

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 643 268**

51 Int. Cl.:

G01N 33/569 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.09.2013 PCT/EP2013/068446**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.03.2014 WO14037490**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.09.2013 E 13758886 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.08.2017 EP 2893349**

54 Título: **Métodos para identificar anticuerpos neutralizantes contra VIH**

30 Prioridad:

06.09.2012 EP 12382342

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
21.11.2017

73 Titular/es:

**LABORATORIOS DEL DR. ESTEVE, S.A. (50.0%)
Avda Mare de Déu de Montserrat 221
08041 Barcelona, ES y
FUNDACIÓ PRIVADA INSTITUT DE RECERCA DE
LA SIDA-CAIXA (50.0%)**

72 Inventor/es:

**BLANCO ARBUÉS, JULIÁN MIGUEL y
CARRILLO MOLINA, JORGE**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 643 268 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

Métodos para identificar anticuerpos neutralizantes contra VIH

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a un método *in vitro* para identificar anticuerpos neutralizantes contra VIH en una muestra. La invención también se refiere a una proteína de fusión para su uso en dicho método y al ácido nucleico que codifica dicha proteína de fusión.

10

Antecedentes de la invención

Durante el transcurso de un proceso de infección el organismo desarrolla una amplia respuesta humoral dirigida contra diferentes antígenos del patógeno que, junto con las respuestas innata y de linfocitos T, controla la infección y conserva la integridad del organismo. En el marco de una infección por VIH-1, esta respuesta humoral puede detectarse pronto durante la infección pero se sabe que es ineficaz, principalmente porque los anticuerpos producidos por la mayoría de los pacientes reconocen epítomos víricos que no pueden interferir con el ciclo de replicación del virus. Véase Tomaras G, *et al.*, J. Virol. 2008; 82:12449-12463. De hecho, pueden identificarse anticuerpos con la capacidad de neutralizar el virus autólogo después de unos pocos meses solamente en algunos pacientes; y se requieren varios años para desarrollar anticuerpos ampliamente neutralizantes (bnAb, por sus siglas en inglés). Véase Mascola J, *et al.*, Annu. Rev. Immunol. 2010; 28:413-444. Hasta la fecha, solo se han identificado unos pocos anticuerpos ampliamente neutralizantes y todos ellos reconocen un conjunto de epítomos conservados en la proteína de la envuelta con un papel importante en la aptitud vírica. Estos anticuerpos incluyen anticuerpos anti-sitio de unión de CD4 (CD4bs) (IgGb12 y VCR01), anticuerpos anti-epítomos inducidos por CD4 (X5), anticuerpos anti-gp41 (2F5 y 4E10), anticuerpos anti-carbohidratos (2G12), anti-epítomos cuaternarios glucosilados (PG9 y PG16) y anticuerpos anti-núcleo. Véase, Barbas C, *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci USA 1992; 89:9339-9343, Wu X, *et al.*, Science 2010; 329: 856-861, Moulard M, *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2002; 99:6913-6918, Muster T, *et al.*, J. Virol. 1993; 67:6642-6647, Zwick M, *et al.*, J. Virol. 2001; 75:10892-10905, Scanlan C, *et al.*, J. Virol. 2002; 76:7306-7321, Walker L, *et al.*, Science 2009; 326:285-289 y Pietzsch J, *et al.*, J. Exp. Med. 2010; 207:1995-2002. Entre ellos, los anticuerpos que pueden bloquear la interacción de gp120/CD4 tales como los anticuerpos anti-CD4bs pueden subrayarse por varias razones: 1) reconocen una región conservada de gp120, 2) pueden neutralizar un amplio número de aislados víricos y 3) pueden prevenir o controlar la infección como se ha mostrado en modelos animales de infección por VIH-1. Véase, Hessel A, *et al.*, Nat. Med. 2009; 15:951-954, Hessel A, *et al.*, Nature 2007; 449:101-104, y Veazey R, *et al.*, Nat. Med. 2003; 9:343-346. Por tanto, la inducción de este tipo de bnAb es un fin interesante para cualquier estrategia de vacunación. Sin embargo, uno de los principales impedimentos en el estudio de estos anticuerpos es su identificación. Los anticuerpos ampliamente neutralizantes en general, y los anticuerpos CD4bs en particular, reconocen epítomos conformacionales que son difíciles de imitar *in vitro*. Hasta la fecha, se han seguido diversas estrategias para estudiar los anticuerpos contra CD4bs, incluyendo el uso de proteínas recombinantes y variantes mutantes que son reconocidas diferencialmente por estos anticuerpos. Véase, Li Y, *et al.*, Nat. Med. 2007; 13:1032-1034, and Lynch R, *et al.*, J. Virol. 2012; 86(4):7588-7595, y Wu, 2010, anteriormente. Además, recientemente se ha desarrollado un ensayo de transferencia vírica de célula a célula que permite detectar la presencia de anticuerpos bloqueantes de CD4/gp120 en muestras de plasma. Este ensayo se basa en el proceso de entrada del virus, que se inhibe por completo en presencia de anticuerpos que bloquean la interacción gp120/CD4 como los anticuerpos contra CD4bs o anti-CD4. Por definición cualquier anticuerpo que sea capaz de bloquear la interacción entre gp120 y el receptor CD4 podría ser un anticuerpo neutralizante. Además, este planteamiento mostró una fuerte correlación entre la presencia de anticuerpos bloqueantes de gp120/CD4 y la capacidad neutralizante del plasma. Véase, Sánchez-Palomino S, *et al.*, Vaccine 2011; 29:5250-5259. Más recientemente, se ha mostrado que más del 80 % de los pacientes infectados por VIH-1 pueden desarrollar anticuerpos contra CD4bs, lo que indica que esta reactividad podría ser más frecuente de lo que se había descrito previamente. Véase, Lynch, 2012, anteriormente.

Sin embargo, no se pudo establecer en este caso una correlación clara entre la presencia de estos anticuerpos y la capacidad neutralizante de las muestras de plasma. Estas discrepancias indican que la metodología es un punto importante a considerar antes de planificar el análisis de los anticuerpos bloqueantes de gp120/CD4. Hay una necesidad en la técnica de métodos más rápidos y fiables para identificar anticuerpos neutralizantes de VIH.

Sumario de la invención

En un primer aspecto, la invención se refiere a un método *in vitro* para determinar los anticuerpos neutralizantes de VIH en una muestra, que comprende:

- (i) poner en contacto una célula que comprende el sitio de unión a CD4 de gp120 en su superficie con dicha muestra y con una proteína de fusión que comprende (i) una proteína capaz de unirse al sitio de unión a CD4 de gp120 y (ii) una región Fc de un anticuerpo primario, y
- (ii) medir la eficacia de unión de dicha proteína de fusión al sitio de unión a CD4 de gp120,

65

en el que los anticuerpos neutralizantes de VIH se determinan en dicha muestra si dicha unión se inhibe en presencia de la muestra.

5 En un segundo aspecto, la presente invención se refiere a una proteína de fusión que comprende (i) una proteína capaz de unirse al sitio de unión a CD4 de gp120 y (ii) una región Fc de un anticuerpo primario.

En un tercer aspecto, la invención se refiere a un ácido nucleico que codifica la proteína de fusión del segundo aspecto y a una casete de expresión, o un vector que comprende dicho ácido nucleico.

10 En un cuarto aspecto, se desvela en el presente documento un kit que comprende la (i) proteína de fusión del segundo aspecto, el ácido nucleico, el vector o el linfocito Transgénica del tercer aspecto y (ii) un indicador capaz de unirse a dicha proteína de fusión.

15 En otro aspecto, la invención se refiere a un método *in vitro* para la identificación de una célula productora de anticuerpos que expresa anticuerpos neutralizantes de VIH, que comprende:

(i) poner en contacto una célula que comprende el sitio de unión a CD4 de gp120 en su superficie con un sobrenadante de un cultivo de dicha célula productora de anticuerpos y con una proteína de fusión que comprende (i) una proteína capaz de unirse al sitio de unión a CD4 de gp120 y (ii) una región Fc de un anticuerpo primario, y
20 (ii) medir la eficacia de unión de dicha proteína de fusión al sitio de unión a CD4 de gp120,

en el que la célula productora de anticuerpos se determina como que expresa anticuerpos neutralizantes de VIH si dicha unión se inhibe en presencia de dicho sobrenadante.

25 En otro aspecto, la invención se refiere a un método para producir anticuerpos neutralizantes de VIH, que comprende:

(i) cultivar células productoras de anticuerpos aisladas de acuerdo con el método de la invención, y
30 (ii) aislar los anticuerpos expresados por dichas células productoras de anticuerpos.

En aún otro aspecto, se desvelan en el presente documento anticuerpos neutralizantes de VIH producidos usando un método de acuerdo con la invención o por células productoras de anticuerpos identificadas por un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones para su uso en el tratamiento o la prevención de una enfermedad asociada a una infección por VIH.

35

Breve descripción de las figuras

40 **Figura 1.** Diagramas del plásmido de expresión pcDNA3.1huCD4mIgG1. Se muestran las características principales del plásmido, tales como el marcador de selección y el marco abierto de lectura. Se usó el programa PlasMapper (<http://wishart.biology.ualberta.ca/PlasMapper/>; Agosto 2012) para dibujar el diagrama.

Figura 2. Titulación del sobrenadante de HEK 293 que contiene la proteína de fusión huCD4mIgG1. **A.** Se usó el sobrenadante de una línea celular HEK 293 transfectada con el plásmido pcDNA3.1huCD4mIgG1 para teñir NL4.3 en una línea celular MOLT crónicamente infectada. La proteína huCD4mIgG1 unida a gp120 en la superficie celular se identificó usando una IgG de cabra anti-ratón conjugada a DyLight-649. Como control negativo se usó una línea celular MOLT sin infectar. **B.** Titulación del sobrenadante usado para teñir la línea celular MOLT NL4.3.

45 **Figura 3.** Actividad bloqueante de CD4/gp120 del CD4bs-bNAbs IgGb12. Se determinó la titulación de la actividad bloqueante de CD4/gp120 del anticuerpo IgGb12 empezando a 48 µg/ml. Se muestra una representación esquemática del mecanismo de acción de IgGb12 bloqueando la interacción entre CD4 y gp120.

Figura 4. Relación entre la especificidad de anticuerpos y la actividad bloqueante de CD4-gp120. Las especificidades implicadas en la actividad bloqueante de CD4-gp120 se ensayaron utilizando varios anticuerpos que reconocían un conjunto conocido de epítomos en la glucoproteína env. Solo los anticuerpos que reconocían el CD4bs en gp120 (IgGb12, VRC01 y VRC03) o el gp120bs en CD4 (Leu3a) bloquearon la interacción entre gp120 y CD4, haciendo el ensayo altamente específico para este tipo de reactividades.

50 **Figura 5.** Cuantificación de los anticuerpos bloqueantes de CD4/gp120 en muestras de plasma. Para determinar la presencia de anticuerpos bloqueantes de CD4/gp120, tal como IgGb12, en muestras de plasma, se determinó la actividad bloqueante de CD4/gp120 por citometría de flujo. Se incluyó una curva patrón con IgGb12 para cuantificar la presencia de anticuerpos bloqueantes de CD4/gp120. Los plasmas ampliamente neutralizantes (plasmas aN) mostraron una presencia principal de anticuerpos bloqueantes de gp120-CD4 que los plasmas no aN.

55 **Figura 6.** Cuantificación de los anticuerpos bloqueantes de CD4/gp120 en muestras de plasma de pacientes infectados con VIH-1 sin tratamiento previo con TAR (VIH-1) e individuos control sin infectar (HC). Se probó la presencia de anticuerpos bloqueantes de CD4/gp120 en 72 muestras de plasma de pacientes infectados con VIH-1 (círculos rojos) y 10 controles sin infectar (cuadrados azules). Los datos muestran el porcentaje de inhibición de CD4/gp120. Se fijó como límite positivo la mediana más dos veces la desviación convencional de

60

65

los valores obtenidos con individuos controles sin infectar. Según este criterio de positividad (línea de puntos), el 43 % de las muestras de VIH-1 (31 de 72) y el 10 % de los controles sin infectar (1 de 10) se consideraron positivos ($p=0,0034$, prueba de Mann-Whitney).

Figura 7. Cuantificación de anticuerpos bloqueantes CD4/gp120 en muestras de plasma de pacientes infectados con VIH-1 sin tratamiento previo con TAR (VIH-1) e individuos control sin infectar (HC) usando el aislado de VIH-1 BaL.7.A) La presencia de anticuerpos bloqueantes CD4/gp120 se probó en 72 muestras de plasma de pacientes infectados con VIH-1 (círculos rojos) y 9 controles sin infectar (cuadrados azules). Los datos muestran el porcentaje de inhibición de CD4/gp120. Como límite positivo se fijó la mediana más dos veces la desviación convencional de los individuos control sin infectar. Según este criterio de positividad (línea de puntos), el 97 % de las muestras de VIH-1 (70 de 72) y el 0 % de los controles sin infectar se consideraron positivos ($p=0,0034$, prueba de Mann-Whitney). 7.B) el porcentaje de inhibición de huCD4mIgG1 tanto en aislados de NL4-3 como de BaL obtenidos para cada muestra de plasma mostró una fuerte correlación ($p<0,0001$, prueba de correlación de Pearson).

15 *Depósito de microorganismos*

El plásmido pcDNA3.1huCD4mIgG1 se depositó el 25 de julio, 2012 en la DSMZ (Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares GmbH), Inhoffenstraße 7 B, D-38124 Braunschweig, República Federal de Alemania con el número de acceso DSM 26215.

20 **Descripción detallada de la invención**

La presente invención se refiere a un ensayo para la identificación y semicuantificación de anticuerpos neutralizantes de VIH en una muestra. La prueba se basa en el reconocimiento de la glucoproteína Env en la superficie de una célula infectada por VIH por una proteína de fusión huCD4/IgG1 murina, aunque puede llevarse a cabo igualmente en diferentes marcos sobre los que se proporcionan detalles en el presente documento. Un anticuerpo se considerará neutralizante si es capaz de prevenir la unión de la proteína de fusión huCD4/IgG1 a la gp120 en la superficie de una célula infectada. Este nuevo enfoque ofrece varias ventajas: 1) las células infectadas con VIH expresan en su superficie la glucoproteína Env con una conformación funcional y nativa, 2) el uso de una proteína de fusión huCD4/IgG1 murina mimetiza la interacción natural entre gp120 y CD4, 3) el diseño citométrico hace este ensayo reproducible y rápido y 4) es semicuantitativo y altamente específico.

30 *1. Definiciones de términos y expresiones generales*

El término “célula productora de anticuerpos”, como se usa en el presente documento, se refiere a una célula capaz de producir o secretar un anticuerpo o un equivalente funcional del mismo, o que es capaz de desarrollarse en una célula que es capaz de producir o secretar un anticuerpo o un equivalente funcional del mismo. Una célula productora de anticuerpos de acuerdo con la invención es preferentemente una célula productora que está adaptada a la producción comercial de anticuerpos. Más preferentemente, dicha célula productora es adecuada para la producción de anticuerpos para su uso en seres humanos.

El término “linfocito B”, como se usa en el presente documento, se refiere a un tipo de linfocito que desempeña un gran papel en la respuesta inmune humoral (opuesto a la respuesta inmune celular, que está dirigida por los linfocitos T). Las funciones principales de los linfocitos B son producir anticuerpos contra antígenos, realizar el papel de células presentadoras de antígenos (CPA) y finalmente desarrollarse a linfocitos B de memoria después de la activación mediante la interacción con el antígeno. Los linfocitos B son un componente esencial del sistema inmune adaptativo.

El término “eficacia de unión”, como se usa en el presente documento, se refiere a la afinidad de un compuesto, preferentemente un anticuerpo, al sitio de unión a CD4 de gp120. “Afinidad” significa la fuerza con la que dicho compuesto se une al sitio de unión a CD4 de gp120. Está determinada por interacciones no covalentes tales como interacciones iónicas como atracción de cargas opuestas en aminoácidos, puentes de hidrógeno o interacciones hidrófobas. Como se usa en el presente documento, el término “unión” o “unión específica”, se refiere a la interacción entre pares de unión (por ejemplo dos proteínas o compuestos, preferentemente el dominio de unión a CD4 de gp120 y CD4 o un compuesto, preferentemente un anticuerpo, específico para este sitio de unión). En algunas realizaciones, la interacción tiene una constante de afinidad de como máximo 10^{-6} moles/litro, como máximo 10^{-7} moles/litro, o como máximo 10^{-8} moles/litro. En general, la frase “que se une” o “que se une específicamente” se refiere a la unión específica de un compuesto a otro, en el que el nivel de unión, medido por cualquier ensayo convencional, es estadísticamente significativamente mayor que el control de fondo para el ensayo.

El término “CD4”, como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo de diferenciación 4, una glucoproteína expresada en la superficie de los linfocitos T auxiliares, monocitos, macrófagos y células dendríticas. CD4 es un correceptor que ayuda al receptor de linfocitos T (TCR) con una célula presentadora de antígenos. Usando su parte que reside dentro del linfocito T, CD4 amplifica la señal generada por el TCR reclutando una enzima, conocida como la tirosina quinasa lck, que es esencial para la activación de muchas moléculas implicadas en la cascada de señalización de un linfocito T activado. La secuencia de proteína completa para CD4 humana tiene

el número de acceso de UniProt P01730 (18 de junio, 2012).

El término “codón optimizado”, como se usa en el presente documento, se refiere al cambio de codones en moléculas de ácido nucleico para reflejar el uso de codones típico del organismo huésped sin cambiar el polipéptido codificado por el ADN, para mejorar la expresión. Se conocen en la técnica varios métodos y herramientas de software para la optimización de codones. Véase, Narum D, *et al.*, *Infect. Immun.* 2001; 69(12):7250-7253, Outchkourov N, *et al.*, *Protein Expr. Purif.* 2002; 24(1):18-24, Feng L, *et al.*, *Biochemistry* 2000; 39(50):15399-15409, y Humphreys D, *et al.*, *Protein Expr. Purif.* 2000; 20(2):252-264.

El término “comprender” o “comprende”, como se usa en el presente documento, desvela también “consistir en” según la práctica de patente generalmente aceptada.

El término “FACS” o “separación celular activada por fluorescencia”, como se usa en el presente documento, se refiere a un método para separar una mezcla heterogénea de células en uno o más envases, una célula cada vez, basado en la dispersión específica de la luz y las características fluorescentes de cada célula.

El término “región del fragmento cristizable” o “región Fc”, como se usa en el presente documento, se refiere a la región de la cola de un anticuerpo que interacciona con los receptores de la superficie celular denominados receptores de Fc y algunas proteínas del sistema del complemento.

El término “proteína de fusión”, como se usa en el presente documento, se refiere a proteínas generadas por tecnología génica que consisten en dos o más dominios funcionales derivados de diferentes proteínas. Se puede obtener una proteína de fusión por medios convencionales (por ejemplo, mediante expresión génica de la secuencia de nucleótidos que codifica dicha proteína de fusión en una célula adecuada).

El término “gp120”, como se usa en el presente documento, se refiere a una glucoproteína que tiene la especificidad antigénica o la función biológica de la proteína de la envuelta externa (env) del VIH. Una “proteína gp120” es una molécula derivada de una región gp120 de un polipéptido Env. Los polipéptidos tipo silvestre gp120 maduros tienen aproximadamente 500 aminoácidos en su secuencia primaria. Gp120 está altamente N-glicosilada dando lugar a un peso molecular aparente de 120 kD. La secuencia de aminoácidos de gp120 tiene aproximadamente 511 aminoácidos. Gp120 contiene cinco dominios relativamente conservados (C1-C5) entremezclados con cinco dominios variables (V1-V5). Los dominios variables contienen extensas sustituciones, inserciones y deleciones de aminoácidos. Un “polipéptido gp120” incluye tanto subunidades únicas como multímeros. La porción gp41 está anclada en (y atraviesa) la bicapa de membrana del virión, mientras que el segmento gp120 sobresale en el entorno circundante. El dominio de unión al receptor de gp120 está localizado en la mitad N-terminal de la proteína. Este está seguido por una región rica en prolina (PRR), que se propone que se comporta como una bisagra o un gatillo para comunicar la unión al receptor a la maquinaria de fusión. El extremo C de gp120 está muy conservado e interacciona con gp41. Están disponibles secuencias ejemplares de polipéptidos gp160 salvajes. Véanse los números de acceso de GenBank AAB05604 y AAD12142. Preferentemente, el polipéptido gp120 deriva de Env de VIH.

Además, un “polipéptido gp120”, como se define en el presente documento, no se limita a un polipéptido que tiene la secuencia exacta descrita en el presente documento. De hecho, el genoma de VIH está en un estado de flujo constante y contiene varios dominios variables que muestran grados relativamente altos de variabilidad entre aislados. Es aparente de inmediato que los términos abarcan polipéptidos gp120 de cualquiera de los aislados de VIH identificados, así como de aislados recién identificados, y subtipos de estos aislados. Las descripciones de las características estructurales se dan en el presente documento con referencia a HXB-2. El experto en la materia a la vista de las enseñanzas de la presente divulgación y la técnica puede determinar las regiones correspondientes en otras variantes de VIH (por ejemplo aislados VIH IIIb, VIH SF2, VIH-1 SF162, VIH-1 SF170, VIH LAV, VIH LAI, VIH MN, VIH-1 CM235, VIH-1 US4, otras cepas de VIH-1 de diversos subtipos (por ejemplo, subtipos de A hasta G, y O), cepas de VIH-2 y diversos subtipos (por ejemplo, VIH-2 UC1 y VIH-2 UC2) y virus de la inmunodeficiencia de simios (VIS). Véase, Joklik W, Ed., “Virology”, 3ª Ed. (Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, PA, EE UU, 1988), Fields B, *et al.*, Eds., “Fundamental Virology”, 3ª Ed. (Raven Press, Nueva York, NY, EE UU, 1995), y Knipe D, *et al.*, Eds., *Fields Virology*, 5ª Ed. (Lippincott Williams & Wilkins, Nueva York, NY, EE UU, 2006). Pueden usarse programas de comparación de secuencias (por ejemplo, BLAST y otros descritos en el presente documento) o programas de identificación y alineamiento de características estructurales (por ejemplo, el programa “ALB” para identificar regiones de lámina β) para comparar la secuencia de las secuencias polipeptídicas de Env nativa y modificada. Las secuencias reales de aminoácido de los polipéptidos Env modificados se pueden basar en cualquier variante de VIH. Además, el término polipéptido gp120 abarca proteínas que incluyen modificaciones adicionales a la secuencia nativa, tales como deleciones, adiciones y sustituciones internas adicionales. Estas modificaciones pueden ser deliberadas, como mediante mutagénesis dirigida, o pueden ser accidentales, tal como mediante sucesos mutacionales naturales.

El término “VIH”, como se usa en el presente documento, se refiere al virus de la inmunodeficiencia humana. Incluye VIH-1 y VIH-2 y VIS; preferentemente se refiere a VIH-1 y/o VIH-2. “VIH-1” significa el virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1. VIH-1 incluye, pero no está limitado a, partículas víricas extracelulares y formas de VIH-1

asociadas a células infectadas por VIH-1. El virus VIH-1 puede representar cualquiera de los subtipos principales conocidos (clases A, B, C, D, E, F, G y H) o subtipo atípico (grupo O) incluyendo cepas de laboratorio y aislados primarios. "VIH-2" significa el virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 2. VIH-2 incluye, pero no está limitado a, partículas víricas extracelulares y formas de VIH-2 asociadas a células infectadas por VIH-2. El término "VIS" se refiere al virus de la inmunodeficiencia simia que es un virus similar a VIH que infecta monos, chimpancés y otros primates no humanos. VIS incluye pero no está limitado a, partículas víricas extracelulares y formas de VIS asociadas con células infectadas por VIS.

Los términos "idéntico" o "porcentaje de identidad", en el contexto de dos o más ácidos nucleicos o polipéptidos, se refiere a dos o más secuencias o subsecuencias que son iguales o tienen un porcentaje especificado de restos de aminoácidos o nucleótidos que son iguales, cuando se comparan y alinean (introduciendo huecos, si es necesario) para la máxima correspondencia, sin considerar ninguna sustitución conservadora de aminoácidos como parte de la identidad de secuencia. El porcentaje de identidad puede medirse usando software o algoritmos de comparación de secuencias o mediante inspección visual. Se conocen en la técnica varios algoritmos y software que pueden usarse para obtener alineamientos de secuencias de aminoácidos o ácidos nucleicos. Los ejemplos de algoritmos adecuados para determinar la similitud de secuencia incluyen, pero no están limitados a, los algoritmos BLAST, Gapped BLAST y BLAST 2.0, WU-BLAST-2, ALIGN y ALIGN-2. Véase, Altschul S, *et al.*, Nuc. Acids Res. 1977; 25:3389-3402, Altschul S, *et al.*, J. Mol. Biol. 1990; 215:403-410, Altschul S, *et al.*, Meth. Enzymol. 1996; 266:460-480, Karlin S, *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1990; 87:2264-2268, Karlin S, *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1993; 90:5873-5877, Genentech Corp, South San Francisco, CA, EE UU, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>, Agosto 2012. Los métodos de alineamiento de secuencia para comparación pueden realizarse, por ejemplo, mediante el algoritmo de homología local de Smith-Waterman, mediante el algoritmo de alineamiento de homología de Needleman-Wunsch, mediante el método de búsqueda de similitud de Pearson-Lipman, mediante implementaciones computarizadas de estos algoritmos o mediante alineamiento manual e inspección visual. Véase, Smith T, Waterman M., Adv. Appl. Math. 1981; 2:482-489; Needleman S, Wunsch C, J. Mol. Biol. 1970; 48:443-453; Pearson W, Lipman D, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1988; 85:2444-2448; los programas GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA, Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, Madison, WI, EE UU; Ausubel F, *et al.*, Eds., "Short Protocols in Molecular Biology", 5ª Ed. (John Wiley and Sons, Inc., Nueva York, NY, EE UU, 2002).

El término "hibridoma", como se usa en el presente documento, se refiere a una célula que se crea mediante fusión de dos células, una célula secretora de anticuerpos del sistema inmune, tal como un linfocito B, y una célula inmortal, tal como un mieloma, dentro de una única membrana.

El término "kit", como se usa en el presente documento, se refiere a un producto que contiene los diferentes reactivos necesarios para llevar a cabo los métodos de la invención, envasados de forma que permite su transporte y almacenamiento. Los materiales adecuados para embalar los componentes del kit incluyen cristal, plástico (por ejemplo, polietileno, polipropileno, policarbonato), botellas, viales, papel o sobres. El kit de la invención puede contener además instrucciones para el uso de los componentes contenidos en el mismo.

El término "anticuerpos neutralizantes de VIH conocidos", como se usa en el presente documento, se refiere a anticuerpos neutralizantes de VIH conocidos en la técnica. Preferentemente, un anticuerpo neutralizante de VIH conocido se selecciona del grupo que consiste en IgGb12, VRC01, VRC03, VRC-PG04, 3BNC60, HJ16, 3BNC117, NIH45-46, 8ANC131, y 12A12. Véase, Waker L, *et al.*, Nature 2011; 477(7365):466-470 y Scheid J, *et al.*, Science 2011; 33(6049):1633-1637. Otros anticuerpos neutralizantes de VIH incluyen, pero no están limitados a, 2F5, 4E10, PG9, PG16 y 2G12.

El término "anticuerpo neutralizante", como se usa en el presente documento, es cualquier anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo que se une a un patógeno e interfiere con la capacidad del patógeno de infectar una célula o producir una enfermedad en un sujeto. Típicamente, los anticuerpos neutralizantes usados en el método de la presente invención pueden unirse a la superficie del patógeno y son capaces de inhibir o reducir la infección por el patógeno en al menos el 99 %, 95 %, 90 %, 85 %, 80 %, 75 %, 70 %, 60 %, 50 %, 45 %, 40 %, 35 %, 30 %, 25 %, 20 % o el 10 % relativo a la infección por el patógeno en ausencia de dicho anticuerpo o anticuerpos o en presencia de un control negativo. Los métodos para confirmar si un anticuerpo es un nAc se han descrito en la técnica. Véase, Li M, *et al.*, J. Virol. 2005; 79:10108-10125, Wei X, *et al.*, Nature 2003; 422:307-312, y Montefiori D, Curr. Protoc. Immunol. 2005; Enero, Capítulo 12: Unidad 12.11. Estos métodos se basan en la determinación de la reducción en expresión de un gen indicador después de una única ronda de infección vírica usando una línea celular receptiva usando un virus que codifica el gen indicador. En el contexto de la invención, este antígeno es preferentemente gp120 y este cuerpo infeccioso es preferentemente VIH. En particular, el término "anticuerpo neutralizante de VIH" se refiere a un anticuerpo con afinidad por el sitio de unión a CD4 de gp120. El término "anticuerpos neutralizantes" incluye la subclase de los bnAb. Como se usa en el presente documento, "anticuerpo ampliamente neutralizante" o "bnAb" se entiende como un anticuerpo obtenido por cualquier método que cuando se administra a una dosis eficaz puede usarse como un agente terapéutico para la prevención o tratamiento de infecciones por VIH o SIDA contra más de 7 cepas de VIH, preferentemente más de 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o más cepas de VIH. La capacidad neutralizante de los anticuerpos puede caracterizarse por la CI50 (es decir, la concentración de anticuerpo que produce una reducción del 50 % en la infección de una célula diana). Preferentemente, los anticuerpos neutralizantes para su uso según la presente invención tienen una CI50 de 2 µg/ml o menor (menos de

- 0,15 µg/ml, menos de 0,125 µg/ml, menos de 0,10 µg/ml, menos de 0,075 µg/ml, menos de 0,05 µg/ml, menos de 0,025 µg/ml, menos de 0,02 µg/ml, menos de 0,015 µg/ml, menos de 0,0125 µg/ml, menos de 0,01 µg/ml, menos de 0,0075 µg/ml, menos de 0,005 µg/ml o menos de 0,004 µg/ml (una concentración de anticuerpo de 10^{-8} o menor, preferentemente 10^{-9} M o menor, preferentemente 10^{-10} M o menor, es decir, 10^{-11} M, 10^{-12} M, 10^{-13} M o menor). Esto significa que solo se requieren concentraciones muy bajas de anticuerpo para la neutralización al 50 por ciento de un asilado clínico de VIH *in vitro*. Se puede medir la potencia usando un ensayo de neutralización convencional como se describe en la técnica.
- La frase “operativamente unido”, como se usa en el presente documento, significa que la secuencia de nucleótidos de interés está unida a la secuencia o secuencias reguladoras de una manera que permite la expresión de la secuencia de nucleótidos (por ejemplo, en un sistema de transcripción/traducción *in vitro* o en una célula hospedadora cuando el vector se introduce en la célula hospedadora). Véase, Auer H, Nature Biotechnol. 2006; 24: 41-43.
- Los términos “polinucleótido” y “ácido nucleico”, como se usan en el presente documento, se refieren a una forma polimérica de nucleótidos de cualquier longitud y formada por ribonucleótidos o desoxirribonucleótidos. El término incluye polinucleótidos tanto mono como bicatenarios, así como polinucleótidos modificados (por ejemplo, metilados, protegidos y similares).
- Los términos “prevenir” y “prevención”, como se usan en el presente documento, se refieren a inhibir el origen o disminuir la aparición de una enfermedad en un sujeto. La prevención puede ser completa (por ejemplo, la ausencia total de células patológicas en un sujeto) o parcial. La prevención también se refiere a una susceptibilidad reducida a un estado clínico.
- Los términos “anticuerpo primario” y “anticuerpo secundario”, como se usan en el presente documento, se refieren en general a dos grupos de anticuerpos basados en si se dirigen a una diana de interés directamente o se dirigen a otro anticuerpo (primario) que, a su vez, está unido a una diana de interés. En el contexto de la presente invención, el anticuerpo primario no se dirige a una diana, ya que solo se usa su región Fc, que se fusiona a la proteína capaz de unirse al sitio de unión a CD4 de gp120. El anticuerpo secundario se dirige a la región Fc.
- El término “muestra”, como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier muestra, preferentemente una muestra biológica, que puede contener anticuerpos. Por ejemplo, puede ser el sobrenadante de un cultivo celular (por ejemplo, un cultivo de linfocitos B, en particular un hibridoma de linfocitos B). Además, puede ser una muestra recogida de un sujeto. Las muestras adecuadas recogidas de un sujeto para su uso en la presente invención incluyen cualquier biofluido y, en particular, sangre, suero, plasma, linfa, saliva, células de sangre periférica o suero de células tisulares, saliva, semen, esputo, líquido cefalorraquídeo (LCR), lágrimas, moco, sudor, leche o extractos cerebrales. El tejido corporal puede comprender timo, ganglio linfático, bazo, médula ósea o tejido amigdalino. Las muestras preferidas son plasma o suero. La frase “muestra control” se refiere a una muestra que no comprende ningún compuesto que se une al sitio de unión a CD4 de gp120.
- El término “sujeto”, como se usa en el presente documento, se refiere a un animal, en particular a un vertebrado, tal como un ser humano, un primate no humano (por ejemplo, chimpancés y otras especies simios y monos), animales de granja, tales como, aves, peces, vacas, ovejas, cerdos, cabras y caballos; mamíferos domésticos, tales como, perros y gatos; animales de laboratorio incluyendo roedores, tales como ratones, ratas y cobayas. El término no indica una edad o sexo particulares. El término “sujeto” abarca un embrión y un feto.
- El término “superficie”, como se usa en el presente documento, se refiere a la membrana externa de una célula, por lo cual “en su superficie” puede significar integrado en o unido a la superficie o membrana. En cualquier caso, el sitio de unión a CD4 de gp120 está fuera de la célula y expuesto de modo que se puede producir tal unión.
- El término “tratar” o “tratamiento”, como se usa en el presente documento, se refiere a la administración de un compuesto de la invención o de una composición o medicamento que lo contiene para controlar la evolución de una enfermedad después de que hayan aparecido los signos clínicos. Se entiende que el control de la evolución de la enfermedad significa los resultados clínicos beneficiosos o deseados que incluyen, pero no están limitados a, reducción de los síntomas, reducción de la duración de la enfermedad, estabilización de los estados patológicos (específicamente para evitar deterioro adicional), retraso en el progreso de la enfermedad, mejora del estado patológico y remisión (tanto parcial como total). El control de la evolución de la enfermedad también implica una extensión de la supervivencia, comparada con la supervivencia esperada si no se aplicara tratamiento.
- El término “vector”, como se usa en el presente documento, se refiere a una molécula de ácido nucleico, lineal o circular, que comprende un segmento de acuerdo con el ácido nucleico de interés operativamente unido a segmentos adicionales que proporcionan su replicación autónoma en una célula hospedadora de interés o de acuerdo con la casete de expresión de interés.

2. Método para determinar anticuerpos neutralizantes de VIH en una muestra

En un primer aspecto, la invención se refiere a un método *in vitro* para determinar anticuerpos neutralizantes de VIH en una muestra, que comprende:

- a) poner en contacto una célula que comprende el sitio de unión a CD4 de gp120 en su superficie con dicha muestra y con una proteína de fusión que comprende (i) una proteína capaz de unirse al sitio de unión a CD4 de gp120 y (ii) una región Fc de un anticuerpo primario, y
- b) medir la eficacia de unión de dicha proteína de fusión al sitio de unión a CD4 de gp120,

en el que los anticuerpos neutralizantes de VIH se determinan en dicha muestra si dicha eficacia de unión es menor que la eficacia de unión determinada en ausencia de cualquier anticuerpo neutralizante.

En una primera etapa, el método para determinar anticuerpos neutralizantes de VIH en una muestra comprende poner en contacto una célula que comprende el sitio de unión a CD4 de gp120 en su superficie con dicha muestra y con una proteína de fusión que comprende (i) una proteína capaz de unirse al sitio de unión a CD4 de gp120 y (ii) una región Fc de un anticuerpo primario.

En una realización preferida, la muestra puede ser un sobrenadante de un cultivo celular, por ejemplo, un cultivo de linfocitos B, en particular un hibridoma de linfocitos B. Además, puede ser una muestra recogida de un sujeto. En una realización más preferida, la muestra es una muestra de plasma o una muestra de suero.

El poner en contacto se lleva a cabo mediante al menos un instante de exposición de dicha célula, dicha muestra y dicha proteína de fusión. En una realización preferida, la exposición es prolongada (es decir, una incubación en condiciones adecuadas para que la célula sobreviva y para la unión específica del sitio de unión a CD4 de gp120 y la proteína de fusión de la invención). Las condiciones durante la etapa de poner en contacto las puede determinar de una manera rutinaria el experto en la materia. Los tampones adecuados que pueden usarse en la etapa de poner en contacto incluyen tampones fisiológicos que no interfieran con el ensayo que se va a realizar. Por ejemplo, puede emplearse un tampón Tris o trietanolamina (TEA). El pH del tampón (y el reactivo de lisis resultante incluyendo la solución tampón) puede variar de aproximadamente 2,0 a aproximadamente 10,0, opcionalmente de aproximadamente 4,0 a aproximadamente 9,0, preferentemente de aproximadamente 7,0 a aproximadamente 8,5, incluso más preferentemente de aproximadamente 7,5 a aproximadamente 8,0, o aproximadamente 7,0, aproximadamente 7,5, aproximadamente 8,0 o aproximadamente 8,5. Las condiciones de "poner en contacto" ejemplares pueden comprender incubación durante 15 minutos a 4 horas (por ejemplo, una hora, a 4 °C, 37 °C o a temperatura ambiente). Sin embargo, estas pueden variar según, por ejemplo, la naturaleza de las moléculas que interaccionan. La muestra se puede someter opcionalmente a agitación, mezcla o rotación suaves. Además, se pueden añadir otros reactivos apropiados tales como agentes bloqueantes para reducir la unión no específica. Por ejemplo, puede usarse BSA al 1-4 por ciento u otro agente bloqueante (por ejemplo, leche). Las condiciones de contacto pueden variar y adaptarse dependiendo del fin del método de cribado. Por ejemplo, si la temperatura de incubación es, por ejemplo, temperatura ambiente o 37 °C, esto puede aumentar la posibilidad de identificar conectores que sean estables en estas condiciones (por ejemplo, en el caso de incubación a 37 °C, conectores que sean estables en las condiciones encontradas en el cuerpo humano). Tal propiedad podría ser extremadamente ventajosa si una o ambas de las moléculas que participan en la unión fuera un candidato a usarse en algún tipo de aplicación terapéutica (por ejemplo, un anticuerpo).

La célula que va a usarse puede ser de cualquier tipo, incluyendo tanto células eucariotas como células procariontas. Preferentemente, la célula es una célula eucariota cultivada, más preferentemente, una célula de mamífero cultivada (por ejemplo, una célula humana cultivada). Los ejemplos preferidos de células de mamífero son, por ejemplo, células HEK-293, células MOLT-3, células COS, células HeLa, células 293T y células de cualquier otra línea celular establecida. Además, preferentemente las células deben ser capaces de expresar la proteína de fusión de la invención en un estado nativo funcional y conformacional. En una realización, dicha célula es una célula infectada por VIH. Preferentemente, dicha célula infectada por VIH está crónicamente infectada. En una realización específica, dicha célula crónicamente infectada por VIH se selecciona del grupo que consiste en una célula MOLT crónicamente infectada por NL4.3, una célula H9 y una célula HuT-78. Véase, Blanco J, *et al.*, *Leukoc. Biol.* 2004; 76(4):804-811 y Blanco J, *et al.*, *Virology* 2003; 305(2):318-329.

El orden en que los diferentes componentes del ensayo se ponen en contacto no es particularmente limitante. Por tanto, en una realización, las células que expresan el sitio de unión a CD4 de gp120 en su superficie se ponen en contacto primero con la proteína de fusión y después con la muestra. En otra realización, las células que expresan el sitio de unión a CD4 de gp120 en su superficie se ponen en contacto primero con la muestra y después con la proteína de fusión. En aún otra realización, la proteína de fusión y la muestra se mezclan y la mezcla se añade entonces a las células que expresan el sitio de unión a CD4 de gp120 en su superficie. En otra realización, la proteína de fusión, la muestra y las células que expresan el sitio de unión a CD4 de gp120 en su superficie se ponen en contacto al mismo tiempo.

- El "sitio de unión a CD4 de gp120" está determinado por la secuencia y conformación de gp120. Aunque la región principal de gp120 implicada en la unión a CD4 es el bucle de unión a CD4 364-SSGGDPEIVTH-374 (numeración de HXB2 P04578), el CD4bs conformacional en gp120 implica otros restos de la cuarta región constante de esta proteína. En particular, D368 (numeración de HXB2) es un resto clave, ya que su mutación anula la unión a CD4. La caracterización del CD4bs se ha publicado previamente. Véase, Sterjovski J, *et al.*, *Virology* 2011; 410(2):418-428. Se prefiere que el sitio de unión a CD4 de gp120 tenga una conformación funcional y nativa. Una forma de proporcionar tal sitio de unión a CD4 de gp120 es usar la proteína gp120, la proteína Env o fragmentos de las mismas que comprendan dicho sitio de unión.
- En una realización preferida, la proteína capaz de unirse al sitio de unión a CD4 de gp120 se selecciona preferentemente de CD4 o una variante funcionalmente equivalente del mismo. En una realización preferida, la proteína capaz de unirse al sitio de unión a CD4 de gp120 es CD4. Dicha CD4 preferentemente deriva de un animal, en particular un vertebrado, tal como un ser humano (por ejemplo, número de acceso de la base de datos UniProtKB P01730), un primate no humano (por ejemplo, chimpancés y otras especies de simios y monos); animales de granja, tales como, aves, peces, vacas, ovejas, cerdos, cabras y caballos; mamíferos domésticos, tales como, perros y gatos; animales de laboratorio incluyendo roedores, tales como ratones, ratas y cobayas. En otra realización preferida, la proteína capaz de unirse al sitio de unión a CD4 de gp120 es una variante funcionalmente equivalente de CD4.
- Las variantes de CD4 pueden ser tanto naturales como artificiales. La expresión "variante natural" se refiere a todas esas variantes de CD4 humana mencionadas anteriormente que aparecen de forma natural en otras especies (es decir, ortólogos de CD4). Dichas variantes naturales incluyen, sin limitación, ortólogos de ratón o pollo de CD4 (números de acceso a la base de datos del NCBI NP_038516,1 y NP_989980,1, respectivamente). Las variantes naturales de CD4 adecuadas para su uso en la presente invención también pueden derivar de dichas secuencias por inserción, sustitución o delección de uno o más aminoácidos e incluyen alelos naturales, variantes resultantes de procesamiento alternativo y formas secretadas y truncadas que aparecen de forma natural.
- Una variante funcionalmente equivalente de CD4, como se usa en la presente invención, se refiere a un polipéptido resultante de la modificación, delección o inserción de uno o más aminoácidos y que conserva sustancialmente la actividad de CD4. Los ensayos adecuados para determinar si un polipéptido se puede ver como una variante funcionalmente equivalente de CD4 incluyen el ensayo mostrado en el ejemplo 3 de la presente invención, basado en la capacidad del polipéptido de unirse a una célula que expresa gp120 en su superficie. El ensayo se puede llevar a cabo poniendo en contacto una célula que expresa gp120 con una proteína de fusión que comprende un fragmento Fc de anticuerpo y la variante supuesta. Se puede ver un polipéptido como una variante funcionalmente equivalente de CD4 si muestra al menos el 100 %, 95 %, 90 %, 85 %, 80 %, 75 %, 70 %, 65 %, 60 % o menos de la eficacia de unión de la CD4 humana mencionada anteriormente.
- Las variantes funcionalmente equivalentes de CD4 contempladas en el contexto de la presente invención, incluyen polipéptidos que muestran al menos el 60 %, 70 %, 80 %, 85 %, 90 %, 92 %, 94 %, 96 %, 98 %, 99 % de similitud o identidad con las diferentes variantes naturales de CD4 mencionadas anteriormente. El porcentaje de identidad entre dos secuencias indica la proporción de aminoácidos idénticos que comparten las dos secuencias que se comparan, mientras que el porcentaje de similitud indica la proporción de residuos de aminoácidos similares (considerando equivalentes a los residuos de aminoácidos como arginina y lisina, o bien ácido aspártico y ácido glutámico). El porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos se calcula comparando dos secuencias alineadas sobre una región particular, determinando el número de posiciones en las que hay aminoácidos idénticos en ambas secuencias para obtener el número de posiciones coincidentes, dividiendo el número de tales posiciones por el número total de posiciones en el segmento que se compara y multiplicando el resultado por 100. El grado de identidad y similitud entre dos polipéptidos se determina usando algoritmos implementados en ordenador y métodos que conocen ampliamente los expertos en la materia. La identidad y similitud entre dos secuencias de aminoácidos se determina preferentemente usando el algoritmo BLASTP. Véase, Altschul, S. *et al.*, "BLAST Manual" (NCBI NLM NIH Bethesda, MD, EE UU, 2001).
- En otra realización, la variante funcionalmente equivalente de CD4 es un fragmento de CD4 que comprende al menos los dominios N-terminales D1-D2 de CD4. El dominio D1 de CD4 (también conocido como tipo V similar a Ig) comprende los aminoácidos 26-125 de CD4 según la numeración de la CD4 humana (es decir, número de acceso a la base de datos UniProtKB P01730). El dominio D2 de CD4 (también conocido como C2 de tipo 1 similar a Ig) comprende los aminoácidos 126-203 de CD4 según la numeración de CD4 humana. En una realización diferente, se usa un fragmento mayor de CD4 (D1-D4). Véase, Chen W, *et al.*, *J. Virol.* 2011; 85(18):9395-9405. El dominio D2 de CD4 incluye un sitio de restricción NheI. El sitio se localiza en el extremo C-terminal (603-608 pb). En otra realización, se usa en su lugar una variante del fragmento de CD4 que tiene al menos el 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 99 % de similitud al fragmento de CD4, en donde dicha variante se puede unir al sitio de unión a CD de gp120. Preferentemente, el fragmento de CD4 comprende una secuencia de SEQ ID NO: 8.
- En una realización, dicho anticuerpo primario se selecciona del grupo que consiste en IgA (por ejemplo, IgA1 o IgA2), IgD, IgE, IgG (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4), e IgM y preferentemente es IgG, más preferentemente IgG1. Se prefiere que dicho anticuerpo primario sea de una especie diferente que la especie de la que deriva dicha

muestra biológica. Dicho anticuerpo primario puede ser cualquier anticuerpo de vertebrado, preferentemente cualquier anticuerpo mamífero y, más preferentemente, cualquier anticuerpo no humano (por ejemplo, un anticuerpo de conejo, ratón, rata, cabra, caballo, oveja o burro). En una realización, dicho anticuerpo primario es IgG murina, preferentemente IgG1 murina.

5 En otra realización, se usa una variante de la región Fc en su lugar que tiene al menos el 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 99 % de similitud a la región Fc, en donde dicha variante se puede unir al correspondiente anticuerpo secundario de dicha región Fc. Preferentemente, la región Fc tiene la secuencia de SEQ ID NO: 9.

10 En una realización más preferida, dicha proteína de fusión capaz de unirse al sitio de unión a CD4 de gp120 comprende o consiste en los dominios N-terminales D1-D2 de CD4 humana y dicha (ii) región Fc de un anticuerpo primario es la región Fc de IgG1 murina. En una realización más preferida, dicha proteína de fusión tiene la secuencia de aminoácidos según SEQ ID NO: 7 o una variante al menos el 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 99 % idéntica a la misma, en donde preferentemente dicha variante puede unirse a un anticuerpo secundario correspondiente a dicha región Fc. "Anticuerpo secundario correspondiente a dicha región Fc" significa que el fragmento Fab del anticuerpo secundario se une a la región Fc del anticuerpo primario (es decir, es específico para la especie del anticuerpo primario). En otra realización, la proteína de fusión capaz de unirse al sitio de unión a CD4 de gp120 está codificada por el polinucleótido según SEQ ID NO: 10.

20 Dicha proteína de fusión también puede contener un conector que une (i) dicha proteína capaz de unirse al sitio de unión a CD4 de gp120 y (ii) dicha región Fc de un anticuerpo primario. Tal conector puede facilitar la flexibilidad mejorada de la proteína de fusión, y también puede reducir el impedimento estérico entre los dos fragmentos, y permitir interacciones de unión apropiadas. El conector también puede facilitar que se produzca el plegamiento adecuado de cada fragmento. El conector puede ser de origen natural, tal como una secuencia determinada para que exista en ovillo aleatorio entre dos dominios de una proteína. Una secuencia conectora ejemplar es el conector encontrado entre los dominios C-terminal y N-terminal de la subunidad α de la ARN polimerasa. Otros ejemplos de conectores naturales incluyen conectores encontrados en las proteínas λ cl y LexA. De forma alternativa, el conector puede ser de origen sintético. Por ejemplo, puede usarse la secuencia (Gly₄Ser)₃ como un conector no estructurado sintético. Véase, Huston J, *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1988; 85:4879-4887 y Huston J, *et al.*, US 5.091.513.

30 Otra realización ejemplar incluye una secuencia de polialanina (por ejemplo (Ala)₃).

En otra realización, la proteína de fusión es un homodímero unido por disulfuro.

35 En una segunda etapa, el método para determinar anticuerpos neutralizantes de VIH según la invención comprende medir la eficiencia de unión de dicha proteína de fusión al sitio de unión a CD4 de gp120.

Preferentemente, dichos anticuerpos neutralizantes de VIH pueden unirse a la superficie de la célula que comprende el sitio de unión a CD4 de gp120 y reducir la unión de la proteína de fusión de la invención, preferentemente en al menos el 99 %, 95 %, 90 %, 85 %, 80 %, 75 %, 70 %, 60 %, 50 %, 45 %, 40 %, 35 %, 30 %, 25 %, 20 %, o 10 % comparado con un control negativo. Más preferentemente, dichos anticuerpos neutralizantes de VIH son anticuerpos que tienen una afinidad hacia el sitio de unión a CD4 de gp120 que es al menos tan alto como la de CD4.

45 Los estudios de unión apropiados dependen de la naturaleza de las moléculas que participan en la unión, e incluyen, pero no están limitados a, inmunoensayos (por ejemplo, ELISA), ensayos de cribado en filtro, FACS, o ensayos de inmunofluorescencia u otros métodos para cuantificar constantes de unión, teñir cortes de tejido o células y otros métodos inmunohistoquímicos. Tales métodos se conocen bien en la técnica y pueden usarse para medir dicha eficiencia de unión.

50 Preferentemente, dicha medida se realiza mediante citometría de flujo (por ejemplo, FACS). Como se usa en el presente documento, el término "citometría de flujo" se refiere a un ensayo en el que se determina la proporción de un material en una muestra marcando el material (por ejemplo, uniendo un anticuerpo marcado al material), produciendo que una corriente de fluido que contiene el material pase a través de un haz de luz, separando la luz emitida de la muestra en longitudes de onda constituyentes mediante una serie de filtros y espejos, y detectando la luz. La citometría de flujo permite la detección sensible y la cuantificación rápida de algunas características de células únicas, tales como la complejidad del tamaño relativo y la fluorescencia endógena, así como el análisis cualitativo de cualquier compuesto celular que se pueda marcar con un fluorocromo. Véase, Melamed M, *et al.*, "Flow Cytometry and Cell Sorting", 2^a Ed. (Wiley-Liss, Nueva York, NY, EE UU, 1990). Una de las principales ventajas de la citometría de flujo es la cuantificación rápida de analitos en un gran número de partículas o células. En general, los fluorocromos seleccionados para su uso como marcadores detectables se seleccionan basándose en la capacidad del fluorocromo de fluorescer cuando se excita por la luz con la longitud de onda usada por el láser. Cuando el fluorocromo se excita por el haz del láser, emite luz que se evalúa entonces por los tubos fotomultiplicadores del citómetro de flujo. Esta técnica es capaz de analizar 10.000 células/partículas en 1 a 2 minutos. Los citómetros de flujo tienen filtros para detectar la emisión de varios fluorocromos que fluorescen a diferentes longitudes de onda, y permite que se usen cuatro o más fluorocromos diferentes lo que significa que actualmente se pueden detectar al menos 4 moléculas diferentes simultáneamente. Estos métodos y aparatos para analizar células están comercialmente disponibles y se conocen bien en la técnica (por ejemplo, citómetro de flujo

FACSCalibur; BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, EE UU).

En una realización, dicha medida comprende la detección de la proteína de fusión unida a dicha célula usando un indicador capaz de unirse a dicha proteína de fusión, preferentemente a la región Fc de dicha proteína de fusión.

En una realización preferida, dicha medida comprende analizar dicha célula, preferentemente por citometría de flujo, usando un indicador capaz de unirse a dicha proteína de fusión, preferentemente a la región Fc de dicha proteína de fusión. Dicho indicador preferentemente comprende un grupo detectable y, más preferentemente, es un anticuerpo secundario específico de Fc acoplado a un grupo detectable.

Los grupos detectables útiles incluyen fluoróforos. Por "fluoróforo" (o "fluorocromo" o "cromóforo") es un compuesto fluorescente que puede reemitir luz tras excitación lumínica. Los fluoróforos que pueden usarse incluyen fluoróforos biológicos (por ejemplo, proteínas) y químicos. Los fluoróforos biológicos ejemplares comprenden T-zafiro, Cerulean, mCFPm, CyPet, EGFP, PA-EGFP, Emerald, EYFP, Venus, mCitrine, mKO, mOrange, DSRed, JRed, mStrawberry, mCherry, PA-mCherry, mRuby, Tomato, mPlum, mKate, mKatushka, Kaede, Halotag y flúor superclíptico. Los fluoróforos químicos ejemplares comprenden Alexafluor, rodamina, BODIPY, tetrametilrodamina, colorantes de cianina, fluoresceína, puntos cuánticos, colorantes IR, colorantes FM, colorante ATTO. También se puede marcar un anticuerpo secundario con enzimas que son útiles para la detección, tal como, por ejemplo, peroxidasa de rábano, β -galactosidasa, luciferasa, fosfatasa alcalina o glucosa oxidasa. Cuando se marca un anticuerpo con una enzima detectable, se puede detectar añadiendo reactivos adicionales que la enzima usa para producir un producto de reacción que se pueda percibir. Por ejemplo, cuando está presente el agente peroxidasa de rábano, la adición de peróxido de hidrógeno y diaminobencidina da lugar a un producto de reacción coloreado, que es visualmente detectable. Un anticuerpo también se puede marcar con biotina, y detectar mediante la medida indirecta de la unión de avidina o estreptavidina. Nótese que la avidina misma se puede marcar con una enzima o un marcador fluorescente.

Preferentemente, dicho anticuerpo secundario específico de Fc es específico para la especie de la que deriva dicho anticuerpo primario. En una realización, dicho anticuerpo secundario específico de Fc se selecciona del grupo que consiste en IgA (por ejemplo, IgA1, IgA2), IgD, IgE, IgG (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4) e IgM. Preferentemente, el anticuerpo secundario es IgG. Dicho anticuerpo secundario específico de Fc puede ser cualquier anticuerpo de vertebrado, preferentemente cualquier anticuerpo de mamífero, y más preferentemente cualquier anticuerpo no humano (por ejemplo, un anticuerpo de conejo, ratón, rata, cabra, caballo, oveja o burro).

En otra realización del método del primer aspecto, la etapa (i) está precedida por una o más etapas de lavado que retiran la proteína de fusión sin unir. Las etapas de lavado pueden llevarse a cabo de una forma cualquiera apropiada dependiendo de la célula y de la naturaleza de las moléculas utilizadas para el estudio del sitio de unión a CD4 de gp120. La célula puede lavarse con cualquier medio adecuado, por ejemplo, un medio de cultivo celular o un tampón tal como PBS. El medio puede contener un detergente tal como Tween20. Puede lavarse cualquier tiempo adecuado, por ejemplo, de 1 a 30 minutos o de 3 a 10 minutos para cada lavado. El lavado puede incluir la agitación o balanceo suave del soporte de dicha célula. La temperatura de lavado es tal que la célula pueda sobrevivir y no se altere la unión. Por ejemplo, puede estar entre 20 y 45 °C o entre 30 y 40 °C. Típicamente, es aproximadamente 37 °C o temperatura ambiente. Los protocolos para el lavado de la proteína de fusión se conocen bien en la técnica.

Una vez se determina la eficacia de unión de la proteína de fusión a la célula que comprende el sitio de unión a CD4 de gp120 en su superficie, el método de la invención comprende determinar los anticuerpos neutralizantes de VIH en la muestra si dicha unión se inhibe en presencia de la muestra.

Una inhibición de la unión se refiere a una unión que es al menos el 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o 100 % con respecto a la unión en presencia de una muestra control.

En una realización preferida, se determina una inhibición de la unión evaluando la eficacia de unión en la muestra en presencia de la proteína de fusión mencionada anteriormente y en una reacción paralela en ausencia de la proteína de fusión y en ausencia de cualquier compuesto capaz de unirse al sitio de unión a CD4 de gp120. En esta situación, se determina que la muestra contiene Ac neutralizantes si la unión de la proteína de fusión a la célula es menor cuando se compara a la unión de la proteína de fusión a la célula en presencia de una muestra que no contiene ningún otro compuesto capaz de unirse al sitio de unión a CD4 de gp120. Las muestras adecuadas que pueden usarse para llevar a cabo el método de la invención incluyen muestras de la misma naturaleza que la muestra en estudio y que se sabe que no contienen ningún Ac neutralizante. En una realización, cuando la muestra que se analiza es una muestra de un paciente, la muestra control puede ser una muestra de la misma naturaleza de un paciente que no tiene antecedentes conocidos de infección por VIH o que ha sido infectado con VIH pero no ha desarrollado Ac neutralizante. En otra realización, cuando la muestra que se analiza es el sobrenadante de un cultivo tisular, la muestra control puede ser un sobrenadante de cultivo de células que se sabe que no producen ningún Ac neutralizante o de células que expresan Ac que no tienen afinidad hacia gp120.

El método del primer aspecto puede usarse para determinar la presencia o ausencia de un anticuerpo neutralizante de VIH en una muestra. Para este fin, se toma un valor como referencia. La frase "valor de referencia" es un valor

umbral usado para determinar si están presentes o no anticuerpos neutralizantes. Si la cantidad de anticuerpos neutralizantes determinada en una muestra supera la cantidad de referencia, los anticuerpos neutralizantes están presentes; si la cantidad de anticuerpos neutralizantes determinada en una muestra es igual o menor que el valor de referencia, los anticuerpos neutralizantes están ausentes. Asimismo, si la unión de la proteína de fusión a la célula supera la cantidad de referencia, los anticuerpos neutralizantes están ausentes; si la unión de la proteína de fusión a la célula es igual o menor que la cantidad de referencia, los anticuerpos neutralizantes están presentes. El valor de referencia se puede establecer, por ejemplo, cuantificando la cantidad de anticuerpos neutralizantes en un conjunto representativo de muestras de sujetos que no están infectados ni inmunizados contra VIH y analizando estadísticamente los resultados obtenidos para determinar la cantidad de referencia. Se debe entender que la cantidad de referencia puede ser, preferentemente, cero o por debajo del límite detectable del ensayo usado para determinar la actividad del gen indicador. Por tanto, la cantidad de referencia se puede obtener, preferentemente, de una célula como se ha definido anteriormente que se ha puesto en contacto con una muestra que se sabe no comprende anticuerpos neutralizantes.

El método del primer aspecto puede usarse para determinar la presencia de un anticuerpo neutralizante de VIH, pero también para cuantificar un anticuerpo neutralizante de VIH. Según esto, la invención también se refiere al método del primer aspecto, en donde dicha determinación es una determinación cuantitativa. El término "determinación cuantitativa" comprende una determinación semicuantitativa (es decir, una aproximación de la cantidad). En ella, se prefiere que en el método del primer aspecto, dicho al menos un control sea un control positivo. Preferentemente, se usan al menos 2, 3, 5, 10, 15 o 20 controles positivos, cada uno comprende una cantidad única del compuesto que se une al sitio de unión a CD4 de gp120. En otras palabras, se usa un control positivo como un patrón en concentraciones diferentes del compuesto que se une al sitio de unión a CD4 de gp120. Los valores de la eficacia de unión obtenidos pueden usarse para dibujar una curva patrón que puede usarse luego para derivar la cantidad del anticuerpo neutralizante de VIH que se va a determinar cuantitativamente.

Preferentemente, determinar la presencia de anticuerpos neutralizantes a que se hace referencia en esta invención se refiere a determinar la presencia de dichos anticuerpos o a medir su cantidad o concentración, preferentemente de forma semicuantitativa o cuantitativa. Lo más preferentemente, la cantidad se mide como un título (es decir, la dilución máxima de una muestra que aún afecta un grado predeterminado de eficacia de unión). Preferentemente, la determinación incluye una etapa de normalización para la cuantificación de los anticuerpos neutralizantes. La normalización, y por tanto la cuantificación preferentemente, se alcanza añadiendo una cantidad predefinida de anticuerpos neutralizantes caracterizados a una mezcla de reacción. Preferentemente, dichos anticuerpos neutralizantes caracterizados son anticuerpos donde la cantidad requerida para lograr un cierto nivel de neutralización se ha predeterminado. El principio de la normalización es determinar la cantidad o dilución de la muestra requerida para alcanzar el mismo nivel de neutralización (por ejemplo, el 50 % de inhibición de la unión comparado con la inhibición por una cantidad predefinida de anticuerpos neutralizantes caracterizados). Para la cuantificación, se puede comparar la neutralización con una curva patrón usando anticuerpos neutralizantes caracterizados o a otro material de referencia adecuado según protocolos bien conocidos en la técnica. El método cuantitativo puede incluir los estudios de unión anteriormente mencionados, tales como, por ejemplo, inmunoensayos (por ejemplo, ELISA), ensayos de cribado en filtro, FACS o ensayos de inmunofluorescencia, u otros métodos para cuantificar constantes de unión, tinción de cortes de tejido o células y otros métodos inmunohistoquímicos.

3. *Proteína de fusión y ácido nucleico de la invención*

En otro aspecto, la presente invención se refiere a una proteína de fusión que comprende (i) una proteína capaz de unirse al sitio de unión a CD4 de gp120 y (ii) una región Fc de un anticuerpo primario.

En una realización preferida, la proteína capaz de unirse al sitio de unión a CD4 de gp120 es CD4 o una variante funcionalmente equivalente de la misma. En una realización más preferida, la variante funcionalmente equivalente de CD4 es un fragmento de CD4 que comprende al menos los dominios N-terminales D1-D2 de CD4.

En otra realización, la región Fc deriva de un anticuerpo primario seleccionado del grupo que consiste en IgA (por ejemplo, IgA1 o IgA2), IgD, IgE, IgG (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4), e IgM. Preferentemente, el anticuerpo es IgG. Más preferentemente, es IgG1. Dicho anticuerpo primario puede ser cualquier anticuerpo de vertebrado, preferentemente cualquier anticuerpo mamífero y más preferentemente, cualquier anticuerpo no humano (por ejemplo, un anticuerpo de conejo, ratón, rata, cabra, caballo, oveja o burro). En una realización, dicho anticuerpo primario es IgG murina, preferentemente IgG1 murina.

Dicha proteína de fusión también puede contener un conector que une (i) dicha proteína capaz de unirse al sitio de unión a CD4 de gp120 y (ii) dicha región Fc de un anticuerpo primario. Tal conector puede facilitar la flexibilidad mejorada de la proteína de fusión, y también puede reducir el impedimento estérico entre los dos fragmentos, y permitir interacciones de unión apropiadas. El conector también puede facilitar que se produzca el plegamiento adecuado de cada fragmento. El conector puede ser de origen natural, tal como una secuencia determinada para que exista en ovillo aleatorio entre dos dominios de una proteína. Una secuencia conectora ejemplar es el conector encontrado entre los dominios C-terminal y N-terminal de la subunidad α de la ARN polimerasa. Otros ejemplos de

conectores de origen natural incluyen conectores encontrados en las proteínas λ cl y LexA. De forma alternativa, el conector puede ser de origen sintético. Por ejemplo, puede usarse la secuencia $(\text{Gly}_4\text{Ser})_3$ como un conector no estructurado sintético. Véase, Huston, 1988, anteriormente. Otra realización ejemplar incluye una secuencia de polialanina (por ejemplo $(\text{Ala})_3$).

5 En otro aspecto, la invención se refiere a un ácido nucleico que codifica la proteína de fusión del segundo aspecto y a una casete de expresión, o un vector que comprende dicho ácido nucleico.

10 Preferentemente, dicho ácido nucleico es un polinucleótido, refiriéndose a polímeros monocatenarios o bicatenarios de monómeros nucleótidos (ácidos nucleicos), incluyendo, pero no limitados a, 2'-desoxirribonucleótidos (ADN) y ribonucleótidos (ARN) unidos por enlaces fosfodiéster internucleotídicos.

15 De forma alternativa, los polinucleótidos que codifican una variante funcionalmente equivalente de CD4 incluyen polinucleótidos capaces de codificar una variante de los polipéptidos con actividad CD4, como se han definido anteriormente por sus secuencias específicas. Dichos polinucleótidos resultan de polinucleótidos previamente definidos mediante inserción, delección o sustitución de uno o varios nucleótidos con respecto a las secuencias anteriormente mencionadas. Preferentemente, los polinucleótidos que codifican variantes funcionalmente equivalentes de CD4 son polinucleótidos cuyas secuencias les permiten hibridar en condiciones muy restrictivas con los polinucleótidos anteriormente mencionados. Las condiciones típicas de la hibridación muy restrictiva incluyen incubación en SSC 6X (SSC 1X: NaCl 0,15 M, citrato de sodio 0,015 M) y formamida al 40 % a 42 °C durante 14 horas, seguido por uno o varios ciclos de lavado usando SSC 0,5X, SDS al 0,1 % a 60 °C. Alternativamente, las condiciones muy restrictivas incluyen las que comprenden una hibridación a una temperatura de aproximadamente 50-55 °C en SSC 6X y un lavado final a una temperatura de 68 °C en SSC de 1-3X. Las condiciones restrictivas moderadas comprenden la hibridación a una temperatura de aproximadamente 50 °C hasta aproximadamente 65 °C en NaCl 0,2 o 0,3 M, seguido por lavado a aproximadamente 50 °C hasta aproximadamente 55 °C en SSC 0,2X, SDS (dodecilsulfato de sodio) al 0,1 %. En una realización adicional, dicho ácido nucleico tiene codones optimizados.

20 En otra realización, se usa en su lugar una variante del ácido nucleico que tiene al menos el 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 99 % de similitud al ácido nucleico, en la que dicha variante codifica la proteína de fusión de la invención.

30 El ácido nucleico del segundo aspecto puede requerir que se corte con enzimas de restricción para ligarse en un vector (es decir, se pueden eliminar algunos nucleótidos terminales, por ejemplo, 1, 2 o 3). Como tal, en una realización, la invención se refiere a dicho ácido nucleico, en donde se ha cortado en cada extremo con una enzima de restricción.

35 En otra realización, la presente invención se refiere a un casete de expresión que comprende el ácido nucleico del segundo aspecto, una secuencia promotora y una 3'-UTR y opcionalmente un marcador de selección. En aún otra realización, la presente invención se refiere a un vector de expresión que comprende el ácido nucleico o el casete de expresión del segundo aspecto. Los vectores adecuados según la presente invención incluyen vectores de expresión procariotas, tales como los plásmidos pUC18, pUC19, Bluescript y sus derivados, como los plásmidos mp18, mp19, pBR322, pMB9, ColEI, pCR1, RP4; fagos y vectores lanzadera tales como, los vectores pSA3 y pAT28; vectores de expresión en levaduras, tales como vectores del tipo de plásmidos de 2 micras; plásmidos de integración; vectores YEP; plásmidos centroméricos y análogos; vectores de expresión en células de insecto, tales como vectores de la serie pAC y la serie pVL; vectores de expresión en plantas, tales como vectores de la serie pIB1, pEarleyGate, pAVA, pCAMBIA, pGSA, pGWB, pMDC, pMY, pORE y análogos; y vectores de expresión en células eucariotas superiores, basados en vectores virales (por ejemplo adenovirus, virus asociados a adenovirus, retrovirus y lentivirus), así como vectores no virales, tales como los vectores pSilencer 4.1-CMV (Ambion®, Life Technologies Corp., Carlsbad, CA, EE UU), pcDNA3, pcDNA3.1/hyg pHCMV/Zeo, pCR3.1, pEF1/His, pIND/GS, pRc/HCMV2, pSV40/Zeo2, pTRACER-HCMV, pUB6/V5-His, pVAX1, pZeoSV2, pCI, pSVL y pKSV-10, pBPV-1, pML2d y pTDTI. En una realización, el vector es un vector de expresión.

40 En otra realización, la presente invención se refiere a una célula transgénica que comprende el ácido nucleico, la casete de expresión o el vector de expresión del segundo aspecto. Las células transgénicas que van a usarse pueden ser de cualquier tipo celular, incluyendo tanto células eucariotas como células procariotas. Preferentemente, las células incluyen células procariotas, células de levadura o células de mamífero.

4. Kits

60 En otro aspecto, se divulga en el presente documento un kit que comprende la (i) proteína de fusión del segundo aspecto, el ácido nucleico, el vector o la célula transgénica del tercer aspecto y (ii) un indicador capaz de unirse a dicha proteína de fusión. En una realización, dicho kit puede comprender además una célula que comprende el sitio de unión a CD4 de gp120 en su superficie. Dicha célula es una célula como se ha definido en el método del primer aspecto.

65

5. Método para la identificación de linfocitos B que expresan anticuerpos neutralizantes de VIH

El ensayo de la presente invención también puede usarse para detectar células productoras de anticuerpos que pueden expresar anticuerpos neutralizantes aplicando el ensayo a un sobrenadante de un cultivo de las células que expresan anticuerpos. Por tanto, en otro aspecto, la invención se refiere a un método *in vitro* para la identificación de células productoras de anticuerpos que expresan anticuerpos neutralizantes de VIH, que comprende:

- (i) poner en contacto una célula que comprende el sitio de unión a CD4 de gp120 en su superficie con un sobrenadante de un cultivo celular de dichas células productoras de anticuerpos con una proteína de fusión que comprende (i) una proteína capaz de unirse al sitio de unión a CD4 de gp120 y (ii) una región Fc de un anticuerpo primario, y
- (ii) medir la eficacia de unión de dicha proteína de fusión al sitio de unión a CD4 de gp120

en el que las células productoras de anticuerpos se determina que expresan anticuerpos neutralizantes de VIH si dicha eficiencia de unión es diferente de la de al menos un control.

En una primera etapa, una célula que comprende el sitio de unión a CD4 de gp120 en su superficie se pone en contacto con un sobrenadante de un cultivo de dichas células productoras de anticuerpos y con una proteína de fusión que comprende (i) una proteína capaz de unirse al sitio de unión a CD4 de gp120 y (ii) una región Fc de un anticuerpo primario. Las condiciones para la etapa de poner en contacto son esencialmente como se han descrito anteriormente para poner en contacto una muestra. En una realización preferida, las células productoras de anticuerpos son linfocitos B, que habitualmente no son inmortales. En otra realización, las células productoras de anticuerpos son células de hibridoma, que habitualmente son inmortales.

En una realización preferida, la proteína capaz de unirse al sitio de unión a CD4 de gp120 se selecciona de CD4 o una variante funcionalmente equivalente de la misma. En una realización aún más preferida, el equivalente funcional de CD4 es un fragmento de CD4 que comprende al menos los dominios N-terminales D1-D2 de CD4. En una realización, CD4 preferentemente deriva de un animal, en particular un vertebrado, tal como un ser humano, un primate no humano (por ejemplo, chimpancés y otras especies simios y monos), animales de granja (aves, peces, vacas, ovejas, cerdos, cabras y caballos), mamíferos domésticos (por ejemplo, perros y gatos), animales de laboratorio (por ejemplo, roedores, tales como ratones, ratas y cobayas). En otra realización, la región Fc de un anticuerpo primario es la región Fc de IgG1 murina.

El orden en que los diferentes componentes del ensayo se ponen en contacto no es particularmente limitante. Por tanto, en una realización, las células que expresan el sitio de unión a CD4 de gp120 en su superficie se ponen en contacto primero con la proteína de fusión y después con el sobrenadante del cultivo. En otra realización, las células que expresan el sitio de unión a CD4 de gp120 en su superficie se ponen en contacto primero con el sobrenadante del cultivo y después con la proteína de fusión. En aún otra realización, la proteína de fusión y el sobrenadante del cultivo se mezclan y la mezcla se añade entonces a las células que expresan el sitio de unión a CD4 de gp120 en su superficie. En otra realización, la proteína de fusión, el sobrenadante del cultivo y las células que expresan el sitio de unión a CD4 de gp120 en su superficie se ponen en contacto al mismo tiempo.

En una segunda etapa, se determina la eficiencia de unión de la proteína de fusión al sitio de unión a CD4 de gp120 en la célula. Los métodos adecuados para determinar la unión de la proteína de fusión a la célula que expresa gp120 se han descrito en detalle anteriormente en el contexto del método para determinar los anticuerpos neutralizantes de VIH en una muestra. En una realización, dicha medida comprende la detección de proteína de fusión unida a dicha célula usando un indicador capaz de unirse a dicha proteína de fusión, preferentemente a la región Fc de dicha proteína de fusión. En una realización preferida, dicha medida comprende analizar dicha célula, preferentemente por citometría de flujo, usando un indicador capaz de unirse a dicha proteína de fusión, preferentemente a la región Fc de dicha proteína de fusión. Dicho indicador preferentemente comprende un grupo detectable y, más preferentemente, es un anticuerpo secundario específico para Fc acoplado a un resto detectable

Una vez se determina la eficacia de unión de la proteína de fusión a la célula que comprende el sitio de unión a CD4 de gp120 en su superficie, el método de la invención comprende determinar la célula productora de anticuerpos como productora de anticuerpos neutralizantes de VIH si dicha unión se inhibe en presencia de la muestra. Una inhibición de la unión se refiere a una unión que es al menos el 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o 100 % con respecto a la unión en presencia de una muestra control.

Si las células productoras de anticuerpos son una población no homogénea, las células se pueden clonar y seleccionar adicionalmente basándose en la producción de anticuerpos neutralizantes para obtener una población celular homogénea. Los clones se pueden subclonar por procedimientos de dilución limitante y cultivar por métodos convencionales. Véase, Goding J, "Monoclonal Antibodies: Principles and Practice", 3ª Ed. (Academic Press, Waltham, MA, EE UU, 1996). Los medios de cultivo adecuados para este fin incluyen, por ejemplo, medio D-MEM o RPMI-1640. Si las células productoras de anticuerpos son células de hibridoma, las células se pueden cultivar *in vivo* como células tumorales de ascitis en un animal.

6. Métodos para obtener anticuerpos neutralizantes

En otro aspecto, la invención se refiere a un método para producir anticuerpos neutralizantes de VIH, que comprende:

- a) cultivar un hibridoma que comprende un linfocito B aislada según el método para el aislamiento de linfocitos B que expresan anticuerpos neutralizantes y
- b) aislar los anticuerpos neutralizantes de VIH expresados por dicho hibridoma.

Las células productoras de anticuerpos que expresan anticuerpos neutralizantes, una vez seleccionadas según los métodos definidos anteriormente, se siembran y hacen crecer en un medio de cultivo adecuado que preferentemente contiene una o más sustancias que inhiben el crecimiento o supervivencia de las células de mieloma parentales sin fusionar. Por ejemplo, si las células de mieloma parentales carecen de la enzima hipoxantina guanina fosforibosil transferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo para los hibridomas típicamente incluirá hipoxantina, aminopterina y timidina (medio HAT), sustancias que previenen el crecimiento de las células deficientes en HGPRT.

Los anticuerpos se pueden aislar de las células o se pueden obtener por medios recombinantes expresando las regiones relevantes de los genes de la inmunoglobulina de las células que son responsables para la especificidad al antígeno en células adecuadas.

Los anticuerpos se pueden purificar del sobrenadante del cultivo de las células productoras de anticuerpos por métodos conocidos en la técnica tales como intercambio anión/catión, exclusión molecular/filtración en gel, precipitaciones y el uso de ligandos de afinidad específicos. Los ligandos de afinidad comúnmente usados son proteína A y proteína G derivadas de bacterias, anticuerpos monoclonales y anticuerpos camélidos o fragmentos de unión derivados de los mismos que unen una o más de las cuatro subclases de IgG humanas o humanizadas.

En el caso de que los anticuerpos se produzcan por medios recombinantes, se aíslan los polinucleótidos que codifican las regiones relevantes de la molécula de inmunoglobulina. Una fuente para ácidos nucleicos de anticuerpos es un hibridoma producido obteniendo un linfocito B de un animal inmunizado con el antígeno de interés y fusionándola con una célula inmortal. De forma alternativa, se pueden aislar ácidos nucleicos de los linfocitos B (o bazo entero) del animal inmunizado. Aún otra fuente de ácidos nucleicos que codifican anticuerpos es una genoteca de tales ácidos nucleicos generada, por ejemplo, mediante tecnología de presentación en fagos. Se pueden identificar los polinucleótidos que codifican los péptidos de interés (por ejemplo, péptidos de las regiones variables con las características de unión deseadas) por métodos convencional conocidos en la técnica (por ejemplo, adsorción).

Se pueden determinar las secuencias de aminoácidos relevantes de una inmunoglobulina o polipéptido de interés mediante secuenciación directa de la proteína, y se pueden diseñar secuencias de nucleótidos codificantes adecuadas según un cuadro de codones universal. Alternativamente, se puede aislar y secuenciar el ADN genómico o ADNc que codifica los anticuerpos monoclonales de células que producen tales anticuerpos usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas oligonucleotídicas que son capaces de unirse específicamente a genes que codifican las cadenas pesada y ligera de los anticuerpos monoclonales). Véase, Brown T, "Gene Cloning" (Chapman & Hall, London, GB, 1995); Watson R, *et al.*, "Recombinant DNA", 2ª Ed. (Scientific American Books, Nueva York, NY, US, 1992); Alberts B, *et al.*, "Molecular Biology of the Cell" (Garland Publishing Inc., Nueva York, NY, US, 2008); Innis M, *et al.*, Eds., "PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications" (Academic Press Inc., San Diego, CA, US, 1990); Erlich H, Ed., "PCR Technology. Principles and Applications for DNA Amplification" (Stockton Press, Nueva York, NY, US, 1989); Sambrook J, *et al.*, "Molecular Cloning. A Laboratory Manual" (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, US, 1989); Bishop T, *et al.*, "Nucleic Acid and Protein Sequence. A Practical Approach" (IRL Press, Oxford, GB, 1987); Reznikoff W, Ed., "Maximizing Gene Expression" (Butterworths Publishers, Stoneham, MA, US, 1987); Davis L, *et al.*, "Basic Methods in Molecular Biology" (Elsevier Science Publishing Co., Nueva York, NY, US, 1986); Schleef M, Ed., "Plasmid for Therapy and Vaccination" (Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, DE, 2001).

Se puede determinar la secuencia que codifica una región variable entera del polipéptido inmunoglobulina; sin embargo, algunas veces será adecuado secuenciar solo una parte de una región variable, por ejemplo la parte codificante de CDR. La secuenciación se lleva a cabo usando técnicas convencionales. Véase, Sambrook, 1989, anteriormente y Sanger F, *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1977; 74:5463-5467. Comparando la secuencia del ácido nucleico clonado con secuencias publicadas de genes y ADNc de inmunoglobulinas humanas, el experto en la materia podrá determinar fácilmente, dependiendo de la región secuenciada, (i) el uso del segmento de la línea germinal del polipéptido de inmunoglobulina del hibridoma (incluyendo el isotipo de la cadena pesada) y (ii) la secuencia de las regiones variables de la cadena pesada y ligera, incluyendo las secuencias resultantes de la adición en la región N y el proceso de maduración somática. Una fuente de información de secuencias de genes de inmunoglobulinas es el Centro Nacional para Información de Biotecnología, Biblioteca Nacional de Medicina, Institutos Nacionales de Salud, Bethesda, MD, EE UU.

7. Métodos terapéuticos

En otro aspecto, se divulga en el presente documento un método para el tratamiento o prevención de VIH o SIDA en un sujeto en necesidad del mismo que comprende la administración a dicho sujeto de los anticuerpos neutralizantes aislados con el método del quinto aspecto de la invención.

Los efectos preventivos o de tratamiento beneficiosos de los anticuerpos neutralizantes de VIH respecto a la infección por VIH o síntomas del SIDA incluyen, por ejemplo, prevenir o retrasar la infección inicial de un individuo expuesto a VIH; reducir la carga vírica en un individuo infectado con VIH; prolongar la fase asintomática de infección por VIH; mantener cargas víricas bajas en pacientes infectados con VIH cuyos niveles de virus se han bajado a través de terapia antirretrovírica (TAR); aumentar los niveles de linfocitos T CD4 o reducir el descenso en linfocitos T CD4, tanto específicas como no específicas para VIH-1, en pacientes sin tratamiento previo con fármacos y en pacientes tratados con ART, aumentar en conjunto la salud o calidad de vida de un individuo con SIDA; y prolongar la esperanza de vida de un individuo con SIDA. Un médico puede comparar el efecto de inmunización con el estado del paciente antes del tratamiento, o con el estado esperado de un paciente sin tratar, para determinar si el tratamiento es eficaz en inhibir el SIDA. En una realización preferida, las composiciones inmunogénicas de la invención son composiciones preventivas.

Los anticuerpos neutralizantes de la invención pueden ser útiles para la terapia de una infección por VIH-1. Mientras que todos los animales que puedan estar afectados con VIH-1 o sus equivalentes se pueden tratar de esta manera (por ejemplo, chimpancés, macacos, babuinos o seres humanos), las composiciones inmunogénicas de la invención se dirigen particularmente a sus usos terapéuticos en seres humanos. Con frecuencia, se puede requerir más de una administración para producir el efecto terapéutico deseado; el protocolo exacto (dosis y frecuencia) se puede establecer por procedimientos clínicos convencional.

La presente invención se refiere además a prevenir o reducir los síntomas asociados con la infección por VIH. Estos incluyen síntomas asociados con la fase sintomática menor de la infección por VIH, incluyendo, por ejemplo, zóster, erupción cutánea e infección de las uñas, llagas bucales, infección recurrente de nariz y garganta, y pérdida de peso. Además, síntomas adicionales asociados con la fase sintomática principal de la infección por VIH incluyen, por ejemplo candidiasis bucal o vaginal (*Candida*), diarrea persistente, pérdida de peso, tos persistente y tuberculosis reactivada o infecciones recurrentes por herpes, tal como herpes labial (herpes simple). Otros síntomas de SIDA en estado más avanzado que se pueden tratar según la presente invención, incluyen, por ejemplo, diarrea, náusea y vómitos, candidiasis y llagas bucales, infecciones vaginales persistentes, recurrentes y cáncer cervical, linfadenopatía generalizada persistente (PGL), infecciones cutáneas graves, verrugas y tiña, infecciones respiratorias, neumonía, en especial neumonía por *Pneumocystis carinii* (PCP), herpes zóster (o culebrilla), problemas del sistema nervioso, tales como dolores, entumecimiento u "hormigueo" en las manos y los pies, anomalías neurológicas, sarcoma de Kaposi, linfoma, tuberculosis y otras infecciones oportunistas.

En otra realización preferida, el sujeto al que se administran los anticuerpos neutralizantes está en terapia antirretrovírica (TAR), preferentemente terapia antirretrovírica altamente activa (TARGA).

Mientras que la invención anterior se ha descrito en algún detalle para fines de claridad y entendimiento, el experto en la materia apreciará de una lectura de esta divulgación que se pueden hacer varios cambios en forma y detalle sin separarse del verdadero ámbito de la invención y reivindicaciones adjuntas.

Ejemplo 1

Construcción del plásmido pcDNA3.1huCD4mIgG1

Los dominios N-terminales D1-D2 de CD4 humana se amplificaron mediante RT-PCR convencional usando el sistema de RT-PCR SuperScript III One-Step con Platinum Taq ADN Pol (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, EE UU) y los siguientes cebadores:

1) CD4 L sentido (SEQ ID NO: 1):
5'-CACCATGAACCGGGGAGTCCCTTTAG-3'

2) CD4L AS NheI (SEQ ID NO: 2):
5'-TATTAGCTAGCACCGATGTCTATTTTG-3'

El ARN extraído de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) humanas se usó como molde. El plásmido pcDNA3.1huCD4 se generó después de clonar el amplímero CD4 usando el kit pcDNA3.1 Directional V5-His-TOPO y siguiendo las instrucciones del fabricante.

La región Fc que contenía bisagra/CH2/CH3 de una IgG1 murina se amplificó como se ha descrito anteriormente usando los cebadores:

3) MPER-mIgG1-S (SEQ ID NO: 3).
5'-GAATAGAGCTGGTGGGCTAGCTGTGCCAGGGATTGTGGT-3'

5 4) mIgG1-AS (SEQ ID NO: 4):
5'-TTATTCTCGAGTCATTTACCAGGAGAGTGGG-3'

Como molde, se usó ARN extraído de la línea celular murina NS1.

10 El amplímero se purificó, se digirió con las enzimas de restricción FastDigest NheI y FastDigest XhoI (Fermentas International Inc., Glen Burnie, MD, EE UU) y se ligó en pcDNA3.1huCD4 (previamente linealizado con las mismas enzimas de restricción) usando ADN ligasa de T4 (Fermentas International Inc., Glen Burnie, MD, EE UU). Por último, se confirmó la integridad de la construcción de ADN mediante secuenciación usando el kit de secuenciación en ciclo BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystems®, Life Technologies Corp., Carlsbad, CA, EE UU). Véase, SEQ ID NO. 5, SEQ ID NO. 6, SEQ ID NO. 7 y la Figura 1.

15 *Ejemplo 2*
Producción de la proteína recombinante huCD4mIgG1

20 Se transfectaron células HEK 293 con el plásmido pcDNA3.1huCD4mIgG1 usando el kit de transfección Calphos (Clontech®, Takara Bio Inc., Otsu, JP) según las instrucciones del fabricante. Después de 48 horas, se recogió el sobrenadante, se clarificó por filtración a través de filtro de 0,45 µm (EMD Millipore, Merck KGaA, Darmstadt, DE) y se almacenó a -20 °C hasta su uso.

25 *Ejemplo 3*
Titulación del sobrenadante que contiene la proteína recombinante huCD4mIgG1

30 Se incubó la línea celular MOLT crónicamente infectada con NL4.3 con diluciones en serie del sobrenadante que contenía CD4mIgG1 durante 30 minutos a temperatura ambiente. Véase, Blanco J, *et al.*, J. Leukoc. Biol. 2004; 76(4):804-811. Después de lavar con PBS se detectó la CD4mIgG1 unida a gp120 en la superficie celular mediante citometría de flujo usando DyLight 649-F(ab)₂ de cabra anti-IgG de ratón específico (Jackson ImmunoResearch, Inc., West Grove, PA, EE UU). Véase, la Figura 2.

35 *Ejemplo 4*
Identificación de anticuerpos bloqueantes de gp120/CD4 usando un ensayo citométrico competitivo

40 Para determinar si la actividad bloqueante de gp120/CD4 de los anticuerpos se puede determinar por citometría de flujo, se preincubaron células MOLT crónicamente infectadas con NL4.3 a temperatura ambiente durante 25 minutos con diluciones en serie (3 veces) del anticuerpo IgGb12, que reconoce el CD4bs de gp120, empezando a 48 µg/ml. A continuación, se añadió el sobrenadante que contiene huCD4mIgG1 a la concentración CI50 y la incubación se extendió durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después de dos lavados con PBS, se añadió el anticuerpo secundario DyLight 649-F(ab)₂ de cabra anti-IgG de ratón específico de Fc (Jackson ImmunoResearch, Inc., West Grove, PA, EE UU) y se incubó de nuevo durante 15 minutos a temperatura ambiente. Las muestras celulares se lavaron con PBS y se analizaron por citometría de flujo. IgGb12 bloqueó la interacción gp120/CD4 con una cinética cuantificable dependiente de la concentración. Véase la Figura 3.

45 *Ejemplo 5*
Determinación de la especificidad de bloqueo de gp120/CD4

50 Para evaluar la especificidad del ensayo, se usaron anticuerpos que reconocían regiones en la glucoproteína Env diferentes del CD4bs en las mismas condiciones descritas anteriormente. Véase la tabla 1. Solo los anticuerpos que reconocían el sitio de unión a CD4 en gp120 (IgGb12, VRC01 y VRC03) o el sitio de unión a gp120 en CD4 (Leu3a) fueron capaces de bloquear la interacción gp120/CD4, lo que indica que el ensayo descrito es altamente específico. Véase la Figura 4.

55

| |
|--|
| Tabla 1 |
| Descripción de los anticuerpos usados para determinar la especificidad asociada con los anticuerpos bloqueantes de gp120/CD4 |

| Nombre del Ac | Especificidad | Fuente | Descripción |
|----------------|-------------------------------|--------|-------------------------------------|
| IgGb12 (b12) | sitio de unión a CD4 en gp120 | 1 | Ac ampliamente neutralizante humano |
| VRC01 | sitio de unión a CD4 en gp120 | 2 | Ac ampliamente neutralizante humano |
| VRC03 | sitio de unión a CD4 en gp120 | 2 | Ac ampliamente neutralizante humano |
| Leu3a | sitio de unión a gp120 en CD4 | 3 | Ac de ratón |
| IgG2G12 (2G12) | epitopo glicosilado en gp120 | 1 | Ac ampliamente neutralizante humano |

| Nombre del Ac | Especificidad | Fuente | Descripción |
|---------------------|---------------------|--------|---|
| 2F5 | región MPER en gp41 | 1 | Ac ampliamente neutralizante humano |
| 4E10 | región MPER en gp41 | 1 | Ac ampliamente neutralizante humano |
| anti-gp120 de cabra | gp120 | 4 | Ac policlonal de cabra no neutralizante |

¹ Polymun Scientific Immunbiologische Forschung GmbH, Klosterneuburg, AT

² NIH AIDS Research and Reference Reagent Program, Bethesda, MD, EE UU

³ BD Biosciences Corp., Franklin Lakes, NJ, EE UU

⁴ Abcam plc, Cambridge, MA, EE UU

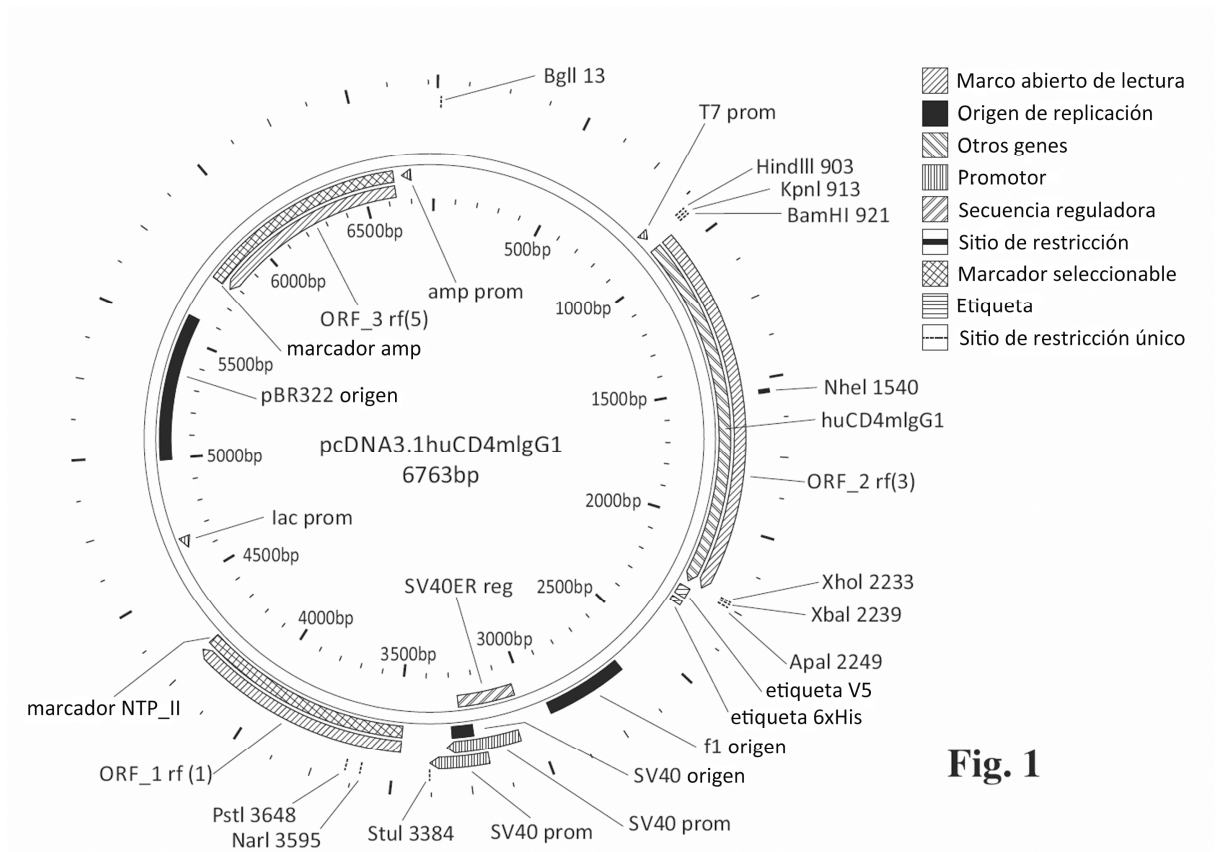
Ejemplo 6

Cuantificación de los anticuerpos bloqueantes de gp120/CD4 en muestras de plasma

- 5 Para identificar y cuantificar los anticuerpos bloqueantes de gp120/CD4 en muestras de plasma y para validar el ensayo, se usaron varias muestras de plasma de pacientes infectados por VIH-1. Estas muestras se habían descrito previamente y analizado su capacidad de neutralización y la presencia de anticuerpos bloqueantes de gp120/CD4 usando un ensayo de célula a célula. Véase, Sánchez-Palomino S, *et al.*, *Vaccine* 2011; 29:5250-5259. Se analizaron un conjunto de cuatro muestras de plasma con anticuerpos ampliamente neutralizantes, que contenían
- 10 Ac bloqueantes de gp120/CD4, y seis plasmas poco neutralizantes, como sigue: se preincubaron células MOLT NL4.3 con diluciones en serie (3 veces, empezando a 1/10) de muestras de plasma durante 25 minutos a temperatura ambiente. Como patrón se usaron diluciones en serie de 3 veces de anticuerpo b12, empezando a 48 µg/ml. Posteriormente, se añadió el sobrenadante de huCD4mIgG1 a concentración de CI50 y el periodo de incubación se extendió durante 30 minutos. Después de lavar, se detectaron las proteínas huCD4mIgG1 unidas a
- 15 gp120 en la superficie de las células con el DyLight 649-F(ab)₂ de cabra anti-IgG de ratón específico de Fc (Jackson ImmunoResearch, Inc., West Grove, PA, EE UU). Por último, las muestras se lavaron con PBS y se analizaron por citometría de flujo y la presencia de anticuerpos bloqueantes de gp120/CD4 se cuantificó como unidades arbitrarias (UA) referidas al anticuerpo b12 usado como patrón. Véase la Figura 5.
- 20 Siguiendo la metodología descrita anteriormente, se probó la presencia de anticuerpos bloqueantes de CD4/gp120 en una cohorte de muestras de plasma de pacientes infectados por VIH-1 sin tratamiento previo con ART e individuos sin infectar que se usaron como control negativo. En este caso, las muestras de plasma se probaron a una dilución 1/5. Los resultados se muestran como porcentaje de inhibición de gp120/CD4. Véase la Figura 6.
- 25 Se obtuvo confirmación adicional del ensayo usando una glucoproteína de envuelta de un aislado de VIH-1 diferente. El mismo conjunto de muestras de plasma probado en la figura 6 se analizó usando células MOLT que expresan la envuelta del aislado Bal de VIH-1. Los resultados se muestran en la figura 7 y confirman la presencia de anticuerpos cuantificables contra el sitio de unión de CD4 en plasma de individuos VIH+. Además, el porcentaje de inhibición de la unión de huCD4mIgG1 tanto a aislados de NL4-3 como BaL obtenidos para muestra de plasma
- 30 mostró una fuerte correlación ($p < 0,0001$, prueba de correlación de Pearson).

REIVINDICACIONES

1. Un método *in vitro* para determinar anticuerpos neutralizantes de VIH en una muestra, que comprende:
 - 5 (i) poner en contacto una célula que comprende el sitio de unión a CD4 de gp120 en su superficie con dicha muestra y con una proteína de fusión que comprende (i) una proteína capaz de unirse al sitio de unión a CD4 de gp120 y (ii) una región Fc de un anticuerpo primario, y
 - (ii) medir la eficacia de unión de dicha proteína de fusión al sitio de unión CD4 de gp120,
- 10 en el que los anticuerpos neutralizantes de VIH se determinan en dicha muestra si dicha unión se inhibe en presencia de la muestra.
2. El método de la reivindicación 1, en el que la proteína capaz de unirse al sitio de unión a CD4 de gp120 es CD4 o una variante funcionalmente equivalente de la misma.
- 15 3. El método de la reivindicación 2, en el que la variante funcionalmente equivalente de CD4 es un fragmento de CD4 que comprende al menos los dominios N-terminales D1-D2 de CD4.
4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicha medida comprende usar un indicador que se une a dicha proteína de fusión.
- 20 5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la etapa (ii) está precedida por al menos una etapa de lavado que retira la proteína de fusión no unida.
- 25 6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 en el que la muestra es una muestra de plasma.
7. Una proteína de fusión que comprende (i) una proteína capaz de unirse al sitio de unión a CD4 de gp120 y (ii) una región Fc de una IgG murina.
- 30 8. La proteína de fusión de la reivindicación 7, en la que la proteína capaz de unirse al sitio de unión a CD4 de gp120 es CD4 o una variante funcionalmente equivalente de la misma.
9. La proteína de fusión de la reivindicación 8, en la que la variante funcionalmente equivalente de CD4 es un fragmento de la misma que comprende al menos los dominios N-terminales D1-D2 de CD4.
- 35 10. La proteína de fusión de la reivindicación 7, en la que la IgG murina es IgG1 murina o una variante funcionalmente equivalente.
11. Un ácido nucleico que codifica la proteína de fusión de una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10, un casete de expresión, un vector o una célula transgénica que comprende dicho ácido nucleico.
- 40 12. Un método *in vitro* para la identificación de una célula productora de anticuerpos que expresa anticuerpos neutralizantes de VIH, que comprende:
 - 45 (i) poner en contacto una célula que comprende el sitio de unión a CD4 de gp120 en su superficie con un sobrenadante de un cultivo de dicha célula productora de anticuerpos y con una proteína de fusión que comprende (i) una proteína capaz de unirse al sitio de unión a CD4 de gp120 y (ii) una región Fc de un anticuerpo primario, y
 - (ii) medir la eficiencia de unión de dicha proteína de fusión al sitio de unión a CD4 de gp120,
- 50 en el que se determina que la célula productora de anticuerpo expresa anticuerpos neutralizantes de VIH si dicha unión se inhibe en presencia de dicho sobrenadante.
13. Un método de acuerdo con la reivindicación 12 en el que las células productoras de anticuerpos son linfocitos B o células de hibridoma.
- 55 14. El método de acuerdo con las reivindicaciones 12 o 13 que comprende además la clonación de la célula que expresa los anticuerpos neutralizantes.
- 60 15. Un método para producir anticuerpos neutralizantes contra VIH, que comprende:
 - (i) cultivar células productoras de anticuerpo aisladas de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14 y
 - (ii) aislar los anticuerpos expresados por dichas células productoras de anticuerpos.



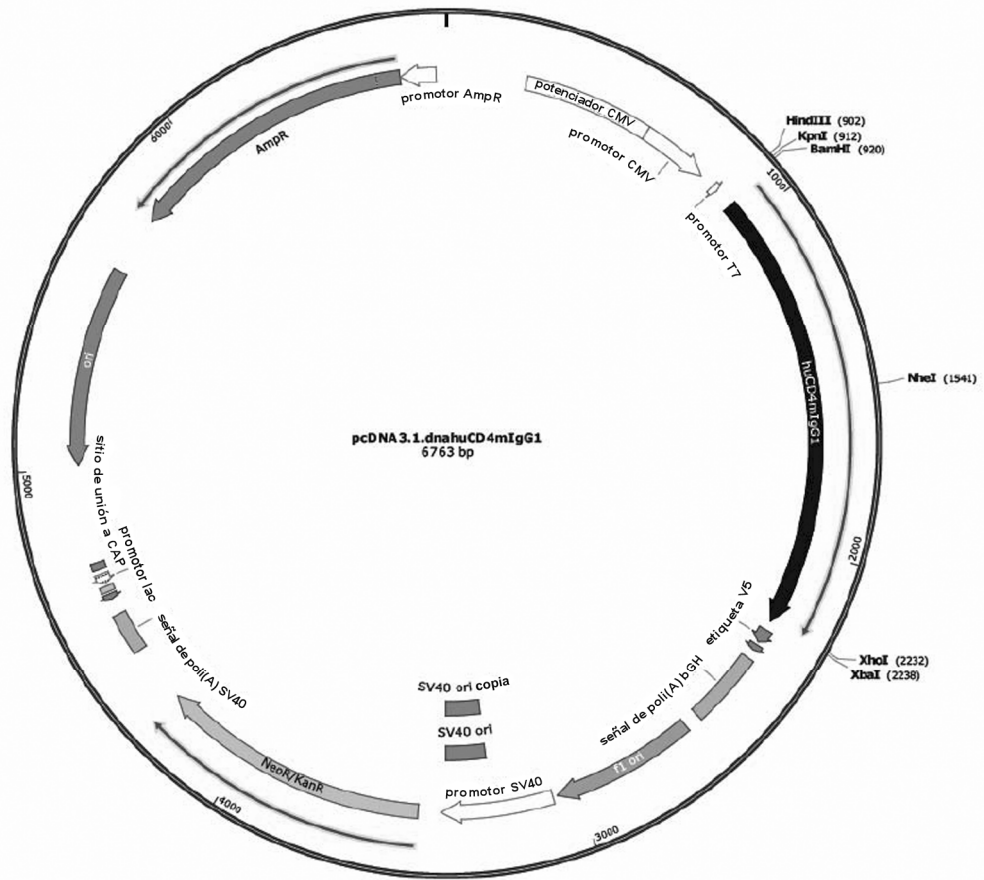


Fig. 1 (cont.)

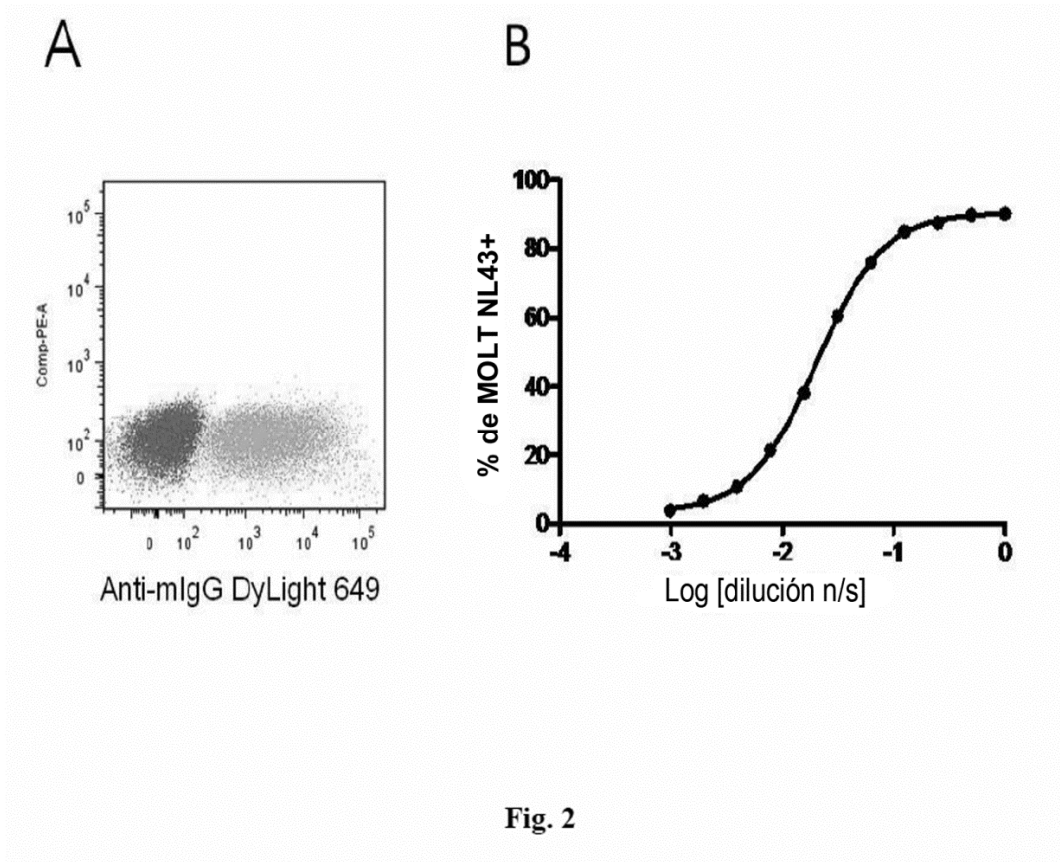
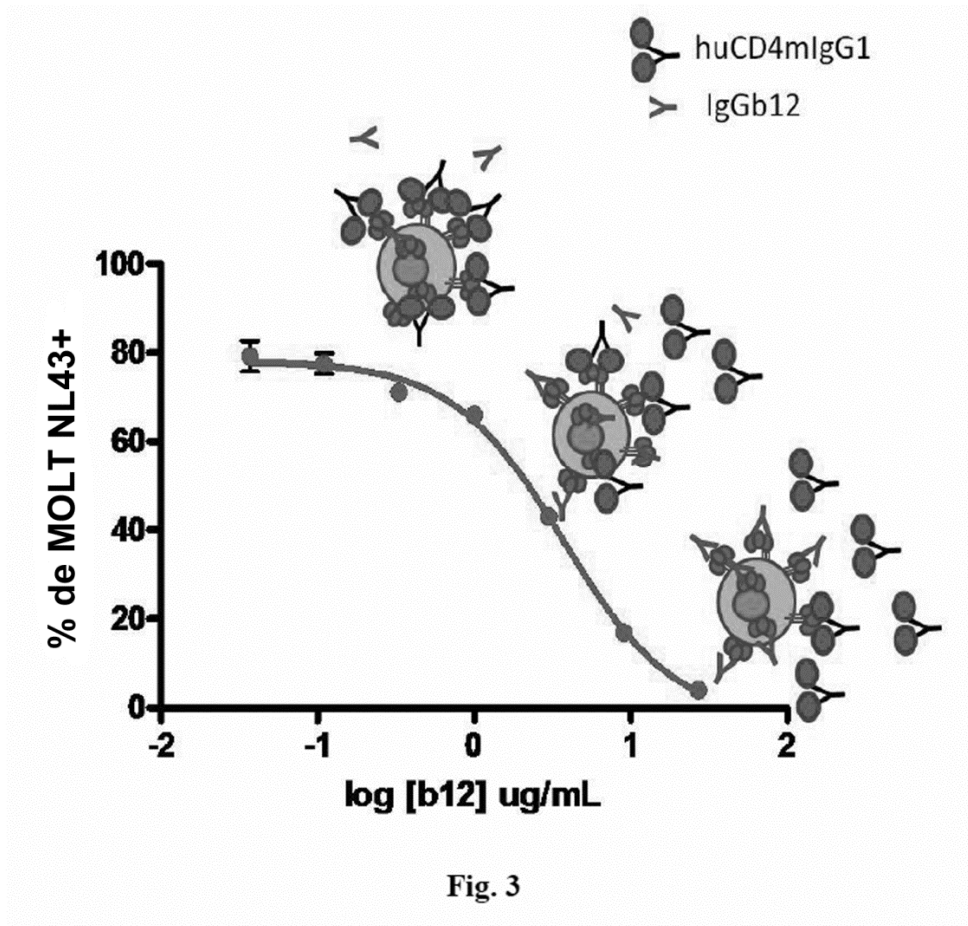


Fig. 2



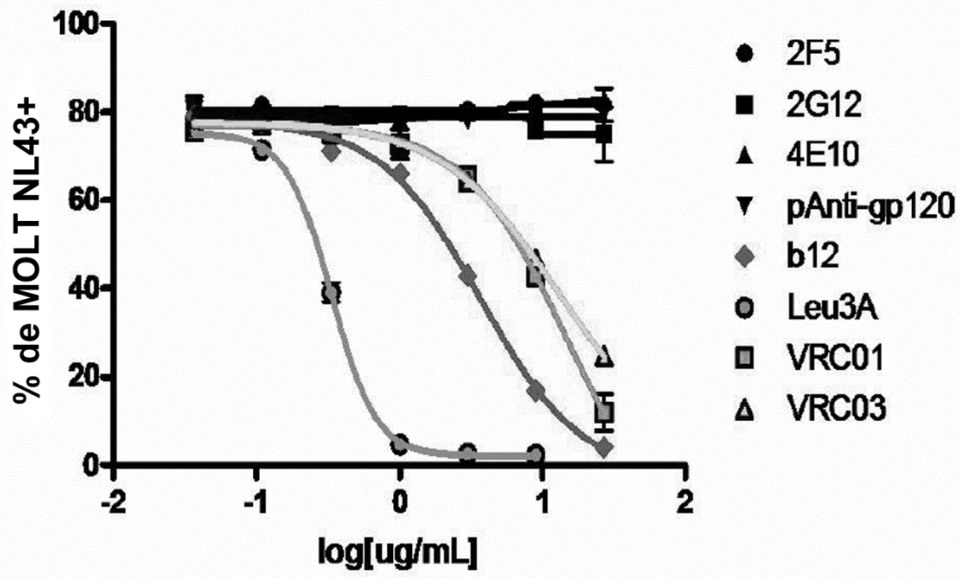
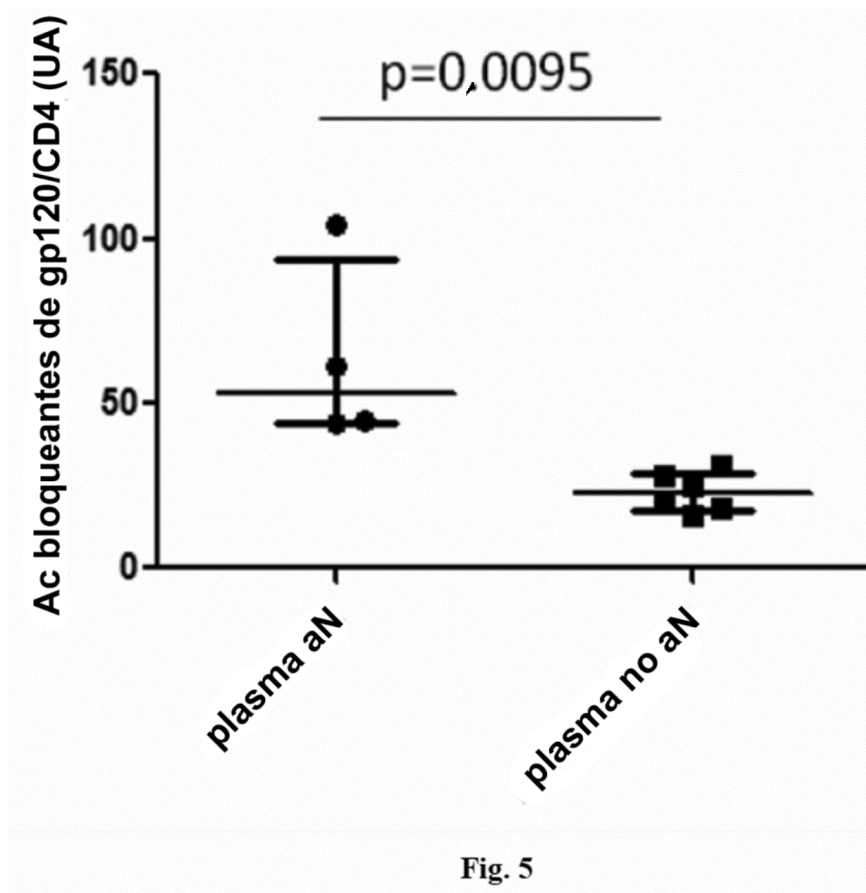


Fig. 4



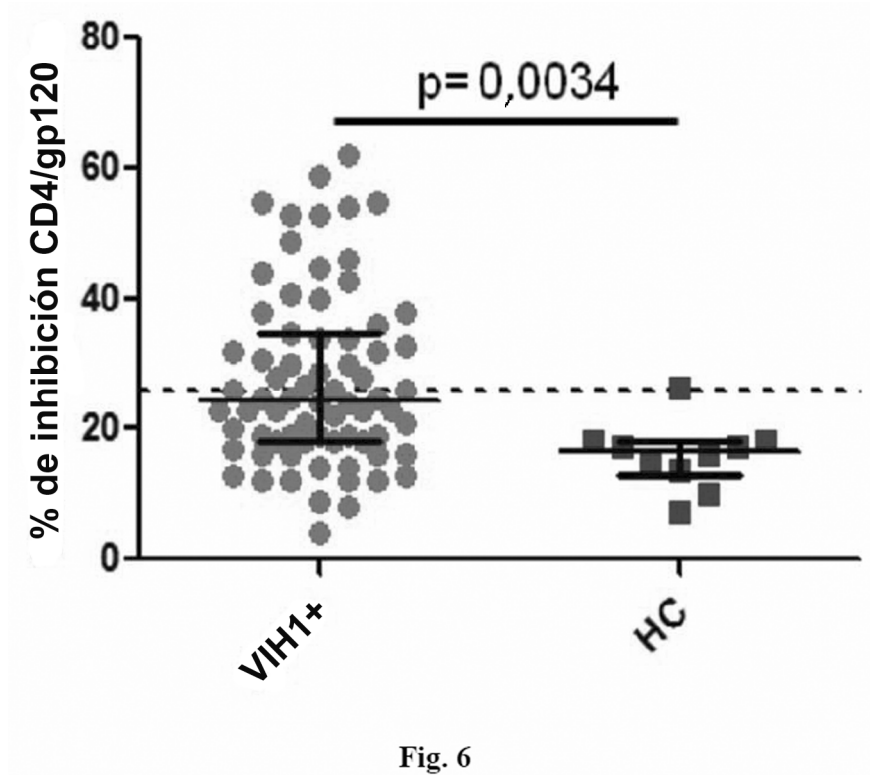


Fig. 6

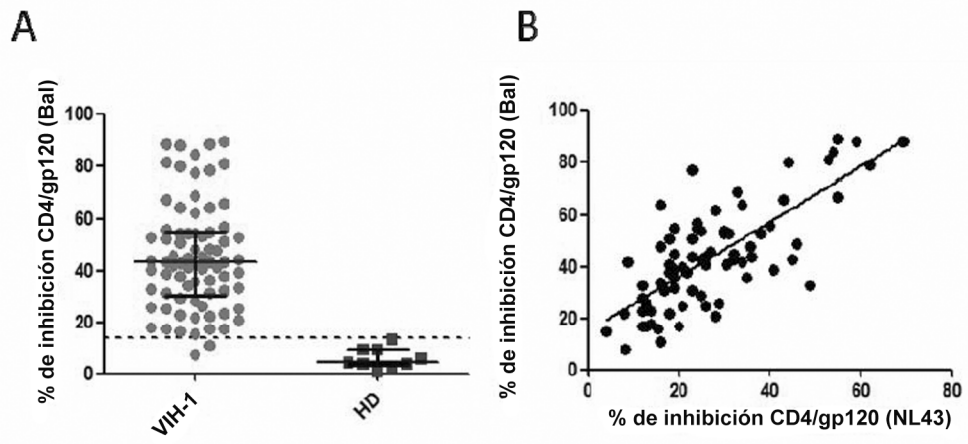


Fig. 7