compuesto para un anticuerpo neutralizante, tal como PG9 o PG16, o el complejo de anticuerpo neutralizante, tal como PG9 o PG16 y un potencial ligante. El sistema puede contener: datos de coordenadas atómicas, definiendo dichos datos la estructura tridimensional de un anticuerpo neutralizante, tal como PG9 o PG16, o al menos un sub-dominio de los mismos; o datos del factor de estructura para anticuerpos neutralizantes, tales como PG9 o PG16", pudiéndose derivar dichos datos del factor de estructura de los datos de las coordenadas atómicas. La solicitud también implica medios legibles por ordenador con: datos de coordenadas atómicas por modelación de homología, definiendo dichos datos la estructura tridimensional de un anticuerpo neutralizante, tal como PG9 o PG16, o al menos un sub-dominio del mismo; o datos del factor de estructura para el anticuerpo neutralizante, tales como PG9 o PG16, pudiéndose derivar dichos datos del factor de estructura de los datos de coordenadas atómicas. "Medio legible por ordenador" se refiere a cualquier medio que

pueda ser leído y accedido directamente a través de un ordenador, e incluye, pero no se limita a: medios de almacenamiento magnéticos tales como discos flexibles, medio de almacenamiento en disco duro y cinta magnética; medios de almacenamiento ópticos tales como discos ópticos o CD-ROM; medios de almacenamiento eléctricos tales como RAM y ROM e híbridos de estas categorías, tales como medios magnéticos/ópticos. Proporcionando tales medios legibles por ordenador, se puede acceder rutinariamente a los datos de coordenadas atómicas para modelar un anticuerpo neutralizante, tal como PG9 o PG16, o un sub-dominio del mismo. Por ejemplo RASMOL (Sayle et al., TIBS vol. 20 (1995), 374) es un paquete de software disponible públicamente que permite el acceso y el análisis de datos de coordenadas atómicas para la determinación estructural y/o el diseño racional de fármacos. La divulgación comprende además procedimientos comerciales proporcionando acceso a dichos medios legibles por ordenador y/o sistemas informáticos y/o datos de coordenadas atómicas a los usuarios; por ejemplo, los medios y/o los datos de coordenadas atómicas pueden ser accesibles para un usuario, por ejemplo, por suscripción, a través de Internet o de una red global de comunicación/informática; o, el sistema informático puede estar disponible para un usuario por suscripción. Los datos del factor de estructura, que pueden derivarse de datos de coordenadas atómicas (ver, p.ej., Blundell et al., en Protein Crystallography, Academic Press, NY, Londres y San Francisco (1976)), son particularmente útiles para calcular mapas de densidad de electrones, por ejemplo, mapas de densidad electrónica por transformada de Fourier diferenciales. Por lo tanto, existen usos adicionales para los medios legibles por ordenador y/o sistemas informáticos y/o datos de coordenadas atómicas y razones adicionales para ofrecerlos a los usuarios. Un "sistema informático" se refiere a los medios de hardware, medios de software y medios de almacenamiento de datos utilizados para analizar los datos de coordenadas atómicas. Los medios físicos mínimos de los sistemas basados en ordenador pueden comprender una unidad central de procesamiento (CPU), medios de entrada, medios de salida y medios de almacenamiento de datos. Deseablemente, se proporciona un monitor para visualizar los datos de la estructura. Los medios de almacenamiento de datos pueden ser RAM u otros medios para acceder a medios legibles por ordenador. Ejemplos de estos sistemas son las estaciones de trabajo de microordenadores disponibles de Silicon Graphics Incorporated y Sun Microsystems que trabajan con sistemas operativos basados en Unix, Linux, Windows NT o IBM OS/2.

Por consiguiente, la memoria descriptiva comprende además procedimientos de transmisión de información obtenida en cualquier procedimiento o etapa de la misma descrita en el presente documento o cualquier información descrita en el presente documento, por ejemplo, a través de telecomunicaciones, teléfono, comunicaciones masivas, medios de comunicación, presentaciones, Internet, correo electrónico, etc.

La memoria descriptiva proporciona también un procedimiento para analizar un complejo de un anticuerpo neutralizante, tal como PG9 o PG16, y un ligante potencial que comprende: emplear datos de difracción cristalográfica de rayos X procedentes del complejo y una estructura tridimensional de un anticuerpo neutralizante, tal como PG9 o PG16, o al menos un sub-dominio del mismo, para generar un mapa diferente de densidad electrónica por transformada de Fourier del complejo; estando ventajosamente, la estructura tridimensional definida por sus datos de coordenadas atómicas.

Tales complejos pueden cristalizarse y analizarse usando procedimientos de difracción de rayos X, por ejemplo, de acuerdo con los enfoques descritos por Greer et al., 1994, y los mapas de densidad electrónica por transformada de Fourier diferenciales se pueden calcular basándose en los patrones de difracción de rayos X del anticuerpo neutralizante empapado o cristalizado, tal como PG9 o PG16, y la estructura resuelta de un anticuerpo neutralizante no en complejo, tal como PG9 o PG16. Estos mapas pueden usarse entonces para determinar si y donde un ligante potencial particular se une a un anticuerpo neutralizante, tal como PG9 o PG16, y/o cambia la conformación de un anticuerpo neutralizante, tal como PG9 o PG16. Los mapas de densidad electrónica se pueden calcular utilizando programas como los del paquete informático CCP4 (Collaborative Computing Project, N.1 4. La serie CCP4: Programas para Cristalografía de Proteínas, Acta Crystallographica, D50, 1994, 760-763). Para la visualización de mapas y construcción de modelos pueden usarse programas tales como "QUANTA" (1994, San Diego, CA: Molecular Simulations, Jones et al., 1991).

La determinación de la estructura 3D de un anticuerpo neutralizante, tal como PG9 o PG16, proporciona información importante sobre el sitio o sitios activos/de unión probables de un anticuerpo neutralizante, tal como PG9 o PG16. Esta información puede utilizarse para el diseño racional de ligandos de anticuerpos neutralizantes, por ejemplo, mediante técnicas computacionales que identifican posibles ligandos de unión para el sitio o sitios activos, permitiendo enfoques de fragmentos enlazados al diseño de fármacos y permitiendo la identificación y localización de ligandos unidos usando análisis tales como análisis cristalográfico de rayos X.

Greer et al., *supra*, se refiere a un enfoque iterativo para el diseño de ligandos basado en secuencias repetidas de modelado por ordenador, formación de complejo proteína-ligando y análisis de rayos X. Los inhibidores de timidilato sintasa fueron diseñados por Greer; y, los ligandos de anticuerpos neutralizantes Fab pueden diseñarse también de esta manera. Usando, por ejemplo, GRID (P. Goodford, 1985) o la estructura 3D resuelta del anticuerpo neutralizante Fab, tal como PG9 o PG16, se puede diseñar un ligante potencial de un anticuerpo neutralizante, tal como PG9 o PG16, que complementa las funcionalidades del sitio o sitios activos del anticuerpo neutralizante. El ligante potencial puede sintetizarse, formarse en un complejo con un anticuerpo neutralizante, tal como PG9 o PG16 y el complejo se analiza a continuación, por ejemplo, mediante cristalografía de rayos X, RMN o una combinación de los mismos, para identificar la posición real del enlace compuesto.

- La determinación de la posición del compuesto ligante potencial en el complejo permite la determinación de las interacciones de éste con un anticuerpo neutralizante, tal como PG9 o PG16. Esto permite al experto en la materia analizar la afinidad y especificidad del compuesto por un anticuerpo neutralizante, tal como PG9 o PG16, y proponer modificaciones al compuesto para aumentar o disminuir cualquiera o ambas de estas propiedades. De este modo, la estructura y/o grupos funcionales del compuesto pueden ser ajustados, si es necesario o deseado, en vista de los resultados del análisis (por ejemplo, análisis de rayos X) y la secuencia de síntesis y análisis se repite hasta que se obtiene un compuesto optimizado. Los enfoques relacionados con el diseño de compuestos y fármacos basados en la estructura se discuten también en otros documentos citados en el presente documento, así como en Bohacek et al., 1996.
- Como resultado de la determinación de la estructura 3D del anticuerpo neutralizante, tal como PG9 o PG16, también se pueden usar técnicas más puramente computacionales para el diseño racional de fármacos y compuestos para diseñar anticuerpos neutralizantes, tales como PG9 o PG16, ligantes y por lo tanto compuestos que provocan anticuerpos anti-VIH; por ejemplo, los programas automatizados de acoplamiento de receptor-ligando (ver Jones et al., 1995) que requieren información precisa sobre las coordenadas atómicas de receptores diana, se pueden usar para diseñar o identificar ligantes de un anticuerpo neutralizante potencial, tal como PG9 o PG16.
- Los enfoques de fragmentos enlazados al diseño de fármacos o compuestos también requieren información precisa sobre las coordenadas atómicas de una diana. Los compuestos pequeños que tienen el potencial de unirse a regiones de un anticuerpo neutralizante, tales como PG9 o PG16, los cuales por sí mismos pueden no ser compuestos ligantes pueden ser ensamblados por enlace químico para proporcionar ligantes potenciales. Por lo tanto, la idea básica que se esconde detrás de estos enfoques es determinar los lugares de unión de más de una, por ejemplo, plural o una pluralidad de ligandos a una molécula diana, y luego construir un armazón molecular para conectar los ligandos entre sí de tal manera que se conservan las posiciones de unión relativas. Los ligandos pueden proporcionarse computacionalmente y modelarse en un sistema informático, o proporcionarse en un entorno experimental, en el que se proporcionan cristales y más de uno, por ejemplo, plural o una pluralidad de ligandos empacados por separado o en mezclas en el cristal antes del análisis, por ejemplo, análisis de rayos X y determinación de su ubicación.
- Se determina el sitio de unión de dos o más ligandos y pueden conectarse para formar así un compuesto prototipo potencial que puede refinarse adicionalmente, por ejemplo, la técnica iterativa de Greer et al. Para un enfoque virtual de fragmentos unidos, véase Verlinde et al., 1992 y para estudios de RMN y rayos X, véase Skuker et al., 1996; y Stout et al., 1998. El uso de estos u otros enfoques para diseñar y/o identificar anticuerpos neutralizantes, tales como PG9 o PG16, ligantes y por lo tanto compuestos que provocan anticuerpos anti-VIH (ver, p.ej, los documentos de patente citados en el presente documento, como en la Sección de Antecedentes y los documentos citados en el presente documento, *supra*) es posible gracias a la determinación de la estructura del anticuerpo neutralizante, tal como PG9 o PG16.
- Muchas de las técnicas y enfoques basados en la estructura descritos en el presente documento emplean análisis de rayos X para identificar la posición de unión de un modulador potencial en un complejo con una proteína. Una manera habitual de hacer esto es realizar la cristalografía de rayos X en el complejo, producir un mapa de densidad electrónica por transformada de Fourier diferencial y asociar un patrón particular de densidad de electrones con el modulador de potencial. Sin embargo, para producir un mapa (Ver Blundell et al., *supra*), es importante conocer previamente la estructura 3D de la proteína (o al menos los factores de estructura de la proteína). Por lo tanto, la determinación de la estructura del anticuerpo neutralizante, tal como PG9 o PG16, también permite producir mapas de densidad electrónica por transformada de Fourier diferenciales de complejos de anticuerpos neutralizantes, tales como PG9 o PG16, con un modulador potencial, los cual puede ayudar en gran medida al procedimiento de diseño o identificación racional del compuesto y/o fármaco.
- Los enfoques para el diseño o la identificación de fármacos o de compuestos basados en la estructura descritos en el presente documento implican la identificación inicial de posibles compuestos para la interacción con la molécula diana (en este caso un anticuerpo neutralizante, tal como PG9 o PG16) y así provocar anticuerpos anti-VIH. A veces estos compuestos son conocidos, por ejemplo, a partir de la bibliografía de investigación. Sin embargo, cuando no lo son, o cuando se desean nuevos compuestos, una primera etapa del diseño del fármaco o del compuesto o del programa de identificación puede implicar una detección *in silico* informatizada en bases de datos de compuestos (tales como la base de datos estructural de Cambridge) con el objetivo de identificar compuestos que interactúan con el sitio o sitios activos de la biomolécula diana (en este caso un anticuerpo neutralizante, tal como PG9 o PG16). Los criterios de detección pueden basarse en propiedades farmacocinéticas tales como la estabilidad metabólica y la toxicidad. Sin embargo, la determinación de la estructura del anticuerpo neutralizante, tal como PG9 o PG16, permite identificar la arquitectura y naturaleza química de cada anticuerpo neutralizador, tal como PG9 o PG16, lo que a su vez permite las limitaciones geométricas y funcionales de un descriptor para obtener el posible ligante. El descriptor puede ser, por lo tanto, un tipo de farmacóforo 3D virtual, que también puede usarse como criterio de selección o filtro para la detección en bases de datos.
- Los compuestos que tienen una estructura química seleccionada usando la invención, en los que dichos compuestos son anticuerpos neutralizantes, tales como PG9 o PG16, ligantes, forman un aspecto adicional de la invención; y tales compuestos pueden usarse en procedimientos de tratamientos médicos, tales como para el diagnóstico, la

prevención o el tratamiento del VIH o para la obtención de anticuerpos para el diagnóstico del VIH, incluyendo el uso en vacunas. Además, dichos compuestos pueden usarse en la preparación de medicamentos para tales tratamientos o prevención, o composiciones para propósitos de diagnóstico. Los compuestos se pueden emplear solos o en combinación con otros tratamientos, vacunas o agentes preventivos y los compuestos pueden usarse en la preparación de medicamentos combinados para tales tratamientos o prevención, o en kits que contienen el compuesto y el otro tratamiento o agente preventivo.

En otra realización más, la presente invención también abarcó el uso de las glicoproteínas de la envoltura solubles descritas en el presente documento como inmunógenos, ventajosamente como componentes de vacuna del VIH-1.

Los términos “proteína”, “péptido”, “polipéptido” y “secuencia de aminoácidos” se usan indistintamente 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 estar interrumpido por restos químicos distintos de los aminoácidos. Los términos incluyen también un polímero de aminoácido que ha sido modificado naturalmente o por intervención; por ejemplo, mediante la formación de enlaces disulfuro, glicosilación, lipidación, acetilación, fosforilación o cualquier otra manipulación o modificación, tal como conjugación con un componente marcador o bioactivo.

Como se usa en el presente documento, los términos “antígeno” o “inmunógeno” se usan indistintamente para referirse a una sustancia, generalmente una proteína, que es capaz de inducir una respuesta inmunitaria en un sujeto. El término también se refiere a proteínas que son inmunológicamente activas en el sentido de que una vez administradas a un sujeto (ya sea directamente o administrando al sujeto una secuencia de nucleótidos o vector que codifica la proteína) es capaz de provocar una respuesta inmunitaria del tipo humoral y/o celular dirigida contra esa proteína.

El término “anticuerpo” incluye moléculas intactas así como fragmentos de las mismas, tales como Fab, F(ab')₂, Fv y scFv que son capaces de unirse al determinante del epítipo. Estos fragmentos de anticuerpo conservan cierta capacidad para unirse selectivamente con su antígeno o receptor e incluyen, por ejemplo:

- Fab, el fragmento que contiene un fragmento monovalente de unión al antígeno de una molécula de anticuerpo puede producirse por digestión de anticuerpo completo con la enzima papaína para producir una cadena ligera intacta y una porción de una cadena pesada;
- Fab', el fragmento de una molécula de anticuerpo se puede obtener tratando un anticuerpo completo con pepsina, seguido de reducción, para producir una cadena ligera intacta y una porción de la cadena pesada; se obtienen dos fragmentos Fab' por molécula de anticuerpo;
- F(ab')₂, el fragmento del anticuerpo que puede obtenerse tratando el anticuerpo completo con la enzima pepsina sin reducción subsiguiente; F(ab')₂ es un dímero de dos fragmentos Fab' unidos entre sí por dos enlaces disulfuro;
- scFv, incluyendo un fragmento genéticamente modificado que contiene la región variable de una cadena pesada y una cadena ligera como una molécula de cadena simple fusionada.

Los procedimientos generales de fabricación de estos fragmentos son conocidos en la técnica. (Véase, por ejemplo, Harlow y Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York (1988)).

Un “anticuerpo 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 potentes anticuerpos neutralizantes de amplio espectro pueden neutralizar más de aproximadamente 50 % de virus VIH-1 (de clados diversos y diferentes cepas dentro de un clado) en un ensayo de neutralización. La concentración inhibitoria del anticuerpo monoclonal puede ser inferior a aproximadamente 25 mg/ml para neutralizar aproximadamente el 50 % del virus de entrada en el ensayo de neutralización.

Debe entenderse que las proteínas, incluyendo los anticuerpos y/o antígenos descritos, pueden diferir de las secuencias exactas ilustradas y descritas en el presente documento. Por lo tanto, la invención contempla delecciones, adiciones y sustituciones a las secuencias mostradas, siempre y cuando las secuencias funcionen de acuerdo con los procedimientos divulgados. A este respecto, las sustituciones particularmente preferidas serán generalmente de naturaleza conservadora, es decir., aquellas sustituciones que tienen lugar dentro de 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. La fenilalanina, el triptófano y la tirosina se clasifican a veces como aminoácidos aromáticos. Es razonablemente predecible que una sustitución aislada de leucina con isoleucina o valina, o viceversa; un aspartato con un glutamato o viceversa; una treonina con una serina o viceversa; o una sustitución conservadora 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 menores que no afectan sustancialmente a la inmunogenicidad de la proteína están, por lo tanto, dentro del alcance de la invención.

Como se usan en el presente documento, las expresiones “secuencias de nucleótidos” y “secuencias de ácido

nucleico” se refieren a secuencias de ácido desoxirribonucleico (ADN) o ácido ribonucleico (ARN), incluyendo, sin limitación, ARN mensajero (ARNm), híbridos de ADN/ARN o ácidos nucleicos sintéticos. El ácido nucleico puede ser monocatenario, o parcialmente o completamente bicatenarios (dúplex). Los ácidos nucleicos dúplex pueden ser homodúplex o heterodúplex.

- 5 Como se usa en el presente documento, el término “transgén” puede usarse para referirse a secuencias de nucleótidos “recombinantes” que pueden derivarse 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 ocurre 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 manipulado “por el hombre”
10 significa manipulado por algunos medios artificiales, incluso mediante el uso de máquinas, optimización de codones, enzimas de restricción, etc.

Por ejemplo, las secuencias de nucleótidos pueden ser mutadas de tal manera que quede anulada la actividad de las proteínas codificadas *in vivo*. Como alternativa, las secuencias de nucleótidos pueden estar optimizadas en cuanto a los codones, por ejemplo, los codones pueden optimizarse para uso humano. Preferentemente, las
15 secuencias de nucleótidos están mutadas para anular la función normal *in vivo* de las proteínas codificadas y codones optimizados para uso humano. Por ejemplo, cada una de las secuencias Gag, Pol, Env, Nef, RT e Int puede ser alterada de estas maneras.

En cuanto a la optimización de codones, las moléculas de ácido nucleico tienen una secuencia de nucleótidos que codifica los antígenos y pueden diseñarse para emplear codones que se utilizan en los genes del sujeto en el que se va a producir el antígeno. Muchos virus, incluyendo el VIH y otros lentivirus, usan un gran número de codones raros y, al alterar estos codones para que correspondan a codones comúnmente utilizados en el sujeto deseado, se puede conseguir una expresión mejorada de los antígenos. En una realización preferida, los codones utilizados son codones “humanizados”, es decir, los codones son aquellos que aparecen frecuentemente en genes humanos altamente expresados (Andre et al., J. Virol. 72: 1497-1503, 1998) en lugar de los codones que son utilizados con
25 frecuencia por el VIH. Tal uso de codones proporciona una expresión eficiente de las proteínas transgénicas del VIH en células humanas. Se puede usar cualquier procedimiento adecuado de optimización de codones. Tales procedimientos y la selección de tales procedimientos, son bien conocidos por los expertos en la materia. Además, hay varias compañías que optimizarán codones de secuencias, como Genart ([genart.com](http://www.genart.com)). De este modo, las secuencias de nucleótidos pueden ser optimizadas en cuanto a los codones.

30 La memoria descriptiva comprende además secuencias de nucleótidos que codifican variantes y derivados funcionalmente y/o antigénicamente equivalentes de los antígenos y fragmentos funcionalmente equivalentes de los mismos. Estas variantes, derivados y fragmentos funcionalmente equivalentes muestran la capacidad de retener la actividad antigénica. Por ejemplo, los cambios en una secuencia de ADN que no cambia la secuencia de aminoácidos codificada, así como los que dan como resultado sustituciones conservadoras de restos de aminoácidos, una o algunas deleciones o adiciones de aminoácidos y sustitución de restos de aminoácidos por aminoácidos análogos son aquellos que no afectarán significativamente a las propiedades del polipéptido codificado. Las sustituciones conservadoras de aminoácidos son glicina/alanina; valina/isoleucina/leucina; asparagina/glutamina; ácido aspártico/ácido glutámico; serina/treonina/metionina; lisina/arginina y fenilalanina/tirosina/triptófano. Por lo tanto, las variantes tienen al menos el 50 %, al menos el 55 %, al menos el 60 %, al menos el 65 %, al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 86 %, al menos el 87 %, al menos el 89 %, al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 % o al menos el 99 % de homología o identidad con el antígeno, epítipo, inmunógeno, péptido o polipéptido de interés.

45 Para los propósitos de la presente invención, la identidad u homología de secuencia se determina comparando las secuencias cuando están alineadas para maximizar la superposición y la identidad a la vez que se minimizan los huecos de secuencia. En particular, la identidad de secuencia se puede determinar usando cualquiera de una serie de algoritmos matemáticos. Un ejemplo no limitativo de un algoritmo matemático utilizado para la comparación de dos secuencias es el algoritmo de Karlin y Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1990; 87:2264-2268, modificado como en Karlin y Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1993; 90:5873-5877.

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

Es ventajoso para el uso de acuerdo con la presente invención el software WU-BLAST (Washington University BLAST) versión 2.0. Los programas ejecutables de WU-BLAST versión 2.0 para varias plataformas UNIX se pueden descargar desde <ftp://blast.wustl.edu/blast/executables>. Este programa se basa en WU-BLAST versión 1.4, que a su vez se basa en el dominio público NCBI-BLAST versión 1.4 (Altschul & Gish, 1996, Local alignment statistics,
60

Doolittle ed., *Methods in Enzymology* 266: 460-480; Altschul et al., *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; todos los cuales se incorporan aquí como referencia).

5 Las diversas secuencias de nucleótidos recombinantes y anticuerpos y/o antígenos se preparan usando ADN recombinante estándar y técnicas de clonación. Dichas técnicas son bien conocidas por los expertos en la materia. Véase, por ejemplo, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", segunda edición (Sambrook et al., 1989).

10 Las secuencias de nucleótidos pueden insertarse en "vectores". El término "vector" es ampliamente utilizado y comprendido por los expertos en la materia y como se usa en el presente documento, el término "vector" se utiliza de acuerdo con su significado para los expertos en la materia. Por ejemplo, el término "vector" es comúnmente usado 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.

15 Se puede usar cualquier vector que permita la expresión de los anticuerpos y/o antígenos. Por ejemplo, se pueden usar los antígenos y/o anticuerpos *in vitro* (tales como el uso de sistemas de expresión libres de células) y/o en células cultivadas crecidas *in vitro* con el fin de producir los antígenos del VIH y/o anticuerpos que pueden utilizarse entonces para diversas aplicaciones tales como en la producción de vacunas proteínicas. Para tales aplicaciones, se puede usar cualquier vector que permita la expresión de los antígenos y/o anticuerpos *in vitro* y/o en células cultivadas.

20 Para aplicaciones en las que se desea que los anticuerpos y/o antígenos se expresen *in vivo*, por ejemplo, cuando los transgenes se usan en ADN o vacunas que contienen ADN, se puede usar cualquier vector que permita la expresión de los anticuerpos y/o antígenos y sea seguro para su uso *in vivo*. Preferentemente, los vectores utilizados son seguros para su uso en seres humanos, mamíferos y/o animales de laboratorio.

25 Para que los anticuerpos y/o antígenos se expresen, la secuencia codificante de la proteína debería estar "ligada operativamente" a las secuencias reguladoras o de control de ácidos nucleicos que dirigen la transcripción y la traducción de la proteína. Como se usa en la presente memoria, se dice que una secuencia codificante y una secuencia o promotor de control de ácido nucleico están "ligadas operativamente" cuando están unidas covalentemente de tal manera que colocan la expresión o transcripción y/o traducción de la secuencia codificante bajo la influencia o control de la secuencia de control del ácido nucleico. La "secuencia de control de ácido nucleico" puede ser cualquier elemento de ácido nucleico, tal como, pero sin limitarse 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 codificante que está operativamente ligada a la misma. El término "promotor" se usará en el presente documento para referirse a un grupo de módulos de control de la transcripción que están agrupados alrededor del sitio de iniciación para la ARN polimerasa II y que cuando están operacionalmente unidos a las secuencias codificantes de proteínas conducen a la expresión de la proteína codificada. La expresión de los transgenes 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 particular, tal como, sin limitación, antibióticos tales como tetraciclina, hormonas tales como ecdisona o metales pesados. El promotor también puede ser específico de un tipo celular, tejido u órgano particular. Se conocen en la técnica muchos promotores y potenciadores adecuados y cualquier promotor o potenciador adecuado se puede usar para la expresión de los transgenes. Por ejemplo, se pueden seleccionar promotores y/o potenciadores adecuados de la Base de Datos de Promotores Eucarióticos (EPDB).

35 La presente divulgación se refiere a un vector recombinante que expresa un epítipo extraño. Ventajosamente, el epítipo es un epítipo del VIH. Ventajosamente, el epítipo del VIH es una glicoproteína de la envoltura soluble, sin embargo, la presente solicitud puede incluir antígenos, epítipos o inmunógenos del VIH adicionales. Ventajosamente, el epítipo del VIH es un antígeno del VIH, un epítipo del VIH o un inmunógeno del VIH, tal como, pero sin limitación, los antígenos del VIH, epítipos del VIH o inmunógenos del VIH de las patentes de los Estados Unidos números 7.341.731; 7.335.364; 7.329.807; 7.323.553; 7.320.859; 7.311.920; 7.306.798; 7.285.646; 7.285.289; 7.285.271; 7.282.364; 7.273.695; 7.270.997; 7.262.270; 7.244.819; 7.244.575; 7.232.567; 7.232.566; 7.223.844; 7.223.739; 7.223.534; 7.223.368; 7.220.554; 7.214.530; 7.211.659; 7.211.432; 7.205.159; 7.198.934; 7.195.768; 7.192.555; 7.189.826; 7.189.522; 7.186.507; 7.179.645; 7.175.843; 7.172.761; 7.169.550; 7.157.083; 7.153.509; 7.147.862; 7.141.550; 7.129.219; 7.122.188; 7.118.859; 7.118.855; 7.118.751; 7.118.742; 7.105.655; 7.101.552; 7.097.971; 7.097.842; 7.094.405; 7.091.049; 7.090.648; 7.087.377; 7.083.787; 7.070.787; 7.070.781; 7.060.273; 7.056.521; 7.056.519; 7.049.136; 7.048.929; 7.033.593; 7.030.094; 7.022.326; 7.009.037; 7.008.622; 7.001.759; 6.997.863; 6.995.008; 6.979.535; 6.974.574; 6.972.126; 6.969.609; 6.964.769; 6.964.762; 6.958.158; 6.956.059; 6.953.689; 6.951.648; 6.946.075; 6.927.031; 6.919.319; 6.919.318; 6.919.077; 6.913.752; 6.911.315; 6.908.617; 6.908.612; 6.902.743; 6.900.010; 6.893.869; 6.884.785; 6.884.435; 6.875.435; 6.867.005; 6.861.234; 6.855.539; 6.841.381; 6.841.345; 6.838.477; 6.821.955; 6.818.392; 6.818.222; 6.815.217; 6.815.201; 6.812.026; 6.812.025; 6.812.024; 6.808.923; 6.806.055; 6.803.231; 6.800.613; 6.800.288; 6.797.811; 6.780.967; 6.780.598; 6.773.920; 6.764.682; 6.761.893; 6.753.015; 6.750.005; 6.737.239; 6.737.067; 6.730.304; 6.720.310; 6.716.823; 6.713.301; 6.713.070; 6.706.859; 6.699.722; 6.699.656; 6.696.291; 6.692.745; 6.670.181; 6.670.115; 6.664.406; 6.657.055; 6.657.050; 6.656.471; 6.653.066; 6.649.409; 6.649.372; 6.645.732; 6.641.816; 6.635.469; 6.613.530; 6.605.427; 6.602.709; 6.602.705; 6.600.023; 6.596.477; 6.596.172; 6.593.103; 6.593.079; 6.579.673; 6.576.758;

ES 2 631 608 T3

	6.573.245; 6.573.040; 6.569.418; 6.569.340; 6.562.800; 6.558.961; 6.551.828; 6.551.824; 6.548.275; 6.544.780;
	6.544.752; 6.544.728; 6.534.482; 6.534.312; 6.534.064; 6.531.572; 6.531.313; 6.525.179; 6.525.028; 6.524.582;
	6.521.449; 6.518.030; 6.518.015; 6.514.691; 6.514.503; 6.511.845; 6.511.812; 6.511.801; 6.509.313; 6.506.384;
	6.503.882; 6.495.676; 6.495.526; 6.495.347; 6.492.123; 6.489.131; 6.489.129; 6.482.614; 6.479.286; 6.479.284;
5	6.465.634; 6.461.615; 6.458.560; 6.458.527; 6.458.370; 6.451.601; 6.451.592; 6.451.323; 6.436.407; 6.432.633;
	6.428.970; 6.428.952; 6.428.790; 6.420.139; 6.416.997; 6.410.318; 6.410.028; 6.410.014; 6.407.221; 6.406.710;
	6.403.092; 6.399.295; 6.392.013; 6.391.657; 6.384.198; 6.380.170; 6.376.170; 6.372.426; 6.365.187; 6.358.739;
	6.355.248; 6.355.247; 6.348.450; 6.342.372; 6.342.228; 6.338.952; 6.337.179; 6.335.183; 6.335.017; 6.331.404;
	6.329.202; 6.329.173; 6.328.976; 6.322.964; 6.319.666; 6.319.665; 6.319.500; 6.319.494; 6.316.205; 6.316.003;
10	6.309.633; 6.306.625; 6.296.807; 6.294.322; 6.291.239; 6.291.157; 6.287.568; 6.284.456; 6.284.194; 6.274.337;
	6.270.956; 6.270.769; 6.268.484; 6.265.562; 6.265.149; 6.262.029; 6.261.762; 6.261.571; 6.261.569; 6.258.599;
	6.258.358; 6.248.332; 6.245.331; 6.242.461; 6.241.986; 6.235.526; 6.235.466; 6.232.120; 6.228.361; 6.221.579;
	6.214.862; 6.214.804; 6.210.963; 6.210.873; 6.207.185; 6.203.974; 6.197.755; 6.197.531; 6.197.476; 6.194.142;
	6.190.871; 6.190.666; 6.168.923; 6.156.302; 6.153.408; 6.153.392; 6.153.392; 6.153.392; 6.153.392; 6.153.392; 6.153.392;
15	6.146.614; 6.143.876 6.140.059; 6.140.043; 6.139.748; 6.132.992; 6.124.306; 6.124.132; 6.121.006; 6.120.990;
	6.114.507; 6.114.143; 6.110.466; 6.107.020; 6.103.521; 6.100.234; 6.099.848; 6.099.847; 6.096.291; 6.093.405;
	6.090.392; 6.087.476; 6.083.903; 6.080.846; 6.080.725; 6.074.650; 6.074.646; 6.070.126; 6.063.905; 6.063.564;
	6.060.256; 6.060.064; 6.048.530; 6.045.788; 6.043.347; 6.043.248; 6.042.831; 6.037.165; 6.033.672; 6.030.772;
	6.030.770; 6.030.618; 6.025.141; 6.025.125; 6.020.468; 6.019.979; 6.017.543; 6.017.537; 6.015.694; 6.015.661;
20	6.013.484; 6.013.432; 6.007.838; 6.004.811; 6.004.807; 6.004.763; 5.998.132; 5.993.819; 5.989.806; 5.985.926;
	5.985.641; 5.985.545; 5.981.537; 5.981.505; 5.981.170; 5.976.551; 5.972.339; 5.965.371; 5.962.428; 5.962.318;
	5.961.979; 5.961.970; 5.958.765; 5.958.422; 5.955.647; 5.955.342; 5.951.986; 5.951.975; 5.942.237; 5.939.277;
	5.939.074; 5.935.580; 5.928.930; 5.928.913; 5.928.644; 5.928.642; 5.925.513; 5.922.550; 5.922.325; 5.919.458;
	5.916.806; 5.916.563; 5.914.395; 5.914.109; 5.912.338; 5.912.176; 5.912.170; 5.906.936; 5.895.650; 5.891.623;
25	5.888.726; 5.885.580 5.885.578; 5.879.685; 5.876.731; 5.876.716; 5.874.226; 5.872.012; 5.871.747; 5.869.058;
	5.866.694; 5.866.341; 5.866.320; 5.866.319; 5.866.137; 5.861.290; 5.858.740; 5.858.647; 5.858.646; 5.858.369;
	5.858.368; 5.858.366; 5.856.185; 5.854.400; 5.853.736; 5.853.725; 5.853.724; 5.852.186; 5.851.829; 5.851.529;
	5.849.475; 5.849.288; 5.843.728; 5.843.723; 5.843.640; 5.843.635; 5.840.480; 5.837.510; 5.837.250; 5.837.242;
	5.834.599; 5.834.441; 5.834.429; 5.834.256; 5.830.876; 5.830.641; 5.830.475; 5.830.458; 5.830.457; 5.827.749;
30	5.827.723; 5.824.497; 5.824.304; 5.821.047; 5.817.767; 5.817.754; 5.817.637; 5.817.470; 5.817.318; 5.814.482;
	5.807.707; 5.804.604; 5.804.371; 5.800.822; 5.795.955; 5.795.743; 5.795.572; 5.789.388; 5.780.279; 5.780.038;
	5.776.703; 5.773.260; 5.770.572; 5.766.844; 5.766.842; 5.766.625; 5.763.574; 5.763.190; 5.762.965; 5.759.769;
	5.756.666; 5.753.258; 5.750.373; 5.747.641; 5.747.526; 5.747.028; 5.736.320; 5.736.146; 5.733.760; 5.731.189;
	5.728.385; 5.721.095; 5.716.826; 5.716.637; 5.716.613; 5.714.374; 5.709.879; 5.709.860; 5.709.843; 5.705.331;
35	5.703.057; 5.702.707 5.698.178; 5.688.914; 5.686.078; 5.681.831; 5.679.784; 5.674.984; 5.672.472; 5.667.964;
	5.667.783; 5.665.536; 5.665.355; 5.660.990; 5.658.745; 5.658.569; 5.643.756; 5.641.624; 5.639.854; 5.639.598;
	5.637.677; 5.637.455; 5.633.234; 5.629.153; 5.627.025; 5.622.705; 5.614.413; 5.610.035; 5.607.831; 5.606.026;
	5.601.819; 5.597.688; 5.593.972; 5.591.829; 5.591.823; 5.589.466; 5.587.285; 5.585.254; 5.585.250; 5.580.773;
	5.580.739; 5.580.563; 5.573.916; 5.571.667; 5.569.468; 5.558.865; 5.556.745; 5.550.052; 5.543.328; 5.541.100;
40	5.541.057; 5.534.406; 5.529.765; 5.523.232; 5.516.895; 5.514.541; 5.510.264; 5.500.161; 5.480.967; 5.480.966;
	5.470.701; 5.468.606; 5.462.852; 5.459.127; 5.449.601; 5.447.838; 5.447.837; 5.439.809; 5.439.792; 5.418.136;
	5.399.501; 5.397.695; 5.391.479; 5.384.240; 5.374.519; 5.374.518; 5.374.516; 5.364.933; 5.359.046; 5.356.772;
	5.354.654; 5.344.755; 5.335.673; 5.332.567; 5.320.940; 5.317.009; 5.312.902; 5.304.466; 5.296.347; 5.286.852;
	5.268.265; 5.264.356; 5.264.342; 5.260.308; 5.256.767; 5.256.561; 5.252.556; 5.230.998; 5.230.887; 5.227.159;
45	5.225.347; 5.221.610 5.217.861; 5.208.321; 5.206.136; 5.198.346; 5.185.147; 5.178.865; 5.173.400; 5.173.399;
	5.166.050; 5.156.951; 5.135.864; 5.122.446; 5.120.662; 5.103.836; 5.100.777; 5.100.662; 5.093.230; 5.077.284;
	5.070.010; 5.068.174; 5.066.782; 5.055.391; 5.043.262; 5.039.604; 5.039.522; 5.030.718; 5.030.555; 5.030.449;
	5.019.387; 5.013.556; 5.008.183; 5.004.697; 4.997.772; 4.983.529; 4.983.387; 4.965.069; 4.945.082; 4.921.787;
	4.918.166; 4.900.548; 4.888.290; 4.886.742; 4.885.235; 4.870.003; 4.869.903; 4.861.707; 4.853.326; 4.839.288;
50	4.833.072 y 4.795.739.

El VIH o los fragmentos inmunogénicos del mismo, pueden utilizarse como epítipo del VIH. Por ejemplo, también son útiles los nucleótidos del VIH de las patentes de los Estados Unidos números 7.393.949. 7.374.877. 7.306.901. 7.303.754. 7.173.014. 7.122.180. 7.078.516. 7.022.814. 6.974.866. 6.958.211. 6.949.337. 6.946.254. 6.896.900. 6.887.977. 6.870.045. 6.803.187. 6.794.129. 6.773.915. 6.768.004. 6.706.268. 6.696.291. 6.692.955. 6.656.706.

55 6.649.409. 6.627.442. 6.610.476. 6.602.705. 6.582.920. 6.557.296. 6.531.587. 6.531.137. 6.500.623. 6.448.078. 6.429.306. 6.420.545. 6.410.013. 6.407.077. 6.395.891. 6.355.789. 6.335.158. 6.323.185. 6.316.183. 6.303.293. 6.300.056. 6.277.561. 6.270.975. 6.261.564. 6.225.045. 6.222.024. 6.194.391. 6.194.142. 6.162.631. 6.114.167. 6.114.109. 6.090.392. 6.060.587. 6.057.102. 6.054.565. 6.043.081. 6.037.165. 6.034.233. 6.033.902. 6.030.769. 6.020.123. 6.015.661. 6.010.895. 6.001.555. 5.985.661. 5.980.900. 5.972.596. 5.939.538. 5.912.338. 5.869.339.

60 5.866.701. 5.866.694. 5.866.320. 5.866.137. 5.864.027. 5.861.242. 5.858.785. 5.858.651. 5.849.475. 5.843.638. 5.840.480. 5.821.046. 5.801.056. 5.786.177. 5.786.145. 5.773.247. 5.770.703. 5.756.674. 5.741.706. 5.705.612. 5.693.752. 5.688.637. 5.688.511. 5.684.147. 5.665.577. 5.585.263. 5.578.715. 5.571.712. 5.567.603. 5.554.528. 5.545.726. 5.527.895. 5.527.894. 5.223.423. 5.204.259. 5.144.019. 5.051.496 y 4.942.122.

En la presente solicitud se puede utilizar cualquier epítipo reconocido por un anticuerpo anti-VIH. Por ejemplo, son

útiles los anticuerpos anti-VIH de las patentes de los Estados Unidos números 6.949.337. 6.900.010. 6.821.744. 6.768.004. 6.613.743. 6.534.312. 6.511.830. 6.489.131. 6.242.197. 6.114.143. 6.074.646. 6.063.564. 6.060.254. 5.919.457. 5.916.806. 5.871.732. 5.824.304. 5.773.247. 5.736.320. 5.637.455. 5.587.285. 5.514.541. 5.317.009. 4.983.529. 4.886.742. 4.870.003 y 4.795.739. Además, también son útiles los anticuerpos monoclonales anti-VIH de las patentes de los Estados Unidos números 7.074.556. 7.074.554. 7.070.787. 7.060.273. 7.045.130. 7.033.593. RE39.057. 7.008.622. 6.984.721. 6.972.126. 6.949.337. 6.946.465. 6.919.077. 6.916.475. 6.911.315. 6.905.680. 6.900.010. 6.825.217. 6.824.975. 6.818.392. 6.815.201. 6.812.026. 6.812.024. 6.797.811. 6.768.004. 6.703.019. 6.689.118. 6.657.050. 6.608.179. 6.600.023. 6.596.497. 6.589.748. 6.569.143. 6.548.275. 6.525.179. 6.524.582. 6.506.384. 6.498.006. 6.489.131. 6.465.173. 6.461.612. 6.458.933. 6.432.633. 6.410.318. 6.406.701. 6.395.275. 10 6.391.657. 6.391.635. 6.384.198. 6.376.170. 6.372.217. 6.344.545. 6.337.181. 6.329.202. 6.319.665. 6.319.500. 6.316.003. 6.312.931. 6.309.880. 6.296.807. 6.291.239. 6.261.558. 6.248.514. 6.245.331. 6.242.197. 6.241.986. 6.228.361. 6.221.580. 6.190.871. 6.177.253. 6.146.635. 6.146.627. 6.146.614. 6.143.876. 6.132.992. 6.124.132. 6.114.143. 6.103.238. 6.060.254. 6.039.684. 6.030.772. 6.020.468. 6.013.484. 6.008.044. 5.998.132. 5.994.515. 5.993.812. 5.985.545. 5.981.278. 5.958.765. 5.939.277. 5.928.930. 5.922.325. 5.919.457. 5.916.806. 5.914.109. 15 5.911.989. 5.906.936. 5.889.158. 5.876.716. 5.874.226. 5.872.012. 5.871.732. 5.866.694. 5.854.400. 5.849.583. 5.849.288. 5.840.480. 5.840.305. 5.834.599. 5.831.034. 5.827.723. 5.821.047. 5.817.767. 5.817.458. 5.804.440. 5.795.572. 5.783.670. 5.776.703. 5.773.225. 5.766.944. 5.753.503. 5.750.373. 5.747.641. 5.736.341. 5.731.189. 5.707.814. 5.702.707. 5.698.178. 5.695.927. 5.665.536. 5.658.745. 5.652.138. 5.645.836. 5.635.345. 5.618.922. 5.610.035. 5.607.847. 5.604.092. 5.601.819. 5.597.896. 5.597.688. 5.591.829. 5.558.865. 5.514.541. 5.510.264. 20 5.478.753. 5.374.518. 5.374.516. 5.344.755. 5.332.567. 5.300.433. 5.296.347. 5.286.852. 5.264.221. 5.260.308. 5.256.561. 5.254.457. 5.230.998. 5.227.159. 5.223.408. 5.217.895. 5.180.660. 5.173.399. 5.169.752. 5.166.050. 5.156.951. 5.140.105. 5.135.864. 5.120.640. 5.108.904. 5.104.790. 5.049.389. 5.030.718. 5.030.555. 5.004.697. 4.983.529. 4.888.290. 4.886.742 y 4.853.326.

Los vectores deben elegirse generalmente de manera que contengan una región reguladora del gen adecuada, tal como un promotor o potenciador, de manera que los antígenos y/o anticuerpos se puedan expresar.

Por ejemplo, cuando el objetivo es expresar los anticuerpos y/o antígenos *in vitro*, o en células cultivadas, o en cualquier sistema procarionta o eucarionta con el fin de producir la proteína(s) codificada(s) por ese anticuerpo y/o antígeno, puede utilizarse cualquier vector adecuado dependiendo de la aplicación. Por ejemplo, pueden usarse plásmidos, vectores víricos, vectores bacterianos, vectores protozoarios, vectores de insectos, vectores de expresión de baculovirus, vectores de levadura, vectores de células de mamíferos y similares. Los vectores adecuados pueden ser seleccionados por el experto en la materia teniendo en cuenta las características del vector y los requisitos para expresar los anticuerpos y/o antígenos bajo las circunstancias identificadas.

Cuando el objetivo es expresar los anticuerpos y/o antígenos *in vivo* en un sujeto, por ejemplo para generar una respuesta inmunitaria contra un antígeno de VIH-1 y/o una inmunidad protectora contra el VIH-1, deberían elegirse los vectores de expresión que son adecuados para la expresión en ese sujeto y que son seguros para el uso *in vivo*. Por ejemplo, puede ser deseable expresar los anticuerpos y/o antígenos en un animal de laboratorio, tal como para pruebas preclínicas de las composiciones inmunógenas del VIH-1 y las vacunas. A veces, será deseable expresar los anticuerpos y/o antígenos en sujetos humanos, tales como en ensayos clínicos y para el uso clínico real de las composiciones inmunógenas y la vacuna. Pueden emplearse cualesquiera vectores que sean adecuados para tales usos y está dentro de las capacidades del experto en la materia seleccionar un vector adecuado. Se puede preferir que los vectores usados para estas aplicaciones *in vivo* estén atenuados para que el vector se amplifique en el sujeto. Por ejemplo, si se usan vectores plasmídicos, estos preferentemente carecerán de un origen de replicación que funcione en el sujeto para aumentar la seguridad para su uso *in vivo* en el sujeto. Si se utilizan vectores víricos, preferentemente se atenuan o son defectuosos en la replicación en el sujeto, de nuevo, con el fin de aumentar la seguridad para el uso *in vivo* en el sujeto.

Se pueden usar vectores virales. Los vectores de expresión viral son bien conocidos por los expertos en la materia e incluyen, por ejemplo, virus tales como adenovirus, virus adenoasociados (AAV), alfavirus, herpesvirus, retrovirus y poxvirus, incluyendo virus avipox, poxvirus atenuados, virus vaccinia y particularmente, el virus vaccinia Ankara modificado (MVA, N.º de Acceso ATCC VR-1566). Tales virus, cuando se usan como vectores de expresión, son innatamente no patógenos en los sujetos seleccionados, tales como seres humanos o han sido modificados para hacerlos no patógenos en los sujetos seleccionados. Por ejemplo, los adenovirus y los alfavirus defectuosos de replicación son bien conocidos y pueden usarse como vectores de administración génica.

Las secuencias de nucleótidos y los vectores se pueden suministrar a las células, por ejemplo si el objetivo es expresar los antígenos del VIH-1 en las células con el fin de producir y aislar las proteínas expresadas, tales como de las células cultivadas en cultivo. Para expresar los anticuerpos y/o antígenos en células, pueden usarse procedimientos de transfección, transformación o administración génica adecuados. Tales procedimientos son bien conocidos por los expertos en la materia y el experto en la materia fácilmente podría seleccionar un procedimiento adecuado dependiendo de la naturaleza de las secuencias de nucleótidos, vectores y tipos de células utilizados. Por ejemplo, se podría usar transfección, transformación, microinyección, infección, electroporación, lipofección o administración mediada por liposomas. La expresión de los anticuerpos y/o antígenos puede llevarse a cabo en cualquier tipo adecuado de células hospedadoras, tales como células bacterianas, levaduras, células de insecto y células de mamífero. Los anticuerpos y/o antígenos también pueden expresarse usando incluyendo la

transcripción/traducción *in vitro*. Todos estos procedimientos son bien conocidos por los expertos en la materia y el experto en la materia fácilmente podría seleccionar un procedimiento adecuado dependiendo de la naturaleza de las secuencias de nucleótidos, vectores y tipos de células utilizados.

5 En realizaciones preferidas, las secuencias de nucleótidos, anticuerpos y/o antígenos se administran *in vivo*, por ejemplo si el objetivo es producir una respuesta inmunogénica en un sujeto. Un "sujeto" en el contexto de la presente invención puede ser cualquier animal. Por ejemplo, en algunas realizaciones se puede desear expresar los transgenes en un animal de laboratorio, tal como para pruebas preclínicas de las composiciones inmunógenas del VIH-1 y vacunas. Por ejemplo, será deseable expresar los anticuerpos y/o antígenos en sujetos humanos, tales como en ensayos clínicos y para el uso clínico real de las composiciones inmunógenas y la vacuna. 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 el VIH-1.

15 Para tales aplicaciones *in vivo*, las secuencias de nucleótidos, anticuerpos y/o antígenos se administran preferentemente como un componente de una composición inmunogénica que comprende las secuencias de nucleótidos y/o antígenos en mezcla con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Las composiciones inmunogénicas son útiles para estimular una respuesta inmunitaria contra el VIH-1 y pueden usarse como uno o más componentes de una vacuna profiláctica o terapéutica contra el VIH-1 para la prevención, mejora o 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 y/o antígenos a un sujeto, tal como un ser humano, de manera que los anticuerpos y/o antígenos se expresan entonces en el sujeto para provocar una respuesta inmunitaria.

20 Las composiciones de la divulgación pueden ser suspensiones inyectables, soluciones, pulverizaciones, polvos liofilizados, jarabes, elixires y similares. Puede utilizarse cualquier forma adecuada de composición. Para preparar dicha composición, se mezcla un ácido nucleico o vector, que tiene el grado de pureza deseado, con uno o más vehículos y/o excipientes farmacéuticamente aceptables. Los vehículos y excipientes deben ser "aceptables" en el sentido de ser compatibles con los otros componentes de la composición. Los vehículos, excipientes o estabilizadores aceptables no son tóxicos para los receptores a las dosis y concentraciones empleadas, e incluyen, pero no se limitan a agua, solución salina, solución salina tamponada con fosfato, dextrosa, glicerol, etanol o combinaciones de los mismos, tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes incluyendo ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencil amonio, cloruro de hexametonio, cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio, fenol, alcohol butílico o bencilico, alquilparabenos tales como metil o propilparabeno, catecol, resorcinol, ciclohexanol, 3-pentanol y m-cresol); polipéptido de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 restos); proteínas, tales como albúmina sérica, 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 Zn-proteína) y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEEN®, PLURONICS® o polietilenglicol (PEG).

25 También se puede formular una composición inmunogénica o inmunológica en forma de una emulsión de aceite en agua. La emulsión de aceite en agua puede basarse, por ejemplo, en aceite de parafina líquido ligero (del tipo descrito en la Farmacopea Europea); aceite de isoprenoide tal como escualano, EICOSANE® o tetratetracontano; aceite resultante de la oligomerización de alqueno(s), p.ej., isobuteno o deceno; ésteres de ácidos o de alcoholes que contienen un grupo alquilo lineal, tales como aceites vegetales, oleato de etilo, di(caprilato/caprato) de propilenglicol, tri(caprilato/caprato) de glicerilo o dioleato de propilenglicol; ésteres de ácidos grasos ramificados o alcoholes, p.ej., ésteres de ácido isoesteárico. El aceite se utiliza ventajosamente en combinación con emulsionantes para formar la emulsión. Los emulsionantes pueden ser tensioactivos no iónicos, tales como ésteres de sorbitán, mannide (p. ej., oleato de anhidromannitol), glicerol, poliglicerol, propilenglicol y ácido oleico, ácido isoesteárico, ricinoleico o hidroxisteárico, los cuales están opcionalmente etoxilados y copolímeros de bloques de polioxipropileno-polioxietileno, tales como los productos Pluronic®, p.ej., L121. El adyuvante puede ser una mezcla de emulsionante(s), agente formador de micelas y aceite tal como el que está disponible comercialmente con el nombre de Provac® (IDEC Pharmaceuticals, San Diego, CA).

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

35 También pueden incluirse adyuvantes. Los adyuvantes incluyen, pero no se limitan a, sales minerales (por ejemplo, AlK(SO₄)₂, AlNa(SO₄)₂, AlNH(SO₄)₂, sílice, alumbre, Al(OH)₃, Ca₃(PO₄)₂, caolín o carbono), polinucleótidos con o sin complejos estimulantes del sistema inmunitario (ISCOM) (por ejemplo, oligonucleótidos CpG, tales como los descritos en Chuang, T.H. Et al., (2002) J. Leuk. Biol. 71(3): 538-44; Ahmad-Nejad, P. et al. (2002) Eur. J. Immunol. 32(7):1958-68; Ácidos poli IC o poli AU, poliarginina con o sin CpG (también conocida en la técnica como IC31, véase Schellack, C. et al (2003) Proceedings of the 34th Annual Meeting of the German Society of Immunology; Lingnau, K. et al (2002) Vaccine 20(29-30): 3498-508), JuvaVax™ (patente US-6.693.086), determinadas sustancias naturales (por ej., cera D de *Mycobacterium tuberculosis*, sustancias encontradas en *Corynebacterium parvum*,

Bordetella pertussis, o miembros del género *Brucella*), flagelina (ligando del receptor de tipo Toll 5); véase McSorley, S.J. et al (2002) J. Immunol. 169(7):3914-9), saponinas tales como QS21, QS17 y QS7 (patentes US-5.057.540; US-5.650.398; US-6.524.584; US-6.645.495), monofosforil lípido A, en particular, 3-des-O-acilado monofosforil lípido A (3D-MPL), imiquimod (también conocido en la técnica como IQM y comercialmente disponible como Aldara®; patentes US-4.689.338; US-5.238.944; Zuber, A.K. et al. (2004) 22(13-14): 1791-8) y el inhibidor de CCR5 CMPD167 (véase Veazey, R.S. et al (2003) J. Exp. Med. 198: 1551-1562).

El hidróxido o el fosfato de aluminio (alumbre) se usan comúnmente en una solución al 0,05 a 0,1 % en solución salina tamponada con fosfato. Otros adyuvantes que pueden usarse, especialmente con vacunas de ADN, son la toxina del cólera, especialmente CTA1-DD/ISCOM (véase Mowat, A.M. et al (2001) J. Immunol. 167(6): 3398-405), polyphosphazenes (Allcock, H.R. (1998) App. Organometallic Chem. 12(10-11): 659-666; Payne, L.G. et al (1995) Pharm. Biotechnol. 6: 473-93), citoquinas tales como, pero sin limitarse a, IL-2, IL-4, GM-CSF, IL-12, IL-15, IGF-1, IFN- α , IFN- β e IFN- γ (Boyer et al., (2002) J. Liposome Res. 121:137-142; WO01/095919), proteínas inmunorreguladoras tales como CD40L (ADX40, véase, por ejemplo, WO03/063899) y el ligando CD1a de células asesinas naturales (también conocido como CRONY o α -galactosil ceramida; Green, T.D. et al., (2003) J. Virol. 77(3): 2046-2055), proteínas de fusión inmunoestimuladoras tales como IL-2 fusionadas con el fragmento Fc de inmunoglobulinas (Barouch et al., Science 290:486-492, 2000) y las moléculas coestimuladoras B7.1 y B7.2 (Boyer), todas las cuales pueden administrarse como proteínas o en forma de ADN, en los mismos vectores de expresión que los que codifican los antígenos o en vectores de expresión separados.

Los adyuvantes pueden ser lecitina combinada con un polímero acrílico (Adjuplex-LAP), gotitas de aceite recubiertas de lecitina en una emulsión de aceite en agua (Adjuplex-LE) o lecitina y 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 vectores de expresión en un sitio de acción deseado y liberarlos a una velocidad apropiada y controlable. Los procedimientos para preparar formulaciones de liberación controlada son conocidos en la técnica. Por ejemplo, las preparaciones de liberación controlada pueden producirse mediante el uso de polímeros para formar complejo o absorber el inmunógeno y/o la composición inmunogénica. Se puede preparar una formulación de liberación controlada utilizando macromoléculas apropiadas (por ejemplo, poliésteres, poliaminoácidos, polivinilpirrolidona, etilenvinilacetato, metilcelulosa, carboximetilcelulosa o sulfato de protamina) conocidas por proporcionar las características de liberación controlada o el perfil de liberación deseados. Otro procedimiento posible para controlar la duración de la acción por una preparación de liberación controlada es incorporar los principios activos en partículas de un material polimérico tales como, por ejemplo, poliésteres, poliaminoácidos, hidrogeles, ácido poliláctico, ácido poliglicólico, copolímeros de estos ácidos o copolímeros de etileno-acetato de vinilo. En otra alternativa, en lugar de incorporar estos principios activos en partículas poliméricas, es posible atrapar estos materiales en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o por polimerización interfacial, por ejemplo, microcápsula de hidroximetilcelulosa o gelatina y microcápsula de poli(metilmecacrilato) respectivamente, en sistemas coloidales de administración de fármacos (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Tales técnicas se desvelan en New Trends and Developments in Vaccines, Voller et al. (eds.), University Park Press, Baltimore, Md., 1978 and Remington's Pharmaceutical Sciences, 16ª edición.

Las dosis adecuadas de los ácidos nucleicos y vectores de expresión (colectivamente, los inmunógenos) de la composición inmunogénica pueden determinarse fácilmente por los expertos en la materia. Por ejemplo, la dosis de los inmunógenos puede variar dependiendo de la vía de administración y del tamaño del sujeto. Las dosis adecuadas pueden ser determinadas por los expertos en la materia, por ejemplo midiendo la respuesta inmunitaria de un sujeto, tal como un animal de laboratorio, usando técnicas inmunológicas convencionales y ajustando las dosis según sea apropiado. Tales técnicas para medir la respuesta inmunitaria del sujeto incluyen, pero no se limitan a, ensayos de liberación de cromo, ensayos de unión a tetrámero, ensayos ELISPOT de IFN- γ , ensayos ELISPOT de IL-2, ensayos de citoquinas intracelulares y otros ensayos de detección inmunológica, por ej., como se detalla en el texto "Antibodies: A Laboratory Manual" de Ed Harlow y David Lane.

Cuando se proporcionan profilácticamente, las composiciones inmunogénicas se administran idealmente a un sujeto antes de la infección por VIH o signos de la infección por VIH, o antes de cualquier síntoma debido al SIDA, especialmente en sujetos de alto riesgo. La administración profiláctica de las composiciones inmunogénicas puede servir para proporcionar inmunidad protectora de un sujeto contra la infección por VIH-1 o para prevenir o atenuar la progresión del SIDA en un sujeto ya infectado con VIH-1. Cuando se proporcionan terapéuticamente, las composiciones inmunogénicas pueden servir para mejorar y tratar los síntomas del SIDA y se utilizan ventajosamente después de la infección tan pronto como sea posible, preferentemente antes de la aparición de cualquier síntoma del SIDA, pero también pueden usarse en (o después) el inicio de los síntomas de la enfermedad.

Las composiciones inmunogénicas pueden administrarse utilizando cualquier procedimiento de administración adecuado incluyendo, pero sin limitarse a, administración intramuscular, intravenosa, intradérmica, mucosa y tópica. Dichas técnicas son bien conocidas por los expertos en la materia. Ejemplos más específicos de procedimientos de administración son inyección intramuscular, inyección intradérmica e inyección subcutánea. Sin embargo, la administración no debe limitarse a los procedimientos de inyección. Además, la administración de ADN al tejido

animal se ha conseguido mediante liposomas catiónicos (Watanabe et al., (1994) Mol. Reprod. Dev. 38:268-274 y documento WO 96/2013), inyección directa de ADN desnudo en tejido muscular animal (Robinson et al., (1993) Vaccine 11:957-960; Hoffman et al., (1994) Vaccine 12:1529-1533; Xiang et al., (1994) Virology 199:132-140; Webster et al., (1994) Vaccine 12:1495-1498; Davis et al., (1994) Vaccine 12:1503-1509 y Davis et al., (1993) Hum. Mol. Gen. 2:1847-1851) o la inyección intradérmica de ADN mediante la tecnología de la "pistola génica" (Johnston et al., (1994) Meth. Cell Biol. 43: 353-365). Como alternativa, las vías de administración pueden ser orales, intranasales o por cualquier otra vía adecuada. La administración también se lleva a cabo a través de una superficie de la mucosa tal como la mucosa anal, vaginal u oral.

Los esquemas (o regímenes) de inmunización son bien conocidos en los animales (incluyendo seres humanos) y pueden determinarse fácilmente para el sujeto particular y la composición inmunogénica. Por lo tanto, los inmunógenos se pueden administrar una o más veces al sujeto. Preferentemente, existe un intervalo de tiempo establecido entre administraciones separadas de la composición inmunogénica. Aunque este intervalo varía para cada sujeto, normalmente oscila entre 10 días y varias semanas y suele ser de 2, 4, 6 u 8 semanas. Para los seres humanos, el intervalo es generalmente de 2 a 6 semanas. Los regímenes de inmunización tienen generalmente de 1 a 6 administraciones de la composición inmunogénica, pero pueden tener tan solo una o dos o cuatro. Los procedimientos para inducir una respuesta inmunitaria también pueden incluir la administración de un adyuvante con los inmunógenos. En algunos casos, la vacunación de refuerzo anual, bianual u otro intervalo largo (5-10 años) puede complementar el protocolo de inmunización inicial.

Los presentes procedimientos también incluyen una variedad de regímenes de sensibilización-refuerzo, por ejemplo regímenes de refuerzo con refuerzo de ADN de adenovirus. En estos procedimientos, una o más inmunizaciones de sensibilización van seguidas por una o más inmunizaciones de refuerzo. La composición inmunogénica real puede ser igual o diferente para cada inmunización y el tipo de composición inmunogénica (por ejemplo, que contiene proteína o vector de expresión), la vía y la formulación de los inmunógenos también se pueden variar. Por ejemplo, si se usa un vector de expresión para las etapas de sensibilización y refuerzo, puede ser del mismo o de diferente tipo (por ejemplo, ADN o vector de expresión bacteriano o viral). Un régimen de sensibilización-refuerzo útil proporciona dos inmunizaciones de sensibilización, con un intervalo de cuatro semanas, seguidas por dos inmunizaciones de refuerzo a las 4 y 8 semanas después de la última inmunización de sensibilización. También debe ser fácilmente evidente para un experto en la materia que hay varias permutaciones y combinaciones que están abarcadas utilizando los vectores de expresión de ADN, bacteriano y vírico para proporcionar regímenes de sensibilización y de refuerzo.

La divulgación proporciona procedimientos para inducir una respuesta inmunitaria contra el VIH en un sujeto administrando una composición inmunogénica, que comprende preferentemente un vector de adenovirus que contiene ADN que codifica uno o más de los epítomos, una o más veces a un sujeto en el que los epítomos se expresan a un nivel suficiente para inducir una respuesta inmunitaria específica en el sujeto. Dichas inmunizaciones pueden repetirse varias 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 pueden administrarse solas, o pueden coadministrarse o administrarse secuencialmente, con otros inmunógenos del VIH y/o composiciones inmunogénicas del VIH, por ejemplo, con "otras" composiciones inmunológicas, antigénicas o vacunales o terapéuticas, proporcionando así composiciones multivalentes o "cóctel" o composiciones combinadas de la invención y procedimientos para emplearlas. De nuevo, los componentes y la forma (secuencial o coadministración) de la administración, así como las dosis pueden determinarse teniendo en cuenta factores tales como la edad, sexo, peso, especie y condición del sujeto particular y la vía de administración.

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

Muchos otros inmunógenos del VIH son conocidos en la técnica, uno de tales inmunógenos preferido es el HIVA (descrito en el documento WO 01/47955), el cual se puede administrar como una proteína, en un plásmido (por ejemplo, pThr.HIVA) o en un vector viral (por ejemplo, MVA.HIVA). Otro de estos inmunógenos del VIH es RENTA (descrito en el documento PCT/US2004/037699), el cual también se puede administrar como una proteína, en un plásmido (por ejemplo, pTh.RENTA) o en un vector viral (por ejemplo, MVA.RENTA).

Por ejemplo, un procedimiento para inducir una respuesta inmunitaria contra el VIH en un sujeto humano comprende administrar al menos una dosis de sensibilización de un inmunógeno del VIH y al menos una dosis de refuerzo de un inmunógeno del VIH, en el que el inmunógeno en cada dosis puede ser el mismo o diferente, siempre que al menos uno de los inmunógenos sea un epítomo de la presente solicitud, un ácido nucleico que codifica un epítomo de la solicitud o un vector de expresión, preferentemente un vector VSV, que codifica un epítomo de la solicitud y en el que los inmunógenos se administren en una cantidad o se expresan a un nivel suficiente para inducir una respuesta inmunitaria específica del VIH en el sujeto. La respuesta inmunitaria específica del VIH puede incluir una respuesta inmunitaria de linfocitos T específica del VIH o una respuesta inmunitaria de linfocitos B específica del VIH. Dichas

inmunizaciones pueden realizarse a intervalos, preferentemente de al menos 2-6 semanas o más.

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

Ejemplos:

Ejemplo 1: Identificación de Env solubles del VIH-1 con mejor unión a PG9/PG16

5 La gp120 desprendida se detectó como se indica a continuación. Se ensayaron más de 50 Env del VIH-1 del Clado B y C, panel del clado C de la India, algunos clados B de nivel I y unas pocas envolturas del virus fundador.

El procedimiento para la selección de la gp120 desprendida fue el siguiente:

- Transfectar células 293T con los plásmidos de enlace posterior NL4-3 y Env del VIH-1;
- Recoger el sobrenadante;
- 10 – Capturar la gp120 desprendida en placa ELISA revestida con D7324 (anti-C5 policlonal) y
- Determinar mediante sonda la Env capturada para la unión a b12, PG9 y PG16.

Los solicitantes tienen codones optimizados de las versiones gp120 y gp140 de las cuatro cepas del Clado C de la India que muestran una unión excepcional a PG9. Los solicitantes han ensayado las Env por transfección transitoria y mantienen la propiedad de unión como se ve en la gp120 desprendida. Los solicitantes pueden usar estas Env para estudios de inmunogenicidad, para generar herramientas para cartografiar anticuerpos similares a PG9 en sueros y/o generar gp120 reestructurados para una mejor presentación de un epítipo PG9.

Ejemplo 2: Mutación estabilizadora BG505 L111A para proteínas de la envoltura del VIH

El Ejemplo se refiere a una forma de estabilizar una proteína de la envoltura (Env) del VIH del Clado recombinante. Es una mutación L111A que elimina los agregados pero también estabiliza las proteínas. La mutación se describió anteriormente como la reducción de la formación de dímeros en una proteína del Clado B (Finzi A et al. J Virol Methods. 2010 Sep; 168(1-2):155-61). La misma mutación introducida en la proteína Env del Clado A no solo tuvo el mismo efecto sino que también permitió la purificación de las proteínas gp120 del VIH, lo cual antes no era posible, aumentando así la estabilidad general de la proteína. Un análisis adicional de las proteínas que llevan esta mutación confirmó que estas proteínas conservan la antigenicidad completa de la proteína de tipo silvestre, es decir, la unión de anticuerpos neutralizantes asociados con la resistencia al VIH. Los solicitantes han ensayado la unión de anticuerpos para varias variantes de conformación de la proteína de la envoltura: gp120 secretada y purificada de células de mamífero, gp140 con un motivo de trimerización artificial y gp160 sobre una superficie celular. También se ensayó un pseudovirus del VIH en un ensayo de neutralización así como células infectadas con un virus VSV recombinante. Para una aplicación de vacuna es importante retener las propiedades de un inmunógeno en una formulación que se puede administrar a sujetos vacunados. Con este fin, los solicitantes confirmaron que la proteína de la envoltura del Clado A mutada adsorbida sobre la superficie de las partículas de aluminio (fosfato de aluminio) (coadyuvante de vacuna ampliamente utilizado) conserva su capacidad de interactuar con anticuerpos neutralizantes. Se usó la gp120 L111A del Clado A para la inmunización de conejos en un experimento de inmunización de sensibilización con ADN – refuerzo con proteína. Los sueros resultantes de los animales inmunizados mostraron anticuerpos que se unen a proteínas de la envoltura afines y alternativas. También fue capaz de neutralizar los pseudovirus del VIH de Nivel 1 y Nivel 2.

El valor universal de esta mutación se confirmó mediante la creación de otra proteína de la envoltura, Clado C, con mejores propiedades de agregación.

Las secuencias de tipo silvestre originales se alinearon con la cepa de referencia HxB2 de la proteína de la envoltura del HIV. La leucina en la posición correspondiente a 111 en HxB2 fue reemplazada por alanina. La mutagénesis real se realizó por GeneArt (Life Technologies) y el ADN se suministró en un plásmido pCI-Neo o pCDNA. Se hicieron varias versiones de BG505 del Clado A: gp120, gp140, gp140 con motivo de trimerización GCN4 y gp160 delta CT (sin cola citoplasmática).

Las proteínas de la envoltura que llevan la mutación L111A y las versiones no mutadas (tipo silvestre) se produjeron por transfección transitoria de ADN de células HEK 293T o HEK 293S. Las células 293T y 293 S difieren en el tipo de glicosilación de las proteínas recombinantes secretadas. Las primeras producen proteínas con oligosacáridos complejos, mientras que las segundas producen proteínas con glicanos de tipo oligomanosa.

Las proteínas secretadas en los medios de cultivo celular se purificaron usando cromatografía de afinidad en columna con lectina de *Galanthus nivalis* (campanilla de invierno) (GNL). (Gilljam G. AIDS Res Hum Retroviruses. 1993 May; 9 (5):431-8)

La antigenicidad (unión a anticuerpos) se midió con múltiples anticuerpos humanos aislados de sujetos infectados con el VIH. Procedimientos utilizados para medir la antigenicidad: ELISA para Env recombinantes solubles capturadas mediante His-tags y citometría de flujo (FACS) para Env gp160 expresadas en la superficie celular.

Para el ensayo de neutralización, se generaron pseudovirus del VIH en células 293T con gp160 del Clado A sobre la superficie del virus. Se midió la actividad del anticuerpo neutralizante mediante la monitorización de la reducción en la expresión del indicador Luciferasa tras un único ciclo de infección viral en células TZM-bl (Li M et al. J Virol. 2005 Aug; 79(16): 10108-25).

5 Se realizaron estudios de inmunogenicidad en conejos. Con sensibilización con ADN para gp120 L111A del Clado A, seguido de refuerzo con proteína gp120 L111A del Clado A purificada. Para este estudio la proteína se purificó a partir de células HEK 293S. Se recogió sangre y se analizó la totalidad de los títulos de gp120 anti-VIH mediante ELISA con gp120 JR-CSF como patrón. Se realizó un análisis adicional midiendo la neutralización de un panel de pseudovirus de Nivel 1 y Nivel 2 en el ensayo TZM-bl mediante sueros de conejo (Li M et al. J Virol. 2005 Aug; 79(16):10108-25 y Mascola JR et al. J Virol. 2005 Aug; 79 (16): 10103-7).

10 La Figura 3 representa un mutante L111A de BG505 que tiene una agregación menor que la proteína original. Las muestras en forma no reducida (NR) o reducida (Red) se separaron por SDS-PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida). Cada muestra contiene 5 µg de proteína. Los solicitantes intentaron la purificación de la gp120 BG505 pero se encontraron con una proteína que estaba muy agregada y de baja actividad. Se preparó un mutante de la BG505 con un patrón de agregación inferior pronosticado (Finzi A et al., J Virol Methods. 2010 Sep; 168(1-2):155-61) y se expresó en células HEK 293S y 293T.

15 La Figura 4 representa la unión a gp120 BG505 L111A en sobrenadantes de cultivo celular. La unión del anticuerpo a gp120 BG505 L111A secretada en medio de cultivo celular se midió mediante ensayo inmunoenzimático ligado a enzimas (ELISA) en microplacas de 96 pocillos. El conjunto de anticuerpos utilizados para caracterizar la antigenicidad incluía anticuerpos específicos del trímero (PG9, PG16), anticuerpos específicos de unión a CD4 (CD4bs) (b6, b12, VRC01, VRC04/PGV04) y la serie PGT (PGT121-130).

20 La Figura 5 representa la purificación de BG505 en columnas de lectina y His-Trap. La proteína modificada puede purificarse por dos procedimientos de cromatografía de afinidad diferentes sin dañarse y conservar su capacidad antigénica. El ensayo se realizó mediante inmunotransferencia Western con anticuerpo neutralizante anti-His, IgG específica de manosa de amplio espectro, 2G12 y un grupo de inmunoglobulinas de individuos VIH-positivos (HIVIG). SDS-PAGE: tinción de proteínas (5 microgramos de proteína por pocillo) y transferencia Western (0,5 microgramos de proteína por pocillo) -detección de HIVIG, 2G12 y anti-His. La gp120 BG505 L111A era de células 293S.

25 La Figura 6 representa un perfil de antigenicidad por ELISA de BG505 L111A purificada mediante 2 métodos cromatográficos diferentes. La unión subsiguiente de los anticuerpos no se pudo distinguir por ELISA.

30 La Figura 7 representa la unión del anticuerpo a la proteína gp120 BG505 L111A purificada. Las proteínas que portaban la mutación L111A se purificaron con éxito tanto a partir de células 293S como 293T mediante columna GNL y conservaron su antigenicidad que fue confirmada por ELISA de proteínas purificadas. Con la excepción de algunos anticuerpos PGT, los anticuerpos más neutralizantes se unen a gp120 BG505 L111A. PGT135, 136 y 141 no se unen a la gp120 BG505.

35 La Figura 8 representa la unión del anticuerpo específica del cebador y específica de CD4bs al trímero BG505 recombinante. Debido a que las proteínas nativas de la envoltura del VIH existen como una espícula en forma de trímero en la superficie del virus, los solicitantes fabricaron trímeros recombinantes para probar el efecto de la mutación. Esta figura muestra que BG505 L111A conserva la capacidad de unir anticuerpos anti-gp120 en una conformación de trímero. El trímero se preparó añadiendo el motivo de trimerización GCN4 a la molécula gp140 BG505 L111A.

40 La Figura 9 representa los anticuerpos PGT que se unen al trímero BG505 L111A gp140 GCN4L4. Una observación similar fue válida para un grupo de anticuerpos neutralizantes PGT de amplio espectro.

45 La Figura 10 representa un ensayo de neutralización (comparación de los pseudovirus BG505 WT y BG505 L111A). El ensayo de neutralización se realizó con pseudovirus BG505 WT y L111A y un panel de anticuerpos neutralizantes humanos de amplio espectro. La mayoría de los anticuerpos neutralizan ambas formas de virus en la misma medida. Esta es una clara indicación de que la mutación L111A no pone en peligro la gp160 totalmente funcional.

50 La Figura 11 representa los perfiles de unión específicos de clados y mutantes por citofluorimetría. Se realizó otro ensayo de la integridad de la proteína de la envoltura gp160 con la mutación L111A con gp160 expresada en células HEK 293T mediante transfección transitoria con un ADN plasmídico. En este estudio se midió la unión de un panel de anticuerpos neutralizantes usando citofluorimetría (FACS). BG505 tenía el patrón de unión más amplio comparado con el Clado B (JR-FL) y el Clado C (16055). El patrón de unión a BG505WT y L111A fue similar.

55 La Figura 12 representa un ensayo de Neutralización con sueros de conejos inmunizados con gp120 BG505 L111A. Este estudio se realizó mediante la inmunización de conejos utilizando la estrategia de sensibilización-refuerzo. En este experimento los solicitantes usaron dos inmunizaciones de ADN (sensibilización 2X) y un refuerzo con proteínas con gp120 BG505 L111A. Los antisueros de los conejos del experimento se diluyeron y se aplicaron en el ensayo de neutralización de pseudovirus. Los resultados se muestran como títulos de IC50. Los conejos que fueron

sensibilizados con ADN y reforzados con proteína desarrollaron actividad de neutralización frente a los pseudovirus del Clado A, B y C.

Las proteínas de este ejemplo pueden ser útiles para la producción de proteínas de la envoltura recombinantes estables solubles como componentes de la vacuna del VIH, como cebo para la identificación de anticuerpos neutralizantes. Las proteínas purificadas de este Ejemplo pueden ser útiles como patrón analítico para la inmunización pasiva con anticuerpos para caracterizar el tipo de anticuerpos neutralizantes inducidos por vacunas para el VIH o para cristalización para identificar epítomos para anticuerpos neutralizantes y diseño de nuevos inmunógenos. Las proteínas de este ejemplo pueden ser útiles en el diseño de inmunógenos genéticos (ADN, vector viral) que llevan proteínas de la envoltura con la mutación estabilizadora o de partículas similares a virus que llevan proteínas de la envoltura con la mutación estabilizadora.

Ejemplo 3: Mutación de estabilización BG505 L111A T332N para las proteínas de la envoltura del VIH

El Ejemplo se refiere a procedimientos para mejorar la unión de ciertos anticuerpos PGT a una proteína de la envoltura del VIH del Clado A recombinante. La mutación T332N que introduce un potencial sitio de glicosilación es importante como parte de epítomos para algunos anticuerpos PGT (Walker LM et al. Nature. 2011,477 (7365):466-70 y Pejchal R et al. Science. 2011, 334(6059):1097-103). La proteína se expresó como gp120 BG505 L111A T332N. Un análisis adicional de las proteínas que llevan esta mutación confirmó que estas proteínas conservan la antigenicidad completa de la proteína de tipo silvestre, es decir, la unión de anticuerpos neutralizantes asociados con la resistencia al VIH. Además de esos anticuerpos, una familia de anticuerpos PGT135 y PGT136 se unían a la proteína mutante. Otros anticuerpos, por ejemplo la familia PGT121, mejoraron sus propiedades de unión. La unión a la proteína T332N mutante no depende de la línea celular utilizada para la expresión. Se usaron células HEK 293T (que producen oligosacáridos complejos) y células HEK 293 S (oligosacáridos altamente manosilados) sin cambios en las propiedades de unión.

Las secuencias de tipo silvestre originales se alinearon con la cepa de referencia HxB2 de la proteína de la envoltura del VIH. La treonina en la posición correspondiente a 332 en HxB2 fue reemplazada por alanina. La mutagénesis real se realizó por GeneArt (Life Technologies) y el ADN se administró en un plásmido pCI-Neo o pCDNA. Se produjo la gp120 BG505 del Clado A.

Las proteínas de la envoltura que llevan la mutación T332N y las versiones no mutadas (tipo silvestre) fueron producidas por transfección transitoria de ADN de células HEK 293T o HEK 293S. Las células 293T y 293S difieren en el tipo de glicosilación de proteínas recombinantes secretadas. Las primeras producen proteínas con oligosacáridos complejos, mientras que las segundas producen proteínas con glicanos de tipo oligomanosa.

Las proteínas secretadas a los medios de cultivo celular se purificaron usando cromatografía de afinidad en la columna de lectina de *Galanthus nivalis* (campanilla de invierno) (GNL).

La antigenicidad (unión a anticuerpos) se midió con múltiples anticuerpos humanos aislados de sujetos infectados con el VIH. Procedimientos utilizados para medir la antigenicidad: ELISA para Env recombinantes solubles capturadas mediante His-tag.

La Figura 13 representa la unión a gp120 BG505 L111A. La unión del anticuerpo a gp120 BG505 L111A secretada en medio de cultivo celular se midió mediante ensayo inmunoenzimático ligado a enzimas (ELISA) en microplacas de 96 pocillos. El conjunto de anticuerpos utilizados para caracterizar la antigenicidad incluía anticuerpos específicos del trímero (PG9, PG16), anticuerpos específicos del sitio de unión a CD4 (CD4bs) (b6, b12, VRC01, VRC04/PGV04) y la serie PGT (PGT121-136). Los anticuerpos que demostraron diferencia en las propiedades de unión se muestran en rojo.

Las proteínas de este Ejemplo pueden ser útiles para la producción de proteínas de la envoltura recombinantes solubles como componentes de la vacuna del VIH, como cebo para la identificación de anticuerpos neutralizantes. Las proteínas purificadas de este Ejemplo pueden ser útiles como patrón analítico para inmunización pasiva con anticuerpos, para caracterizar el tipo de anticuerpos neutralizantes inducidos por las vacunas del VIH o para cristalización para identificar epítomos para anticuerpos neutralizantes y diseño de nuevos inmunógenos. Las proteínas de este ejemplo pueden ser útiles en el diseño de inmunógenos genéticos (ADN, vector viral) o partículas similares a virus que llevan envolturas con propiedades antigénicas e inmunogénicas mejoradas.

La divulgación se describe adicionalmente mediante los siguientes párrafos numerados:

1. Una glicoproteína de la envoltura del VIH-1 soluble aislada o no natural.
2. La glicoproteína del párrafo 1, en la que la glicoproteína se aísla de un virus del Clado A del VIH-1, virus del Clado B del VIH-1, virus del Clado C del VIH-1, pseudovirus del Clado A del VIH-1, pseudovirus del Clado B del VIH-1 o pseudovirus del Clado C del VIH-1.
3. La glicoproteína del párrafo 1 o 2, en la que la glicoproteína se une a un anticuerpo ampliamente neutralizante.
4. La glicoproteína del párrafo 3, en la que el anticuerpo es PG9 y/o PG16.
5. La glicoproteína de cualquiera de los párrafos 1-4, en la que las glicoproteínas de la envoltura solubles se aíslan de un virus del Clado A del VIH-1, virus del Clado B del VIH-1, virus del Clado C del VIH-1, pseudovirus del Clado A

del VIH-1, pseudovirus del Clado B del VIH-1 o pseudovirus del Clado C del VIH-1, el virus 6535, el virus 13095, el virus 16055, el virus 25710, el virus 25925, el virus CAAN o el virus Zm109F.

6. La glicoproteína de cualquiera de los párrafos 1-5, en la que una secuencia de aminoácidos de la glicoproteína tiene una secuencia de consenso sustancialmente similar a la secuencia de consenso representada en las Figs. 2A-2J.

7. Un procedimiento para detectar anticuerpos neutralizantes de amplio espectro que comprende poner en contacto la glicoproteína de cualquiera de los párrafos 1 a 6 con un suero animal o humano, aislar la glicoproteína en complejo con los anticuerpos neutralizantes de amplio espectro, seleccionando así un anticuerpo neutralizante de amplio espectro.

8. Un procedimiento para identificar un sitio de unión de una glicoproteína de la envoltura del VIH-1 soluble a un anticuerpo neutralizante de amplio espectro que comprende poner en contacto la glicoproteína de cualquiera de los párrafos 1-6 con un anticuerpo neutralizante de amplio espectro, aislar la glicoproteína en complejo con el anticuerpo y determinar la estructura cristalina del complejo glicoproteína-anticuerpo, en el que la estructura cristalina identifica el sitio de unión de la glicoproteína y el anticuerpo, identificando así un sitio de unión de una glicoproteína de la envoltura del VIH-1 soluble a un anticuerpo neutralizante de amplio espectro.

9. El procedimiento del párrafo 6, en el que el anticuerpo es PG9 y/o PG16.

10. Un procedimiento para producir una respuesta inmunitaria que comprende administrar a un mamífero la glicoproteína de cualquiera de los párrafos 1-6.

11. Un procedimiento para obtener una respuesta inmunitaria que comprende administrar a un mamífero el vector de cualquiera de los párrafos 1-6.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Uso de una glicoproteína de la envoltura aislada de la cepa BG505 del VIH-1, diseñada para tener una sustitución L por A en la posición correspondiente a L111 en la env de la cepa HxB2 del VIH-1 y opcionalmente una sustitución T por N en la posición correspondiente a N332 en la env de la cepa HxB2 del VIH-1 cuando las secuencias de env de BG505 y HxB2 están alineadas para la detección de anticuerpos neutralizantes de amplio espectro que comprende poner en contacto dicha glicoproteína con un suero animal o humano, aislar la glicoproteína en complejo con los anticuerpos neutralizantes de amplio espectro, seleccionando así un anticuerpo neutralizante de amplio espectro.
- 10 2. Uso de una glicoproteína de acuerdo con la reivindicación 1 como reactivo para la detección de moléculas pequeñas que compiten por la unión de anticuerpos neutralizantes de amplio espectro.
3. Uso de una glicoproteína de acuerdo con la reivindicación 1 como monómero y mimético del trímero de la envoltura nativa para estudios de cristalización.
4. El uso de la reivindicación 1 o 2, en el que el anticuerpo es PG9 y/o PG16.
- 15 5. Glicoproteína de acuerdo con la reivindicación 1 para su uso como inmunógeno en diferentes formas como componentes de la vacuna del VIH-1.

FIG. 1

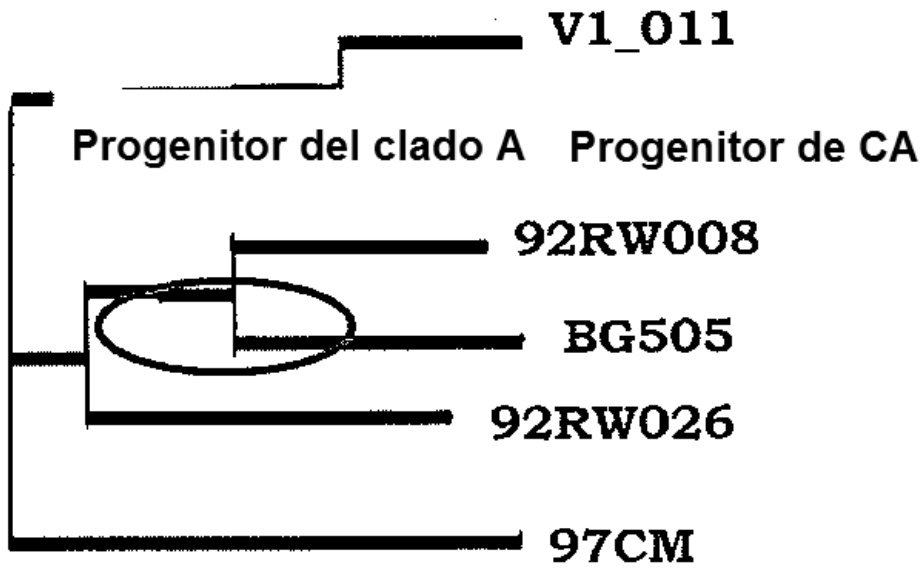
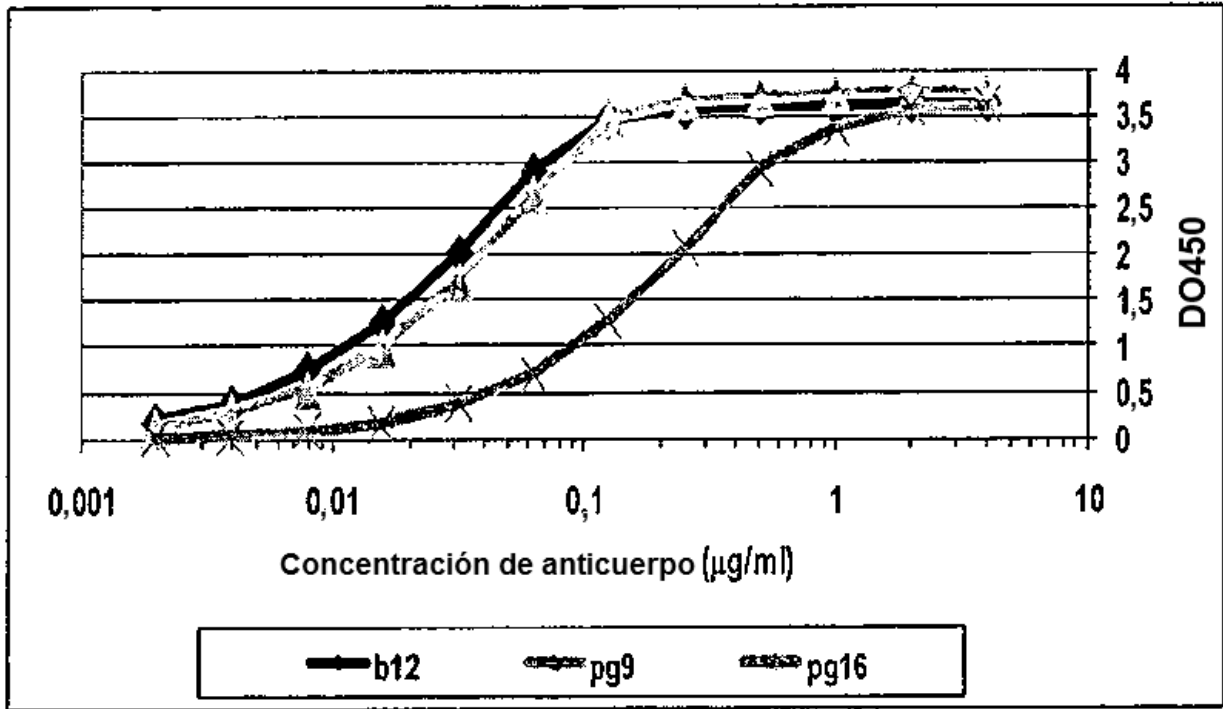


FIG. 2A

```

EF117267_GB LWVTVYYGVPVWKEAKTTLFCASDAKAYEKEVHNVWATHACVPTD PNPQEMVLENTENF
EF117271_GB LWVTVYYGVPVWKEATTTLFCASDAKAYDKEVHNVWATHACVPTD PNPQEMVLENTENF
EF117273_GB LWVTVYYGVPVWKEAKATLFCASDAKAYETEVEHNVWATHACVPTD PNPQEIIVLENTENF
EF117265_NB LWVTVYYGVPVWKEAKTTLFCASDAKAREVEHNVWATHYACVPTD PNPQEIIVLKNVTENF
EF117268_GB LWVTVYYGVPVWKEAKTTLFCASDAKAYEKEVHNVWATHACVPTD PNPQEMVLENTENF
EF117266_WB LWVTVYYGVPVWKEARTTLFCASDAKAYETEVEHNVWATHACVPTD PNPQEMVLENTENF
EF117270_NB LWVTVYYGVPVWKEAKTTLFCASDAKAYETEVEHNVWATHACVPTD PNPQELVLENTENF
EF117269_WB LWVTVYYGVPVWREAKTTLFCASDAKAYEKEVHNVWATHACVPTD PNPQEIIDL-NVTENF
EF117274_NB LWVTVYYGVPVWKEAKTTLFCASDAKAYEKEVHNVWATHACVPTD PNPQEIIVLGNVTEDE
AY423984_WB LWVTVYYGVPVWREAKTTLFCASDAKAYEREVEHNVWATHACVPTD PNPQEMVLENTENF
EF117272_NB LWVTVYYGVPVWKEAKTTLFCASDAKGYDKEVHNVWATHACVPTD PNPQEMPLNVTENF
DQ411854_WB LWVTVYYGVPVWKEAKTTLFCASDAKAYDKEVHNVWATHACVPTD PNPQEIIVLENTENF
DQ435682_WB LWVTVYYGVPVWREAKTTLFCASDAKAYEKEVHNVWATHACVPTD PNPQEIIVLGNVTENF
DQ388514_WB LWVTVYYGVPVWREAKTTLFCASDAKAYEKEVHNVWATHACVPTD PNPQEMNLENTENF
DQ388516_NB LWVTVYYGVPVWREAKTTLFCASDAKAYEKEVHNVWATHACVPTD PNPQELVLENTENF
DQ388517_WB LWVTVYYGVPVWREAKTTLFCASDAKAYETEVAHSVWATHACVPTD PNPQEMVLENTENF
DQ435683_WB LWVTVYYGVPVWKEAKTTLFCASDAKGYDTEVEHNVWATHACVPTD PNPQEIIVLENTENF
DQ411853_WB LWVTVYYGVPVWKEAKTTLFCASDAKAKHEEVHNIWATHACVPTD PNPQEIIVLKNVTENF
DQ388515_WB LWVTVYYGVPVWKEAKATLFCASDAKAYEKEVHNVWATHACVPTD PNPQEIPLGNVTENF
AY424079_NB LWVTVYYGVPVWREAKTTLFCASDAKAYEKEVHNVWATHACVPTD PNPQELVLENTENF
AY424138_GB LWVTVYYGVPVWKEAKTTLFCASDAKAYEREVEHNVWATHACVPTD PNPQELVLENTENF
AY835438_GB LWVTVYYGVPVWKEATTTLFCASEAKAYDTEVEHNVWATHACVPTD PNPQEVLENTENF
AY835450_WB LWVTVYYGVPVWKEATTTLFCASDAKAYETEVEHNVWATHACVPTD PNPQELVLENTENF
AY835449_WB LWVTVYYGVPVWKEATTTLFCASDAKAYDQEIHNWATHACVPTD PNPQEVLENTENF
AY835445_WB LWVTVYYGVPVWKEATTTLFCASDAKAYDTEVEHNVWATHACVPTD PNPQEVVLENTENF
AY835447_WB LWVTVYYGVPVWKEANTTTLFCASDAKAYDTEAHNVWATHACVPTD PNPQEVVLENTENF
AY835451_WB LWVTVYYGVPVWREANTTTLFCASDAKAYDTEVEHNVWATHACVPTD PNPQEVVLENTENF
AY835441_WB LWVTVYYGVPVWKEATTTLFCASDAKAYETEVEHNVWATHACVPTD PNPQEVVLENTENF
AY835439_NB LWVTVYYGVPVWKEATTTLFCASDAKAYETEVEHNVWATHACVPTD PNPQEVVLENTENF
JRCSEF_WB LWVTVYYGVPVWKEATTTLFCASDAKAYDTEVEHNVWATHACVPTD PNPQEVVLENTENF
JRFL_NB LWVTVYYGVPVWKEATTTLFCASDAKAYDTEVEHNVWATHACVPTD PNPQEVVLENTENF
Ba1_WB LWVTVYYGVPVWKEATTTLFCASDAKAYDTEVEHNVWATHACVPTD PNPQEVVLENTENF
HXBC2_WB LWVTVYYGVPVWKEATTTLFCASDAKAYDTEVEHNVWATHACVPTD PNPQEVVLENTENF
SF162_NB LWVTVYYGVPVWKEATTTLFCASDAKAYDTEVEHNVWATHACVPTD PNPQEIIVLENTENF
AY835446_WB -WVTVYYGVPVWKEANTTTLFCASDAKAYNTEVEHNVWATHACVPTD PNPQEVLENTENF
AY835448_NB LWVTVYYGVPVWKEAVTTLFCASDAKAYDTEVEHNVWATHACVPTD PNPQEVVLENTENF
AY835452_GB LWVTVYYGVPVWKEATTTLFCASDAKGYEKEVHNVWATHACVPTD PNPQEVVLENTENF
AY835444_WB LWVTVYYGVPVWKEATTTLFCASDAKAYNTEVEHNVWATHACVPTD PNPQEVGLENVTENF
*****::: :*****:*.:. * *.:*.:*****:***: : **** *
    
```

FIG. 2B

EF117267_GB	NMWENDVVDQMHEdVlSLWDQSLKPCVKLTPLCVTLNCSKAKNITEEV-----IKNNY
EF117271_GB	NMWKNEMVnQMHEdVlSLWDQSLKPCVKLTPLCVTLNCSN-----VTYNES
EF117273_GB	NMWENDMVnQMHEdVlSLWDQSLKPCVKLTPLCVTLNCSN-----TYNGT
EF117265_NB	NMWENDMVDQMHEdVlSLWDQSLKPCIKLTPLCVTLNCSN-----TIHNET
EF117268_GB	NMWKNMVEQMHEdVlSLWDQSLKPCVKLTPLCVTLNCSN-----SSVNV
EF117266_WB	NMWKNMVDQMHEdVlSLWAQSLKPCVKLTPLCVTLNCSN-----TQVNV
EF117270_NB	NMWRNDMVDQMHEdVlSLWDQSLKPCVKLTPLCVTLNCSN-----KMNVD
EF117269_WB	NMWKNMVEQMHEdVlSLWDQSLKPCVKLTPLCVTLNCSN-----TSSN
EF117274_NB	NMWKNMVDQMHEdVlSLWDQSLKPCVKLTPLCVTLNCSN-----ANVT
AY423984_WB	NMWKNMVDQMHEdVlSLWDQSLKPCVKLTPLCVTLNCSN-----NGE---
EF117272_NB	NMWENDMVnQMHEdVlSLWDES LKPCVKLTPLCVTLNCSN-----DTDNY
DQ411854_WB	NMWKNMVDQMHEdVlSLWDQSLKPCVKLTPLCVTLNCSN-----T-ATLNS
DQ435682_WB	NMWKNMVDQMHEdVlSLWDQSLKPCVKLTPLCVTLNCSN-----ATINGS
DQ388514_WB	NMWKNMVDQMHEdVlSLWDQSLKPCVKLTPLCVTLNCSN-----STYNT
DQ388516_NB	NMWKNMVDQMHEdVlSLWDQSLKPCVKLTPLCVTLNCSN-----FNVT
DQ388517_WB	NMWKNMVDQMHEdVlSLWDQSLKPCVKLTPLCVTLNCSN-----TYNT
DQ435683_WB	NMWKNMVDQMHEdVlSLWDQSLKPCVKLTPLCVTLNCSN-----TYNNG
DQ411853_WB	NMWKNMVDQMHEdVlSLWDQSLKPCVKLTPLCVTLNCSN-----TYNNA
DQ388515_WB	NMWKNMVDQMHEdVlSLWDQSLKPCVKLTPLCVTLNCSN-----SNQTY
AY424079_NB	NMWENDMVDQMHEdVlSLWDQSLKPCVKLTPLCVTLNCSN-----SNQTY
AY424138_GB	NMWKNMVDQMHEdVlSLWDQSLKPCVKLTPLCVTLNCSN-----AAHNE
AY835438_GB	NMWKNMVEQMHEdVlSLWDQSLKPCVKLTPLCVTLNCSN-----TTNTN
AY835450_WB	DMWKNMVEQMHEdVlSLWDQSLKPCVKLTPLCVTLNCSN-----TTNSN
AY835449_WB	NMWKNMVEQMHEdVlSLWDQSLKPCVKLTPLCVTLNCSN-----TNSN
AY835445_WB	NMWKNMVDQMHEdVlSLWDQSLKPCVKLTPLCVTLNCSN-----NTNS
AY835447_WB	NMWKNMVEQMHEdVlSLWDQSLKPCVKLTPLCVTLNCSN-----S
AY835451_WB	NMWKNMVEQMHEdVlSLWDQSLKPCVKLTPLCVTLNCSN-----T
AY835441_WB	NMWKNMVEQMHEdVlSLWDQSLKPCVKLTPLCVTLNCSN-----TYANV
AY835439_NB	NMWKNMVEQMHEdVlSLWDES LKPCVKLTPLCVTLNCSN-----SYANK
JRCSE_WB	NMWKNMVEQMHEdVlSLWDQSLKPCVKLTPLCVTLNCSN-----ATNT
JRFL_NB	NMWKNMVEQMHEdVlSLWDQSLKPCVKLTPLCVTLNCSN-----ATNT
Bal_WB	NMWKNMVEQMHEdVlSLWDQSLKPCVKLTPLCVTLNCSN-----SRNV
HXB2_WB	NMWKNMVEQMHEdVlSLWDQSLKPCVKLTPLCVTLNCSN-----DTNT
SF162_NB	NMWKNMVEQMHEdVlSLWDQSLKPCVKLTPLCVTLNCSN-----ATNT
AY835446_WB	NMWKNMVDQMHEdVlSLWDQSLKPCVKLTPLCVTLNCSN-----NDT
AY835448_NB	NMWKNMVEQMHEdVlSLWDQSLKPCVKLTPLCVTLNCSN-----TSSA
AY835452_GB	NMWKNMVEQMHEdVlSLWDQSLKPCVKLTPLCVTLNCSN-----TS
AY835444_WB	NMWKNMVEQMHEdVlSLWDQSLKPCVKLTPLCVTLNCSN-----TTNP

:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*

FIG. 2C

N156, S158, F159, N160, T162, Y173, F176, V181

```

EF117267_GB -----KEDIKNCSEFNTTEVDRDKKQKVHAFYRLDIVPLNKRNSSESEEEENSSGY
EF117271_GB -----MKEVRKNCSEFNTTELDRDKKQKVHAFYRLDIVPLN-----DTEKKNSSRPY
EF117273_GB -----NE-MKNCSEFNTTELDRDKKQKVSAFYRLDIVPLNR-----SSSSNSSDY
EF117265_NB -----YESMRKNCSEFNTTELKDKKQKVYAFYRLDIVPLN-----NSNEY
EF117268_GB -----NGEIKNCSEFNTTEIRDKKQKVYAFYRLDIVPLEE-----ERKNS--SKY
EF117266_WB QV-----NGDEMRKNCSEFNTTEIRDKKQKAYAFYRLDIVPLER---ENRGDSNSASKY
EF117270_NB R-----NVEEMKNCSEFNTTELDRDKKQKVYAFYRLDIVPLNE-----NKSTSSSENY
EF117269_WB TSYEINKEDMGEIKNCSEFNTTELIDKQKQVHAFYRLDIVSLEK--DNSSKKKNSNEY
EF117274_NB -----EIKNCSEFNTTDVDRDKKQKVYAFYRLDIVPLD-----GRSNTSN--Y
AY423984_WB -----ATDGEIKNCSEFNTTELDRDKKQKVYAFYRLDIVPLDG-----RNSSEY
EF117272_NB -----ETMKERRNCTFNTTELDRDKKQKVYAFYRLDIVPLDD-----NDNAS-Y
DQ411854_WB M-----NGEIKNCSEFNTTELDRDKKQKVYAFYRLDIVPLN-----GGEHNETGEY
DQ435682_WB L-----TEEVKNCSEFNTTELDRDKKQKAYAFYRLDIVPLNK-----NSPQNSSEY
DQ388514_WB E-----GEIKNCSEFNTTELDRDKKQKVYAFYRLDIVPLN-----GNNSNEY
DQ388516_NB M-----KEEMKNCSEFNTSELDRDKKQKVYAFYRLDIVPLN-----DEGNSYSY
DQ388517_WB -----HNIKEMKNCSEFNTTELDRDKKQKVYAFYRLDIVPLN-----SSNTTNY
DQ435683_WB -----TNSTDTEKNCSEFNTTELDRDKKQKVYAFYRLDIVPLKNE-----SESONFSEY
DQ411853_WB TYN--NNNTISDMKNCSEFNTTEITDKKQKAYAFYRLDIVPLDQK---TNSTNSSEY
NATSNDTEMKGEIKNCSEFNTTEVDRDKKQKQVAFYRLDIVPLEE--KNSSKNSSYKEY
AY424079_NB -----MDKEIKNCSEFNTTELDRDKKQKVYAFYRLDIVPLDGN--SNESINSSEGDY
AY424138_GB -----ETRVKNCSEFNTTDVDRDKKQKVYAFYRLDIVPLSS-----SDNSSSSLY
AY835438_GB NTNSSKIEG-GEMKNCSEFNTTNRGDKKQKVYAFYRLDIVSLEN-----TSSSY
AY835450_WB ISKEETIEG-GEMKNCSEFNTTATGDKK-KKRAFFYKLDVAPIDN-----SNTSY
AY835449_WB HSTNSSLEAKGEIKNCSEFNTTTPRDKIQKAYAFYRLDIVPLK-----DNISY
AY835445_WB STHSYNNSLEAGEMKNCSEFNTTAGIRDKVQKAYAFYRLDIVPIEDKDTN-----KTTY
AY835447_WB NITRVDNTEKEMKNCSEFNTSGIRDKVQKAYAFYRLDIVPIDNDNTSHR----DNTSY
AY835451_WB NGSTANVTMREEMKNCSEFNTTVIRDKIQKAYAFYRLDIVPIE-GKNTN-----TG
AY835441_WB EK-----GEIKNCSEFNTTAIRDQVQKAYAFYRLDIVPIDNNHGNSSN---YSNY
AY835439_NB ETYKTSNETFGEIKNCSEFNTFGIRDKVQVYAFYRLDIVPIDNNSSKNNNGSYSSY
JRCSF_WB SSS-EGMMEERGEIKNCSEFNTKSIRDQVQKAYAFYRLDIVPIDNK-----NNTKY
JRFL_NB NDS-EGTMEERGEIKNCSEFNTTSIRDQVQKAYAFYRLDIVPIDN-----NNTSY
Bal_WB SSS-RGMVGGGEMKNCSEFNTTGIRGKQVQKAYAFYRLDIVPIDN-----KIDRY
HXBC2_WB SSSGRMIMEKGEIKNCSEFNTSIRGKQVQKAYAFYRLDIVPIDN-----DTTSY
SF162_NB SSN-WKEMDRGEIKNCSEFNTSIRNKMQKAYAFYRLDIVPIDN-----DNTSY
AY835446_WB NNSRWDKMEKGEIKNCSEFNTTNMRDKMQKAYAFYRLDIVPIEKGKNNNS---SFTDY
AY835448_NB SSANKTAKEEAVMKNCSEFNTTNVRDKVQKAYAFYRLDIVKLEE-----GETSY
AY835452_GB VNTTASSMEGGEIKNCSEFNTTMSDKMQKAYAFYRLDIVPIVK-----ENNTY
AY835444_WB SSRVIKEMMGEIKNCSEFNTTDIRDQKQVYAFYRLDIVPIQDHTIENNTIENNTTY
: * * * . . . . . : : * : : *
    
```

FIG. 2D

EF117267_GB	RLINCNTSAVTQACPKVTFDPIPIHYCTPAGYAILKCNNEETFNGTGPCHNVSTVQCTHGI
EF117271_GB	RLINCNTSAITQACPKVTFDPIPIHYCTPAGYAILKCNDRKFKFNGTGPCHKVSTVQCTHGI
EF117273_GB	RLISCNTSAITQACPKVTFDPIPIHYCAPAGFALLKCNKNTFNGTGPCNVSTVQCTHGI
EF117265_NB	RLINCNTSAIKQACPKVTFDPIPIHYCAPAGYAILKCNDRKFKFNGTGPCNVSTVQCTHGI
EF117268_GB	RLINCNTSAITQACPKVTFDPIPIHYCAPAGYAILKCNKNTFNGTGPCNVSTVQCTHGI
EF117266_WB	ILINCNTSAITQACPKVTFDPIPIHYCTPAGYAILKCNKNTFNGTGSCNNVSTVQCTHGI
EF117270_NB	RLINCNTSAITQACPKVTFDPIPIHYCTPAGYAILKCNKNTFNGTGPCNVSTVQCTHGI
EF117269_WB	RLINCNTSAITQACPKVTFDPIPIHYCAPAGYAILKCNKNTFNGTGPCNVSTVQCTHGI
EF117274_NB	RLINCNTSTITQACPKVSFDPIPIHYCAPAGYAILKCNKNTFNGKGPCHNISTVQCTHGI
AY423984_WB	RLINCNTSTITQACPKVSFDPIPIHYCAPAGYAILKCNKNTFNGTGPCNVSTVQCTHGI
EF117272_NB	RLINCNTSTLTQACPKVSFDPIPIHYCAPAGYAILKCNKNTFNGIGPCNKVSTVQCTHGI
DQ411854_WB	ILINCNTSTITQACPKVSFDPIPIHYCAPAGYAILKCNKNTFNGTGPCNVSTVQCTHGI
DQ435682_WB	ILINCNTSTITQACPKVSFDPIPIHYCAPAGYAILKCNKNTFNGTGPCNVSTVQCTHGI
DQ388514_WB	RLINCNTSAITQACPKVSFDPIPIHYCAPAGYAILKCNKNTFNGKGPCHNISTVQCTHGI
DQ388516_NB	RLINCNTSTIKQACPKVSFEPIPIHYCAPAGYAILKCNKNTFNGSGPCNVSTVQCTHGI
DQ388517_WB	RLISCNTSTITQACPKVSFDPIPIHYCAPAGYAILKCNKNTFNGTGPCNVSTVQCTHGI
DQ435683_WB	ILINCNTSTIAQACPKVSFDPIPIHYCAPAGYAILKCNKNTFNGTGPCNVSTVQCTHGI
DQ411853_WB	RLINCNTSAVTQACPKVSFDPIPIHYCAPAGYAILKCNKNTFNGTGPCNVSTVQCTHGI
DQ388515_WB	RLISCNTSTITQACPKVSFDPIPIHYCAPAGYAILKCNKNTFNGTGPCNVSTVQCTHGI
AY424079_NB	ILINCNTSTIAQACPKVTFDPIPIHYCAPAGYAILKCNKNTFNGIGPCKNVSTVQCTHGI
AY424138_GB	RLISCNTSTITQACPKVSFDPIPIHYCAPAGYAILKCNKNTFSGKGPCHNISTVQCTHGI
AY835438_GB	RLISCNTSVITQACPKVTFEPIPIHYCAPAGFALLKCNDRKFKFNGTGPCNVSTVQCTHGI
AY835450_WB	RLISCNTSVITQACPKISFEPIPIHYCAPAGFALLKCNDRKFKFNGTGSCNVSTVQCTHGI
AY835449_WB	RLISCNTSVITQACPKVTFEPIPIHYCAPAGFALLKCNDRKFKFNGTGPCNVSTVQCTHGI
AY835445_WB	RLRSCNTSVITQACPKVTFEPIPIHYCAPAGFALLKCNDRKFKFNGTGPCNVSTVQCTHGI
AY835447_WB	RLISCNTSVITQACPKISFEPIPIHYCAPAGFALLKCNDRKFKFNGTGPCNVSTVQCTHGI
AY835451_WB	RLINCNTSVITQACPKVSFEPIPIHYCAPAGFALLKCNKNTFNGKGPCHNISTVQCTHGI
AY835441_WB	RLINCNTSVITQACPKVSFEPIPIHYCAPAGFALLKCNKNTFNGTGPCNVSTVQCTHGI
AY835439_NB	RLINCNTSVITQACPKVSFEPIPIHYCAPAGFALLKCNKNTFNGTGPCNVSTVQCTHGI
JRCSF_WB	RLISCNTSVITQACPKVSFEPIPIHYCAPAGFALLKCNKNTFNGKGPCHNISTVQCTHGI
JRFL_NB	RLISCNTSVITQACPKISFEPIPIHYCAPAGFALLKCNDRKFKFNGKGPCHNISTVQCTHGI
Ba1_WB	RLISCNTSVITQACPKVSFEPIPIHYCAPAGFALLKCNDRKFKFNGKGPCHNISTVQCTHGI
HXBC2_WB	KLISCNTSVITQACPKVSFEPIPIHYCAPAGFALLKCNKNTFNGTGPCNVSTVQCTHGI
SF162_NB	KLINCNTSVITQACPKVSFEPIPIHYCAPAGFALLKCNDRKFKFNGSGPCNVSTVQCTHGI
AY835446_WB	RLISCNTSVITQACPKVTFEPIPIHYCAPAGFALLKCNDRKFKFNGTGPCNVSTVQCTHGI
AY835448_NB	RLVSCNTSVITQACPKITFEPIPIHYCAPAGFALLKCNKNTFNGTGPCNVSTVQCTHGI
AY835452_GB	RLISCNTSVITQACPKVSFEPIPIHYCAPAGFALLKCNKNTFDGKGPCHNISTVQCTHGI
AY835444_WB	RLISCNTSVITQACPKISFEPIPIHYCTPAGFALLKCNDRKFKFNGSGPCNVSTVQCTHGI

* .*:.*.: *****.*:*****.*:***.*:* *:.: * * * * :*****

FIG. 2E

P299, K305

EF117267_GB	KPVVSTQLLNGSLAEG-EIIIRSKNLTDNAKTIIVHLNQSVEIVCTRPNNRHKKSIRI-
EF117271_GB	KPVVSTQLLNGSLAEG-EIIIRSENLTNNAKTIIVHLNQSVEIVCARPNNNTRTSIRI-
EF117273_GB	KPVVSTQLLNGSLAEG-EIIIRSKNLTSDNVKTIIVHLNESVEIVCTRPNNNTRKKSIRI-
EF117265_NB	KPVVSTQLLNGSLAEG-EIIIRSKKLDNANTIIIVHLDEPVKIECTRPNNNTRKKSIRI-
EF117268_GB	KPVVSTQLLNGSLAEG-EIIIRSENLTNNVKTIIIVHLNESVEIVCTRPNNNTRKKSIRI-
EF117266_WB	KPVVSTQLLNGSLAEE-EIIIRSENLTNDVKTIIIVHLDQSVVEIVCTRPNNNTRKKSIRI-
EF117270_NB	KPVVSTQLLNGSLAEE-GIIIRSENLTNDVKTIIIVHLEEPVEIVCTRPNNNTRKKSIRI-
EF117269_WB	KPVVSTQLLNGSLAEE-EIIIRSENLTNNAKIIIVHLNQAVEIVCTRPNNNTRKKSIRI-
EF117274_NB	KPVVSTQLLNGSLAEE-EIIIRSENLTNNVKTIIIVHLNKPVKIVCTRPNNNTRKKSIRI-
AY423984_WB	KPVI STQLLNGSTAAE-DIIIRSENLTNNAKTIIVHLNESIEIECTRPNNNTRKKSIRI-
EF117272_NB	KPVVSTQLLNGSLAEE-DIVIRSENI TDNAKTIIVHLNESVEIVCIRPNNNTRKKSIRI-
DQ411854_WB	KPVVSTQLLNGSLAEE-EIIIRSENLTNNIKTIIVHLNKSVEIKCTRPNNNTRKKSIRI-
DQ435682_WB	KPVVSTQLLNGSLAEE-DIIIKSENLTNNIKTIIVHLNKSVEIVCRPNNNTRKKSIRI-
DQ388514_WB	KPVVSTQLLNGSLAEG-EIIIRSENI TDNVKTIIVHLNESVEINCTRPNNNTRKKSIRI-
DQ388516_NB	KPVVSTQLLNGSLAEG-EIMIRSENLTNNAKTIIVQLTEAVNITCMEPNNNTRKSVRI-
DQ388517_WB	KPVVSTQLLNGSLAEE-EIIIRFENLTNDVKTIIIVQLNETINICTRPNNNTRKKSIRI-
DQ435683_WB	KPVVSTQLLNGSLAEE-EVVIRSENI SNNVKTIIIVHLNESVNI TCIRPNNNTRKKSIRI-
DQ411853_WB	KPVVSTQLLNGSLAEE-EVVIRSENI TDNNTKTIIVHLNESVEINCTRPNNNTRKKSIRI-
DQ388515_WB	KPVVSTQLLNGSLAEE-EIIIRSENLTNDNTKTIIVHLNESVEIECVRPNNNTRKKSIRI-
AY424079_NB	KPVVSTQLLNGSLAEE-GIIIRSKNLTNDNTKTIIVHLNESVAIVCTRPNNNTRKKSIRI-
AY424138_GB	RPVVSTQLLNGSLAEE-EIVIRSENLTDNAKTIIVHLNKSVEIECIRPNNNTRKKSIRI-
AY835438_GB	RPTVSTQLLNGSLAKE-EVIRSANLSDNAKIIIVQLKDPVEINCTRPNNNTRKKSINL-
AY835450_WB	RPVVSTQLLNGSLAEE-EVVIRSKNFSDNAKIIIVQLNESVPIINCTRPNNNTRKKSIRI-
AY835449_WB	RPAISTQLLNGSLAED-KVVIRSENF TDNAKTIIVHLNETVVKINCTRPNNNTRKKSIRI-
AY835445_WB	RPVVSTQLLNGSLAEE-EVVIRSENF TNNAKTIIVQLNESIAINCTRPNNNTRKKSIRI-
AY835447_WB	RPVVSTQLLNGSLAEE-EVVIRSENF TNNVKNIIIVQLNESVQINCTRPNNNTRKKSIRI-
AY835451_WB	KPVVSTQLLNGSLAEE-DIIIRSENF TNNGNKIIIVQLKPEVKINCTRPNNNTRKKSIRI-
AY835441_WB	RPVVSTQLLNGSLAEE-EVVIRSENF TDNAKTIIVQLNDSVIINCTRPNNNTRKKSIRI-
AY835439_NB	RPVVSTQLLNGSLAEE-EVVIRSENF TNNAKTIIVHLKKSVEINCTRPNNNTRKKSIRI-
JRCSE_WB	RPVVSTQLLNGSLAEE-KVVIRSDNF TDNAKTIIVQLNESVKINCTRPNNNTRKKSIRI-
JRFL_NB	RPVVSTQLLNGSLAEE-EVVIRSDNF TNNAKTIIVQLKESVEINCTRPNNNTRKKSIRI-
Bal_WB	RPVVSTQLLNGSLAEE-EVVIRSENF TNNAKIIIVQLNESVEINCTRPNNNTRKKSIRI-
HXBC2_WB	RPVVSTQLLNGSLAEE-EVVIRSVNF TDNAKTIIVQLNNTSVEINCTRPNNNTRKKSIRI-
SF162_NB	RPVVSTQLLNGSLAEE-GVVIRSENF TDNAKTIIVQLKESVEINCTRPNNNTRKKSIRI-
AY835446_WB	KPVVSTQLLNGSLAEE-EVVIRSENF SNNARTIIIVQLNNTSVEIKCIRPNNNTRKKSIRI-
AY835448_NB	KPVVSTQLLNGSLAEGGEMIRSANFTNNAKTIIVQLSKSVAINCTRPNNNTRKKSIRI-
AY835452_GB	KPVVSTQLLNGSLAEE-EVVIRSDNF TDNAKTIIVHLNESIEICTRPNNNTRKKSIRI-
AY835444_WB	RPVVSTQLLNGSRAEE-EVIRSENF TNNAKTIIVQLNKTVEINCTRPNNNTRKKSIRI-

*.:***** : : : : : * . * : * * * : * : : :

FIG. 2F

EF117267_GB	-GPGQAFYATGDIIGDIRQARCNISEEKWNETLQRVGRKLAEHFPN--KTIKFKSSSSGGD
EF117271_GB	-GPGQTFYATGAIIGDIRQAHCNISKDKWNETLQRVGKLAEHFPN--KTIKFNSSSSGGD
EF117273_GB	-GPGQTFYATGAIIGDIRQAHCNISRDKNWNETLQRVGKLEEQFPN--KTIINFSSSSGGD
EF117265_NB	-GPGQTFYATGEIIGDIRQAHCDISEDQWNETLQRVGKLAELFPN--KTIIFNSSSSGGD
EF117268_GB	-GPGQTFYATGDIIGDIRQAYCNIKKDDWIRTLQRVGKLAEHFPR--RIINFSSSSGGD
EF117266_WB	-GPGQTFYATGDIIGDIRQAHCNISEKKWHEMLRRVSEKLAEHFPN--KTIKFTSSSSGGD
EF117270_NB	-GPGQTFYATGEIIGDIRQAHCNISEAKWNETLQNVTKKLEHFPN--KTIIFNSSSSGGD
EF117269_WB	-GPGQTFYATGDIIGDIRQAHCNISEAKWNETLREVSKLAEHFPN--KTIIFNSSSSGGD
EF117274_NB	-GPGQTFYATGEIIGDIRQAHCNISKEEWNKTLQGVGKLAEHFPN--KTIETSPSSGGD
AY423984_WB	-GPGQAFFATNIIIGDIRQAYCIINKANWNTLHRVSKLEEHFPN--KTIINFSSSSGGD
EF117272_NB	-GPGQTFYATGDIVGDIRQAYCNISEGKWNKTLQRVSEKLAEHFPN--STINFNSSSSGGD
DQ411854_WB	-GPGQTFYATGEIIGDIRQAHCNISRETWNSTLIQVKEKLEHY-N--KTIKFEPPSSGGD
DQ435682_WB	-GPGQAFYATNDIIGDIRQAHCNINNSTWNRTEQIKKKLREHFLN--RTIEFEPPSSGGD
DQ388514_WB	-GPGQTFYATGEIIGKIREAHCNISKEKWNKTLRVAKKLEHFPN--KAIFEPPSSGGD
DQ388516_NB	-GPGQTFYATGEIIGDIRQAHCNISKDKWNQTLQNVRAKLGEHFD--KTIKFEPPSSGGD
DQ388517_WB	-GPGQSFYATGEIVGNIREAHCNISASKWNKTLERVTKLEHFPN--RTIEFEPPSSGGD
DQ435683_WB	-GPGQAFYAMGDIIGDIRQAHCNISEKAWNETLKKVVEKLVKYPFN--KTIFFAPPVGGD
DQ411853_WB	-GPGQTFYATGDIIGDIRQAHCNISRKWNKTLQRVKLEKLEKFPN--KTIQFAPSSGGD
DQ388515_WB	-GPGQTFYATGEIIGDIRQAHCDLSKSNWTTTLKRIEKKLEHFPN--ATIKFESSAGGD
AY424079_NB	-GPGQTFYATGEIIGDIRQAHCNISGEQWNRTERIKDKLTYEFPD--KTIKFNHSSGGD
AY424138_GB	-GPGQTFYATGDVIGDIRKAYCKINGSEWNETLTKVSEKLEKLYF-N--KTIFFAQSSGGD
AY835438_GB	-GPGRAFYATGDIIGDIRQAHCNISRAKWNKTLREIACKLAEQFNN--RTIVFNQSSGGD
AY835450_WB	-GPGRAWYATGDIIGDIRKAYCNISEAKWNKTLKQIVTEKLEKQFNK--TIIVFNQPSGGD
AY835449_WB	-APGRAFYATGEIIGDIRKAYCTINESEWNETLQKIVVTLREQFNN--KTIIVFNQSSGGD
AY835445_WB	-GPGRAFYATGDIIGDIRQAHCNISRETNWNTLRQIVTKLREQQLGDPNKTIIFNQSSGGD
AY835447_WB	-GPGRAFYATGKIIIGDIRQAHCNISREKWNKTLKQIVKLEKLEQFK--NKTIAFAPSSGGD
AY835451_WB	-GPGRAFYATGAIIGDIRKAHCNISTEQWNTLQIVDKLREQQFG--NKTIIIFNQSSGGD
AY835441_WB	-GPGRVFY--TGEIVGDIRQVHCLSSAKWNKTLKQVVKLREQQFG--NKTIVFNQSSGGD
AY835439_NB	-GPGRAFYATGDIIGDIRQAHCLSSVQWNTLQKQIVIKLGEQFGT--NKTIAFNQSSGGD
JRCSF_WB	-GPGRAFYTGEIIGDIRQAHCNISRAQWNTLQKQIVKLEKLEQFNN--KTIIVFTHSSGGD
JRFL_NB	-GPGRAFYTGEIIGDIRQAHCNISRAKWNKTLKQIVIKLREQFEN--KTIIVFNHSSGGD
Bal_WB	-GPGRAFYTGEIIGDIRQAHCNLSRAKWNKTLNKKIVIKLREQFGN--KTIIVFKHSSGGD
HXBC2_WB	RGPGRAFVTIGK--IGNMRQAHCNISRAKWNKTLQKQIVKLEKLEQFGN--NKTIIIFKQSSGGD
SF162_NB	-GPGRAFYATGDIIGDIRQAHCNISGEKWNKTLKQIVTKLQAQFGN--KTIIVFKQSSGGD
AY835446_WB	-GPGRAFYTGDIIIGDIRQAHCNISRQWNTLQKQIAEKLEKLEQFGN--KTIIVFRNSSGGD
AY835448_NB	-GPGGAFFATGRIIGDIRKAYCTVNGTEWNTLRQIVKLEKLEKQFGE--NKTIVFKPSAGGD
AY835452_GB	-GPGRAFYATGRIIGDIRKAHCNISGEKWHNALEQIVKLEKLEKFPN--ATTIREFNQSSGGD
AY835444_WB	-GPGRAFYATGDIIGDIRQAHCNLSRAEWNKTLKYISTKLEKLEQFGN--KTIIFNGSSGGD

..** : *.:*. * :. * * : .: * * ***

FIG. 2G

EF117267_GB	LEITTHSFNCRGEEFFYCNTSGLFNGTYMPTYM-----PNSTNSNSSSNIITIPCRIKQV
EF117271_GB	LEITTHSFNCRGEEFFYCNTSGLFNGTFNGTYVS-----PNSTDSNSSSIIITIPCRIKQI
EF117273_GB	LEITTHSFNCRGEEFFYCNTSKLFNSTYIPTYR-----PNNTQGNSSSTIITIPCRIKQI
EF117265_NB	LEITTHSFNCRGEEFFYCNTSSLFKGYRPNGT-----SNSTSG---SIITLPCYIKQV
EF117268_GB	LEITTHSFNCRGEEFFYCNTSSLFNSTYNPNDTN-----SNSSSSNSSLDITIPCRIKQI
EF117266_WB	LEITTHSFNCRGEEFFYCNTSGLFNSTYMPNGTY-----MPNGTNNSNSTIITLPCRIKQI
EF117270_NB	LEITTHSFNCRGEEFFYCNTSKLFNGIYNGTQS-----NSSNSNSTIITIPCRIKQI
EF117269_WB	LEITTHSFNCRGEEFFYCNTSSLFNSTFNSTYM-----TNDTDMNSNSTISIPCRIKQI
EF117274_NB	LEITTHSFNCRGEEFFYCNTSDLFNGIYNGTYI-----PKG---NLNSTITIQCCKIKQF
AY423984_WB	LEITTHSFNCRGEEFFYCNTSSLFNGTYN-----DIDIYNSTDIILLCRIKQI
EF117272_NB	LEITTHSFNCRGEEFFYCNTSGLFNGTYMNDTK-----SNDTKSNSSSIIITIPCRIKQI
DQ411854_WB	LEVTTTHSFNCRGEEFFYCNTTKLFNETKLFNESE-----YVDNKTITLPCRIKQI
DQ435682_WB	LEVTTTHSFNCRGEEFFYCNT-----TRLFKWSS-----NVTNDTITIPCRIKQF
DQ388514_WB	LEITTHSFNCRGEEFFYCNTSKLFNSTYNPNDE-----S--NSNNSNETLITLTCRIKQI
DQ388516_NB	LEITTHSFNCRGEEFFYCNTNLFSRTYNGSNS-----NVNITSATITLPCRIKQI
DQ388517_WB	LEITTHSFNCRGEEFFYCNTSGLFNAIN-----GTLTSNVTLPCRIKQI
DQ435683_WB	LEITTHSFNCRGEEFFYCNTTKLFNSTHNSDSTVNSTDAETGNSTNTNITLPCRIKQI
DQ411853_WB	LEITTHSFNCRGEEFFYCNTSDLFNSTYMSN-----NTGGANITLQCRIKQI
DQ388515_WB	LEITTHSFNCRGEEFFYCNTSGLFNSSLNDTDG-----TSNSTSNATITLPCRIKQI
AY424079_NB	LEITTHSFNCRGEEFFYCNTSILF-----TENENSSDNIITLPCRIKQF
AY424138_GB	LEVTTTHSFNCRGEEFFYCNTSELENS-----NATESNITLPCRIKQI
AY835438_GB	PEIVMHSFNCRGEEFFYCNTSGLFN-STWNSNST---WNDTNNNNSTE--KIILSCRIRQI
AY835450_WB	PEVTMHSFNCRGEEFFYCNTSKLFN-GTWNSTKR---ANNTG-----IITLQCRIKQI
AY835449_WB	PEVTMHTFNCRGEEFFYCNTAQLFN-SSWDNTN---GNDTQGPSENN--TIITLPCRIKQI
AY835445_WB	TEITMHSFNCRGEEFFYCNTTKLFN-STWNGN-N---TBSNSTGEN--ITLPCRIKQI
AY835447_WB	PEIVMHSFNCRGEEFFYCNTTKLFT-STWNSWTN---STWNTGEGNSSTVIITLPCRIKQI
AY835451_WB	PEIVMHTFNCRGEEFFYCNTSGLFN-STWFNNGT---STWN-STADN---ITLPCRIKQV
AY835441_WB	PEIVMHSFNCRGEEFFYCNTTQLFN-STWNINGT---WHGT--TVSN--KTIITLPCRIKQI
AY835439_NB	PEIVMHSFNCRGEEFFYCNTTQLFN-STWEPHGN---WTRSNFTESNSTIITLPCRIKQI
JRCSF_WB	PEIVMHSFNCRGEEFFYCNTSGLFN-STWN-----DTEKSSGTEGNDTITLPCRIKQI
JRFL_NB	PEIVMHSFNCRGEEFFYCNTSGLFN-STWNN-----NTEGSNNTGEGN--TIITLPCRIKQI
Bal_WB	PEIVTHSFNCRGEEFFYCNTSGLFN-STWN-----VTEESNNTVENNTIITLPCRIKQI
HXBC2_WB	PEIVTHSFNCRGEEFFYCNTSGLFN-STWFNSTW---STEGSNNTGEGSDTITLPCRIKQI
SF162_NB	PEIVMHSFNCRGEEFFYCNTSGLFN-STWN-----NTIGPNNTNGT--ITLPCRIKQI
AY835446_WB	PEIVMHTFNCRGEEFFYCNTAELEFN-STWYANGT---ISIGGNKTN---IITLPCRIKQF
AY835448_NB	PEIVTHSFNCRGEEFFYCNTNLFNSSSTELNST---WSGNSNDTGKNDTITLPCRIKQI
AY835452_GB	QEIVMHTFNCRGEEFFYCNTSGLFN-STWPNGT---TTEWSNETSNG--TITLPCRIKQI
AY835444_WB	PEIVTHSFNCRGEEFFYCNTTKLFN-STWDANGN---CTGCDESDGNN--TITLPCRIKQI
	*.: *:* *:* *:* *:* * : : * *:*

FIG. 2H

EF117267_GB	INMWQEVGRAMYAPPIEGEITCKSNITGLLLVRDGGNGNDTN-----KTEIFRPEGGD
EF117271_GB	INMWQEVGRAMYAPPIAGNITCKSNITGLLLVRDGGTGSESN-----KTEIFRPGGGD
EF117273_GB	INMWQEVGRAMYAPPIAGNITCKSNITGLLLVRDGGTGLNS-----STETFRPGGGD
EF117265_NB	INLWQEVGRAIYAPPIEGNITCISNITGLLLVRDGGNHBEAN-----TTETFRPGGGN
EF117268_GB	INMWQEVGRAMYAPPIEGNITCKSNITGLLLVRDGG--GVESN-----ETEIFRPGGGD
EF117266_WB	INMWQEVGRAMYAPPIAGNITCKSNITGLLLVRDGG--GK--NN-----NTEIFRPGGGD
EF117270_NB	VNMWQKVGRAMYAPPIAGNITCKSNITGLLLVRDGG---PDN-----VTEIFRPGGGD
EF117269_WB	INMWQEVGRAMYAPPIAGNITCKSNITGLLLVRDGGNSNDTN-----EPEIFRPGGGD
EF117274_NB	INMWQEVGRAMYAPPIQGNITCKSNITGLLLVRDGGNSNST-----EEIFRPGGGD
AY423984_WB	INMWQEVGRAMYAPPIEGNITCKSNITGLLLVRDGG--SKNN-----TEEIFRPGGGD
EF117272_NB	INMWQEVGRAVYAPPIAGNITCKSNITGILLTRDGGGRGEEVKN-----DTETFRPGGGN
DQ411854_WB	INMWQEVGRAMYAPPIEGNITCKSNITGLLLTWDGG--ENS-----TEGVFRPGGGN
DQ435682_WB	INMWQVGRAMYAPPIEGNITCKSNITGLLLTWDGG--TDRN-----DTEIFRPGGGN
DQ388514_WB	INMWQVGRAMYAPPIEGNITCKSNITGLLLTWDGG--SKNN-----TEEIFRPGGGN
DQ388516_NB	INMWQEVGRAMYAPPIAGNITCKSNITGLLLTWDGGNGNDTN-----DTETFRPGGGD
DQ388517_WB	INMWQEVGRAMYAPPIAGNITCKSNITGLLLTWDGGNS--S-----TTETFRPGGGD
DQ435683_WB	INMWQEVGRAMYAPPSKGNITCKSNITGLLLTWDGGNGKTENN-----DTEIFRPGGGD
DQ411853_WB	IRMWQVGRAMYAPPIAGNITCKSNITGLLLTWDGGKEKN-----DTETFRPGGGD
DQ388515_WB	INMWQEVGRAMYAPPIAGNITCKSNITGLLLTWDGG--NKSA-----GTEIFRPGGGN
AY424079_NB	VNMWQEVGRAMYAPPIAGNITCKSNITGLLLTWDGGNNKEN-----GTETFRPGGGD
AY424138_GB	INMWQVGRAMYAPPIEGNITCKSNITGLLLTWDGGNNNNST-----EEIFRPGGGD
AY835438_GB	INRWQEVGKAMYAPPIEGQIKCSSNITGLLLARDGGN-----ETN--VTEIFRPGGGD
AY835450_WB	INRWQEVGKAMYAPPIEGQIKCSSNITGLLLARDGGK-----TANNTEIFRPGGGN
AY835449_WB	INMWQEVGKAMYAPPIEGQIKCSSNITGLLILTRDGGN-----SSLSPETIFRPGGGD
AY835445_WB	INLWQEVGKAMYAPPIEGQIKCSSNITGLLLARDGGNN-----NSSGPETIFRPGGGN
AY835447_WB	INMWQEVGKAMYAPPIEGQIKCSSNITGLLLARDGGVD-----TTR--E'ETFRPGGGN
AY835451_WB	INMWQEVGKAMYAPPIRGQIDCSSNITGLLILTRDGGSN-----SSQN--E'ETFRPGGGD
AY835441_WB	INMWQEVGKAMYAPPIRGQIRCSSNITGLLLARDGGN-----NNSTTEIFRPGGGD
AY835439_NB	VNMWQEVGKAMYAPPIRGQIRCSSNITGLLLARDGGV-----NG--TRETFRPGGGD
JRCSF_WB	INMWQEVGKAMYAPPIEGQIKCSSNITGLLLARDGGK-----NESEIEIFRPGGGD
JRFL_NB	INMWQEVGKAMYAPPIRGQIRCSSNITGLLLARDGGI-----NENGTEIFRPGGGD
Ba1_WB	INMWQEVGKAMYAPPIRGQIRCSSNITGLLLARDGGP-----EDNKTVEIFRPGGGD
HXBC2_WB	INMWQVGVKAMYAPPIEGQIKCSSNITGLLLARDGGN-----SNNESEIFRPGGGD
SF162_NB	INRWQEVGKAMYAPPIRGQIRCSSNITGLLLARDGGKE-----ISNTEIFRPGGGD
AY835446_WB	INMWQEVGKAMYAPPIEGQIKCSSNITGLLLARDGGGRGN-----QTDNQTVEIFRPGGGD
AY835448_NB	INMWQVGVKAMYAPPIEGQIKCSSNITGLLLARDGGSDGGSKNSKNETGTEIFRPGGGD
AY835452_GB	INMWQEVGKAMYAPPIEGPISCSNITGLLLARDGGND-----NETNGTEIFRPGGGD
AY835444_WB	VNMWQEVGKAMYAPPIKGLIKCTSNITGLLLARDGGAN-----NTNETFRPGGGD

:. ** .*:*:**.* ** * * * * *:*. ** *** **:

FIG. 21

```

EF117267_GB MRDNWRSELYKYKVVVEIKPLGIAPT-----
EF117271_GB MRDNWRSELYKYKVVVEIKPLGVAPT-----
EF117273_GB MRDNWRSELYKYKVVVEIKPLGVAPTAAKRRVVQREKR
EF117265_NB MRDNWRSELYKYKVVVEIKPLGVAPT-----
EF117268_GB MRNNWRSELYKYKVVVEIKPLGIAPT-----
EF117266_WB MRDNWRSELYKYKVVVEIKPLGVAPT-----
EF117270_NB MRDNWRSELYKYKVVVEIKPLGIAPT-----
EF117269_WB MRDNWRSELYKYKVVVEIKPLGVAPTAAKRRVVGREKR
EF117274_NB MRDNWRSELYKYKVVVEIKPLGVAPTDAAKRRVVERGKR
AY423984_WB MRDNWRSELYKYKVVVEIKPLGIAPT-----
EF117272_NB MKDNWRSELYKYKVVVEIKPLGVAPT-----
DQ411854_WB MKDNWRSELYKYKVVVEIKPLGVAPTKSKRRVVGREKR
DQ435682_WB MKDNWRSELYKYKVVVEIKPLGVAPT-----
DQ388514_WB MKDNWRSELYKYKVVVEIKPLGVAPT-----
DQ388516_NB MRDNWRSELYKYKVVVEIKPLGIAPTAKRRVVGREKR
DQ388517_WB MKNNWRSELYKYKVVVEIKPLGIAPT-----
DQ435683_WB MKDNWRSELYKYKVVVEIKPLGVAPT-----
DQ411853_WB MRDNWRSELYKYKVVVEIKPLGIAPT-----
DQ388515_WB MKDNWRSELYKYKVVVEIKPLGIAPTSKRRVVVEREKR
AY424079_NB MRDNWRSELYKYKVVVEIKPLGVAPT-----
AY424138_GB MRDNWRSELYKYKVVVEIKPLGIAPTEAKRRVVQREKR
AY835438_GB MRDNWRSELYKYKVVQIEPLGIAPTAKRRVVQREKR
AY835450_WB MKDNWRSELYKYKVVRIEPLGVAPTKAKRRVVQREKR
AY835449_WB MRDNWRSELYKYKVVQIEPLGIAPTRAKRRVQREKR
AY835445_WB MKDNWRSELYKYKVKIEPLGVAPTRAKRRVVQREKR
AY835447_WB MKDNWRSELYKYKVVRIEPLGVAPTKAKRRVVQREKR
AY835451_WB MKDNWRSELYKYKVKIEPLGIAPTRAKRRVVQREKR
AY835441_WB MRDNWRSELYKYKVKIEPLGIAPTKAKRRVVQREKR
AY835439_NB MRDNWRSELYKYKVKIEPLGVAPTKAKRRVVQREKR
JRCSF_WB MRDNWRSELYKYKVKIEPLGVAPTKAKRRVVQREKR
JRFL_NB MRDNWRSELYKYKVKIEPLGVAPTKAKRRVVQREKR
Bal_WB MRDNWRSELYKYKVKIEPLGVAPTKAKRRVVQREKR
HXBC2_WB MRDNWRSELYKYKVKIEPLGVAPTKAKRRVVQREKR
SF162_NB MRDNWRSELYKYKVKIEPLGVAPTKAKRRVVQREKR
AY835446_WB MKNNWRSELYKYKVVRIEPLGIAPTRAKRRVVQREKR
AY835448_NB MRDNWRSELYKYKVVRIEPLGVAPTKAKRRVQREKR
AY835452_GB MRDNWRSELYKYKVKIEPLGVAPTKAKRRVVQREKR
AY835444_WB MRDNWRSELYKYKVVQIEPLGI-----
*.:***.*****:.*.***:
    
```

Leyenda:

- N.º Acceso_GB representa ligantes buenos
- N.º Acceso_WB representa ligantes débiles/moderados
- N.º Acceso_NB representa no ligantes

FIG. 2J

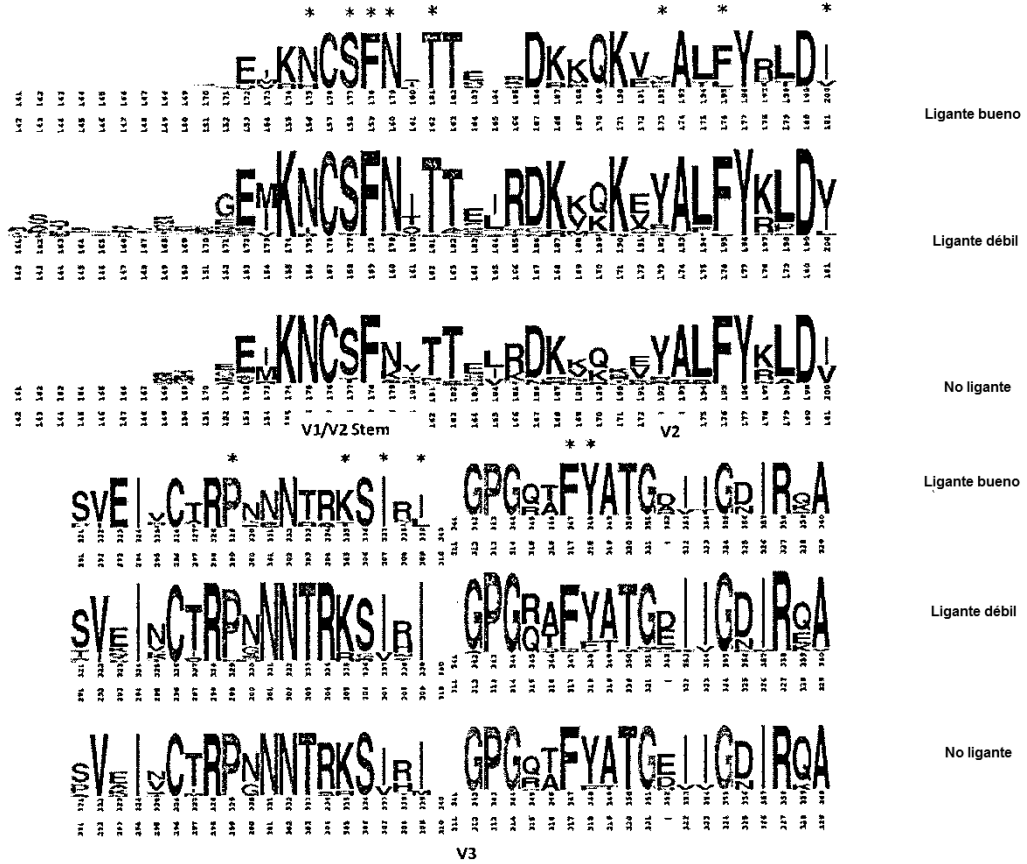


FIG. 3

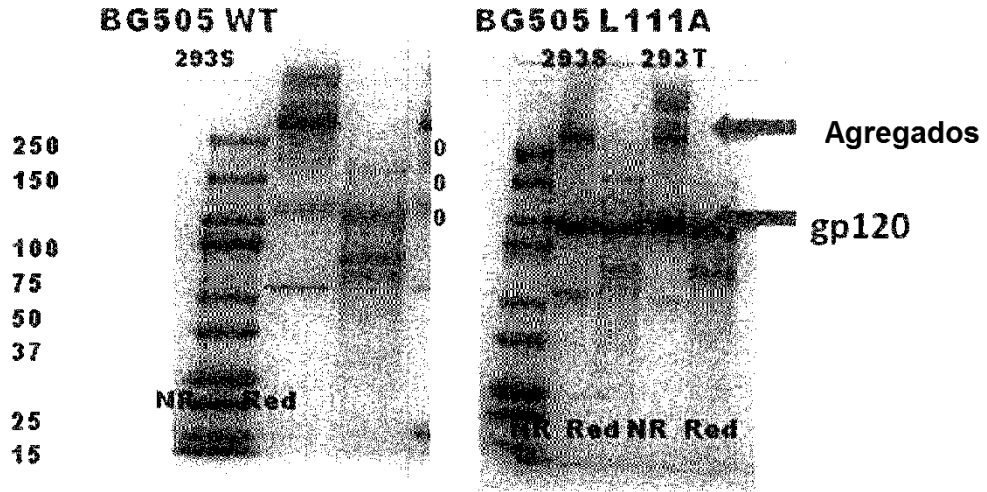
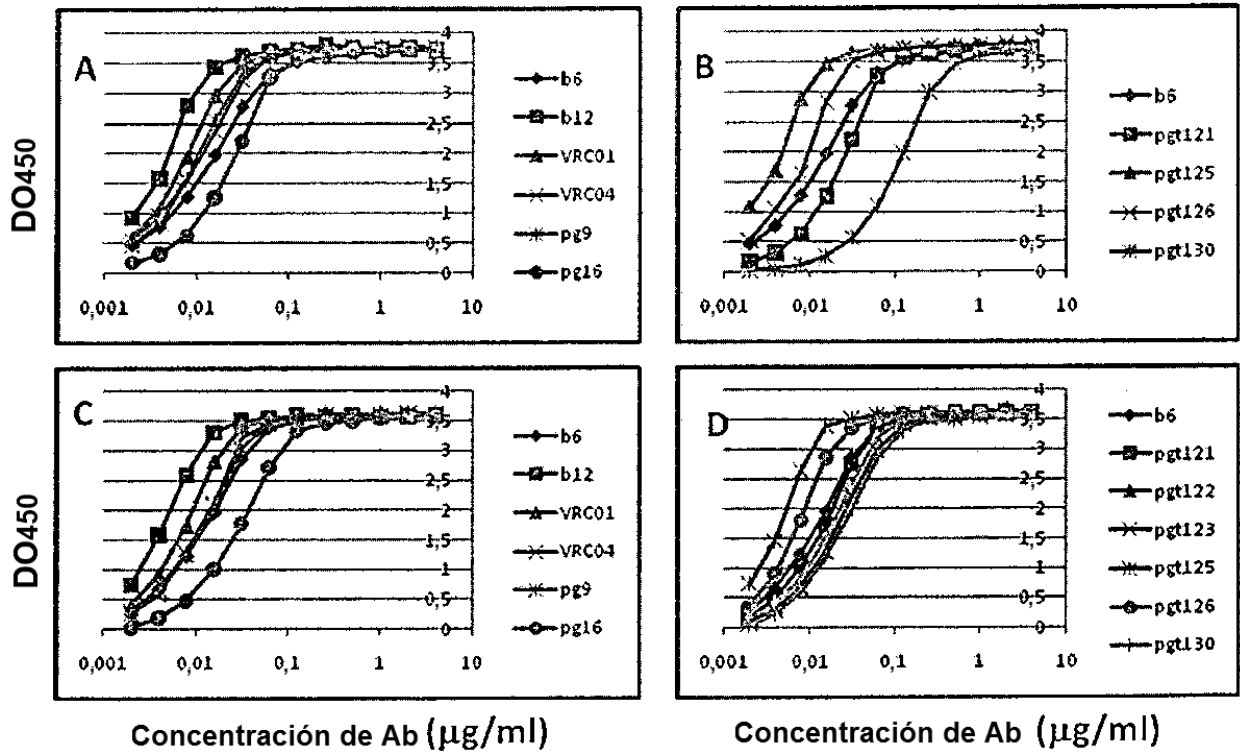


FIG. 4



A, B – BG505 gp120 L111A de células 293S;
 C, D – BG505 gp120 L111A de células 293T

FIG. 5

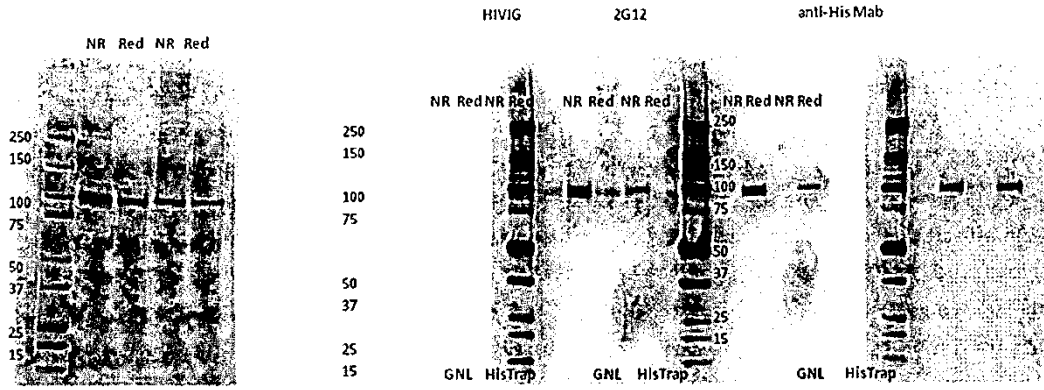


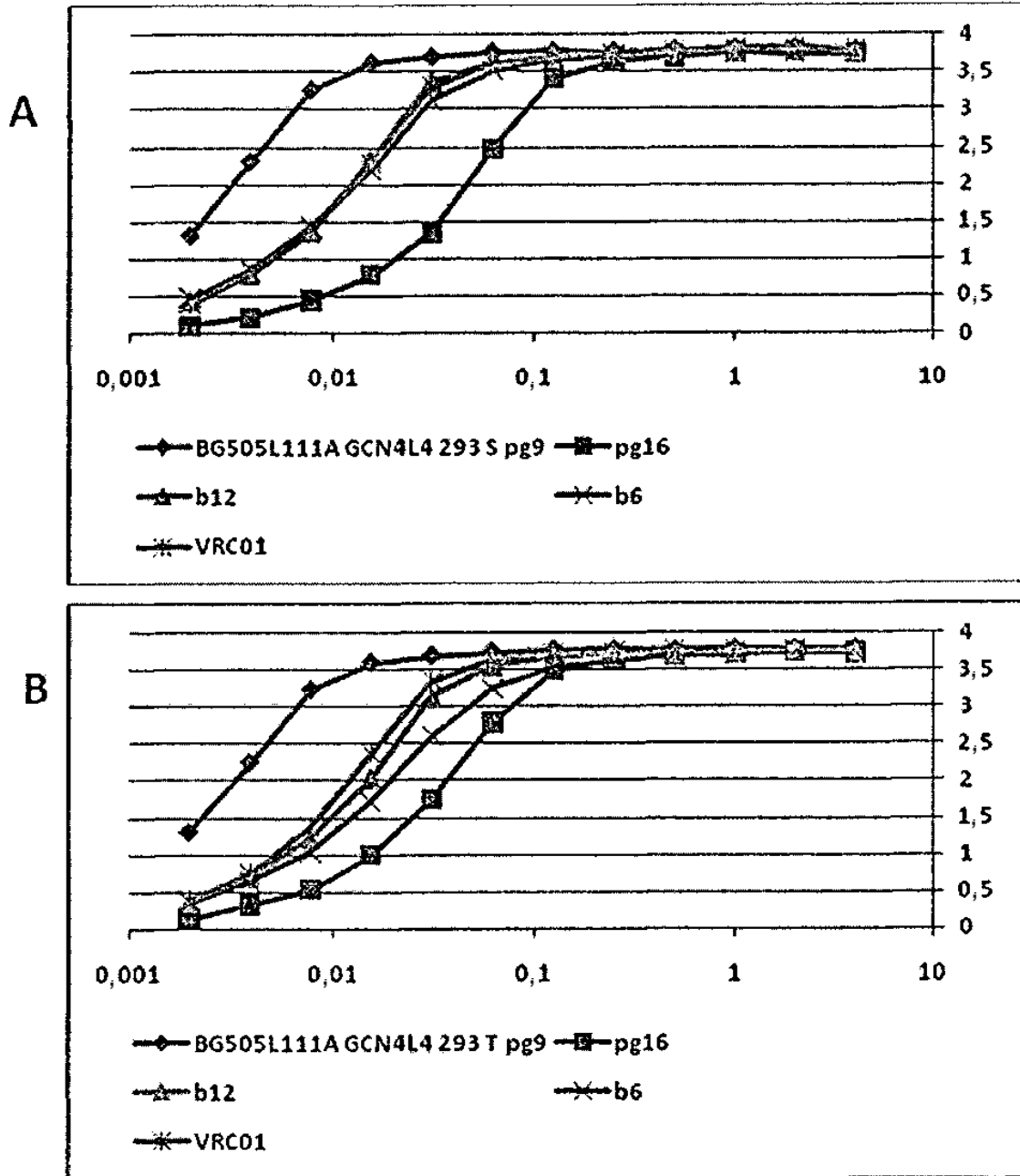
FIG. 6

BG505 L111A gp120 purificada en columna GNL	DO₄₅₀	BG505 L111A gp120 purificada en columna HisTrap	DO₄₅₀
b12	3,764	b12	3,7285
b6	3,801	b6	3,766
pg9	3,839	pg9	3,7985
pg16	3,7785	pg16	3,733
VCR01	3,8155	VCR01	3,7935
PGV04	3,7965	PGV04	3,7885

FIG. 7

Anticuerpos (2 mg/ml)		BG505 L111A gp120 (purificada de los sobrenadantes de 293S) unión, DO450	BG505 L111A gp120 (purificada de los sobrenadantes de 293T) unión, DO450
Anticuerpos específicos de la estructura cuaternaria	pg9	3,74	3,73
	pg16	3,72	3,70
Anticuerpos específicos del sitio de unión a CD4	b12	3,69	3,69
	b6	3,72	3,75
	VRG01	3,76	3,74
	VRCPG04 (PGV04)	3,74	3,75
Anticuerpos PGT dependientes de ácido-siálico	PGT121	1,67	3,74
	PGT122	0,06	3,72
	PGT123	0,23	3,61
Anticuerpos PGT independientes de ácido siálico	PGT125	3,76	3,74
	PGT126	3,76	3,75
	PGT130	3,61	3,56

FIG. 8

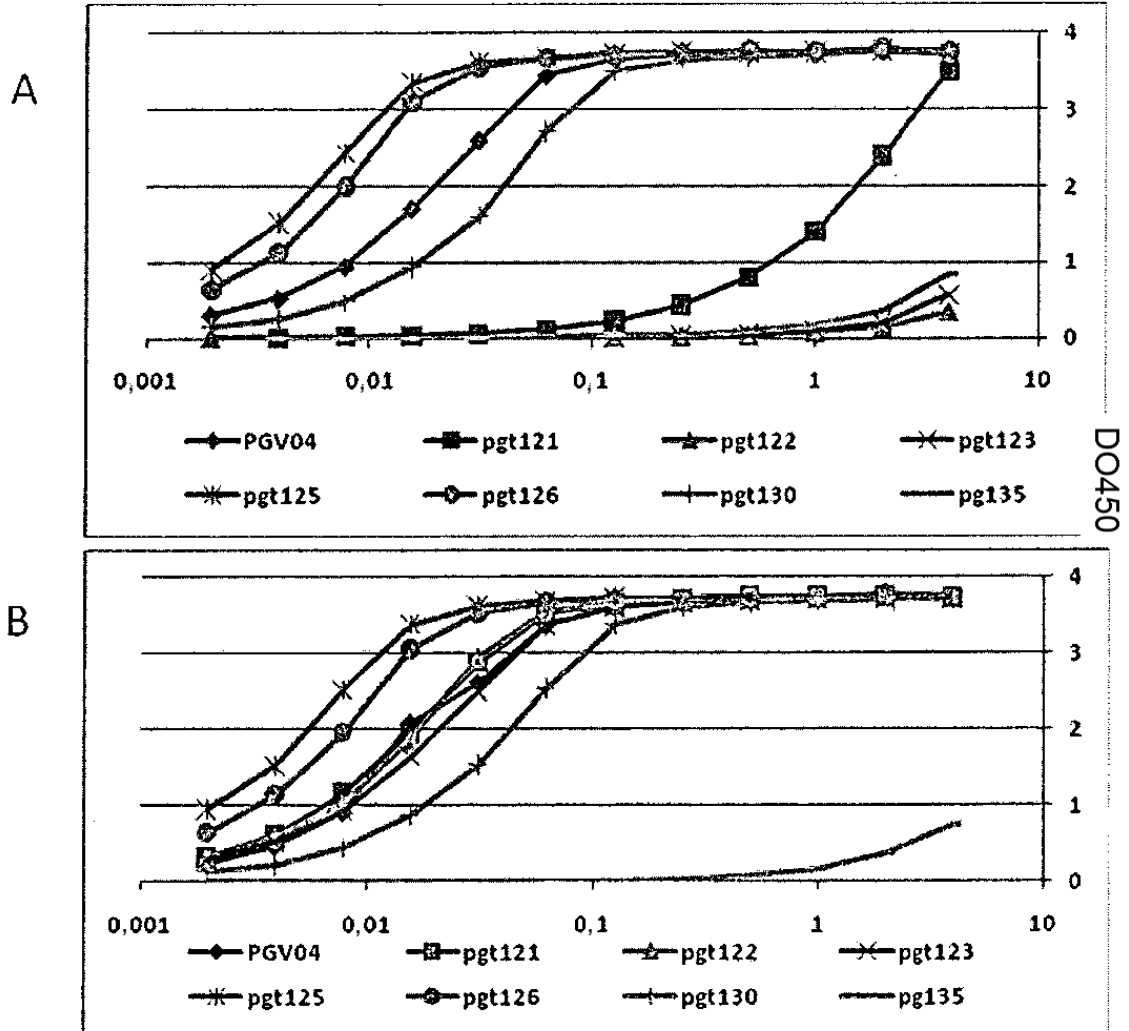


DO450

Log de la concentración de anticuerpos ($\mu\text{g/ml}$)

- BG505 L111A gp140 con motivo de trimerización GCN4 y enlazador 4
- A - expresado en células 293S y B - células 293T
- ELISA de los sobrenadantes

FIG. 9



Log de la concentración de anticuerpos ($\mu\text{g/ml}$)

- A - sobrenadantes de gp140 de células 293S; B - sobrenadantes de gp140 de células 293T
- PGV04 incluido como un control
- La unión de Pgt121, 122 y 123 depende la sialilación de los oligosacáridos
- Pgt135 muestra una unión débil
- Pgt136 y 141 no se unen

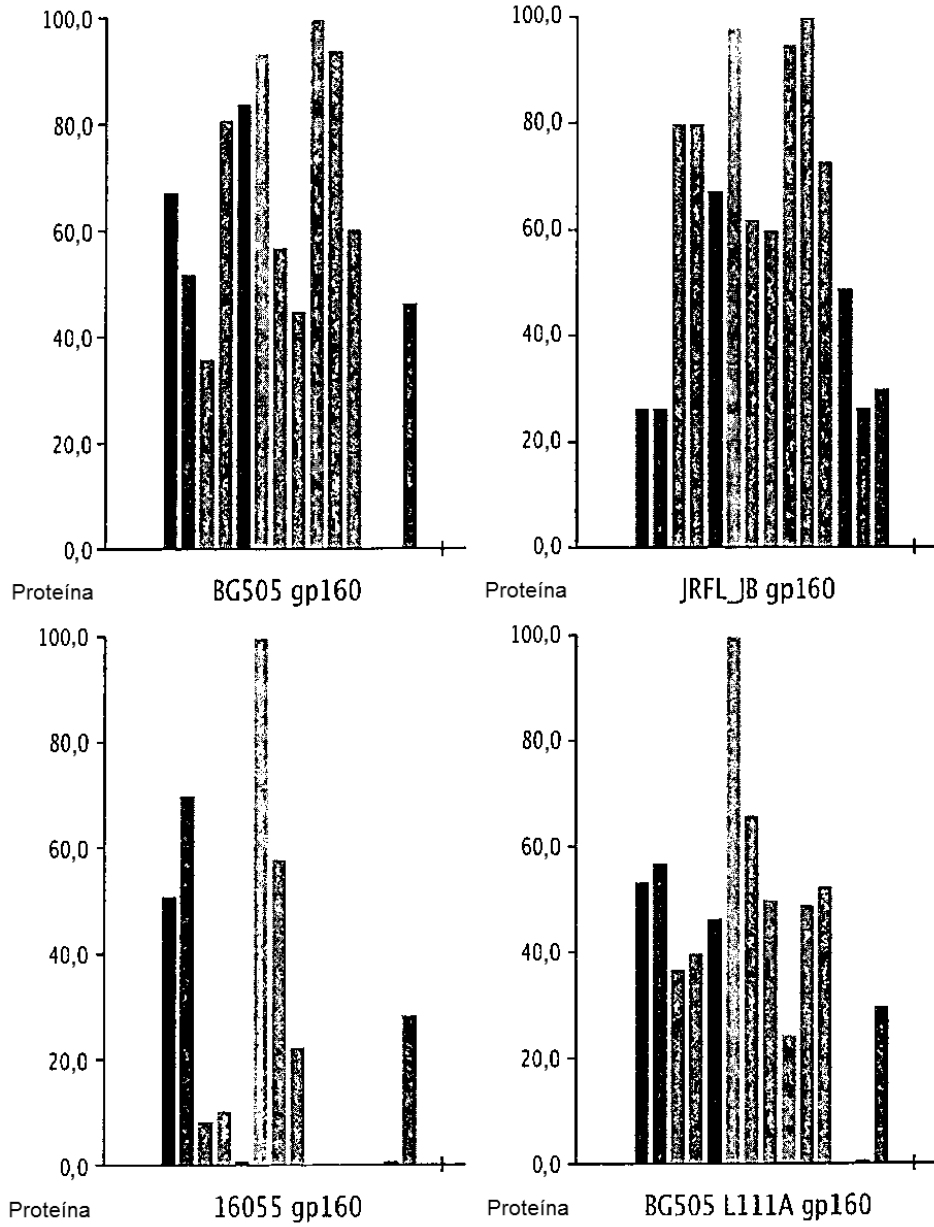
FIG. 10

	PG9	PG16	b12	VRC01	PGV04	2F5	4E10
BG505 wt	0,11	< 0,01	>25	0,06	0,05	0,46	0,89
BG505 L111A	0,02	<0,01	>25	< 0,01	< 0,01	0,34	2

	PGT 121	PGT122	PGT123	PGT125	PGT126	PGT130	PGT136
BG505 wt	0,06	0,09	5,37	< 0,01	0,26	0,06	18,16
BG505 L111A	< 0,01	< 0,01	0,65	< 0,01	< 0,01	4,99	> 25

- El ensayo de neutralización usa el pseudovirus del VIH para ensayar anticuerpos que evitan la entrada del virus en la célula.
- Solo las espículas de gp160 totalmente funcionales sobre la superficie del virus son reconocidas y neutralizadas por bnAb humanos.
- El grado de neutralización se presenta como valor CI50 (μg de anticuerpo por ml)
- El ensayo de neutralización muestra que gp160 BG505 escindida es funcional y reconocida y neutralizada por pg9/16 y por la mayoría de otros anticuerpos anti-gp120 neutralizantes
- También es neutralizada por 2F5 y 4E10 (anti-gp41)
- b12, 2G12 y PGT136/136 no neutralizan el pseudovirus BG505
- El patrón del pseudovirus BG505 L111A es muy similar al virus de tipo silvestre

FIG. 11









Leyenda del gráfico de barras

- Anticuerpo: pg9 ▨ Anticuerpo: VRC01 ▩ Anticuerpo: pgt122 ▪ Anticuerpo: pgt126 ▫ Anticuerpo: pgt136
- ▬ Anticuerpo: pg16 ▩ Anticuerpo: VRC04 ▨ Anticuerpo: pgt123 ▩ Anticuerpo: pgt130 ▪ Anticuerpo: pgt145
- ▩ Anticuerpo: B12 ▨ Anticuerpo: pgt121 ▩ Anticuerpo: pgt125 ▫ Anticuerpo: pgt135

FIG. 12

Sensibilización	Refuerzo		Semana 14 Valores CI50					
			SF162	JRCSF	93IN905	BG505	94UG103	MuLV
ADN control	Proteína BG505 L111A	R796	22,46	29,73	62,99	58,51	33,47	<20
		R797	54,27	58,30	34,88	63,76	47,38	52,74
		R798	<20	<20	<20	<20	<20	<20
		R799	152,75	20,29	29,92	<20	<20	<20
ADN de BG505 L111A	Proteína BG505 L111A	R800	>1280	88,37	74,0	60,11	<20	20,13
		R801	>1280	161,18	10,71	11,74	43,73	38,70
		R802	>1280	143,01	938,87	20,33	<20	22,85
		R803	>1280	183,66	>1280	61,77	47,13	30,13

Título CI50	
	<20
	20 - 49,9
	50 - 99,9
	100 - 299
	300 - 799
	≥800

SF162 - Clado B sensible (cepa de laboratorio)
 JRCSF - Clado B moderadamente sensible
 93IN905 - Clado C sensible
 BG505 - Clado A (sensibilidad desconocida)
 94UG103 - Clado A moderadamente resistente

FIG. 13

Anticuerpos (2 mg/ml)		BG505 L111A gp120 (de los sobrenadantes de 293S) unión, DO450	BG505 L111A T332N gp120 (de los sobrenadantes de 293S) unión, DO450	BG505 L111A gp120 (de los sobrenadantes de 293T) unión, DO450	BG505 L111A T332N gp120 (de los sobrenadantes de 293T) unión, DO450
Anticuerpos específicos de la estructura cuaternaria	pg9	3,74	3,55	3,73	3,50
	pg16	3,72	3,50	3,70	2,86
Anticuerpos específicos del sitio de unión a CD4	b12	3,69	3,49	3,69	3,53
	b6	3,72	3,48	3,75	3,48
	VRC01	3,76	N/A	3,74	N/A
	VRCPG04 (PGV04)	3,74	3,54	3,75	3,50
Anticuerpos PGT dependientes de hidratos de carbono	PGT121	1,67	3,53	3,74	3,55
	PGT122	0,06	N/A	3,72	N/A
	PGT123	0,23	N/A	3,61	N/A
	PGT125	3,76	3,53	3,74	3,55
	PGT126	3,76	3,52	3,75	3,55
	PGT130	3,61	N/A	3,56	N/A
	PGT135	0,00	3,54	0,00	3,53
	PGT136	0,00	3,53	0,00	3,51