

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 651 124**

51 Int. Cl.:

C07K 14/16 (2006.01)

A61K 39/21 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

C12N 15/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.02.2012 PCT/EP2012/053185**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.08.2012 WO12113921**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.02.2012 E 12705689 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.09.2017 EP 2678351**

54 Título: **Variante de GP-120 de VIH**

30 Prioridad:

25.02.2011 EP 11382051

25.02.2011 US 201161446595 P

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

24.01.2018

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:

YUSTE HERRANZ, MARÍA ELOÍSA;

SÁNCHEZ MERINO, VÍCTOR y

FERREIRA, CAROLINA

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 651 124 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Variante de GP-120 de VIH

5 **Campo de la invención**

La presente divulgación se refiere a un método para la selección rápida de inmunógenos que pueden inducir altas actividades de anticuerpo neutralizantes (nAc). Se divulgan y ejemplifican varios ejemplos de estos inmunógenos con actividades de nAc aumentadas. En particular, se divulgan inmunógenos con afinidad de anticuerpo aumentada
10 contra epítomos Env de VIH-1.

Antecedentes de la invención

15 Se estima que más de 60 millones de personas en el mundo se han infectado con el virus de la inmunodeficiencia humana desde 1982. Casi la mitad de estos individuos infectados han muerto del síndrome de inmunodeficiencia adquirido (SIDA) resultante en el mismo intervalo de tiempo. Aunque la propagación del virus parece haber alcanzado una meseta últimamente, se describieron 2,5 millones de nuevas infecciones por VIH en 2009. El VIH aún es un problema de salud pública principal. Véase, UNAIDS, 2010 Report on the Global AIDS Epidemic.

20 El VIH-1 es uno de los patógenos víricos genéticamente más diversos descritos hasta ahora. Hay tres ramas principales del árbol filogenético del VIH-1, los grupos M (mayor), N (nuevo) y O (atípico). Los virus del grupo M son los más extendidos, representan más del 99% de las infecciones globales. Este grupo está actualmente dividido en nueve subtipos genéticos distintos o clados (de A hasta K), basado en gran parte en secuencias cortas del gen *env* (envuelta). Véase, McCutchan F, AIDS 2000; 14(S3):S31-S44 y Robertson D, *et al.*, Science 2000; 288:55-56.

25 *Env* es el gen más variable de VIH-1, con hasta el 35% de diversidad de secuencia entre clados, el 20% de diversidad de secuencia en clados y hasta el 10% de diversidad de secuencia en una única persona infectada. Véase, Kuiken C, *et al.*, AIDS 1996; 10:31-37 y Shankarappa R, *et al.*, J. Virol. 1999; 73:10489-10502. El clado B es dominante en Europa, América y Australia. Véase, Kuiken C, *et al.*, AIDS 1996; Am. J. Epidemiol. 2000; 152:814-822. El clado C es común en África del sur, China e India y actualmente infecta más personas en el mundo que ningún otro clado. Véase, McCutchan, 2000, anteriormente. Los clados A y D son prominentes en África central y oriental.

35 Sin embargo, muchos virus son difíciles de clasificar en clados debido al entremezclado común de virus cocirculantes que produce recombinantes interclado. Véase, Heyndrickx L, *et al.*, J. Virol. 200; 74:363-370 y McCutchan F, *et al.*, Virology 1999; 254:226-234. Algunas formas recombinantes de hecho han dado lugar a linajes epidémicos importantes, denominados formas recombinantes circulantes (CRF). Las dos más comunes de estas son CRF01 (AE), descubierta en Tailandia, que se clasificó inicialmente como clado E, aunque más tarde se encontró que era solo clado E en *env* y clado A en otras partes del genoma, y CRF02, una forma recombinante AG común en África occidental. Véase, Robertson, 2000, anteriormente. En conjunto, los clados A hasta D y los recombinantes CRF01 AE y CRF02 AG representan más del 90% de las infecciones globales.

45 Los anticuerpos neutralizantes (nAc) contra las proteínas de la envuelta vírica (Env) son una primera línea de defensa inmunitaria adaptativa contra la exposición a VIH-1 que bloquea la infección de células susceptibles. Véase, Kwong P, *et al.*, Nature 1998; 393:648-659, Moore J, *et al.*, J. Virol. 1994; 68:469-484, Moore P, *et al.*, J. Virol. 1996; 70:1863-1872 y Parren P, *et al.*, AIDS 1999; 13:S137-S162. La eficacia de vacunas contra varios virus se ha atribuido a su capacidad de inducir nAc. Véase, Burton D, Nat. Rev. Immunol. 2002; 2: 706-713 y Zinkerangel R, *et al.*, Adv. Immunol. 2001; 79:1-53. BHATTACHARYYA *et al.* (J. BIOL. CHEM., 2010, vol. 285, no. 35, p.27100-27110) y LI *et al.* (J. VIROL., 2005, vol. 79, 16, p.10108-10125) divulgan variantes de gp120 de VIH-1 con múltiples mutaciones comparadas con la env del aislado AC10 de VIH-1, que inducen anticuerpos neutralizantes y permiten la
50 detección de anticuerpos neutralizantes.

Sin embargo, ha habido un progreso limitado hacia el desarrollo de inmunógenos efectivos de VIH-1 a pesar de los enormes esfuerzos. Véase, Burton, 2002, anteriormente, McMichael A, Hanke T, Nat. Med. 2003; 9:874-880 y Moore, 1996, anteriormente. El diseño de estos inmunógenos requiere la identificación de epítomos capaces de inducir mejores respuestas de nAc. Desgraciadamente, todos los intentos de desarrollar inmunógenos que provoquen respuestas de Ac ampliamente neutralizantes han fracasado hasta ahora.

60 Por tanto, hay una necesidad en la técnica para nuevos inmunógenos de VIH-1 capaces de inducir mejores respuestas de nAc.

Compendio de la invención

65 La presente invención se define en su sentido más amplio en las reivindicaciones independientes. La presente invención se refiere a un método para la selección rápida de inmunógenos (RIS) que pueden provocar actividades altas de nAc cuando se usan como inmunógenos de células B. El método comprende: i) mutar al azar la secuencia

codificante de nucleótidos de un epítipo de tipo salvaje de interés para generar una genoteca de variantes de dicho epítipo, ii) probar la genoteca con un anticuerpo, o partes del mismo, que se sabe tiene afinidad hacia el epítipo de tipo salvaje, y iii) seleccionar las variantes de epítipo que aumentan la afinidad del anticuerpo. Preferiblemente, el epítipo es un epítipo de VIH. Más preferiblemente, el epítipo es un epítipo Env.

5 En un segundo aspecto, la divulgación se refiere a secuencias de nucleótidos y péptidos obtenidos por el método RIS tal como la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1. La invención se refiere a la secuencia de nucleótidos definida por SEQ ID NO: 3.

10 En un tercer aspecto, la divulgación se refiere al uso de las secuencias de nucleótidos y péptidos obtenidos por el método RIS para la prevención y el tratamiento de enfermedades inducidas totalmente o en parte por la acción del epítipo de tipo salvaje de interés. Preferiblemente, la enfermedad es SIDA o una enfermedad causada por una infección de VIH.

15 En un cuarto aspecto, la divulgación se refiere al uso diagnóstico del método RIS.

Breve descripción de las figuras

20 **Figura 1.** Secuencia de los mutantes identificados usando el método RIS de la invención. La secuencia superior corresponde a los aminoácidos 121 a 160 del polipéptido gp160 de AC10. Las secuencias de las regiones correspondientes en los clones aislados se muestran como puntos en donde el aminoácido es el mismo que en la gp160 de AC10 o con el aminoácido correspondiente en esas posiciones en donde la secuencia del mutante se diferencia de la del tipo salvaje.

25 **Figura 2.** Interacción propuesta entre el anticuerpo 4E10 y el mutante específico LR1-C1. Se muestran once sustituciones de aminoácidos a lo largo del gen *env* entero, incluyendo la pérdida de 3 potenciales sitios de N-glicosilación. La mutación C131Y es especialmente relevante porque esta sustitución elimina el puente disulfuro nativo entre C131 y C157 rompiendo la arquitectura del bucle V1/V2.

30 **Figura 3.** El virión LR1-C1 identificado usando el método RIS según la invención muestra afinidad aumentada hacia el anticuerpo ampliamente neutralizante 4E10. El gráfico muestra una titulación de la unión de viriones a placas recubiertas con el anticuerpo 4E10 determinada añadiendo cantidades crecientes del aislado de tipo salvaje AC10 y el aislado de LR1-C1 a placas recubiertas con el anticuerpo 4E10 o dejadas sin tratar. El diagrama ilustra un aumento de 4 veces en la afinidad del anticuerpo 4E10 hacia LR1-C1 en comparación con la variante salvaje.

35 **Figura 4.** El virión LR1-C1 identificado usando el método RIS según la invención con el anticuerpo 4E10 no muestra afinidad aumentada hacia otros anticuerpos ampliamente neutralizantes. El gráfico muestra una titulación de la unión de viriones a placas recubiertas con los anticuerpos 2F5 (panel A), 2G12 (panel B) o b12 (panel C) determinado añadiendo cantidades crecientes del aislado de tipo salvaje AC10, el aislado LR1-C1 o viriones que tienen una delección en el gen *env* a las placas recubiertas con los anticuerpos o dejadas sin tratar.

40 **Figura 5.** Alineamiento de SEQ ID NO:31 con la secuencia HXB2 salvaje de AC10. La SEQ ID NO:31 tiene afinidad hacia el anticuerpo PG16. La secuencia modificada muestra dos mutaciones: i) N203S, en un potencial sitio de glicosilación, y ii) G604E, en la región inmunodominante de gp41.

45 Descripción detallada de la invención

A. Método de selección rápida de inmunógeno (RIS)

50 La divulgación se refiere a un nuevo enfoque para optimizar la proteína de la envuelta de VIH-1 (Env) como un inmunógeno. Este enfoque tiene en cuenta que la capacidad de un epítipo para inducir anticuerpos depende de su exposición en el virión. El método se basa en la selección de variantes con afinidad aumentada para Ac ampliamente neutralizantes de una librería de viriones con proteínas de envuelta mutadas al azar.

55 Según la divulgación, se usa el gen *env* de longitud completa de la cepa de VIH AC10 para generar librerías de envueltas mutadas al azar mediante un método basado en PCR. La clonación se realizó en el contexto pNL4-3 y los viriones se obtuvieron por transfección transitoria en células 293T. La selección de virus con afinidad aumentada al Ac ampliamente neutralizante 4E10 se llevó a cabo mediante un ensayo mejorado de captura de viriones en solución. Se extrajo ARN de la población de virus capturados y se realizó transcripción inversa y PCR para obtener el gen *env* de los virus correspondientes para secuenciación adicional y clonación de nuevo en el contexto de pNL4-3. Después de una ronda de selección, se aisló una envuelta con un aumento de 4 veces en la afinidad hacia 4E10. Véanse los ejemplos.

60 De esta manera, en un primer aspecto, la divulgación se refiere a un método para la identificación de inmunógenos capaces de inducir anticuerpos neutralizantes contra un polipéptido que comprende:

- (i) poner en contacto un anticuerpo neutralizante específico para dicho polipéptido con una librería de virus recombinantes, cada uno de dichos virus recombinantes contiene un gen aleatorizado que codifica una variante de dicho polipéptido y expresa dicho polipéptido,
- (ii) separar esos miembros de la librería de virus recombinantes que se unen al anticuerpo neutralizante de los miembros que no se unen en base a su capacidad de unirse al anticuerpo neutralizante, y
- (iii) determinar la secuencia de los polipéptidos variantes encontrados en los miembros de la librería de virus recombinantes seleccionados en el paso (ii).

El término “inmunógeno” como se usa en el presente documento, se pretende que indique una sustancia de materia, que es capaz de inducir una respuesta inmunitaria adaptativa en un individuo, donde dicha respuesta inmunitaria adaptativa es capaz de inducir una respuesta inmunitaria, que significativamente compromete agentes patógenos, que comparten características inmunológicas con el inmunógeno.

El término “provocar” cuando se refiere a una respuesta inmunitaria, como se usa en la presente divulgación, se refiere a controlar o influir específicamente la actividad de la respuesta inmunitaria, e incluye activar una respuesta inmunitaria, regular por incremento una respuesta inmunitaria, aumentar una respuesta inmunitaria y/o alterar una respuesta inmunitaria (tal como provocando un tipo de respuesta inmunitaria que a su vez cambia el tipo prevalente de respuesta inmunitaria en un sujeto de una que es dañina o ineficaz a una que es beneficiosa o protectora).

El término “anticuerpo neutralizante” es cualquier anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une a un patógeno e interfiere con la capacidad del patógeno de infectar una célula y/o producir enfermedad en un sujeto. Típicamente, los anticuerpos neutralizantes usados en el método de la presente divulgación se unen a la superficie del patógeno e inhiben o reducen la infección por el patógeno en al menos el 99 por ciento, al menos el 95 por ciento, al menos el 90 por ciento, al menos el 85 por ciento, al menos 80 por ciento, al menos el 75 por ciento, al menos el 70 por ciento, al menos el 60 por ciento, al menos el 50 por ciento, al menos el 45 por ciento, al menos el 40 por ciento, al menos el 35 por ciento, al menos el 30 por ciento, al menos el 25 por ciento, al menos el 20 por ciento o al menos el 10 por ciento relativo a la infección por el patógeno en ausencia de dicho(s) anticuerpo(s) o en presencia de un control negativo. Los nAc se pueden probar luego para determinar si tienen actividad neutralizante o actividad BNAC usando cualquiera de los métodos proporcionados en el presente documento. Si los anticuerpos neutralizantes o BNAC se produjeron en un animal no humano, las CDR se pueden transferir del marco no humano a un marco humano para generar un anticuerpo adecuado para la administración a un ser humano. Los métodos para determinar 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 una única ronda de infección vírica usando una línea celular receptiva usando un virus que codifica el gen indicador.

El término “virus”, como se usa en el presente documento, se refiere a un agente infeccioso pequeño que se puede replicar solo en el interior de células vivas de organismos. Los ejemplos no limitantes de familias víricas que se pueden usar en el método de la presente divulgación incluyen, adenoviridae, virus similares al de la peste porcina africana, arenaviridae, arterivirus, astroviridae, baculoviridae, birnaviridae, bunyaviridae, caliciviridae, circoviridae, coronaviridae, deltavirus, filoviridae, flaviviridae, hepadnaviridae, hepeviridae, herpesviridae, orthomyxoviridae, paramyxoviridae, picomaviridae, poxyviridae, reoviridae, retroviridae y rhabdoviridae.

A.1. Etapa de poner en contacto

En una primera etapa, el método de la divulgación implica poner en contacto un anticuerpo neutralizante específico para un polipéptido presentado en la superficie de dicho virus con una librería de virus recombinantes, cada uno de dichos virus recombinantes contiene un gen aleatorizado que codifica una variante de dicho polipéptido presentado en la superficie del virus.

El término “librería”, como se usa en el presente documento, se refiere a una colección o mezcla diversa de polinucleótidos que comprenden polinucleótidos que codifican diferentes polipéptidos recombinantes. El tamaño y complejidad de las librerías que se van a usar en los métodos de la presente divulgación puede variar. Por ejemplo, los métodos de la divulgación se pueden usar para cribar librerías con hasta 500000 miembros diferentes, o librerías con 1×10^6 , 1×10^8 o más miembros. Las librerías de virus típicas tienen de 1×10^9 a 1×10^{13} miembros y tales librerías se pueden cribar usando los métodos de la divulgación. En efecto, tales librerías son preferidas, aunque los métodos se pueden usar claramente para cribar librerías mucho más pequeñas (por ejemplo, librerías con 1000 a 50.000, de 50 a 1000, o de 100 a 500, o de 10 a 100, o de 5 a 100 miembros). La diversidad en la librería variante se puede generar mediante mutagénesis de los genes que codifican las variantes a nivel del triplete de ADN, de modo que los codones individuales sean muy diversificados (por ejemplo, usando cebadores de secuencia parcialmente aleatorizada en una reacción de PCR).

Cuando se hace referencia a librerías en el presente documento, el término se puede usar para referirse a tal librería a nivel de ácido nucleico o proteína (es decir, antes o después de que se haya producido la expresión de las proteínas codificadas). Claramente, sin embargo, tales librerías de expresión deben estar presentes a nivel de

proteína para que tenga lugar la selección de compañeros de unión que interaccionan. De esta manera, para que se produzca con éxito el paso de poner en contacto (a), las librerías tienen que estar presentes a nivel de proteína (aunque inicialmente puedan estar presentes a nivel de ácido nucleico).

5 En un aspecto preferido, el polipéptido contra el que se usan los anticuerpos neutralizantes en el paso (i) se expresa en el virus. En un aspecto preferido, el polipéptido se presenta “en la superficie de un virus”. Como se usa en el presente documento este término se refiere a cualquier polipéptido que es accesible a reactivos, tales como anticuerpos, sin necesidad de romper la estructura del virus. Se entenderá que el polipéptido presentado en la superficie puede ser un polipéptido de la cápside para virus sin envuelta o un polipéptido de la envuelta para virus con envuelta. En un aspecto preferido, el polipéptido presentado en la superficie de un virus es un polipéptido de la envuelta.

Se puede modificar cualquier proteína de envuelta vírica para obtener una librería de virus recombinantes, cada uno de dichos virus recombinantes contiene un gen aleatorizado que codifica una variante de dicho polipéptido. Antígenos ilustrativos incluyen los seleccionados de la hemaglutinina del virus de la gripe, glicoproteína G del virus respiratorio sincitial, proteína central, proteína de matriz u otra proteína del virus del Dengue, hemaglutinina del virus del sarampión, glicoproteína gB del virus del herpes simple de tipo 2, VP1 del poliovirus I, glicoproteína de la envuelta o cápside de VIH-1 o VIH-II, antígeno de superficie del virus de la hepatitis B, toxina de la difteria, epítipo 24M de estreptococo, pilina gonocócica, g50 (gpD) del virus de la pseudorrabia, virus de la pseudorrabia II (gpB), gIII del virus de la pseudorrabia (gpC), glicoproteína H del virus de la pseudorrabia, glicoproteína E del virus de la pseudorrabia, glicoproteína 195 de la gastroenteritis transmisible, proteína de matriz de la gastroenteritis transmisible, glicoproteína 38 del rotavirus porcino, proteína de la cápside de parvovirus porcino, antígeno protector de *Serpulinahyodysenteriae*, glicoproteína 55 de la diarrea vírica bovina, hemaglutinina-neuraminidasa de virus de la enfermedad de Newcastle, hemaglutinina del virus de la gripe porcina, neuraminidasa del virus de la gripe porcina, virus de la fiebre aftosa, virus de la peste porcina, virus de la gripe porcina, virus de la peste porcina africana, micoplasma *lyopneutiioniae*, virus de la rinotraqueítis infecciosa bovina, glicoproteína E del virus de la rinotraqueítis infecciosa bovina, glicoproteína G, virus de la laringotraqueítis infecciosa, glicoproteína G o glicoproteína I del virus de la laringotraqueítis infecciosa, una glicoproteína del virus de La Crosse, virus de la diarrea neonatal de ternera, virus de la encefalomielitís equina venezolana, virus punta toro, virus de la leucemia murina, virus del tumor mamario de ratón, proteína central del virus de la hepatitis B y antígeno de superficie del virus de la hepatitis B o un fragmento o derivado del mismo, antígeno del virus de la gripe equina o virus del herpes equino, incluyendo la neuraminidasa del virus de la gripe equina de tipo A/Alaska 91, neuraminidasa del virus de la gripe equina de tipo A/Miami 63, neuraminidasa del virus de la gripe equina de tipo A/Kentucky 81, glicoproteína B del virus del herpes equino de tipo 1 y glicoproteína D del virus del herpes equino de tipo 1, antígeno del virus respiratorio sincitial bovino o del virus paragripal bovino, proteína de unión del virus respiratorio sincitial bovino (BRSV G), proteína de fusión del virus respiratorio sincitial bovino (BRSV F), proteína de nucleocápside del virus respiratorio sincitial bovino (BRSVN), proteína de fusión del virus paragripal bovino de tipo 3, hemaglutinina neuraminidasa del virus paragripal bovino de tipo 3, glicoproteína 48 y glicoproteína 53 del virus de la diarrea vírica bovina.

40 Preferiblemente, la librería de virus recombinantes es una librería de retrovirus. El término “retrovirus” significa cualquier virus de ARN que se replica en una célula huésped a través de la enzima transcriptasa inversa para producir ADN a partir de su genoma de ARN y que pertenece a la familia retroviridae.

El término “retrovirus” se usa en el presente documento en su significado convencional y en general abarca una clase de virus en los que el material genético es ARN monocatenario y que emplea transcriptasa inversa para transcribir el ARN vírico a ADN en un huésped. Los retrovirus como se pretende en el presente documento pueden pertenecer particularmente a la familia vírica retroviridae, más en particular a las subfamilias oncovirinae, lentivirinae o spumavirinae como se pretende en el presente documento pueden ser patogénicos. Las secuencias Env pueden derivar de cualquier retrovirus conocido, incluyendo, pero no limitado a, VIH, MuLV, SMRV, SFV, HPV, MMTV, SRV, HTLV-I, HTLV-II, BLV, BIV, visna virus, EIAV, FIV y EIAV, y de cualquiera de las subfamilias retrovíricas (por ejemplo, oncovirinae, lentivirinae o spumavirinae). Muchos clones retrovíricos, incluyendo clones de VIH-1, están bien caracterizados y disponibles.

Particularmente deseados en el presente documento son retrovirus que infectan animales, más preferiblemente retrovirus de animales de sangre caliente, incluso más preferiblemente de animales vertebrados, aún más preferiblemente de mamíferos, todavía más preferiblemente de primates y lo más preferiblemente de seres humanos. Particularmente preferidos en el presente documento son retrovirus humanos incluyendo sin limitación VIH-1, VIH-2, HTLV-I y HTLV-2. Repositorios bien establecidos de información de secuencia de VIH (y otros retrovirus) incluye GenBank, EMBL, DDBJ y el NCBI. Clones bien caracterizados de HIV-1 incluyen HXCB2, HIV-1-MN y HIV-1-MN-ST.1. Véase Hall L, *et al.*, J. Virol. 1992; 66(9):5553-5560.

En un aspecto preferido, la librería de virus recombinantes es una librería de virus VIH resultante de la aleatorización de al menos un polipéptido de superficie. El acrónimo “VIH” se usa en el presente documento para referirse a los virus de la inmunodeficiencia humana genéricamente e incluye todos los clados y/o cepas de virus de la inmunodeficiencia humana 1 (VIH-1) y virus de la inmunodeficiencia humana 2 (VIH-2) y es sinónimo con los términos más antiguos para VIH, tales como HTLVIII y LAV.

En un aspecto aún más preferido, los diferentes miembros de la librería de VIH están aleatorizados en el gen *env*. Como se usa en el presente documento, el término gen *env* indica el polinucleótido del genoma vírico que codifica la proteína de la envuelta de VIH. Como se usan en el presente documento, los términos “polipéptido Env” o “polipéptido de la envuelta” se refiere a una molécula derivada de una proteína de la envuelta de VIH. La proteína de la envuelta de VIH es una glicoproteína de alrededor de 160 kD (gp160). Durante la infección vírica de la célula huésped, gp160 se corta por las proteasas de la célula huésped para formar gp120 y la proteína integral de membrana, gp41.

Un “polipéptido gp120” es una molécula derivada de una región gp120 de un polipéptido Env. Los polipéptidos salvajes gp120 maduros tienen alrededor de 500 aminoácidos en su secuencia primaria. Gp120 está muy 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 solas como multímeros. La parte 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.

La aleatorización del gen *env* se puede llevar a cabo en la secuencia completa del gen *env* o, preferiblemente, en la parte del gen *env* que corresponde a la región codificante para gp120, ya que esta es la molécula que interacciona con el receptor en la célula diana y que constituye el mejor candidato para la unión a los anticuerpos neutralizantes. Además, la aleatorización de la región del gen *env* que codifica gp120 se puede llevar a cabo en la secuencia completa o dirigir a uno o más dominios del polipéptido gp120. De esta manera, el método RIS según la divulgación contempla el uso de librerías de VIH resultantes de la aleatorización en cualquiera de los bucles conservados (C1 a C5) de gp120, en cualquiera de los bucles variables (V1-V5) en gp120 o en una combinación preferida de regiones conservadas y bucles variables. En otro aspecto, la aleatorización se lleva a cabo en el gen *env* entero. En otro aspecto, la aleatorización se lleva a cabo en la región del gen *env* correspondiente a gp120. En otro aspecto, la aleatorización se lleva a cabo en las regiones del gen *env* correspondientes a las regiones V1 y/o V2 de gp120.

Se puede usar cualquier técnica de mutagénesis para introducir mutaciones en la molécula de ácido nucleico. Véase, Sambrook J, *et al.*, “Molecular Cloning. A Laboratory Manual” (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, EE UU, 1989), Bishop T, *et al.*, “Nucleic Acid and Protein Sequence. A Practical Approach” (IRL Press, Oxford, Inglaterra, 1987), Reznikoff W, Ed., “Maximizing Gene Expression” (Butterworths Publishers, Stoneham, MA, EE UU, 1987), Davis L, *et al.*, “Basic Methods in Molecular Biology” (Elsevier Science Publishing Co., Nueva York, NY, EE UU, 1986), Schleaf M, Ed., “Plasmid for Therapy and Vaccination” (Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, Alemania 2001), Adereth Y, *et al.*, Biotechniques 2005, 38:864-868, Allan J, *et al.*, Biotechniques 1995; 18:746-750, Bubeck A, *et al.*, J. Virol. 2004, 78:8026-8035, Doran B, publicación de patente de EE UU 20070111201, Locher C, *et al.*, DNA Cell Biol. 2005; 24:256-263, Vasl J, *et al.*, Biotechniques 2004; 37:726-730, Weiss G, *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2000; 97:8950-8954, y Delcourt M, US 6.924.112. Las estrategias de mutagénesis incluyen mutagénesis al azar, mutagénesis por barrido de alanina, mutagénesis específica de sitio y recombinación quimérica. Los kits y servicios de mutagénesis están ampliamente disponibles comercialmente.

El término “anticuerpos neutralizantes” incluye la subclase de BNAc. Como se usa en el presente documento, “anticuerpo ampliamente neutralizante” o “BNAc” se entiende como un anticuerpo obtenido por cualquier método que cuando se administra a una dosis eficaz se puede usar como un agente terapéutico para la prevención o tratamiento de infecciones por VIH o SIDA contra más de 7 cepas de VIH, preferiblemente más de 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o más cepas de VIH. Los anticuerpos neutralizantes adecuados para su uso en el método RIS según la presente divulgación incluyen, sin limitación, anticuerpos dirigidos contra la región externa proximal de membrana (MPER), anticuerpos dirigidos contra el sitio de unión de CD4 y anticuerpos dirigidos contra los glicanos ricos en manosa. En aspectos preferidos, los anticuerpos neutralizantes para su uso en el método RIS según la presente divulgación incluyen uno o más de un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en:

- a) el anticuerpo 4E10 que reconoce un segmento del ectodominio de gp41 adyacente a la membrana vírica. Véase, Cardoso R, *et al.*, Immunity 2005; 22:163-173, número de acceso de PSHL 90.091703, número de catálogo de NIH ARRRP 10091, y Katinger H, *et al.*, US 5.753.503.
- b) el anticuerpo 2F5 que reconoce un segmento del ectodominio de gp41 adyacente a la membrana vírica. Véase, Ofek G, *et al.*, J. Virol. 2004; 78:10724-10737, número de acceso de PSHL 90.091704, número de catálogo de NIH ARRRP 1475, y Katinger, anteriormente.
- c) los anticuerpos descritos en el documento EP 0822941 que se unen a dos determinantes antigénicos diferentes de VIH-1, en donde los determinantes antigénicos son fragmentos de gp160 y corresponden a las secuencias de aminoácidos 79 a 184 y 326 a 400 de gp120 procesada de aislado de VIH-1 BH 10. Véanse los números de acceso de PSHL 95032240 y 95032241.

- d) El 2G12 que reconoce hidratos de carbono en la superficie externa de gp120 (mAc 2G12). Véase, Trkola A, *et al.*, J. Virol. 1996; 70:1100-1108, número de acceso de EACC 93091517, y número de catálogo de NIH ARRRP 1476.
- e) el anticuerpo b12 que reconoce el sitio de unión de CD4. Véase, Burton D, *et al.*, Science 1994; 266: 1024-1027, número de catálogo de NIH ARRRP 2640 y Burton D, *et al.*, documento EP 0675904; y
- f) los anticuerpos neutralizantes PG9, PG16, PG20, PGG14 y PGC14. Véase, Chan-Hui P, *et al.*, documento WO2010107939.

Los métodos para determinar si un anticuerpo es un nAc se han descrito en la técnica. Algunos de estos métodos se basan en la determinación de la reducción en el efecto del anticuerpo de la expresión de un gen indicador después de una única ronda de infección vírica usando una línea celular receptiva que codifica el gen indicador. Véase, Li, 2005, Wei, 2003, Montefiori, 2005, anteriormente, y Alvin C, WO2009117661

La capacidad neutralizante de los anticuerpos para su uso según la presente divulgación se puede caracterizar por la CI50 (es decir, la concentración de anticuerpo que produce una reducción del 50% en la infección de una célula diana). Preferiblemente, los anticuerpos neutralizantes para su uso según la presente divulgación 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, preferiblemente 10^{-9} M o menor, preferiblemente 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 estándar como se describe en la técnica.

La etapa de poner en contacto se lleva a cabo en condiciones adecuadas de modo que esos miembros de la librería de virus recombinantes capaces de unirse específicamente a los anticuerpos neutralizantes realmente se unen a dichos anticuerpos.

Como se usa en el presente documento, el término "unirse específicamente" (o derivados del mismo), se refiere a la interacción entre pares de unión (por ejemplo, dos proteínas o compuestos). En algunos aspectos 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 "se une específicamente" se refiere a la unión específica de un compuesto a otro, en donde el nivel de unión, medido por cualquier ensayo estándar (por ejemplo, un inmunoensayo), es estadísticamente significativamente mayor que el control de fondo para el ensayo.

Las condiciones durante la etapa de poner en contacto las puede determinar de una manera rutinaria el experto en la materia. 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 sea apropiado según, por ejemplo, la naturaleza de los compañeros de unión que interaccionan. La muestra se puede opcional y preferiblemente someter a agitación, mezclado o rotación suave. Además, se pueden añadir otros reactivos adecuados tales como agentes bloqueantes para reducir la unión no específica. Por ejemplo, se puede usar BSA del 1-4 por ciento u otro agente bloqueante adecuado (por ejemplo, leche). Sin embargo, se apreciará que el experto en la materia puede variar y adaptar las condiciones de poner en contacto 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 unidores que sean estables en estas condiciones (por ejemplo, en el caso de incubación a 37°C, unidores que son estables en condiciones encontradas en el cuerpo humano). Tal propiedad podría ser extremadamente ventajosa si uno o ambos de los compañeros de unión fuera un candidato a ser usado en algún tipo de aplicación terapéutica (por ejemplo, un anticuerpo). Tales adaptaciones están en el ámbito del experto en la materia.

En un aspecto preferido, el anticuerpo neutralizante usado en la etapa de poner en contacto puede estar inmovilizado en un soporte sólido usando una variedad de técnicas que conocen los expertos en la materia, que se describen ampliamente en la bibliografía de patentes y científica. El soporte sólido puede ser cualquier material que conocen los expertos en la materia al que se puede unir el anticuerpo. Por ejemplo, el soporte sólido puede ser un pocillo de prueba en una placa de microtitulación o un filtro de nitrocelulosa u otra membrana adecuada. De forma alternativa, el soporte puede ser una bola o disco, tal como vidrio, fibra de vidrio, látex o un material plástico tal como poliestireno o cloruro de polivinilo. El soporte también puede ser una partícula magnética o un sensor de fibra óptica. Véase, Jorgenson R, *et al.*, US 5.359.681.

El anticuerpo se puede inmovilizar en un soporte sólido usando una variedad de técnicas que conocen los expertos en la materia, que se describen ampliamente en la bibliografía de patentes y científica. En el contexto de la presente divulgación, la inmovilización incluye tanto la asociación no covalente, tal como adsorción, como unión covalente (que puede ser una unión directa entre el antígeno y grupos funcionales en el soporte o puede ser una unión mediante un agente de entrecruzamiento). La inmovilización por adsorción a un pocillo en una placa de microtitulación o a una membrana es preferida. En tales casos, la adsorción se puede alcanzar poniendo en contacto el anticuerpo, en un tampón adecuado, con el soporte sólido durante un tiempo adecuado. El tiempo de contacto

varía con la temperatura, pero típicamente es entre 1 hora y 1 día. En un aspecto, poner en contacto un pocillo de una placa de microtitulación de plástico (tal como poliestireno o cloruro de polivinilo) con una cantidad de anticuerpo que varía desde alrededor de 10 ng hasta alrededor de 1 µg, y preferiblemente alrededor de 100-200 ng, es suficiente para inmovilizar una cantidad adecuada de polipéptido.

La unión covalente de un anticuerpo a un soporte sólido también se puede alcanzar haciendo reaccionar primero el soporte con un reactivo bifuncional que reaccionará tanto con el soporte como con un grupo funcional, tal como un grupo hidroxilo o amino, en el anticuerpo. Por ejemplo, se puede unir covalentemente el anticuerpo a soportes que tienen un recubrimiento polimérico apropiado usando benzoquinona o por condensación de un grupo aldehído en el soporte con una amina y un hidrógeno activo en el compañero de unión, usando técnicas bien conocidas.

De forma alternativa, en lugar de inmovilizar el anticuerpo neutralizante a un soporte de forma covalente o no covalente, la divulgación contempla la posibilidad de inmovilizar el anticuerpo mediante unión a un primer anticuerpo específico para Fc o un fragmento de anticuerpo anti-Fc; que se ha inmovilizado previamente al soporte. Además de ayudar a capturar el anticuerpo, el primer anticuerpo orienta el anticuerpo neutralizante para aumentar el porcentaje de anticuerpo inmovilizado que es activo para unirse a miembros de la librería vírica. Por ejemplo, la inmovilización se puede llevar a cabo poniendo primero en contacto un anticuerpo que se ha inmovilizado en un soporte sólido, comúnmente el pocillo de una placa de microtitulación, con la librería, de modo que se permite que esos virus en la librería que muestran afinidad hacia la muestra de anticuerpo neutralizante se unan al anticuerpo inmovilizado. La muestra no unida se elimina luego de los complejos anticuerpo-virus inmovilizados. Más específicamente, una vez que el anticuerpo está inmovilizado en el soporte como se describe anteriormente, el resto de los sitios de unión de la proteína en el soporte típicamente se bloquean.

A.2. Etapa de separación

En una segunda etapa, el método RIS de la divulgación comprende separar esos miembros de la librería de virus recombinantes que se unen al anticuerpo neutralizante de miembros que no se unen en base a su capacidad de unirse al anticuerpo neutralizante.

Dicha etapa de separación se puede referir a una separación física (por ejemplo, en bolas o FACS) o eliminación de la fase sólida de la mezcla de reacción, o se puede referir a una etapa en la que la fase sólida se somete a una o más etapas de lavado para eliminar los otros componentes de la mezcla de reacción. En aspectos donde se lleva a cabo la separación física o la eliminación de la fase sólida, preferiblemente, la fase sólida también se somete a una o más etapas de lavado.

Las etapas de lavado se pueden llevar a cabo de cualquier modo apropiado dependiendo de la naturaleza de la fase sólida y los compañeros de unión que interaccionan unidos a la misma. Los métodos apropiados de lavar fases sólidas particuladas los conoce bien el experto en la materia. Por ejemplo, si la fase sólida es particulada, las etapas de lavado pueden tener lugar centrifugando las partículas en tales condiciones que formen un precipitado mientras se elimina el sobrenadante. Después, las partículas se pueden resuspender en un medio acuoso apropiado (por ejemplo, el mismo utilizado en la etapa de poner en contacto). La rigurosidad de los lavados (o realmente, la etapa de poner en contacto) se puede modificar añadiendo reactivos apropiados que conocen bien los expertos en la materia (por ejemplo, Tween) para, por ejemplo, disminuir el fondo o la unión inespecífica. Tales etapas de precipitar y resuspender constituirían un lavado. Se puede llevar a cabo cualquier número apropiado de lavados. Sin embargo, si la fase sólida fuera magnética, las etapas de lavado se podrían llevar a cabo de forma conveniente aplicando un campo magnético al recipiente en el que se ha llevado a cabo la etapa de poner en contacto, eliminando el sobrenadante y resuspendiendo la fase sólida en un medio acuoso apropiado. Tales etapas de separación magnética y resuspensión constituirían una etapa de lavado y se podrían llevar a cabo cualquier número apropiado de lavados. Si el soporte sólido es no particulado (por ejemplo, es una superficie plana tal como una placa, un disco o un filtro), de nuevo los expertos en la materia conocen bien métodos apropiados de lavar tales fases sólidas.

Además de las etapas de lavado opcionales descritas anteriormente, se debe advertir que también se pueden llevar a cabo una o más etapas de lavado en cualquier otra fase apropiada en el método RIS. Por ejemplo, también se podrían llevar a cabo una o más etapas de lavado de fases sólidas después haber realizado cualquier etapa de inmovilización, por ejemplo, para eliminar anticuerpos neutralizantes que no se han unido a la fase sólida. En efecto, tales etapas de lavado son preferidas. Además, se pueden llevar a cabo una o más etapas de lavado en fases sólidas a otros tiempos apropiados durante el curso del método para eliminar, por ejemplo, entidades no unidas. El experto en la materia puede determinar fácilmente el número de lavados requeridos.

Una vez eliminados los componentes de la mezcla de reacción que se unen débilmente o se unen de forma no específica a los anticuerpos neutralizantes, la etapa de separación finalmente se lleva a cabo eluyendo esos miembros de la librería de virus recombinantes que se han unido específicamente a los anticuerpos neutralizantes. Dependiendo del tipo de inmovilización, dicha etapa de elución se podría llevar a cabo por cualquier método adecuado, tal como, por ejemplo, utilizando un álcali, detergente o agente similar que rompe enlaces no covalentes, seguido por neutralización, para dejar que los compañeros que interaccionan se replieguen y se unan entre sí. En el caso de etiquetas de biotina, en general, las construcciones de la librería que contienen tales etiquetas se manipulan

para que contengan algún tipo de sitio para corte como un sitio de proteasa, un sitio de enzima de restricción, un grupo enlazador cortable S-S que se puede abrir con ditiotreitól (DTT). También se podría usar TEA. Se puede usar un sitio de corte tales como los descritos anteriormente con cualquier tipo de etiqueta para permitir o facilitar la elución.

La liberación de los virus del anticuerpo neutralizante como resultado de la etapa de elución se puede llevar a cabo típicamente midiendo la presencia de uno o más polipéptidos víricos en el sobrenadante. En un aspecto preferido, el polipéptido ensayado es un polipéptido de cápside vírica. Cuando se usa una librería de VIH en particular, ejemplos no limitantes de proteínas de VIH que pueden ser adecuadas para su uso en los aspectos presentados en el presente documento incluyen las proteínas gag de VIH p53, p24, p17, p7, p6, p2 o p1, glicoproteínas env de VIH gp120, gp41 o gp160, enzimas de VIH incluyendo integrasa (p31), transcriptasa inversa (p51 o p66), RNasa H (p15), proteasa (p10), las proteínas nef de VIH (p25/p27), la proteína vif de VIH p23, la proteína rev de VIH p19, la proteína vpr de VIH (p12/p10), la proteína vpu de VIH (p16) o las proteínas tat de VIH (p16/p14). En un aspecto preferido, el polipéptido de VIH ensayado para establecer si el virus seleccionado se ha eluido de forma eficaz de anticuerpo neutralizante es p24.

Como se usa en el presente documento, el término "p24 de VIH" se refiere al producto génico de la región gag de VIH, caracterizado como que tiene un peso molecular relativo aparente de alrededor de 24.000 dalton. El término "p24 de VIH" también se refiere a modificaciones y fragmentos de p24 que tienen la actividad inmunológica de p24.

Se puede medir p24 con inmunoensayos enzimáticos mientras que la detección de p24 unido requiere pretratamiento con un ácido para disociar el complejo. Aunque los procedimientos varían entre fabricantes, las pruebas de antígeno p24 de VIH emplean tecnología ELISA con modificaciones para detectar antígeno, no anticuerpo. En un ensayo representativo, tal como de tipo "sándwich de anticuerpo", se une un anticuerpo monoclonal específico contra p24 de VIH a la fase sólida (pocillo de placa de microtitulación o bola de poliestireno) que actúa para "capturar" el antígeno vírico en la muestra cuando se añade. Se añade un detergente (por ejemplo, Triton X100) para romper viriones y si el antígeno está presente en el medio, el antígeno se unirá al anticuerpo monoclonal en la fase sólida.

A.3. Etapa de detección

En una tercera etapa, el método RIS según la divulgación comprende determinar la secuencia de dicho péptido variante presentado en la superficie del virus en esos miembros de la librería seleccionados en la etapa (ii).

Una vez seleccionados o aislados uno o más conjuntos de miembros que interaccionan de las librerías víricas según los métodos de la divulgación, estos se someten a análisis adicional. Dichos análisis o usos adicionales en general requieren que los compañeros de unión del candidato se despeguen, retiren, aislen o eluyan del anticuerpo neutralizante y se expresen o produzcan adicionalmente. De esta manera, el método de la presente divulgación comprende además una etapa en donde dichos miembros de la librería vírica capaces de interaccionar específicamente con el anticuerpo neutralizante se despegan, retiran, eluyen o preferiblemente aislan o se expresan o producen en aislamiento entre ellos. Dicho análisis adicional en general implica el aislamiento de miembros individuales de la librería que interaccionan mediante aislamiento del ARN de los virus unidos, transcripción inversa del ARN vírico a ADNc y clonación de dicho ADNc en un vector de expresión adecuado.

Una vez que el ADN que codifica los compañeros de unión se clona en un vector de expresión adecuado, el ADN que codifica el compañero de unión se puede secuenciar o se puede expresar la proteína en forma soluble y someter a estudios de unión apropiados para caracterizar adicionalmente los candidatos a nivel de proteína. Los estudios de unión apropiados dependerán de la naturaleza de los compañeros de unión e incluyen, pero no están limitados a, ELISA, ensayos de cribado en filtros, FACS o ensayos de inmunofluorescencia, medidas de afinidad en BiaCore u otros métodos para cuantificar constantes de unión, tinción de cortes de tejidos o células y otros métodos inmunohistoquímicos. Tales métodos están bien establecidos en la bibliografía y se pueden usar uno o más de ellos para analizar las variantes de proteínas de envuelta seleccionadas.

Como se ha mencionado anteriormente, los métodos apropiados para analizar los compañeros de unión que interaccionan individuales se conocen en la técnica. Un método preferido será secuenciar el material genético de los virus de la librería que se unen específicamente al anticuerpo neutralizante.

Típicamente, en el caso de retrovirus que tienen ARN como material genético, el paso de detección implica el aislamiento del ARN, transcripción inversa del ARN a ADNc monocatenario resultado, tratar el ADN monocatenario para obtener ADN bicatenario y clonar el ADNc bicatenario en el vector de elección y secuenciar el ADNc.

La transcripción inversa se lleva a cabo usando métodos que conoce el experto en la materia y se puede llevar a cabo de forma isotérmica, así como usando ARN polimerasas termoestables en presencia de una ADN polimerasa dependiente de ARN incluyendo, sin limitación, AMV, AMV clonada, MMLV, SpuerscriptII, ReverTraAce, transcriptasa inversa Tth, transcriptasa inversa del virus de la hepatitis B, transcriptasa inversa del virus del mosaico de la coliflor, transcriptasa inversa bacteriana y Thermoscript. Las enzimas utilizadas en la presente divulgación

incluyen las que tienen actividad RNasa H reducida, sustancialmente reducida o completamente eliminada. Mediante una enzima con "actividad RNasa H sustancialmente reducida" se quiere decir una enzima que tiene menos del alrededor del 20%, preferiblemente menos de alrededor del 15%, el 10% o el 5%, y lo más preferiblemente menos de alrededor del 2%, de la actividad RNasa H de la correspondiente enzima tipo salvaje o RNasa H+, tal como virus de la leucemia murina de Moloney de tipo salvaje (M-MLV), transcriptasas inversas de virus de la mieloblastosis aviar (AMV) o del virus del sarcoma de Rous (RSV). La actividad RNasa H de cualquier enzima se puede determinar mediante una variedad de ensayos conocidos. Véase, Kotewicz M, *et al.*, Nucl. Acids Res. 1988; 16:265-277, Gerard G, *et al.*, Focus 1992; 14(5):91-93, y Kotewicz M, *et al.*, US 5.244.797. Polipéptidos particularmente preferidos para uso en la divulgación incluyen, pero no están limitados a la transcriptasa inversa de M-MLV, transcriptasa inversa de RSV, transcriptasa inversa de AMV, transcriptasa inversa de RAV (virus asociado a Rous), transcriptasa inversa de MAV (virus asociado a mieloblastosis) y transcriptasa inversa de VIH. Véase Kotewicz M, *et al.*, US 5.244.797 y Gerard G, *et al.*, WO1998047912. Sin embargo, el experto en la materia entenderá que se puede usar de forma equivalente cualquier enzima capaz de producir una molécula de ADN a partir de una molécula de ácido ribonucleico (es decir, que tiene actividad transcriptasa inversa) en las composiciones, métodos y kits de la divulgación.

El ADNc monocatenario se puede tratar de modo que se obtenga un ADN bicatenario usando cualquier método conocido en la técnica. Preferiblemente, la conversión del ADNc monocatenario a ADN bicatenario se lleva a cabo usando tecnologías de amplificación *in vitro* tales como reacción en cadena de la polimerasa (PCR), reacción en cadena de la ligasa (LCR), amplificación basada en secuencia de ácidos nucleicos (NASBA), amplificación por desplazamiento de la hebra (SDA), amplificación mediada por transcripción (TMA), tecnología de ADN ramificado (bDNA), amplificación de ADN auxiliada por enlazador (LADA), amplificación por replicasa Q-beta (Q-beta), amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP) y tecnología de amplificación por círculo rodante (RCAT) u otras tecnologías de amplificación enzimática *in vitro*. El paso de amplificación se lleva a cabo usando cebadores correspondientes a las secuencias de las regiones adaptadoras. El ADN bicatenario resultante se puede purificar usando una columna de purificación, bolas electromagnéticas a las que se une el cebador o por electroforesis mediante un gel de agarosa.

El ADN bicatenario resultante se puede insertar en un vector de elección usando métodos conocidos en la técnica. En un aspecto preferido, los cebadores usados durante el paso de amplificación por PCR contienen en sus regiones 5' sitios diana para endonucleasas de restricción que generan extremos compatibles con los presentes en el vector de elección. Los sitios diana de endonucleasas permiten la generación de extremos cohesivos que se pueden usar para clonar los polinucleótidos en vectores apropiados.

La etapa de secuenciación se puede llevar a cabo usando cualquier medio conocido de secuenciación tal como secuenciación química (Maxam-Gilbert), secuenciación dideoxi de Sanger, pirosecuenciación, secuenciación con detección de fluorescencia y secuenciación de ADN por espectrometría de masas.

B. Polipéptidos inmunogénicos, polinucleótidos, vectores y células huésped

El método de selección inmunogénica rápida (RIS) según la presente divulgación permite la identificación de polipéptidos que son variantes del polipéptido presentado en la superficie de un virus y que son candidatos para generar anticuerpos neutralizantes y por tanto, para su uso como composiciones inmunogénicas o vacunas. De esta manera, en otro aspecto, la divulgación se refiere a polipéptidos identificados por el método de la invención.

El término "polipéptido", que se usa en el presente documento de forma intercambiable con proteína, se refiere a una cadena de aminoácidos de cualquier longitud en donde los diferentes aminoácidos están unidos entre sí por medio de enlaces peptídicos o puentes disulfuro.

En el caso particular en donde el virus seleccionado según el método de la divulgación sea un retrovirus, el polipéptido es una variante de una proteína de la envuelta. En un aspecto preferido, el retrovirus es VIH y el polipéptido según la presente divulgación es una variante de gp120.

El polipéptido identificado según el método RIS de la divulgación, preferiblemente comprende al menos una mutación en una región seleccionada del grupo que consiste en la región constante C1, la región variable V1, la región variable V2, la región constante C2, la región constante C5 y el ectodominio de gp41.

En un aspecto más preferido, la mutación en la región constante C1 es una mutación en la posición 88. En un aspecto más preferido, el residuo mutado en la posición 88 es un Asp. En un aspecto aún más preferido, la mutación en la región constante C1 es una mutación N88D.

En un aspecto más preferido, la mutación en la región variable V1 es una mutación en una o más posiciones seleccionadas del grupo que consiste en las posiciones 131, 132 y 138. En un aspecto más preferido, los residuos mutados en las posiciones 131, 132 y 138 en la región V1 son Y, N y/o G, respectivamente. En un aspecto aún más preferido, la mutación en la región V1 es C131Y, T132N y/o D138G.

En un aspecto más preferido, la mutación en la región variable V2 es una mutación en una o más posiciones seleccionadas del grupo que consiste en las posiciones 160 y 187. En un aspecto más preferido, los residuos mutados en la región V2 son Y en la posición 160 y/o Asp en la posición 187. En un aspecto aún más preferido, la mutación en la región V2 es N160Y y/o N191D.

5 En un aspecto más preferido, la mutación en la región constante C2 es una mutación en la posición 219. En un aspecto más preferido, el residuo mutado en la posición 219 de la región C2 es Val. En un aspecto aún más preferido, la mutación en la región C2 es I219V.

10 En un aspecto más preferido, la mutación en la región constante C5 es una mutación en una o más posiciones seleccionadas del grupo que consiste en las posiciones 479 y 507. En un aspecto más preferido, los residuos mutados en las posiciones 479 y 507 en la región C5 son Ile y Trp, respectivamente. En un aspecto aún más preferido, la mutación en la región C5 es M475I y/o R507W.

15 En un aspecto más preferido, la variante de gp120 o fragmento de la misma según la divulgación tiene las mutaciones C131Y, T132N, D138G y N160Y.

En un aspecto más preferido, la variante de gp120 o fragmento de la misma según la divulgación tiene las mutaciones N88D, C131Y, T132N, D138G, N160Y, N191D, A226V, M479I, R507W e Y647N.

20 En otro aspecto, la variante de gp120 o fragmento de la misma según la divulgación tiene las mutaciones N203S y G604E.

En un aspecto más preferido, la mutación en el ectodominio de gp41 es T643N.

25 La numeración de las posiciones mencionadas anteriormente se refiere a la secuencia de la preproteína gp160 codificada por el gen *env* (SEQ ID NO: 1) del aislado AC10HXb2 de VIH representado en SEQ ID NO: 2, que está codificado por el gen *env* representado en SEQ ID NO: 1. Véase, Li, 2005, anteriormente y el número de acceso del NCBI AY835446.

30 El polipéptido inmunogénico según la invención comprende el polipéptido env del aislado LR1-C1 (SEQ ID NO: 4) codificado por polinucleótido de SEQ ID NO: 3. El aislado LR1-C1 contiene las mutaciones N88D, C131Y, T132N, D138G, T132N, N160Y, N191D, A226V, M479I, R507W e Y647N con respecto a la numeración de SEQ ID NO:2.

35 En un aspecto preferido, el polipéptido inmunogénico según la divulgación comprende el polipéptido env del clon 10 aislado con el anticuerpo PG16 (SEQ ID NO:31) o un fragmento del mismo. La secuencia modificada muestra las mutaciones N203S y G604E.

40 En un aspecto preferido, la variante inmunogénica de gp120 según la divulgación o el fragmento de la misma comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:29 y SEQ ID NO:31.

45 Aunque los mutantes de gp120 que muestran afinidad aumentada hacia anticuerpos neutralizantes que se han determinado en la presente descripción derivan del aislado AC10 de VIH (número de acceso del NCBI AY835446 y el gen *env* mostrado en SEQ ID NO: 1), se apreciará que los polipéptidos inmunogénicos según la presente divulgación pueden derivar de otros aislados de VIH cambiando las posiciones correspondientes en el gen *env* de dichos otros aislados de VIH. Las posiciones correspondientes en otros aislados de VIH se pueden determinar sin más usando cualquier algoritmo de alineamiento de secuencia adecuado.

50 Los métodos de alineamiento de secuencias para comparación se conocen bien en la técnica. El alineamiento óptimo de secuencia para comparación se puede realizar, 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, paquete de software genético de Wisconsin, Genetics Computer Group, Madison, WI, EE UU; Ausubel F, et al., Eds, "Short Protocols in Molecular Biology", 4ª Ed. (John Wiley and Sons, Inc., Nueva York, NY, EE UU).

60 Un "fragmento" es una parte única del polinucleótido que codifica el polipéptido de la envuelta de VIH de la presente divulgación más corto en longitud que la secuencia parental. De forma similar, el término "fragmento" se refiere a un polipéptido de envuelta de VIH-1 de la presente divulgación que comprende hasta la longitud completa de la secuencia peptídica definida menos un residuo de aminoácido y la secuencia codificante de nucleótidos de la misma. Por ejemplo, un fragmento puede comprender de 5 a 2500 nucleótidos o residuos de aminoácidos contiguos. Un fragmento usado como sonda, cebador, antígeno, molécula terapéutica o para otros fines, puede tener al menos

65

5, 10, 15, 16, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 75, 100, 150, 250, 500 o al menos 700 nucleótidos o residuos de aminoácidos contiguos de longitud. Los fragmentos se pueden seleccionar preferentemente de ciertas regiones de una molécula. Por ejemplo, un fragmento polipeptídico puede comprender una cierta longitud de aminoácidos contiguos seleccionados de los primeros 250 o 500 aminoácidos (o primer 25 por ciento o 50 por ciento) de un polipéptido mostrado en cierta secuencia definida. Claramente estas longitudes son ejemplares, y cualquier longitud que esté apoyada por la especificación, incluyendo la lista de secuencias, tablas y figuras, puede estar abarcada por los presentes aspectos.

La presente divulgación concierne a construcciones de ácido nucleico incluyendo secuencias de polinucleótidos que codifican polipéptidos gp120 antigénicos de VIH-1. Estos polinucleótidos incluyen secuencias de ADN, ADNc y ARN que codifican el polipéptido de interés.

El término "polinucleótido", como se usa en esta divulgación, se refiere a un polímero formado por un número variable de monómeros en donde los monómeros son nucleótidos, incluyendo tanto ribonucleótidos como desoxirribonucleótidos. Los polinucleótidos incluyen monómeros modificados por metilación, así como formas sin modificar. Los términos "polinucleótido" y "ácido nucleico" se usan de forma intercambiable en esta divulgación e incluyen ARNm, ADNc y polinucleótidos recombinantes. Como se usa en esta divulgación, los polinucleótidos no están limitados a polinucleótidos como aparecen en la naturaleza, sino que incluyen polinucleótidos que contienen análogos de nucleótidos y enlaces internucleotídicos no naturales.

Los métodos para la manipulación e inserción de los ácidos nucleicos de esta divulgación en vectores se conocen bien en la técnica. Véase, Sambrook, 1989, anteriormente y Ausubel F, *et al.*, Eds, "Short Protocols in Molecular Biology", 4ª Ed. (John Wiley and Sons, Inc., Nueva York, NY, EE UU, 2002).

Típicamente, las construcciones de ácido nucleico que codifican los polipéptidos gp120 de la divulgación son plásmidos. Sin embargo, se pueden utilizar otros vectores (por ejemplo, vectores víricos, fagos, cósmidos) para replicar los ácidos nucleicos. En el contexto de esta divulgación, las construcciones de ácido nucleico típicamente son vectores de expresión que contienen una secuencia promotora que facilita la transcripción eficaz de la secuencia genética insertada. El vector de expresión típicamente contiene un origen de replicación, un promotor, así como secuencias específicas de ácido nucleico que permiten la selección fenotípica de las células transformadas.

Más en general, las secuencias de polinucleótidos que codifican los polipéptidos gp120 de esta divulgación pueden estar operativamente unidas a cualquier promotor y/o potenciador capaz de dirigir la expresión del ácido nucleico tras la introducción en una célula huésped. Un promotor es una serie de secuencias control de ácido nucleico (que pueden estar) cerca del sitio de inicio de la transcripción, tal como en el caso del promotor tipo polimerasa II (un elemento TATA). Un promotor también puede incluir elementos distales potenciador o represor que pueden estar localizados tanto como a varios miles de pares bases del sitio de iniciación de la transcripción. Se incluyen tanto promotores constitutivos como inducibles. Véase, Bitter G, *et al.*, Meth. Enzymol. 1987; 153:516-544.

Para producir tales construcciones de ácidos nucleicos, las secuencias de polinucleótidos que codifican los polipéptidos gp120 se insertan en un vector de expresión adecuado, tal como un vector de expresión plasmídico. Los procedimientos para producir secuencias de polinucleótidos que codifican polipéptidos gp120 y para manipularlas *in vitro* las conocen bien los expertos en la materia. Véase, Sambrook, 1989 y Ausubel, 2002, anteriormente.

Las secuencias de polinucleótidos que codifican un polipéptido gp120 inmunogénico se pueden insertar en un vector de expresión incluyendo, pero no limitado a, un plásmido, virus u otro vehículo que se puede manipular para permitir la inserción o incorporación de secuencias que se pueden expresar en procariontes o eucariontes. Los huéspedes pueden incluir organismos microbianos, levaduras, insectos y mamíferos. Los métodos de expresar secuencias de ADN que tienen secuencias eucariontes o víricas en procariontes se conocen bien en la técnica. Los vectores de ADN víricos y plasmídicos biológicamente funcionales capaces de expresión y replicación en un huésped se conocen en la técnica.

La transformación de una célula huésped con ADN recombinante se puede llevar a cabo por técnicas convencionales que conocen bien los expertos en la materia. Donde el huésped es procarionte, tal como *E. coli*, se pueden preparar células competentes de que son capaces de captar ADN a partir de células recogidas después de la fase de crecimiento exponencial y tratar posteriormente por el método de CaCl₂ usando procedimientos bien conocidos en la técnica. De forma alternativa, se puede usar MgCl₂ o RbCl. La transformación también se puede realizar después de formar un protoplasto de la célula huésped si se desea, o por electroporación.

Cuando el huésped es un eucariota, se pueden usar tales métodos de transfección de ADN como coprecipitados de fosfato de calcio, procedimientos mecánicos convencionales tales como microinyección, electroporación, inserción de un plásmido encerrado en liposomas, o vectores víricos. Las células eucariontes también se pueden cotransformar con secuencias de polinucleótidos que codifican un polipéptido gp120 inmunogénico, y una segunda molécula de ADN exógeno que codifica un fenotipo seleccionable, tal como el gen de la timidina quinasa del herpes simple. Otro método es usar un vector vírico eucariota, tal como el virus simio 40 (SV40) o virus del papiloma bovino, para

infectar o transformar de forma transitoria células eucariotas y expresar la proteína. Véase, Gluzman Y, Ed., "Eukaryotic Viral Vectors" (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, EE UU, 1982).

C. Anticuerpos

Las variantes de gp120 y fragmentos de las mismas según la presente divulgación también se pueden usar para generar anticuerpos capaces de reconocer y neutralizar VIH cuando el virus o partículas del mismo están presentes en un líquido biológico de un sujeto. De esta manera, en otro aspecto, la divulgación se refiere a un anticuerpo que se une específicamente a un polipéptido inmunógeno según la divulgación.

Como se usa en la presente divulgación, el término "anticuerpo" se refiere a una proteína monomérica o multimérica que comprende al menos un polipéptido que tiene la capacidad de unirse a un antígeno determinado y comprende todo o parte de la región variable de la cadena ligera o pesada de una molécula de inmunoglobulina. Los anticuerpos de la divulgación incluyen, pero no están limitados a, anticuerpos monoclonales, anticuerpos mono-específicos, anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos, anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados, anticuerpos camelizados, anticuerpos quiméricos, anticuerpos de cadena sencilla, anticuerpos de dominio único, fragmentos Fab, fragmentos F(ab'), fragmentos F(ab')₂, fragmentos Fv (es decir, el módulo funcional más pequeño de un anticuerpo), Fv de cadena sencilla (scFV), Fv estabilizados por disulfuro (dsFV), Fd, V_H, V_L, V_α, V_β y anticuerpos anti-idiotípicos (anti-Id) (por ejemplo, anticuerpos anti-Id hacia anticuerpos de la invención), intracuerpos y fragmentos de unión a epítomos de cualquiera de los anteriores. En algunos aspectos los anticuerpos son anticuerpos monoclonales. En otros aspectos, los anticuerpos son fragmentos Fv, incluyendo regiones V_H y V_L.

Estos anticuerpos se pueden generar por medios convencionales utilizando los péptidos de esta divulgación. Véase, Kieber-Emmons T, *et al.*, WO1991004273. Por ejemplo, se pueden generar anticuerpos policlonales estimulando de forma convencional el sistema inmunitario de un animal seleccionado con uno o ambos de los péptidos identificados anteriormente o construcciones multivalentes, lo que permite que el sistema inmunitario produzca anticuerpos naturales contra ellos, y recoger estos anticuerpos de la sangre del animal u otro líquido biológico. Se pueden obtener anticuerpos policlonales de título alto usando las construcciones multivalentes descritas anteriormente como antígenos. Los anticuerpos resultantes son capaces de unirse al antígeno de VIH seleccionado como aparece en los líquidos biológicos de un sujeto infectado.

Además, también se pueden usar los péptidos de la presente divulgación para generar anticuerpos que se pueden usar como moldes para generar anticuerpos anti-idiotípicos que tienen la imagen interna de la estructura del epítipo neutralizante contenida en la secuencia del péptido. Estos anticuerpos, policlonales o monoclonales, se pueden usar después en formulaciones de vacuna o en inmunoterapia activa. Según esto, la presente divulgación también incluye anticuerpos monoclonales o policlonales que tienen la imagen interna de los péptidos, así como métodos para generar estos anticuerpos. Véase, Kieber-Emmons, anteriormente.

Donde sea deseable obtener y utilizar anticuerpos monoclonales (Acm) para las composiciones y métodos de esta divulgación, se pueden generar líneas de células de hibridoma que expresen los MAc deseables usando líneas de células tumorales disponibles. Véase, Köhler G, Milstein C, Nature 1975; 256(5517):495-497.

Se pueden generar anticuerpos recombinantes usando técnicas conocidas para su producción. Véase, Huse W, *et al.*, Science 1989; 246:1275-1281. También se pueden generar anticuerpos de título alto deseables aplicando técnicas recombinantes conocidas a los anticuerpos monoclonales o policlonales desarrollados hacia estos antígenos. Véase, Amit R, *et al.*, Science 1986; 233:747-753, Queen C, *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1988; 86:10029-10033; Riechmann L, *et al.*, Nature 1988; 332:323-327 y Barbas C, *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1992; 89:4457-4461 y Winter P, GB 2188638.

D. Composiciones inmunogénicas capaces de generar anticuerpos neutralizantes

Los polipéptidos gp120 variantes y moléculas de ácido nucleico que codifican los polipéptidos gp120 variantes divulgados en el presente documento se pueden usar como inmunógenos o para producir inmunógenos para provocar una respuesta inmunitaria (composiciones inmunogénicas) contra gp120 o un virus que expresa gp120 para prevenir, reducir o controlar, por ejemplo, la infección por VIH-1 o sus síntomas. Después de la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de las composiciones terapéuticas divulgadas, se puede seguir al sujeto para infección por VIH-1, síntomas asociados con la infección por VIH-1 o ambos. De esta manera, en otro aspecto, la divulgación se refiere a una composición inmunogénica que comprende un polipéptido gp120 variante de VIH-1 o un fragmento inmunogénico del mismo según la divulgación, un polinucleótido que codifica dicho polipéptido o un vector de expresión que comprende dicho polinucleótido.

Los fragmentos inmunogénicos adecuados de gp120 para uso en las composiciones inmunogénicas incluyen péptidos de tamaño relativamente pequeño, tal como aproximadamente de 5 a 100 aminoácidos de tamaño, por ejemplo, aproximadamente 5, aproximadamente 6, aproximadamente 7, aproximadamente 8, aproximadamente 9, aproximadamente 10, aproximadamente 15, aproximadamente 20, aproximadamente 25, aproximadamente 30,

aproximadamente 40, aproximadamente 50, aproximadamente 60, aproximadamente 70, aproximadamente 80, aproximadamente 90 o aproximadamente 100. De esta manera, se pueden usar fragmentos (por ejemplo, epítomos u otros fragmentos antigénicos) de un polipéptido gp120, tal como cualquiera de los polipéptidos gp120 descritos en el presente documento o un fragmento de los mismos como inmunógenos.

El término "composición inmunogénica" se refiere a una composición que provoca una respuesta inmunitaria que produce anticuerpos o respuestas inmunitarias celulares contra un inmunógeno específico. Se pueden preparar composiciones inyectables, por ejemplo, como soluciones, suspensiones y emulsiones líquidas. El término "composición inmunogénica" se refiere a una composición que puede ser reconocida por un sistema inmunitario huésped. Por ejemplo, una composición antigénica contiene epítomos que pueden reconocer componentes humorales (por ejemplo, anticuerpo) y/o celulares (por ejemplo, linfocitos T) de un sistema inmunitario huésped.

El término "vacuna" se refiere a una composición inmunogénica para administración *in vivo* a un huésped, que puede ser un primate, particularmente un huésped humano, para conferir protección contra enfermedad, particularmente una enfermedad vírica.

Las composiciones inmunogénicas según la divulgación son útiles para el tratamiento o prevención de enfermedades causadas por una infección de VIH. En un aspecto adicional, la divulgación se refiere a un péptido, un ácido nucleico, un vector, una composición inmunogénica o una vacuna según la divulgación para uso en la prevención de una enfermedad resultante de una infección por VIH-1. De forma alternativa, la invención se refiere al uso de un péptido, un ácido nucleico, un vector, una composición inmunogénica o una vacuna según la divulgación para la fabricación de un medicamento para la prevención de una enfermedad resultante de infección por VIH-1. De forma alternativa, la divulgación se refiere a un método para la prevención en un sujeto de una enfermedad resultante de infección por VIH-1 que comprende la administración a dicho sujeto de un péptido, un ácido nucleico, un vector, una composición inmunogénica o una vacuna según la divulgación.

El término "tratamiento", como se usa en el presente documento comprende cualquier tipo de terapia, cuyo fin es terminar, prevenir, mejorar y/o reducir la susceptibilidad a un estado clínico descrita en el presente documento. En una forma de realización preferida, el término tratamiento se refiere a tratamiento profiláctico (es decir, una terapia para reducir la susceptibilidad a un estado clínico, un trastorno o afección como se define en el presente documento).

De esta manera, "tratamiento", "tratar" y similares, como se usan en el presente documento, se refieren a obtener un efecto farmacológico y/o fisiológico deseado, que cubre cualquier tratamiento de un afección patológica o trastorno en un mamífero incluyendo un ser humano. El efecto puede ser profiláctico en términos de prevenir completa o parcialmente un trastorno o síntoma del mismo y/o puede ser terapéutico en términos de una cura parcial o completa para un trastorno y/o efecto adverso atribuible al trastorno. Esto es, "tratamiento" incluye (1) prevenir que el trastorno se produzca o reaparezca en un sujeto, (2) inhibir el trastorno, tal como parar su desarrollo, (3) parar o terminar el trastorno o al menos los síntomas asociados con el mismo, de modo que el huésped no padezca más el trastorno o sus síntomas, tal como producir regresión del trastorno o sus síntomas, por ejemplo, restaurar o reparar una función perdida, que falta o defectuosa, o estimular un proceso ineficaz, o (4) mitigar, aliviar o mejorar el trastorno, o síntomas asociados con el mismo, donde se usa mejora en un sentido amplio para referirse a al menos una reducción en la magnitud de un parámetro, tal como inflamación, dolor y/o deficiencia inmunitaria.

Los términos "prevenir" y "prevención", como se usan en el presente documento, se refieren a un descenso en la aparición de células patológicas en un animal. La prevención puede ser completa (por ejemplo, la ausencia total de células patológicas en un sujeto). La prevención también puede ser parcial, de modo que por ejemplo la aparición de células patológicas en un sujeto es menor que la que se habría producido sin la presente divulgación. Prevención también se refiere a susceptibilidad reducida a una afección clínica.

Las composiciones inmunogénicas según la divulgación pueden comprender además un soporte farmacéuticamente aceptable.

Un "soporte farmacéuticamente aceptable", "diluyente farmacéuticamente aceptable" o "excipiente farmacéuticamente aceptable" o "vehículo farmacéuticamente aceptable", usados de forma intercambiable en el presente documento, se refiere a un relleno, diluyente, material encapsulante o formulación auxiliar de cualquier tipo convencional sólido, semisólido o líquido no tóxico. Un soporte farmacéuticamente aceptable es esencialmente no tóxico para los receptores a las dosis y concentraciones empleadas y es compatible con otros ingredientes de la formulación. Por ejemplo, el soporte para una formulación que contiene polipéptidos normalmente no incluiría agentes oxidantes y otros compuestos que se sabe que son dañinos para los polipéptidos. Los soportes adecuados incluyen, pero no están limitados a, agua, dextrosa, glicerol, solución salina, etanol y combinaciones de los mismos. El soporte puede contener agentes adicionales tales como agentes humectantes o emulsionantes, agentes reguladores del pH o adyuvantes que aumentan la eficacia de la formulación. Los adyuvantes de podrían seleccionar por ejemplo, de grupo que consiste en: $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2$, $\text{AlNa}(\text{SO}_4)_2$, $\text{AlNH}_4(\text{SO}_4)$, sílice, alúmina, $\text{Al}(\text{OH})_3$, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, caolín, carbono, hidróxido de aluminio, muramil dipéptidos, N-acetil-muramil-L-treonil-D-isoglutamina (thr-DMP), N-acetil-normuramil-L-alanil-D-isoglutamina (CGP 11687, también denominado nor-MDP), N-acetilmuramil-L-alanil-D-

isoglutaminil-L-alanina-2-(1'2'-dipalmitoil-sn-glicero-3-hidroxfosforiloxi)-etilamina (CGP 19835A, también denominada MTP-PE), RIBI (MPL+TDM+CWS) en una emulsión al 2 por ciento de escualeno/Tween-80®, lipopolisacáridos y sus varios derivados, incluyendo lípido A, adyuvante completo de Freund (FCA), adyuvantes incompletos de Freund, adyuvante 65 de Merck, polinucleótidos (por ejemplo, ácidos poli IC y poli AU), cera D de Mycobacterium, tuberculosis, sustancias encontradas en *Corynebacterium parvum*, *Bordetella pertussis*, y miembros del género *Brucella*, Titermax, ISCOMS, Quil A, ALUN, derivados de lípido A, derivados de la toxina del cólera, derivados de HSP, derivados de LPS, matrices peptídicas sintéticas o GMDP, interleuquina 1, interleuquina 2, Montanide ISA-51 y QS-21, oligonucleótido CpG, poli I:C y GM-CSF. Véase Hunter R, US 5.554.372, y Jager E, Knuth A, WO1997028816.

Se puede unir de forma covalente un polipéptido gp120 variante según la divulgación a un soporte, que es una macromolécula inmunogénica a la que se puede unir una molécula antigénica. Cuando está unido a un soporte, el polipéptido unido se hace más inmunogénico. Los soportes se eligen para aumentar la inmunogenicidad de la molécula unida y/o inducir títulos mayores de anticuerpos contra el soporte que son diagnóstica, analítica y/o terapéuticamente beneficiosos. La unión covalente de una molécula a un soporte puede conferir inmunogenicidad aumentada y dependencia de células T. Véase, Pozsgay V, *et al.*, PNAS 1999; 96:5194-5197, Lee S, *et al.*, J. Immunol. 1976; 116:1711-1718 y Dintzis R, *et al.*, PNAS 1976; 73:3671-3675. Soportes útiles incluyen soportes poliméricos, que pueden ser naturales (por ejemplo, polisacáridos, polipéptidos o proteínas de bacterias o virus), materiales semisintéticos o sintéticos que contienen uno o más grupos funcionales a los que se pueden unir un grupo reactivo. También se pueden usar como soportes productos bacterianos y proteínas víricas (por ejemplo, antígeno de superficie y antígeno central del virus de la hepatitis B), así como proteínas de organismos superiores tal como hemocianina de lapa californiana, hemocianina de cangrejo bayoneta, edestina, seroalbúminas de mamífero e inmunoglobulinas de mamífero. Productos bacterianos adicionales para uso como soportes incluyen proteínas de la pared bacteriana y otros productos (por ejemplo, paredes celulares y lipopolisacárido (LPS) de estreptococos y estafilococos).

La presente divulgación se refiere además a prevenir o reducir síntomas asociados con 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, tuberculosis reactivada e infecciones recurrentes por herpes, tal como herpes labial (herpes simple). Los síntomas de SIDA en estado más avanzado que se pueden tratar según la presente divulgación, 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.

Los efectos beneficiosos de los péptidos, ácidos nucleicos y vectores de la divulgación 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 a través de terapia anti-retroviral (TAR); aumentar los niveles de células T CD4 o reducir el descenso en células 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.

La composición inmunogénica se puede administrar por cualquier medio que conozca el experto en la materia, tal como mediante inyección intramuscular, subcutánea o intravenosa, y administración oral, nasal o anal. Véase, Banga A, "Parenteral Controlled Delivery of Therapeutic Peptides and Proteins", en *Therapeutic Peptides and Proteins* (Technomic Publishing Co., Inc., Lancaster, PA, EE UU, 1995). Para prolongar el tiempo durante el que está disponible el péptido o proteína para estimular una respuesta, se puede suministrar el péptido o proteína como un implante, una inyección oleaginoso o como un sistema particulado. El sistema particulado puede ser una micropartícula, una microcápsula, una microesfera, una nanocápsula, o partícula similar. Véase Banga, 1995, anteriormente. Se ha mostrado que un soporte particulado basado en un polímero sintético actúa como adyuvante para aumentar la respuesta inmunitaria, además de proporcionar una liberación controlada. También se pueden usar sales de aluminio como adyuvantes para producir una respuesta inmunitaria.

Se pueden formular composiciones inmunogénicas en formas farmacéuticas unitarias, adecuadas para la administración individual de dosis precisas. En dosis pulsadas, se proporciona una administración embolada de una composición inmunogénica que incluye un inmunógeno divulgado, seguido por un periodo de tiempo en donde no se administra inmunógeno divulgado al sujeto, seguido por una segunda administración embolada. Se puede administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición inmunogénica en una dosis única, o en dosis múltiples, por ejemplo, a diario, durante un ciclo de tratamiento. En ejemplos específicos, no limitantes, se

administran dosis pulsadas de una composición inmunogénica que incluye un inmunógeno divulgado durante el curso de un día, durante el curso de una semana o durante el curso de un mes.

5 Las composiciones inmunogénicas se pueden administrar siempre que se desee el efecto (tal como signos, síntomas o resultados analíticos de infección por VIH-1 disminuidos). En general, la dosis es suficiente para tratar o mejorar síntomas o signos de enfermedad sin producir toxicidad inaceptable al sujeto. Se puede utilizar administración sistémica o local.

10 Las cantidades eficaces para el uso terapéutico pueden depender de la gravedad de la enfermedad y la edad, peso, estado general del paciente y otros factores clínicos. De esta manera, la determinación final de la pauta de tratamiento apropiada la hará el médico. Típicamente, las dosis usadas *in vitro* pueden proporcionar directrices útiles en las cantidades útiles para la administración *in situ* de la composición farmacéutica, y se pueden usar modelos animales para determinar dosis eficaces para el tratamiento de trastornos particulares. Véase Gilman R, *et al.*, Eds., Goodman and Gilman's: The Pharmacological Basis of Therapeutics, 8ª Ed. (Pergamon Press, Nueva York, NY, EE UU, 1990) y Gennaro A, Ed., Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª Ed. (Mack Publishing Co., Easton, PA, EE UU, 1990). Típicamente, el intervalo de dosis para un polipéptido gp120 es desde alrededor de 0,1 µg/kg de peso corporal hasta alrededor de 100 mg/kg de peso corporal. Otros intervalos adecuados incluyen dosis desde alrededor de 1 µg/kg hasta 10 mg/kg de peso corporal. En un ejemplo, la dosis es alrededor de 1,0 µg hasta alrededor de 50 mg, por ejemplo, de 1 µg a 1 mg, tal como 1 mg de péptido por sujeto. El plan de dosis puede variar de a diario hasta tan raramente como una vez al año, dependiendo de factores clínicos, tales como la sensibilidad del sujeto al péptido y el ritmo de su enfermedad. Por tanto, un sujeto puede recibir una primera dosis de una molécula terapéutica divulgada, y después recibir una segunda dosis (o incluso más dosis) a tiempo(s) posterior(es), tal como al menos un día después, tal como al menos una semana después.

25 Las composiciones farmacéuticas divulgadas en el presente documento se pueden preparar y administrar en formas farmacéuticas. Las formas farmacéuticas sólidas incluyen comprimidos, cápsulas, sistemas de administración transdérmica y supositorios. La administración de una cantidad terapéutica se puede llevar a cabo tanto por administración única en forma de una forma farmacéutica individual o como varias formas farmacéuticas más pequeñas como por administraciones múltiples de dosis subdivididas a intervalos específicos. Las dosis únicas o divididas adecuadas incluyen, pero no están limitadas a, alrededor de 0,01, 0,1, 0,5, 1, 3, 5, 10, 15, 30 o 50 µg de proteína/kg/día.

35 Las construcciones de ácido nucleico que codifican los polipéptidos gp120 antigénicos descritos en el presente documento se usan, por ejemplo, en combinación, como composiciones farmacéuticas (medicamentos) para uso en pautas terapéuticas, por ejemplo, profilácticas (tal como vacunas) y se administran a sujetos (por ejemplo, sujetos primates, tales como sujetos humanos) para provocar una respuesta inmunitaria contra uno o más clados o cepas de VIH. Por ejemplo, las composiciones descritas en el presente documento se pueden administrar a un sujeto humano (o no humano) antes de la infección con VIH para inhibir la infección por o replicación del virus. De esta manera, las composiciones farmacéuticas descritas anteriormente se pueden administrar a un sujeto para provocar una respuesta inmunitaria protectora contra VIH. Para provocar una respuesta inmunitaria, se administra una cantidad terapéuticamente eficaz (por ejemplo, inmunológicamente eficaz) de las construcciones de ácido nucleico a un sujeto, tal como un sujeto humano (o no humano).

45 La inmunización por construcciones de ácido nucleico se conoce bien y se enseña en la técnica, por ejemplo. Véase, Robinson H, *et al.*, US 5.643.578 (que describe métodos de inmunizar vertebrados introduciendo ADN que codifica un antígeno deseado para provocar una respuesta celular o humoral); Weiner D, *et al.*, US 5.593.972 y Weiner D, *et al.*, US 5.817.637 (que describe unir operativamente una secuencia de ácido nucleico que codifica un antígeno a secuencias reguladoras que permiten la expresión), y Urban R, *et al.*, US 5.880.103 (que describe varios métodos de administración de ácidos nucleicos que codifican péptido inmunogénicos u otros antígenos a un organismo). Los métodos incluyen administración liposomal de ácidos nucleicos (o de los péptidos sintéticos mismos), y construcciones inmunostimuladoras, o ISCOMS® estructuras similares a jaulas negativamente cargadas de 30-40 nm de tamaño formadas espontáneamente al mezclar colesterol y QUILA® (saponina).

55 Para la administración de moléculas de ácido nucleico de gp120, el ácido nucleico se puede administrar intracelularmente, por ejemplo, mediante expresión a partir de un vector de expresión de ácido nucleico apropiado que se administra de modo que se hace intracelular, tal como mediante el uso de un vector retroviral, por inyección directa, mediante el uso de bombardeo de micropartículas (por ejemplo, un cañón de genes; Biolistic, Dupont Corp., Delaware, DE, EE UU), recubrimiento con lípidos, receptores de superficie o agentes de transfección, o por administración en unión a un péptido similar a homeobox que se sabe que entra en el núcleo. Véase Morgan J, *et al.*, US 4.980.286, y Joliot A, *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1991; 88:1864-1868. La presente divulgación incluye todas las formas de administración de ácidos nucleicos, incluyendo oligos sintéticos, ADN desnudo, plásmido y vírico, integrado o no en el genoma.

65 En otro enfoque para usar ácidos nucleicos para inmunización, también se puede expresar un polipéptido gp120 inmunogénico mediante huéspedes víricos atenuados o vectores o vectores bacterianos. Se pueden usar virus vaccinia recombinante, virus adenoasociados (AAV), virus del herpes, retrovirus u otros vectores víricos para

expresar el péptido o proteína, provocando de esta manera una respuesta de LTC. Por ejemplo, vectores vaccinia y métodos útiles en protocolos de inmunización de TB proporcionan otros vehículos potenciales para los péptidos de la divulgación. Véase Paoletti E, *et al.*, US 4.722.848, y Stover C, *et al.*, Nature 1991; 351:456-460.

5 En un ejemplo, se utiliza un vector vírico. Estos vectores incluyen, pero no están limitados a, adenovirus, herpesvirus, vaccinia o un virus de ARN tal como un retrovirus. En un ejemplo, el vector retroviral es un derivado de un retrovirus murino o aviar. Ejemplos de vectores retrovirales en los que se puede insertar un único gen exógeno incluyen, pero no están limitados a: virus de la leucemia murina de Moloney (MoMuLV), virus del sarcoma murino de Harvey (HaMuSV), virus del tumor mamario murino (MuMTV) y virus del sarcoma de Rous (RSV). Cuando el sujeto
10 es un ser humano, se puede utilizar un vector tal como el virus de la leucemia del mono del gibón (GaLV). Un número de vectores retrovirales adicionales pueden incorporar múltiples genes. Todos estos vectores pueden transferir o incorporar un gen para un marcador seleccionable de modo que se puedan identificar y generar células transducidas. Insertando una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido gp120 en el vector vírico, junto con otro gen que codifica el ligando para un receptor en una célula diana específica, por ejemplo, el vector es ahora específico de diana. Los vectores retrovirales se pueden hacer específicos de diana uniendo, por ejemplo, un
15 azúcar, un glicolípido o una proteína. El direccionamiento preferido se logra usando un anticuerpo para dirigir el vector retroviral. Los expertos en la materia saben de, o pueden determinar fácilmente sin experimentación excesiva, secuencias específicas de polinucleótidos que se pueden insertar en el genoma retroviral o unir a la envuelta vírica para permitir la distribución específica de diana del vector retroviral que contiene el polinucleótido que codifica un polipéptido gp120.
20

Las formulaciones adecuadas para las construcciones del ácido nucleico, incluyen soluciones acuosas y no acuosas, soluciones isotónicas estériles, que pueden contener antioxidantes, tampones y bacteriostáticos, y suspensiones acuosas y no acuosas estériles que pueden incluir agentes suspensores, solubilizantes, agentes
25 espesantes, estabilizantes y conservantes. Las formulaciones se pueden presentar en envases unidos o multidosis sellados, tal como ampollas y viales, y se pueden almacenar en condición liofilizada que requiere solo la adición del soporte líquido estéril, por ejemplo, agua, inmediatamente antes del uso. Se pueden preparar soluciones y suspensiones extemporáneas de polvos estériles, gránulos y comprimidos. Preferiblemente, el soporte es una solución salina tamponada. Más preferiblemente, la composición para uso en el método se formula para proteger las construcciones de ácido nucleico del daño antes de la administración. Por ejemplo, la composición se puede
30 formular para reducir la pérdida de los vectores adenovirales en dispositivos usados para preparar, almacenar o administrar el vector de expresión, tal como material de vidrio, jeringuillas o agujas. Las composiciones se pueden formular para disminuir la sensibilidad a la luz y/o sensibilidad a temperatura de los componentes. Para este fin, la composición preferiblemente comprende un soporte líquido farmacéuticamente aceptable, tal como, por ejemplo, los descritos anteriormente, y un agente estabilizador seleccionado del grupo que consiste en polisorbato 80, L-arginina, polivinilpirrolidona, trehalosa y combinaciones de los mismos.
35

En aplicaciones terapéuticas, se administra una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición a un sujeto antes de o después de exposición a o infección por VIH. Cuando se administran antes de la exposición, la aplicación
40 terapéutica se puede denominar administración profiláctica (tal como en forma de una vacuna). Administraciones únicas o múltiples de las composiciones se administran dependiendo de la dosis y frecuencia según se requiera y tolere el sujeto. En un aspecto, la dosis se administra una vez como inyección i.v. rápida, pero en otro aspecto se puede aplicar periódicamente hasta que se alcanza un efecto terapéutico, tal como una respuesta inmunitaria protectora. En general, la dosis es suficiente para tratar o mejorar síntomas o signos de enfermedad sin producir toxicidad inaceptable al sujeto. Se puede utilizar administración sistémica o local.
45

En el contexto de vacunas de ácido nucleico, se pueden administrar composiciones inmunoestimuladoras naturales o sintéticas que se unen a y estimulan receptores implicados en inmunidad innata junto con construcciones de ácido nucleico que codifican los polipéptidos gp120. Por ejemplo, se pueden administrar agentes que estimulan ciertos
50 receptores tipo Toll (tal como TLR7, TLR8 y TLR9) en combinación con las construcciones de ácido nucleico que codifican los polipéptidos gp120. En algunos aspectos, se administra la construcción de ácido nucleico en combinación con oligonucleótidos inmunoestimuladores CpG.

Las construcciones de ácido nucleico que codifican polipéptidos gp120 se pueden introducir *in vivo* como plásmidos de ADN desnudo. Se pueden introducir vectores de ADN en las células huésped deseadas por métodos conocidos en la técnica incluyendo, pero no limitados a, transfección, electroporación (por ejemplo, electroporación
55 transcutánea), microinyección, transducción, fusión celular, DEAE dextrano, precipitación de fosfato de calcio, uso de un cañón de genes, o uso de un transportador de vector de ADN. Véase Wu C, *et al.*, J. Biol. Chem. 1992; 267:963-967, Wu C y Wu G, Biol. Chem. 1988; 263:14621-14624, y Williams R, *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1991; 88:2726-2730. Los métodos para formular y administrar ADN desnudo a tejido muscular de mamífero también se conocen. Véase Felgner P, *et al.*, US 5.580.859 y US 5.589.466. Otras moléculas también son útiles para facilitar la transfección de un ácido nucleico *in vivo*, tales como oligopéptidos catiónicos, péptidos derivados de proteínas de unión a ADN o polímeros catiónicos. Véase Bazile D, *et al.*, WO1995021931 y Byk G, *et al.*, WO1996025508.
60

65 Otro método bien conocido que se puede usar para introducir construcciones de ácido nucleico que codifican inmunógenos gp120 en células huésped es el bombardeo de partículas (por otro nombre transformación biolística).

La transformación biológica se logra comúnmente en una de varias maneras. Un método común implica impulsar partículas inertes o biológicamente activas a células. Véase Sanford J, *et al.*, US 4.945.050, US 5.036.006 y US 5.100.792.

5 De forma alternativa, el vector se puede introducir *in vivo* por lipofección. El uso de lípidos catiónicos puede fomentar la encapsulación de ácidos nucleicos negativamente cargados, y también fomentar la fusión con membranas negativamente cargadas. Véase Felgner P, Ringold G, *Science* 1989; 337:387-388. Se han descrito compuestos lipídicos y composiciones particularmente útiles para la transferencia de ácidos nucleicos. Véase Felgner P, *et al.*, US 5.459.127, Behr J, *et al.*, WO1995018863 y Byk G, WO1996017823.

10 Como con el polipéptido inmunogénico, las composiciones de ácido nucleico se pueden administrar en una única dosis o en dosis múltiples separadas por un intervalo de tiempo para provocar una respuesta inmunitaria contra VIH. Por ejemplo, se pueden administrar dos dosis, o tres dosis, o cuatro dosis, o cinco dosis, o seis dosis o más a un sujeto durante un periodo de varias semanas, varios meses o incluso varios años, para optimizar la respuesta inmunitaria.

15 Puede ser ventajoso administrar las composiciones inmunogénicas divulgadas en el presente documento con otros agentes tales como proteínas, péptidos, anticuerpos y otros agentes anti-VIH. Ejemplos de tales agentes terapéuticos anti-VIH incluye inhibidores nucleósidos de transcriptasa inversa, tales como abacavir, AZT, didanosina, emtricitabina, lamivudina, estavudina, tenofovir, zalcitabina, zidovudina, y similares, inhibidores no nucleósidos de transcriptasa inversa, tales como delavirdina, efavirenz, nevirapina, inhibidores de proteasas tales como amprenavir, atazanavir, indinavir, lopinavir, nelfinavir, osamprenavir, ritonavir, saquinavir, tipranavir, y similares e inhibidores de fusión tales como efuvirtida y similares. En ciertos aspectos, las composiciones inmunogénicas se administran al mismo tiempo que otros agentes terapéuticos anti-VIH. En ciertos aspectos, las composiciones inmunogénicas se administran secuencialmente con otros agentes terapéuticos anti-VIH, tal como antes o después del otro agente. El experto en la materia sabría que la administración secuencial puede significar inmediatamente después o después de un periodo de tiempo apropiado, tal como horas, días, semanas, meses o incluso años después.

30 *E. Métodos para la detección de anticuerpos anti-VIH en una muestra biológica y métodos para la detección de una respuesta de anticuerpos neutralizantes*

Los inmunógenos descritos en la presente divulgación son adecuados para la identificación en una muestra de un paciente de anticuerpos específicos para dichos inmunógenos. Puesto que los inmunógenos según la presente divulgación específicamente se unen a anticuerpos neutralizantes, los inmunógenos se pueden usar para la detección de esos pacientes que han desarrollado anticuerpos neutralizantes. De esta manera, los anticuerpos pueden ayudar en la identificación de terapias personalizadas basadas en si un paciente muestra anticuerpos neutralizantes o no. De esta manera, en otro aspecto, la divulgación se refiere a un método para la detección en una muestra de anticuerpos neutralizantes específicos hacia un virus que comprende:

- 40
- (i) poner en contacto dicha muestra con un polipéptido según la divulgación, y
 - (ii) detectar la formación de un complejo inmune entre dicho polipéptido.

45 Los términos y expresiones "anticuerpos neutralizantes", "virus", "polipéptido" se han descrito en detalle anteriormente.

En un aspecto preferido, el virus es VIH y el polipéptido es un polipéptido variante gp120 o un fragmento inmunogénico del mismo como se ha definido anteriormente. En un aspecto más preferido, la muestra es de un paciente infectado con VIH-1 o de un receptor de vacuna contra el SIDA.

50 Se puede usar cualquiera de una amplia variedad de formatos de ensayo según los métodos de la presente divulgación. Tales formatos pueden ser heterogéneos u homogéneos, secuenciales o simultáneos, competitivos o no competitivos. Véase Peterson M, *et al.*, US 5.563.036, Cheng A, *et al.*, US 5.627.080, Lee J, *et al.*, US 5.633.141, Peterson M, *et al.*, US 5.679.525, Draetta G, *et al.*, US 5.691.147, Lucas F, *et al.*, US 5.698.411, Yan C, *et al.*, US 5.747.352, Davidson R, US 5.811.526, Oh C, *et al.*, US 5.851.778 y Landrum E, *et al.*, US 5.976.822. Tales ensayos se pueden formatear para que sean cuantitativos, para medir la concentración o cantidad de un anticuerpo anti-VIH, o se pueden formatear para que sean cualitativos, para medir la presencia o ausencia de un anticuerpo anti-VIH. Descripciones adicionales de inmunoensayos que se pueden adaptar para uso según los principios de la presente divulgación están disponibles en la bibliografía científica. Véase Gnann J, *et al.*, *Methods Enzymol.* 1989; 178:693-714, Doppel S, *et al.*, *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 1991; 29:331-337, Manocha M, *et al.*, *Immunol. Lett.* 2003; 85(3):275-278), Brattegaard K, *et al.*, *AIDS* 1995; 9(6):656-657, Beristain C, *et al.*, *J. Clin. Lab. Anal.* 1995; 9:347-350, Modrow S, *et al.*, *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 1989; 2:141-148, Gueye-Ndiaye A, *et al.*, *AIDS* 1993; 7:475-481, Sabatier J, *et al.*, *AIDS* 1989; 3:215-220, Sommerfelt M, *et al.*, *Expert Opin. Biol. Ther.* 2004; 4:349-361, Alcaro M, *et al.*, *Curr. Protein Pept. Sci.* 2003; 4:285-290, Smith R, *et al.*, *Arch. Pathol. Lab. Med.* 1990; 114:254-258, Petrov R, *et al.*, *Biomed. Sci.* 1990; 1:239-244, Zolla-Pazner S, *Nat. Rev. Immunol.* 2004; 4:199-210, Baillou A, *et al.*, *J. Clin. Microbiol.* 1991; 29:1387-1391, y McGaughey G, *et al.*, *Curr. HIV Res.* 2004; 2:193-204.

Las técnicas de inmunoensayos heterogéneos implican típicamente el uso de un material de fase sólida al que se une el producto de reacción, pero se puede adaptar para implicar la unión de antígenos y anticuerpos no inmovilizados (es decir, un inmunoensayo en fase solución). El producto de reacción se separa del exceso de muestra, reactivos del ensayo y otras sustancias eliminando la fase sólida de la mezcla de reacción (por ejemplo, mediante lavados). Un tipo de inmunoensayo en fase sólida que se puede usar según la presente divulgación es un inmunoensayo sándwich. En el ensayo sándwich, cuanto más analito hay presente en la muestra, mayor es la cantidad de marcador presente en la fase sólida. Este tipo de formato de ensayo en general es preferido, especialmente para la visualización de bajas concentraciones de analito, porque la aparición de marcador en la fase sólida se detecta más fácilmente.

Según un aspecto preferido de la presente divulgación, un péptido de la presente divulgación que es específicamente reactivo con un anticuerpo anti-VIH se une a un soporte sólido (es decir, inmovilizar) e incuba en contacto con la muestra biológica en la que se prueba la presencia de un anticuerpo anti-VIH. Se puede añadir un agente bloqueante para reducir la unión no específica.

Como se apreciará, el péptido se puede incubar con la muestra biológica en un estado no unido y unirse posteriormente al soporte sólido (es decir, inmovilizar). Los soportes se tratan luego preferiblemente de forma extensa (por ejemplo, lavando) para eliminar sustancialmente los anticuerpos no contra VIH que pueden estar presentes pero que han fracasado en unirse al péptido unido. Como resultado de tal tratamiento, se forma un complejo inmunitario entre el péptido y el anticuerpo anti-VIH.

Después se añade preferiblemente un segundo anticuerpo detectablemente marcado (capaz de unirse al anticuerpo inicial (por ejemplo, un anticuerpo anti-IgG humano)) y el soporte se incuba en condiciones suficientes para permitir que el segundo anticuerpo se una a cualquier anticuerpo anti-VIH que pueda estar presente. El soporte se trata luego preferiblemente de forma extensa (por ejemplo, lavando) para eliminar sustancialmente cualquier segundo anticuerpo no unido. Si está presente un anticuerpo anti-VIH en la muestra de prueba, los dos anticuerpos formarán un complejo inmune con el péptido inmovilizado (es decir, un sándwich segundo anticuerpo/anticuerpo anti-VIH/péptido inmovilizado). En tal ensayo, la detección del segundo anticuerpo unido al soporte es indicativa de anticuerpo anti-VIH en la muestra que se prueba. Véase Schuurs A, *et al.*, US 3.791.932 y US 4.016.043 y Pankratz T, *et al.*, US 5.876.935. El segundo anticuerpo puede ser una inmunoglobulina natural aislada de una especie no humana (por ejemplo, anticuerpo murino anti-IgG humana, anticuerpo de cabra anti-IgG humana, anticuerpo de cabra anti-IgM humana) o se puede producir de forma recombinante o sintética. Puede ser una inmunoglobulina o un fragmento de inmunoglobulina (por ejemplo, FAb, F[Ab]₂). Según se desee, se pueden emplear otras moléculas de unión (capaces de unirse a anticuerpos anti-VIH) junto con o en lugar de tales segundos anticuerpos. Por ejemplo, los anticuerpos anti-VIH se pueden biotinilar y el segundo anticuerpo se puede cambiar por avidina o estreptavidina marcada.

Para eliminar la etapa de separación unido-libre y reducir el tiempo y equipo necesarios para un ensayo de unión química, se puede emplear de forma alternativa un formato de ensayo homogéneo. En tales ensayos, un componente del par de unión puede estar aún inmovilizado; sin embargo, la presencia del segundo componente del par de unión se detecta sin una separación unido-libre. Ejemplos de métodos ópticos homogéneos son el método EMIT (Syva, Sunnyvale, CA, EE UU), que opera mediante detección de extinción de fluorescencia; el método de aglutinación de partículas de látex por nefelometría laser de Behringwerke (Marburgo, DE), que opera detectando cambios en la dispersión de la luz; el método de aglutinación de partículas de látex LPIA (Mitsubishi Chemical Industries, Tokio, JP); el método de despolarización de fluorescencia TDX (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL, EE UU); y el método de transferencia de energía de fluorescencia (Cis Bio International, Paris, FR). Se puede adaptar cualquiera de tales ensayos para su uso según los objetivos de la presente divulgación.

El ensayo de unión de la presente divulgación se puede configurar como un ensayo competitivo. En un ensayo competitivo, cuanto más anticuerpo anti-VIH esté presente en la muestra de prueba, menor cantidad de marcador estará presente en la fase sólida.

De una manera similar al ensayo sándwich, el ensayo competitivo se puede realizar suministrando una cantidad definida de un anticuerpo anti-VIH marcado y determinar si el líquido que se prueba contiene anticuerpo anti-VIH que competiría con el anticuerpo marcado para unirse al soporte. En tal ensayo competitivo, la cantidad de anticuerpo marcado capturado es inversamente proporcional a la cantidad de analito presente en la muestra de prueba. Se han descrito varios ensayos de este tipo en la técnica. Véase Smith D, *et al.*, US 4.401.764, Claggett J, *et al.*, US 4.746.631, Li C, *et al.*, US 4.661.444, Chieriegatt E, *et al.*, GB 2084317, Mochida E, *et al.*, US 4.185.084, Sadeh D, *et al.*, US 4.243.749, Lucas F, *et al.*, US 5.698.411, Landrum, anteriormente, Leuvering J, US 4.313.734, Gribnau T, *et al.*, US 4.373.932, y Baugher B, *et al.*, US 5.501.985. El uso de enzimas (en especial fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa, peroxidasa de rábano o ureasa) como marcador detectable (es decir, un inmunoensayo enzimático o EIA) es preferido.

La presencia de marcadores enzimáticos se puede detectar mediante el uso de sustratos cromogénicos (incluyendo los que producen o adsorben luz fluorescente, UV, visible) en respuesta a catálisis por el marcador enzimático. Más preferiblemente, se pueden emplear marcadores químicos (por ejemplo, marcadores de oro coloidal, bolas de látex).

5 La detección del marcador se puede lograr usando múltiples detectores, filtros de varios pasos, rejillas, o flúores espectralmente distintos. Véase Ward D, *et al.*, US 5.759.781. Es particularmente preferido emplear peroxidasa como un marcador enzimático, en especial junto con el sustrato cromogénico 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB), OPD o ABTS. En el caso del marcaje de los anticuerpos con peroxidasa como enzima, es posible usar la técnica del peroyodato o un método descrito en el que los compañeros se unen con un reactivo heterobifuncional. Véase
10 Nakane P, *et al.*, J. Histochem. Cytochem. 1974; 22:1084-1090. Se puede emplear cualquiera de una amplia variedad de soportes sólidos en los inmunoensayos de la presente divulgación. Los materiales adecuados para el soporte sólido son sintéticos como poliestireno, cloruro de polivinilo, poliamida u otros polímeros sintéticos, polímeros naturales tales como celulosa, así como polímeros naturales derivados tales como acetato de celulosa o nitrocelulosa, y vidrio, especialmente fibras de vidrio. El soporte puede tomar la forma de esferas, bastones, tubos y
15 placas de microensayo o microtitulación. Las estructuras similares a láminas tales como tiras de papel, placas pequeñas y membranas también son adecuadas. La superficie de los soportes puede ser permeable e impermeable para soluciones acuosas.

Aunque la descripción anterior se refiere a ensayar la presencia de anticuerpos anti-VIH en muestras biológicas que son líquidos (por ejemplo, suero, sangre, orina, saliva, jugos pancreáticos, líquido cefalorraquídeo, semen), se apreciará que cualquier muestra biológica fluidica (por ejemplo, extractos de tejido o biopsia, extractos de heces, esputo) se pueden emplear también en los ensayos de la presente divulgación. Lo más preferiblemente, la muestra biológica que se ensaya será suero o plasma.

25 Puesto que los inmunógenos según la presente divulgación son capaces de inducir la producción de anticuerpos ampliamente neutralizantes, estos inmunógenos también se pueden usar para la detección de una respuesta de anticuerpos neutralizantes a un patógeno en un paciente. De esta manera, en otro aspecto, la divulgación se refiere a un método para la detección de una respuesta de anticuerpos neutralizantes contra la infección de un virus en un sujeto que comprende detectar en dicho sujeto la presencia de anticuerpos neutralizantes usando un método para
30 detectar anticuerpos neutralizantes según la divulgación, en donde la presencia de anticuerpos neutralizantes en dicho sujeto con respecto a un sujeto control es indicativa de una respuesta de anticuerpos neutralizantes a dicha infección por virus en dicho sujeto.

En un aspecto preferido, el virus es VIH y en donde el polipéptido es un polipéptido variante gp120 o un fragmento del mismo según la divulgación. En un aspecto más preferido, la muestra es de un paciente infectado con VIH-1 o de receptor de vacuna contra el SIDA.

Procedimientos generales

40 1. Reactivos

Se utilizaron los siguientes reactivos:

- 45 (a) Plásmidos. El plásmido pNL4.3 se obtuvo de National Institutes of Health AIDS Research and Reference Reagent Program (NIH ARRRP, NIH, Bethesda, MD, EE UU). El plásmido pcDNA3.1 se obtuvo de Invitrogen (Carlsbad, CA, EE UU).
- (b) Aislado de VIH-1. Se usó un aislado primario de clado B, AC-10 (NeutNet consortium, Milán, IT).
- (c) Líneas celulares. Las células TZM-bl ($CD4^+$, $CXCR4^+$, $CCR5^+$) se obtuvieron del repositorio del NIH (NIH, Bethesda, MD, EE UU). Las células 293T y TZM-bl se mantuvieron en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) que contenía suero fetal de ternera al 10%, L-glutamina 20 mM, 100 U de penicilina/ml y 100 μ g de estreptomina/ml.
- 50 (d) Anticuerpos. Se usaron anticuerpos monoclonales (MAc) anti-Env-VIH-1 con actividad ampliamente neutralizante (especificidades de epítipo indicadas en paréntesis) (NIH ARRRP, NIH, Bethesda, MD, EE UU; Polymun AG viena, AT). estos incluían: E410 (región externa proximal de membrana, MPER), 2F5 (MPER), b12 (sitio de unión a $CD4$), 2G12 (glicanos ricos en manosa de gp120) y PG16 (espículas víricas de gp120).

2. Mutagénesis al azar *in vitro*

60 Se introdujeron mutaciones en *env* de VIH-1 AC-10 usando un kit de mutagénesis al azar Genomorph II (Stratagene, La Jolla, CA, EE UU). Se generó una librería de viriones VIH quiméricos transfiriendo las envueltas mutadas al azar en los plásmidos pNL4-3 y pcDNA3.1. La transferencia estuvo mediada por la introducción de sitios de restricción que conservan las secuencias víricas y digestión con las enzimas XbaI y NotI (New England Biolabs, Ipswich, MA, EE UU).

65 3. Clonación y producción de librería

Los productos de PCR se clonaron en los vectores pNL4.3 y pcDNA3.1 usando el kit Rapid DNA Ligation (Roche Applied Science, Indianápolis, IN) según las especificaciones del fabricante. Los vectores recombinantes de pNL4.3 y pcDNA3.1 se introdujeron en las células competentes MAX Efficiency[®] Stb12[™] y células competentes MAX Efficiency[®] DH5 α [™] (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE UU), respectivamente, y se amplificaron durante la noche (ON) a 30°C con agitación en un volumen de 3 ml. Se realizaron varias transformaciones simultáneamente para evitar la pérdida de variabilidad y se mezclaron en el aumento a escala de la amplificación (250 ml, 30°C, ON con agitación). Después de la incubación, se plaquearon 20 μ l y el ADN del plásmido se purificó usando un sistema PureYield[™] Plasmid Maxiprep (Promega, Madison, WI, EE UU). Ambos productos se digirieron además con XbaI y NotI para verificar la presencia del gen *env*. Si eran positivos, los clones se secuenciaron y/o usaron para transfección. Los virus se produjeron por cotransfección transitoria de células 293T usando las construcciones de pNL4.3. Se recogieron los sobrenadantes del cultivo celular que contenían los viriones 2 días después de la transfección y los viriones se concentraron usando una unidad de filtro centrífugo Amicon[®] Ultra. Los viriones se resuspendieron en solución salina tamponada con fosfato (PBS).

4. Ensayo de captura de viriones

Se recubrieron pocillos de microtitulación durante la noche a 4°C con anti-Fc policlonal (5 μ g/ml en 100 μ l de PBS). Los pocillos se bloquearon con seroalbúmina bovina (BSA) al 3% en PBS durante 1 hora a 37°C. Se añadieron 100 μ l de virus (1000 ng/ml) originarios de la librería a los pocillos de microtitulación. Se añadieron 5 μ l de los Acm de captura (100 ng/ml) a los pocillos correspondientes y la placa se incubó a 37°C con agitación (450 rpm). Después de una incubación de 2 horas, los pocillos se lavaron seis veces con PBS y se cuantificaron equivalentes de virus por ensayo inmunoenzimático de adsorción (ELISA) de p24 o se extrajo el ARN con el kit High Pure Viral RNA (Roche Applied Science, Indianápolis, IN, EE UU) según las instrucciones del fabricante.

5. Amplificación de ARN de *env* de VIH-1 por RT-PCR anidada

Se amplificó el ARN de *env* del aislado de VIH-1 mediante transcripción inversa reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) usando un kit de RT-PCR (The GeneAmp[®] Gold RNA PCR Reagent Kit; Applied Biosystems, Carlsbad, CA, EE UU) y un sistema de PCR Expand High Fidelity (Roche Applied Science, Indianápolis, IN). Se usó un volumen de molde de ARN de 8 μ l para reacción de RT-PCR y el ARN se sometió a transcripción inversa con el cebador 102 (inverso) a 50°C durante 20 minutos. La región *env* se amplificó con los cebadores 101 (directo) y 104 (inverso) de un volumen de 5 μ l de ADNc seguido por una PCR anidada con los cebadores 179 (directo) y 180 (inverso) usando un volumen de 2 μ l de molde. Véase la tabla 1. Las condiciones de ambas amplificaciones por PCR de *env* fueron: i) 1 ciclo de 94°C durante 2 minutos, ii) 35 ciclos de 94°C durante 2 minutos, 55°C durante 1 minuto y 72°C durante 3 minutos, iii) 1 ciclo de 72°C durante 7 minutos y iv) parada a 4°C. El amplicón resultante (2583 pb) se sometió a electroforesis con un marcador de peso molecular de 1 Kb en un gel de agarosa al 1,0% teñido con tinción de gel SYBR[®] Safe DNA.

6. Clonación y secuenciación del gen *env*

Los productos de PCR del paso anterior se clonaron en los vectores pNL4.3 y pcDNA3.1 como se ha descrito anteriormente. Se transformaron células competentes Stb12 y DH5 α con estos plásmidos como se ha ilustrado previamente. El ADN del plásmido se purificó usando un kit QIAprep Spin Miniprep (Qiagen, Valencia, CA, EE UU) y se digirió además con XbaI y NotI para verificar la presencia del gen *env*. Los clones positivos para *env* se secuenciaron usando BigDye[®] Terminator v3.1 y los cebadores 183 (directo), 185 (directo), 186 (directo), 190 (inverso), 192 (inverso) y 193 (inverso). Véase la tabla 1.

7. Análisis de secuencia

El alineamiento de las secuencias de nucleótidos se realizó usando las aplicaciones del programa CLUSTAL W (EMBL-EBI, <http://www.ebi.ac.uk/FTP/>, Febrero 2011) y programa Contig Assembly (CAP) integradas en BioEdit versión 7.0.9.0 y después se editaron a mano. Véase Thompson J, *et al.*, Nucl. Acids Res. 1994; 22(22):673-680 y Huang X, Genomics 1992; 14(1):18-25.

ID del cebador	Secuencia	Localización en el genoma	SEQ ID NO:
101	TAGAGCCCTGGAAGCATCCAGGAAG	5853-5877	5
102	TTGCTACTTGTGATTGCTCCATGT	8936-8913	6
104	AGCTGGATCCGTCTCGAGATACTGCTCCCACCC	8916-8882	7
179	GTAGTACATGTAATGCAACC	6050-6069	8
180	AGCTCGTCTCATTCTTTCCC	8865-8846	9
183	CCAATTCCCATACATTATTGTGC	6858-6880	10
185	GGAGCAGCAGGAAGCACTATGGGC	7794-7817	11
186	GAGTTAGGCAGGGATACTCACC	8344-8365	12
190	GCCAGGACTCTTGCTGGAGCTG	7969-7947	13
192	CTTGTATTGTTGTTGGGTC	7135-7117	14
193	CATGGCTTTAGGCTTTGATCCC	6580-6559	15

Tabla 1: Secuencias de cebadores y localización génica. La localización génica se basa en el genoma de VIH-1 HXB2 (Número de acceso de GenBank K03455). Wei X, *et al.*, Antimicrob. Agents Chemother. 2002; 46(6):1896-1905.

5 8. Producción de virus recombinantes

Los clones que expresaban las glicoproteínas de la envuelta específicas de 4E10 con mutaciones relevantes (pérdida de potenciales sitios de glicosilación y cambios en la arquitectura de los bucles V1/V2) se amplificaron ON, en un volumen de 250 ml a 30°C con agitación. El ADN de plásmido se purificó con un sistema PureYield™ Plasmid Maxiprep (Promega, Madison, WI, EE UU) y se usó para cotransfección transitoria de células 293T. Los sobrenadantes que contenían pseudovirus se recogieron dos días después de la transfección. Se cuantificó el nivel de p24 por ELISA.

15 9. Ensayos de unión

Se determinó la unión de Acm (4E10, 2F5, 2G12, b12 y PG16) a viriones intactos con el ensayo de captura descrito previamente. Primero, el virus se incubó con los BNAC en solución para facilitar la unión virus-BNAC. Después, los complejos virus-BNAC se capturaron con los anticuerpos anti-Fc previamente inmovilizados en la placa. Se lisaron los virus-BNAC inmovilizados con Triton X-100 al 1% en PBS. Se cuantificó la p24 en el lisado del virus por ELISA como se ha descrito anteriormente. Se usó una construcción ΔEnv pNL4.3 como control negativo. Se determinó el aumento en la afinidad de unión mediante comparación con el virus AC-10 de tipo salvaje.

Mientras que la invención anterior se ha descrito en algún detalle para propósitos 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 que se define en las reivindicaciones adjuntas.

Lista de secuencias

- <110> Laboratorio del Dr. Esteve S.A.
Fundació Privada Institut de Recerca de la SIDA-Caixa
- <120> MÉTODO DE SELECCIÓN RÁPIDA DE INMUNÓGENOS
- <130> P6927PC00
- <150> EP 11382051
<151> 25-02-2011
- <150> US 61/446.595
<151> 25-02-2011
- <160> 32

ES 2 651 124 T3

<170> PatentIn versión 3.5

5 <210> 1
 <211> 2583
 <212> ADN
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> gen env del aislado AC10 de VIH

<400> 1
 atgagagtga gggagaccag gaagaattat cagcacttgt ggtggaaatg gggcatgatg 60
 ctccctggga tgttgatgat ctgtagtgct gtagaacaaa cgtgggtcac agtctattat 120
 ggggtacctg tgtggaaaga agcaaacacc attttatttt gtgcatcaga tgctaaagca 180
 tataatacag aggtacataa tgtttgggcc acacatgcct gtgtaccac agacccaac 240
 ccacaagaag tagaattgga aatgtgaca gaaaatttta acatgtggaa aaacaacatg 300
 gtagatcaga tgcattggga tataatcagt ttatgggatc aaagcctaaa gccatgtgta 360
 aaattaactc cactctgtgt tactttaagt tgcactgata atgtgggaaa tgatactagt 420
 accaataata gtagatggga taaaatggaa aaaggagaaa taaagaactg ctctttcaat 480
 atcaccacaa acatgagaga taagatgcag aaacaatatg cactttttta taaacttgat 540
 gtagtaccac tagaggaagg taagaataat aacagtagtt ttaccgacta taggttgata 600
 agttgtaaca cctcagtcac tacacaggcc tgtccaaagg taacotttga gccaatccc 660
 atacattatt gtgccccagc tggttttgcg cttctaaaat gtaaggataa gaaattcaat 720
 ggaacaggac catgtaaaaa tgtagcaca gtacaatgta cacatggaat taagccagta 780
 gtatcaactc agctgctatt aatggcagt ctagcagaag aagaggtagt aataagatct 840
 gagaacttct cgaacaatgc tagaaccata atagtacagc tgaatacatc tgtagaata 900
 aagtgtataa gaccaacaa caatacaaga aaaggtatac atataggacc agggagagca 960
 ttttatacaa caggagatat aataggagat ataagacaag cacattgtaa cattagtaga 1020
 caaaattgga ataacacttt aaaacagata gctgaaaagt taagagaaca atttgggaat 1080

ES 2 651 124 T3

aaaacaatag tctttagaaa ctctctgga ggggatccag aaattgtaat gcacactttt 1140
 aattgtgcag ggaattttt ctactgtaat acagcagaac tgtttaatag tacttggtat 1200
 gcaaatggca caattagtat tggaggggga aacaagacta atatcactact cccatgcaga 1260
 ataaaacaat ttataaacat gtggcaggaa gtaggaaaag caatgtatgc ccctcccatc 1320
 agtggacaga ttagatgttc atcaaatatt acaggactgc tattaacaag agatgggtgt 1380
 aggggcaatc agaccgacaa ccagactgag atcttcagac ctgtaggagg agatatgaaa 1440
 aacaattgga gaagtgaatt atataaatat aaagtagtaa gaattgaacc attaggaata 1500
 gcaccacca gggcaaaaag gagagtgtg cagagagaaa aaagagcagt gggaatagga 1560
 gctttgttcc ttgggttctt gggagcagca ggaagcacta tgggcgagc gtcaatgacg 1620
 ctgacggtac aggccagact attattgtct ggtatagtgc aacagcagaa caatctgctg 1680
 agggctattg aggcgcaaca gcatctgtt caactcacag tctggggcat caagcagctc 1740
 caggcaagag tcctggctgt gaaagatac ctacgtgatc aacagctcct ggaatttgg 1800
 ggttgcctctg gaaaactcat ctgcaccact gctgtgcctt ggaatgtag ttggaataat 1860
 agatctgtgg atgacatttg gaaaacatg acctggatgc agtgggatag agaaattagt 1920
 aattacacaa gttaataata caccttaatt gaagaatcgc agaactcagca agaaaagaat 1980
 gaacaagaat tattggcatt agataaatgg gcaaatttgt ggaattgggt caacataaca 2040
 gaatggctgt ggtatataaa aatattcata atgatagtag gaggcttggg aggtttaaga 2100
 atagtttttg ctgtgctttc tatagtgaat agagttaggc agggatactc accattatcg 2160
 tttcagaccc acctcccagc tcagagggga cccgacagc cgggaggaat cgaagaagaa 2220
 ggtggagaga gcgacagaga cagatccgga agattagtga atggattctt agcaattatc 2280
 tggatcgacc tgcggagcct gtgccttttc agctaccacc acttgagaga cttactattg 2340
 attgtaacga ggattgtgga aattctggga cgcagggggg gggaaatcct caagtattgg 2400
 tggaatctcc tgcagtattg gattcaggaa ctaaagaata gtgctgtag cttgctcaac 2460
 gccatagcca tagcagtagg tgaggggaca gataggatta tagaagcatt tagaagcatt 2520
 tttagagcta ttctccacat acctacaaga ataagacagg gcttggaag gtctttgcta 2580
 taa 2583

<210> 2
 <211> 860
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> polipéptido env del aislado AC10 de VIH

10

<400> 2

ES 2 651 124 T3

Met Arg Val Arg Glu Thr Arg Lys Asn Tyr Gln His Leu Trp Trp Lys
 1 5 10 15

Trp Gly Met Met Leu Leu Gly Met Leu Met Ile Cys Ser Ala Val Glu
 20 25 30

Gln Thr Trp Val Thr Val Tyr Tyr Gly Val Pro Val Trp Lys Glu Ala
 35 40 45

Asn Thr Ile Leu Phe Cys Ala Ser Asp Ala Lys Ala Tyr Asn Thr Glu
 50 55 60

Val His Asn Val Trp Ala Thr His Ala Cys Val Pro Thr Asp Pro Asn
 65 70 75 80

Pro Gln Glu Val Glu Leu Glu Asn Val Thr Glu Asn Phe Asn Met Trp
 85 90 95

Lys Asn Asn Met Val Asp Gln Met His Gly Asp Ile Ile Ser Leu Trp
 100 105 110

Asp Gln Ser Leu Lys Pro Cys Val Lys Leu Thr Pro Leu Cys Val Thr
 115 120 125

Leu Ser Cys Thr Asp Asn Val Gly Asn Asp Thr Ser Thr Asn Asn Ser
 130 135 140

Arg Trp Asp Lys Met Glu Lys Gly Glu Ile Lys Asn Cys Ser Phe Asn
 145 150 155 160

Ile Thr Thr Asn Met Arg Asp Lys Met Gln Lys Gln Tyr Ala Leu Phe
 165 170 175

Tyr Lys Leu Asp Val Val Pro Ile Glu Glu Gly Lys Asn Asn Asn Ser
 180 185 190

Ser Phe Thr Asp Tyr Arg Leu Ile Ser Cys Asn Thr Ser Val Ile Thr
 195 200 205

Gln Ala Cys Pro Lys Val Thr Phe Glu Pro Ile Pro Ile His Tyr Cys
 210 215 220

Ala Pro Ala Gly Phe Ala Leu Leu Lys Cys Lys Asp Lys Lys Phe Asn
 225 230 235 240

Gly Thr Gly Pro Cys Lys Asn Val Ser Thr Val Gln Cys Thr His Gly
 245 250 255

ES 2 651 124 T3

Ile Lys Pro Val Val Ser Thr Gln Leu Leu Leu Asn Gly Ser Leu Ala
 260 265 270

Glu Glu Glu Val Val Ile Arg Ser Glu Asn Phe Ser Asn Asn Ala Arg
 275 280 285

Thr Ile Ile Val Gln Leu Asn Thr Ser Val Glu Ile Lys Cys Ile Arg
 290 295 300

Pro Asn Asn Asn Thr Arg Lys Gly Ile His Ile Gly Pro Gly Arg Ala
 305 310 315 320

Phe Tyr Thr Thr Gly Asp Ile Ile Gly Asp Ile Arg Gln Ala His Cys
 325 330 335

Asn Ile Ser Arg Gln Asn Trp Asn Asn Thr Leu Lys Gln Ile Ala Glu
 340 345 350

Lys Leu Arg Glu Gln Phe Gly Asn Lys Thr Ile Val Phe Arg Asn Ser
 355 360 365

Ser Gly Gly Asp Pro Glu Ile Val Met His Thr Phe Asn Cys Ala Gly
 370 375 380

Glu Phe Phe Tyr Cys Asn Thr Ala Glu Leu Phe Asn Ser Thr Trp Tyr
 385 390 395 400

Ala Asn Gly Thr Ile Ser Ile Gly Gly Gly Asn Lys Thr Asn Ile Ile
 405 410 415

Leu Pro Cys Arg Ile Lys Gln Phe Ile Asn Met Trp Gln Glu Val Gly
 420 425 430

Lys Ala Met Tyr Ala Pro Pro Ile Ser Gly Gln Ile Arg Cys Ser Ser
 435 440 445

Asn Ile Thr Gly Leu Leu Leu Thr Arg Asp Gly Gly Arg Gly Asn Gln
 450 455 460

Thr Asp Asn Gln Thr Glu Ile Phe Arg Pro Val Gly Gly Asp Met Lys
 465 470 475 480

Asn Asn Trp Arg Ser Glu Leu Tyr Lys Tyr Lys Val Val Arg Ile Glu
 485 490 495

Pro Leu Gly Ile Ala Pro Thr Arg Ala Lys Arg Arg Val Val Gln Arg

ES 2 651 124 T3

	500		505		510														
Glu	Lys	Arg	Ala	Val	Gly	Ile	Gly	Ala	Leu	Phe	Leu	Gly	Phe	Leu	Gly				
		515					520					525							
Ala	Ala	Gly	Ser	Thr	Met	Gly	Ala	Ala	Ser	Met	Thr	Leu	Thr	Val	Gln				
	530					535					540								
Ala	Arg	Leu	Leu	Leu	Ser	Gly	Ile	Val	Gln	Gln	Gln	Asn	Asn	Leu	Leu				
545					550					555					560				
Arg	Ala	Ile	Glu	Ala	Gln	Gln	His	Leu	Leu	Gln	Leu	Thr	Val	Trp	Gly				
				565					570					575					
Ile	Lys	Gln	Leu	Gln	Ala	Arg	Val	Leu	Ala	Val	Glu	Arg	Tyr	Leu	Arg				
			580					585					590						
Asp	Gln	Gln	Leu	Leu	Gly	Ile	Trp	Gly	Cys	Ser	Gly	Lys	Leu	Ile	Cys				
		595					600					605							
Thr	Thr	Ala	Val	Pro	Trp	Asn	Val	Ser	Trp	Asn	Asn	Arg	Ser	Val	Asp				
	610					615					620								
Asp	Ile	Trp	Glu	Asn	Met	Thr	Trp	Met	Gln	Trp	Asp	Arg	Glu	Ile	Ser				
625					630					635					640				
Asn	Tyr	Thr	Ser	Leu	Ile	Tyr	Thr	Leu	Ile	Glu	Glu	Ser	Gln	Asn	Gln				
				645					650					655					
Gln	Glu	Lys	Asn	Glu	Gln	Glu	Leu	Leu	Ala	Leu	Asp	Lys	Trp	Ala	Asn				
			660					665					670						
Leu	Trp	Asn	Trp	Phe	Asn	Ile	Thr	Glu	Trp	Leu	Trp	Tyr	Ile	Lys	Ile				
		675					680					685							
Phe	Ile	Met	Ile	Val	Gly	Gly	Leu	Val	Gly	Leu	Arg	Ile	Val	Phe	Ala				
	690					695					700								
Val	Leu	Ser	Ile	Val	Asn	Arg	Val	Arg	Gln	Gly	Tyr	Ser	Pro	Leu	Ser				
705					710					715					720				
Phe	Gln	Thr	His	Leu	Pro	Ala	Gln	Arg	Gly	Pro	Asp	Arg	Pro	Gly	Gly				
				725					730					735					
Ile	Glu	Glu	Glu	Gly	Gly	Glu	Ser	Asp	Arg	Asp	Arg	Ser	Gly	Arg	Leu				
			740					745					750						

ES 2 651 124 T3

Val Asn Gly Phe Leu Ala Ile Ile Trp Ile Asp Leu Arg Ser Leu Cys
 755 760 765

Leu Phe Ser Tyr His His Leu Arg Asp Leu Leu Leu Ile Val Thr Arg
 770 775 780

Ile Val Glu Ile Leu Gly Arg Arg Gly Trp Glu Ile Leu Lys Tyr Trp
 785 790 795 800

Trp Asn Leu Leu Gln Tyr Trp Ile Gln Glu Leu Lys Asn Ser Ala Val
 805 810 815

Ser Leu Leu Asn Ala Ile Ala Ile Ala Val Gly Glu Gly Thr Asp Arg
 820 825 830

Ile Ile Glu Ala Phe Arg Ser Ile Phe Arg Ala Ile Leu His Ile Pro
 835 840 845

Thr Arg Ile Arg Gln Gly Leu Glu Arg Ser Leu Leu
 850 855 860

<210> 3
 <211> 2583
 <212> ADN
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> polinucleótido que codifica un fragmento del polipéptido env del aislado LR1-C1

10

<400> 3
 atgagagtga gggagaccag gaagaattat cagcacttgt ggtggaaatg gggcatgatg 60
 ctcccttggga tgttgatgat ctgtagtgtc gtagaacaaa cgtgggtcac agtctattat 120
 ggggtacctg tgtggaaaga agcaaacacc attttatttt gtgcatcaga tgctaaagca 180
 tataatacag aggtacataa tgtttgggcc acacatgcct gtgtaccac agaccccaac 240
 ccacaagaag tagaattgga agatgtgaca gaaaatttta acatgtggaa aaacaacatg 300
 gtagatcaga tgcattggga tataatcagt ttatgggatc aaagcctaaa gccatgtgta 360
 aaattaactc cactctgtgt tactttaagt tacaatgata atgtgggaaa tgggtactagt 420
 accaataata gtagatggga taaaatggaa aaaggagaaa taaagaactg ctctttctat 480
 atcaccacaa acatgagaga taagatgcag aaacaatatg cactttttta taaacttgat 540
 gtagtaccaa tagaggaag taagaataat gacagtagtt ttaccgacta taggttgata 600
 agttgtaaca cctcagtcac tacacaggcc tgtccaaagg taacctttga gccaatcccc 660
 atacattatt gtgtcccagc tggttttgcg cttctaaaat gtaaggataa gaaattcaat 720
 ggaacaggac catgtaaaaa tgtagcaca gtacaatgta cacatggaat taagccagta 780

ES 2 651 124 T3

gtatcaactc agctgctatt aatggcagt ctagcagaag aagaggtagt aataagatct 840
 gagaacttct cgaacaatgc tagaaccata atagtacagc tgaatacatc tgtagaata 900
 aagtgtataa gacccaacaa caatacaaga aaaggtatac atataggacc agggagagca 960
 ttttatacaa caggagatat aataggagat ataagacaag cacattgtaa cattagtaga 1020
 caaaattgga ataacacttt aaaacagata gctgaaaagt taagagaaca atttgggaat 1080
 aaaacaatag tctttagaaa ctctctgga ggggatccag aaattgtaat gcacactttt 1140
 aattgtgcag ggaattttt ctactgtaat acagcagaac tgtttaatag tacttggtat 1200
 gcaaattggca caattagtat tggaggggga aacaagacta atatcatact cccatgcaga 1260
 ataaaacaat ttataaacat gtggcaagaa gtaggaaaag caatgtatgc ccctcccatc 1320
 agtggacaga ttagatgttc atcaaatatt acaggactgc tattaacaag agatgggtgt 1380
 aggggcaatc agaccgacaa ccagactgag atcttcagac ctgtaggagg agatataaaa 1440
 aacaattgga gaagtgaatt atataaatat aaagtagtaa gaattgaacc attaggaata 1500
 gcaccaccca gggcaaatg gagagtgtg cagagagaaa aaagagcagt ggaatagga 1560
 gctttgttcc ttgggttctt gggagcagca ggaagcacta tgggcgcagc gtcaatgacg 1620
 ctgacggtac aggccagact attattgtct ggtatagtgc aacagcagaa caatctgctg 1680
 agggctattg aggcgcaaca gcatctgtt ccaactcacag tctggggcat caagcagctc 1740
 caggcaagag tcctggctgt gaaagatac ctacgtgatc aacagctcct ggaatttgg 1800
 ggttgcctcg gaaaactcat ctgcaccact gctgtgcctt ggaatgtag ttggaataat 1860
 agatctgtgg atgacatttg gaaaacatg acctggatgc agtgggatag agaaattagt 1920
 aattacacaa gtttaataaa caccttaatt gaagaatcgc agaatcagca agaaaagaat 1980
 gaacaagaat tattggcatt agataaatgg gcaaatttgt ggaattggtt caacataaca 2040
 gaatggctgt ggtatataaa aatattcata atgatagtag gaggcttgg aggtttaaga 2100
 atagtttttg ctgtgctttc tatagtgaat agagttaggc agggatactc accattatcg 2160
 tttcagacct acctcccagc tcagagggga cccgacaggc cgggaggaat cgaagaagaa 2220
 ggtggagaga gcgacagaga cagatccgga agattagtga atggattctt agcaattatc 2280
 tggatcgacc tgcggagcct gtgccttttc agctaccacc acttgagaga cttactattg 2340
 attgtaacga ggattgtgga aattctggga cgcaggggggt gggaaatcct caagtattgg 2400
 tggaatctcc tgcagtattg gattcaggaa ctaaagaata gtgctgtag cttgctcaac 2460
 gccatagcca tagcagtagg tgaggggaca gataggatta tagaagcatt tagaagcatt 2520
 tttagagcta ttctccacat acctacaaga ataagacagg gcttggaaag gtctttgcta 2580
 taa 2583

<210> 4
 <211> 860

ES 2 651 124 T3

<212> PRT
<213> Artificial

<220>

5 <223> polipéptido env del aislado LR1-C1

<400> 4

```

Met Arg Val Arg Glu Thr Arg Lys Asn Tyr Gln His Leu Trp Trp Lys
1          5          10          15

Trp Gly Met Met Leu Leu Gly Met Leu Met Ile Cys Ser Ala Val Glu
          20          25          30

Gln Thr Trp Val Thr Val Tyr Tyr Gly Val Pro Val Trp Lys Glu Ala
          35          40          45

Asn Thr Ile Leu Phe Cys Ala Ser Asp Ala Lys Ala Tyr Asn Thr Glu
          50          55          60

Val His Asn Val Trp Ala Thr His Ala Cys Val Pro Thr Asp Pro Asn
65          70          75          80

Pro Gln Glu Val Glu Leu Glu Asp Val Thr Glu Asn Phe Asn Met Trp
          85          90          95

Lys Asn Asn Met Val Asp Gln Met His Gly Asp Ile Ile Ser Leu Trp
          100          105          110

Asp Gln Ser Leu Lys Pro Cys Val Lys Leu Thr Pro Leu Cys Val Thr
          115          120          125

Leu Ser Tyr Asn Asp Asn Val Gly Asn Gly Thr Ser Thr Asn Asn Ser
130          135          140

Arg Trp Asp Lys Met Glu Lys Gly Glu Ile Lys Asn Cys Ser Phe Tyr
145          150          155          160

Ile Thr Thr Asn Met Arg Asp Lys Met Gln Lys Gln Tyr Ala Leu Phe
          165          170          175

Tyr Lys Leu Asp Val Val Pro Ile Glu Glu Gly Lys Asn Asn Asp Ser
          180          185          190

Ser Phe Thr Asp Tyr Arg Leu Ile Ser Cys Asn Thr Ser Val Ile Thr
195          200          205

```

ES 2 651 124 T3

Gln Ala Cys Pro Lys Val Thr Phe Glu Pro Ile Pro Ile His Tyr Cys
 210 215 220

Val Pro Ala Gly Phe Ala Leu Leu Lys Cys Lys Asp Lys Lys Phe Asn
 225 230 235 240

Gly Thr Gly Pro Cys Lys Asn Val Ser Thr Val Gln Cys Thr His Gly
 245 250 255

Ile Lys Pro Val Val Ser Thr Gln Leu Leu Leu Asn Gly Ser Leu Ala
 260 265 270

Glu Glu Glu Val Val Ile Arg Ser Glu Asn Phe Ser Asn Asn Ala Arg
 275 280 285

Thr Ile Ile Val Gln Leu Asn Thr Ser Val Glu Ile Lys Cys Ile Arg
 290 295 300

Pro Asn Asn Asn Thr Arg Lys Gly Ile His Ile Gly Pro Gly Arg Ala
 305 310 315 320

Phe Tyr Thr Thr Gly Asp Ile Ile Gly Asp Ile Arg Gln Ala His Cys
 325 330 335

Asn Ile Ser Arg Gln Asn Trp Asn Asn Thr Leu Lys Gln Ile Ala Glu
 340 345 350

Lys Leu Arg Glu Gln Phe Gly Asn Lys Thr Ile Val Phe Arg Asn Ser
 355 360 365

Ser Gly Gly Asp Pro Glu Ile Val Met His Thr Phe Asn Cys Ala Gly
 370 375 380

Glu Phe Phe Tyr Cys Asn Thr Ala Glu Leu Phe Asn Ser Thr Trp Tyr
 385 390 395 400

Ala Asn Gly Thr Ile Ser Ile Gly Gly Gly Asn Lys Thr Asn Ile Ile
 405 410 415

Leu Pro Cys Arg Ile Lys Gln Phe Ile Asn Met Trp Gln Glu Val Gly
 420 425 430

Lys Ala Met Tyr Ala Pro Pro Ile Ser Gly Gln Ile Arg Cys Ser Ser
 435 440 445

Asn Ile Thr Gly Leu Leu Leu Thr Arg Asp Gly Gly Arg Gly Asn Gln
 450 455 460

ES 2 651 124 T3

Thr Asp Asn Gln Thr Glu Ile Phe Arg Pro Val Gly Gly Asp Ile Lys
 465 470 475 480
 Asn Asn Trp Arg Ser Glu Leu Tyr Lys Tyr Lys Val Val Arg Ile Glu
 485 490 495
 Pro Leu Gly Ile Ala Pro Thr Arg Ala Lys Trp Arg Val Val Gln Arg
 500 505 510
 Glu Lys Arg Ala Val Gly Ile Gly Ala Leu Phe Leu Gly Phe Leu Gly
 515 520 525
 Ala Ala Gly Ser Thr Met Gly Ala Ala Ser Met Thr Leu Thr Val Gln
 530 535 540
 Ala Arg Leu Leu Leu Ser Gly Ile Val Gln Gln Gln Asn Asn Leu Leu
 545 550 555 560
 Arg Ala Ile Glu Ala Gln Gln His Leu Leu Gln Leu Thr Val Trp Gly
 565 570 575
 Ile Lys Gln Leu Gln Ala Arg Val Leu Ala Val Glu Arg Tyr Leu Arg
 580 585 590
 Asp Gln Gln Leu Leu Gly Ile Trp Gly Cys Ser Gly Lys Leu Ile Cys
 595 600 605
 Thr Thr Ala Val Pro Trp Asn Val Ser Trp Asn Asn Arg Ser Val Asp
 610 615 620
 Asp Ile Trp Glu Asn Met Thr Trp Met Gln Trp Asp Arg Glu Ile Ser
 625 630 635 640
 Asn Tyr Thr Ser Leu Ile Asn Thr Leu Ile Glu Glu Ser Gln Asn Gln
 645 650 655
 Gln Glu Lys Asn Glu Gln Glu Leu Leu Ala Leu Asp Lys Trp Ala Asn
 660 665 670
 Leu Trp Asn Trp Phe Asn Ile Thr Glu Trp Leu Trp Tyr Ile Lys Ile
 675 680 685
 Phe Ile Met Ile Val Gly Gly Leu Val Gly Leu Arg Ile Val Phe Ala
 690 695 700
 Val Leu Ser Ile Val Asn Arg Val Arg Gln Gly Tyr Ser Pro Leu Ser
 705 710 715 720

ES 2 651 124 T3

Phe Gln Thr His Leu Pro Ala Gln Arg Gly Pro Asp Arg Pro Gly Gly
 725 730 735

Ile Glu Glu Glu Gly Gly Glu Ser Asp Arg Asp Arg Ser Gly Arg Leu
 740 745 750

Val Asn Gly Phe Leu Ala Ile Ile Trp Ile Asp Leu Arg Ser Leu Cys
 755 760 765

Leu Phe Ser Tyr His His Leu Arg Asp Leu Leu Leu Ile Val Thr Arg
 770 775 780

Ile Val Glu Ile Leu Gly Arg Arg Gly Trp Glu Ile Leu Lys Tyr Trp
 785 790 795 800

Trp Asn Leu Leu Gln Tyr Trp Ile Gln Glu Leu Lys Asn Ser Ala Val
 805 810 815

Ser Leu Leu Asn Ala Ile Ala Ile Ala Val Gly Glu Gly Thr Asp Arg
 820 825 830

Ile Ile Glu Ala Phe Arg Ser Ile Phe Arg Ala Ile Leu His Ile Pro
 835 840 845

Thr Arg Ile Arg Gln Gly Leu Glu Arg Ser Leu Leu
 850 855 860

5 <210> 5
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> cebador que se alinea con un fragmento del genoma de HXB2 de VIH-1

<400> 5
tagagccctg gaagcatcca ggaag 25

15 <210> 6
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> cebador que se alinea con un fragmento del genoma de HXB2 de VIH-1

<400> 6
ttgctacttg tgattgctcc atgt 24

25 <210> 7
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Artificial

30 <220>
 <223> cebador que se alinea con un fragmento del genoma de HXB2 de VIH-1

ES 2 651 124 T3

	<400> 7	agctggatcc gtctcgagat actgctccca ccc	33
5	<210> 8 <211> 20 <212> ADN <213> Artificial		
10	<220> <223> cebador que se alinea con un fragmento del genoma de HXB2 de VIH-1		
	<400> 8	gtagtacatg taatgcaacc	20
15	<210> 9 <211> 20 <212> ADN <213> Artificial		
20	<220> <223> cebador que se alinea con un fragmento del genoma de HXB2 de VIH-1		
	<400> 9	agctcgtctc attccttccc	20
25	<210> 10 <211> 23 <212> ADN <213> Artificial		
30	<220> <223> cebador que se alinea con un fragmento del genoma de HXB2 de VIH-1		
35	<400> 10	ccaattccca tacattattg tgc	23
40	<210> 11 <211> 24 <212> ADN <213> Artificial		
45	<220> <223> cebador que se alinea con un fragmento del genoma de HXB2 de VIH-1		
	<400> 11	ggagcagcag gaagcactat gggc	24
50	<210> 12 <211> 22 <212> ADN <213> Artificial		
55	<220> <223> cebador que se alinea con un fragmento del genoma de HXB2 de VIH-1		
	<400> 12	gagttaggca gggatactca cc	22
60	<210> 13 <211> 23 <212> ADN <213> Artificial		

ES 2 651 124 T3

<220>
 <223> cebador que se alinea con un fragmento del genoma de HXB2 de VIH-1

<400> 13
 5 gccaggactc ttgcctggag ctg 23

<210> 14
 <211> 19
 <212> ADN
 10 <213> Artificial

<220>
 <223> cebador que se alinea con un fragmento del genoma de HXB2 de VIH-1

<400> 14
 15 cttgtattgt tgttgggtc 19

<210> 15
 <211> 22
 20 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> cebador que se alinea con un fragmento del genoma de HXB2 de VIH-1

<400> 15
 25 catggcttta ggctttgatc cc 22

<210> 16
 <211> 106
 30 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 35 <223> Fragmento de la preproteína gp160 codificado por el gen env del aislado salvaje AC10 de VIH

<400> 16

Gln	Ser	Leu	Lys	Pro	Cys	Val	Lys	Leu	Thr	Pro	Leu	Cys	Val	Thr	Leu
1			5					10						15	

Ser	Cys	Thr	Asp	Asn	Val	Gly	Asn	Asp	Thr	Ser	Thr	Asn	Asn	Ser	Arg
			20					25					30		

Trp	Asp	Lys	Met	Glu	Lys	Gly	Glu	Ile	Lys	Asn	Cys	Ser	Phe	Asn	Ile
		35					40					45			

Thr	Thr	Asn	Met	Arg	Asp	Lys	Met	Gln	Lys	Gln	Tyr	Ala	Leu	Phe	Tyr
	50					55					60				

Lys	Leu	Asp	Val	Val	Pro	Ile	Glu	Glu	Gly	Lys	Asn	Asn	Asn	Ser	Ser
65					70					75				80	

Phe	Thr	Asp	Tyr	Arg	Leu	Ile	Ser	Cys	Asn	Thr	Ser	Val	Ile	Thr	Gln
				85					90					95	

Ala	Cys	Pro	Lys	Val	Thr	Phe
			100			

40 <210> 17

ES 2 651 124 T3

<211> 103
 <212> PRT
 <213> Artificial

5 <220>
 <223> Fragmento del polipéptido env del aislado LC1-C1

<400> 17
 Gln Ser Leu Lys Pro Cys Val Lys Leu Thr Pro Leu Cys Val Thr Leu
 1 5 10 15
 Ser Tyr Asn Asp Asn Val Gly Asn Gly Thr Ser Thr Asn Asn Ser Arg
 20 25 30
 Trp Asp Lys Met Glu Lys Gly Glu Ile Lys Asn Cys Ser Phe Tyr Ile
 35 40 45
 Thr Thr Asn Met Arg Asp Lys Met Gln Lys Gln Tyr Ala Leu Phe Tyr
 50 55 60
 Lys Leu Asp Val Val Pro Ile Glu Glu Gly Lys Asn Asn Asp Ser Ser
 65 70 75 80
 Phe Thr Asp Tyr Arg Leu Ile Ser Cys Asn Thr Ser Val Ile Thr Gln
 85 90 95
 Ala Cys Pro Lys Val Thr Phe
 100

10 <210> 18
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Artificial

15 <220>
 <223> fragmento secuenciado de ENV AC10

<400> 18
 Lys Leu Thr Pro Leu Cys Val Thr Leu Ser Cys Thr Asp Asn Val Gly
 1 5 10 15
 Asn Asp Thr Ser Thr Asn Asn Ser Arg Trp Asp Lys Met Glu Lys Gly
 20 25 30
 Glu Ile Lys Asn Cys Ser Phe Asn
 35 40

20 <210> 19
 <211> 40
 <212> PRT
 25 <213> Artificial

<220>
 <223> cóntigo L1-1 de ENV

ES 2 651 124 T3

<400> 19

Lys Leu Thr Pro Leu Cys Val Thr Leu Ser Cys Thr Asp Asn Val Gly
 1 5 10 15

Asn Asp Thr Ser Thr Asn Asn Ser Arg Trp Asp Lys Met Glu Lys Gly
 20 25 30

Glu Ile Lys Asn Cys Tyr Phe Asn
 35 40

5 <210> 20
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> cóntigo L1-2 de ENV

<400> 20
 Lys Leu Thr Gln Leu Cys Asp Thr Leu Ser Cys Thr Asp Asn Val Gly
 1 5 10 15

Asn Asp Thr Ser Thr Asn Asn Ser Arg Trp Asp Lys Met Glu Lys Gly
 20 25 30

Glu Ile Lys Asn Cys Ser Phe Asn
 35 40

15 <210> 21
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> cóntigo L1-3 de ENV

<400> 21
 Lys Leu Thr Pro Leu Cys Val Thr Leu Ser Cys Thr Asp Asn Glu Gly
 1 5 10 15

Asn Asp Thr Ser Thr Asn Asn Ser Arg Trp Asp Lys Met Gly Lys Gly
 20 25 30

Glu Ile Lys Asn Cys Ser Phe Asn
 35 40

25 <210> 22
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Artificial

30 <220>
 <223> cóntigo L1-6 de ENV

35 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (29)..(29)

ES 2 651 124 T3

<223> /nota= en donde Xaa es cualquier aminoácido

<400> 22

Lys Leu Thr Pro Leu Cys Val Thr Leu Ser Cys Thr Asp Asn Val Gly
1 5 10 15

Asn Asp Thr Ser Thr Asn Asn Ser Arg Trp Asp Lys Xaa Glu Lys Gly
20 25 30

Glu Ile Lys Asn Cys Ser Phe Asn
35 40

5

<210> 23
<211> 40
<212> PRT
<213> Artificial

10

<220>
<223> cóntigo L2-2 de ENV

15

<220>
<221> VARIANTE
<222> (35)..(35)
<223> /nota= en donde Xaa es cualquier aminoácido

<400> 23

Lys Leu Thr Pro Leu Cys Val Thr Leu Ser Cys Thr Asp Asn Val Gly
1 5 10 15

Asn Asp Thr Ser Thr Asn Asn Ser Arg Trp Asp Lys Met Glu Lys Gly
20 25 30

20

Glu Ile Xaa Asn Cys Ser Phe Asn
35 40

<210> 24
<211> 40
<212> PRT
<213> Artificial

25

<220>
<223> cóntigo L2-3 de ENV

30

<400> 24

Lys Leu Thr Pro Leu Cys Val Thr Leu Ser Cys Thr Asp Asn Val Gly
1 5 10 15

Asn Asp Ile Ser Thr Ile Asn Ser Arg Trp Asp Lys Met Glu Lys Gly
20 25 30

Glu Ile Lys Asn Cys Ser Cys Asn
35 40

<210> 25
<211> 40
<212> PRT

35

ES 2 651 124 T3

<213> Artificial

<220>

<223> cóntigo L3-4 de ENV

5

<400> 25

Lys Leu Thr Pro Leu Cys Val Thr Leu Ser Cys Thr Asp Asn Met Gly
 1 5 10 15

Asn Asp Thr Ser Thr Asn Asn Ser Arg Trp Asp Lys Met Glu Lys Gly
 20 25 30

Glu Ile Lys Asn Cys Ser Phe Asn
 35 40

<210> 26

10

<211> 40

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

15

<223> cóntigo L2 clon 5 pNL43

<400> 26

Lys Leu Thr Pro Leu Cys Val Thr Leu Ser Cys Thr Asp Asn Val Gly
 1 5 10 15

Asn Asp Thr Ser Thr Asn Asn Ser Arg Trp Asp Lys Met Glu Lys Gly
 20 25 30

Glu Ile Lys Asn Phe Ser Phe Asn
 35 40

<210> 27

20

<211> 40

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

25

<223> cóntigo BR1 clon 1 pcDNA

<400> 27

Lys Leu Thr Pro Leu Cys Val Thr Leu Ser Tyr Asn Asp Asn Val Gly
 1 5 10 15

Asn Asp Thr Ser Thr Asn Asn Ser Arg Trp Asp Lys Met Glu Lys Gly
 20 25 30

Glu Ile Lys Asn Cys Ser Phe Asn
 35 40

<210> 28

30

<211> 40

<212> PRT

<213> Artificial

35

ES 2 651 124 T3

<220>

<223> cóntigo BR1 clon 3 pcDNA

<400> 28

Lys Leu Thr Pro Leu Cys Val Thr Leu Ser Tyr Lys Asp Asn Val Gly
1 5 10 15

Asn Asp Thr Ser Thr Asn Asn Ser Arg Trp Asp Lys Met Glu Lys Gly
20 25 30

Glu Ile Lys Asn Cys Ser Phe Asn
35 40

5

<210> 29

<211> 40

<212> PRT

10 <213> Artificial

<220>

<223> cóntigo BR1 clon 1

15 <400> 29

Lys Leu Thr Pro Leu Cys Val Thr Leu Ser Tyr Asn Asp Asn Val Gly
1 5 10 15

Asn Asp Gly Ser Thr Asn Asn Ser Arg Trp Asp Lys Met Glu Lys Gly
20 25 30

Glu Ile Lys Asn Cys Ser Phe Tyr
35 40

<210> 30

<211> 2583

20 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia de nucleótidos de Env seleccionada con el anticuerpo PG16-C10

25

<400> 30

ES 2 651 124 T3

atgagagtga gggagaccag gaagaattat cagcacttgt ggtggaaatg gggcatgatg	60
ctccttggga tgttgatgat ctgtagtgct gtagaacaaa cgtgggtcac agtctattat	120
ggggtacctg tgtggaaaga agcaaacacc attttatttt gtgcatcaga tgctaaagca	180
tataatacag aggtacataa tgtttgggcc acacatgcct gtgtaccac agacccaac	240
ccacaagaag tagaattgga aatgtgaca gaaaatttta acatgtggaa aaacaacatg	300
gtagatcaga tgcattggga tataatcagt ttatgggatc aaagcctaaa gccatgtgta	360
aaattaactc cactctgtgt tactttaagt tgcactgata atgtgggaaa tgatactagt	420
accaataata gtagatggga taaaatggaa aaaggagaaa taaagaactg ctctttcaat	480
atcaccacaa acatgagaga taagatgcag aaacaatatg cactttttta taaacttgat	540
gtagtaccaa tagaggaagg taagaataat aacagtagtt ttaccgacta taggttgata	600
agttgtagca cctcagtcac tacacaggcc tgtccaaagg taaccttga gccattccc	660
atacattatt gtgccccagc tggttttgcg cttctaaaat gtaaggataa gaaattcaat	720
ggaaccggac catgtaaaaa tgttagcaca gtacaatgta cacatggaat taagccagta	780
gtatcaactc agctgctatt aaatggcagt ctagcagaag aagaggtagt aataagatct	840
gagaacttct cgaacaatgc tagaaccata atagtacagc tgaatacatc tgtagaata	900
aagtgtataa gaccaacaaa caatacaaga aaaggtatac atataggacc agggagagca	960
ttttatacaa caggagatat aataggagat ataagacaag cacattgtaa cattagtaga	1020
caaaattgga ataacacttt aaaacagata gctgaaaagt taagagaaca atttgggaat	1080

ES 2 651 124 T3

aaaacaatag tctttagaaa ctctctgga ggggatccag aaattgtaat gcacactttt 1140
 aattgtgcag gggaatTTTT ctactgtaat acagcagaac tgtttaatag tacttggtat 1200
 gcaaattggca caattagtat tggaggggga aacaagacta atatcatact cccatgcaga 1260
 ataaaacaat ttataaacat gtggcaggaa gtaggaaaag caatgtatgc ccctcccatc 1320
 agtggacaga ttagatgttc atcaaatatt acaggactgc tattaacaag agatggtggt 1380
 aggggcaatc agaccgacaa ccagactgag atcttcagac ctgtaggagg agatatgaaa 1440
 aacaattgga gaagtgaatt atataaatat aaagtagtaa gaattgaacc attaggaata 1500
 gcaccaccca ggcaaaaag gagagtgtg cagagagaaa aaagagcagt gggaatagga 1560
 gctttgttcc ttgggttctt gggagcagca ggaagcacta tgggocgagc gtcaatgacg 1620
 ctgacggtac aggccagact attattgtct ggtatagtgc aacagcagaa caatctgctg 1680
 agggctattg aggcgcaaca gcatctgttg caactcacag tctggggcat caagcagctc 1740
 caggcaagag tcctggctgt ggaaagatac ctacgtgatc aacagctcct gggaaattgg 1800
 ggttgctctg aaaaactcat ctgcaccact gctgtgcctt ggaatgtag ttggaataat 1860
 agatctgtgg atgacatttg ggaaaacatg acctggatgc agtgggatag agaaattagt 1920
 aattacacaa gttaataata caccttaatt gaagaatcgc agaatacagca agaaaagaat 1980
 gaacaagaat tattggcatt agataaatgg gcaaatTTGT ggaattggtt caacataaca 2040
 gaatggctgt ggtatataaa aatattcata atgatagtag gaggcttggg aggtttaaga 2100
 atagtttttg ctgtgctttc tatagtgaat agagttaggc agggatactc accattatog 2160
 tttcagaccc acctcccagc tcagagggga cccgacaggc cgggaggaat cgaagaagaa 2220
 ggtggagaga gcgacagaga cagatccgga agattagtga atggattcctt agcaattatc 2280
 tggatcgacc tgcggagcct gtgccttttc agctaccacc acttgagaga cttactattg 2340
 attgtaacga ggattgtgga aattctggga cgcagggggt gggaaatcct caagtattgg 2400
 tggaatctcc tgcagtattg gattcaggaa ctaaagaata gtgctgtag cctgctcaac 2460
 gccatagcca tagcagtagg tgaggggaca gataggatta tagaagcatt tagaagcatt 2520
 tttagagcta ttctccacat acctacaaga ataagacagg gcttggaag gtctttgcta 2580
 taa 2583

<210> 31
 <211> 860
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> PG16 clon 10

10

<400> 31

ES 2 651 124 T3

Met Arg Val Arg Glu Thr Arg Lys Asn Tyr Gln His Leu Trp Trp Lys
1 5 10 15

Trp Gly Met Met Leu Leu Gly Met Leu Met Ile Cys Ser Ala Val Glu
20 25 30

Gln Thr Trp Val Thr Val Tyr Tyr Gly Val Pro Val Trp Lys Glu Ala
35 40 45

Asn Thr Ile Leu Phe Cys Ala Ser Asp Ala Lys Ala Tyr Asn Thr Glu
50 55 60

Val His Asn Val Trp Ala Thr His Ala Cys Val Pro Thr Asp Pro Asn
65 70 75 80

Pro Gln Glu Val Glu Leu Glu Asn Val Thr Glu Asn Phe Asn Met Trp
85 90 95

Lys Asn Asn Met Val Asp Gln Met His Gly Asp Ile Ile Ser Leu Trp
100 105 110

Asp Gln Ser Leu Lys Pro Cys Val Lys Leu Thr Pro Leu Cys Val Thr
115 120 125

Leu Ser Cys Thr Asp Asn Val Gly Asn Asp Thr Ser Thr Asn Asn Ser
130 135 140

Arg Trp Asp Lys Met Glu Lys Gly Glu Ile Lys Asn Cys Ser Phe Asn
145 150 155 160

Ile Thr Thr Asn Met Arg Asp Lys Met Gln Lys Gln Tyr Ala Leu Phe
165 170 175

Tyr Lys Leu Asp Val Val Pro Ile Glu Glu Gly Lys Asn Asn Asn Ser
180 185 190

Ser Phe Thr Asp Tyr Arg Leu Ile Ser Cys Ser Thr Ser Val Ile Thr
195 200 205

Gln Ala Cys Pro Lys Val Thr Phe Glu Pro Ile Pro Ile His Tyr Cys
210 215 220

Ala Pro Ala Gly Phe Ala Leu Leu Lys Cys Lys Asp Lys Lys Phe Asn
225 230 235 240

Gly Thr Gly Pro Cys Lys Asn Val Ser Thr Val Gln Cys Thr His Gly
245 250 255

ES 2 651 124 T3

Ile Lys Pro Val Val Ser Thr Gln Leu Leu Leu Asn Gly Ser Leu Ala
 260 265 270

Glu Glu Glu Val Val Ile Arg Ser Glu Asn Phe Ser Asn Asn Ala Arg
 275 280 285

Thr Ile Ile Val Gln Leu Asn Thr Ser Val Glu Ile Lys Cys Ile Arg
 290 295 300

Pro Asn Asn Asn Thr Arg Lys Gly Ile His Ile Gly Pro Gly Arg Ala
 305 310 315 320

Phe Tyr Thr Thr Gly Asp Ile Ile Gly Asp Ile Arg Gln Ala His Cys
 325 330 335

Asn Ile Ser Arg Gln Asn Trp Asn Asn Thr Leu Lys Gln Ile Ala Glu
 340 345 350

Lys Leu Arg Glu Gln Phe Gly Asn Lys Thr Ile Val Phe Arg Asn Ser
 355 360 365

Ser Gly Gly Asp Pro Glu Ile Val Met His Thr Phe Asn Cys Ala Gly
 370 375 380

Glu Phe Phe Tyr Cys Asn Thr Ala Glu Leu Phe Asn Ser Thr Trp Tyr
 385 390 395 400

Ala Asn Gly Thr Ile Ser Ile Gly Gly Gly Asn Lys Thr Asn Ile Ile
 405 410 415

Leu Pro Cys Arg Ile Lys Gln Phe Ile Asn Met Trp Gln Glu Val Gly
 420 425 430

Lys Ala Met Tyr Ala Pro Pro Ile Ser Gly Gln Ile Arg Cys Ser Ser
 435 440 445

Asn Ile Thr Gly Leu Leu Leu Thr Arg Asp Gly Gly Arg Gly Asn Gln
 450 455 460

Thr Asp Asn Gln Thr Glu Ile Phe Arg Pro Val Gly Gly Asp Met Lys
 465 470 475 480

Asn Asn Trp Arg Ser Glu Leu Tyr Lys Tyr Lys Val Val Arg Ile Glu
 485 490 495

Pro Leu Gly Ile Ala Pro Thr Arg Ala Lys Arg Arg Val Val Gln Arg

ES 2 651 124 T3

	500							505								510
Glu	Lys	Arg	Ala	Val	Gly	Ile	Gly	Ala	Leu	Phe	Leu	Gly	Phe	Leu	Gly	
		515					520					525				
Ala	Ala	Gly	Ser	Thr	Met	Gly	Ala	Ala	Ser	Met	Thr	Leu	Thr	Val	Gln	
	530					535					540					
Ala	Arg	Leu	Leu	Leu	Ser	Gly	Ile	Val	Gln	Gln	Gln	Asn	Asn	Leu	Leu	
545					550					555					560	
Arg	Ala	Ile	Glu	Ala	Gln	Gln	His	Leu	Leu	Gln	Leu	Thr	Val	Trp	Gly	
				565					570					575		
Ile	Lys	Gln	Leu	Gln	Ala	Arg	Val	Leu	Ala	Val	Glu	Arg	Tyr	Leu	Arg	
			580					585					590			
Asp	Gln	Gln	Leu	Leu	Gly	Ile	Trp	Gly	Cys	Ser	Glu	Lys	Leu	Ile	Cys	
		595					600					605				
Thr	Thr	Ala	Val	Pro	Trp	Asn	Val	Ser	Trp	Asn	Asn	Arg	Ser	Val	Asp	
	610					615						620				
Asp	Ile	Trp	Glu	Asn	Met	Thr	Trp	Met	Gln	Trp	Asp	Arg	Glu	Ile	Ser	
625					630					635					640	
Asn	Tyr	Thr	Ser	Leu	Ile	Tyr	Thr	Leu	Ile	Glu	Glu	Ser	Gln	Asn	Gln	
				645					650					655		
Gln	Glu	Lys	Asn	Glu	Gln	Glu	Leu	Leu	Ala	Leu	Asp	Lys	Trp	Ala	Asn	
			660					665					670			
Leu	Trp	Asn	Trp	Phe	Asn	Ile	Thr	Glu	Trp	Leu	Trp	Tyr	Ile	Lys	Ile	
		675					680					685				
Phe	Ile	Met	Ile	Val	Gly	Gly	Leu	Val	Gly	Leu	Arg	Ile	Val	Phe	Ala	
	690					695					700					
Val	Leu	Ser	Ile	Val	Asn	Arg	Val	Arg	Gln	Gly	Tyr	Ser	Pro	Leu	Ser	
705					710					715					720	
Phe	Gln	Thr	His	Leu	Pro	Ala	Gln	Arg	Gly	Pro	Asp	Arg	Pro	Gly	Gly	
				725					730					735		
Ile	Glu	Glu	Glu	Gly	Gly	Glu	Ser	Asp	Arg	Asp	Arg	Ser	Gly	Arg	Leu	
			740					745					750			

ES 2 651 124 T3

Val Asn Gly Phe Leu Ala Ile Ile Trp Ile Asp Leu Arg Ser Leu Cys
 755 760 765

Leu Phe Ser Tyr His His Leu Arg Asp Leu Leu Leu Ile Val Thr Arg
 770 775 780

Ile Val Glu Ile Leu Gly Arg Arg Gly Trp Glu Ile Leu Lys Tyr Trp
 785 790 795 800

Trp Asn Leu Leu Gln Tyr Trp Ile Gln Glu Leu Lys Asn Ser Ala Val
 805 810 815

Ser Leu Leu Asn Ala Ile Ala Ile Ala Val Gly Glu Gly Thr Asp Arg
 820 825 830

Ile Ile Glu Ala Phe Arg Ser Ile Phe Arg Ala Ile Leu His Ile Pro
 835 840 845

Thr Arg Ile Arg Gln Gly Leu Glu Arg Ser Leu Leu
 850 855 860

<210> 32
 <211> 860
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Secuencia Env AC10

10

<400> 32
 Met Arg Val Arg Glu Thr Arg Lys Asn Tyr Gln His Leu Trp Trp Lys
 1 5 10 15

Trp Gly Met Met Leu Leu Gly Met Leu Met Ile Cys Ser Ala Val Glu
 20 25 30

Gln Thr Trp Val Thr Val Tyr Tyr Gly Val Pro Val Trp Lys Glu Ala
 35 40 45

Asn Thr Ile Leu Phe Cys Ala Ser Asp Ala Lys Ala Tyr Asn Thr Glu
 50 55 60

Val His Asn Val Trp Ala Thr His Ala Cys Val Pro Thr Asp Pro Asn
 65 70 75 80

Pro Gln Glu Val Glu Leu Glu Asn Val Thr Glu Asn Phe Asn Met Trp
 85 90 95

Lys Asn Asn Met Val Asp Gln Met His Gly Asp Ile Ile Ser Leu Trp

ES 2 651 124 T3

	100		105		110														
Asp	Gln	Ser	Leu	Lys	Pro	Cys	Val	Lys	Leu	Thr	Pro	Leu	Cys	Val	Thr				
	115						120					125							
Leu	Ser	Cys	Thr	Asp	Asn	Val	Gly	Asn	Asp	Thr	Ser	Thr	Asn	Asn	Ser				
	130					135					140								
Arg	Trp	Asp	Lys	Met	Glu	Lys	Gly	Glu	Ile	Lys	Asn	Cys	Ser	Phe	Asn				
145					150					155					160				
Ile	Thr	Thr	Asn	Met	Arg	Asp	Lys	Met	Gln	Lys	Gln	Tyr	Ala	Leu	Phe				
				165					170						175				
Tyr	Lys	Leu	Asp	Val	Val	Pro	Ile	Glu	Glu	Gly	Lys	Asn	Asn	Asn	Ser				
			180					185					190						
Ser	Phe	Thr	Asp	Tyr	Arg	Leu	Ile	Ser	Cys	Asn	Thr	Ser	Val	Ile	Thr				
		195					200					205							
Gln	Ala	Cys	Pro	Lys	Val	Thr	Phe	Glu	Pro	Ile	Pro	Ile	His	Tyr	Cys				
	210					215					220								
Ala	Pro	Ala	Gly	Phe	Ala	Leu	Leu	Lys	Cys	Lys	Asp	Lys	Lys	Phe	Asn				
225					230					235					240				
Gly	Thr	Gly	Pro	Cys	Lys	Asn	Val	Ser	Thr	Val	Gln	Cys	Thr	His	Gly				
				245					250					255					
Ile	Lys	Pro	Val	Val	Ser	Thr	Gln	Leu	Leu	Leu	Asn	Gly	Ser	Leu	Ala				
			260					265					270						
Glu	Glu	Glu	Val	Val	Ile	Arg	Ser	Glu	Asn	Phe	Ser	Asn	Asn	Ala	Arg				
		275					280					285							
Thr	Ile	Ile	Val	Gln	Leu	Asn	Thr	Ser	Val	Glu	Ile	Lys	Cys	Ile	Arg				
	290					295					300								
Pro	Asn	Asn	Asn	Thr	Arg	Lys	Gly	Ile	His	Ile	Gly	Pro	Gly	Arg	Ala				
305					310					315					320				
Phe	Tyr	Thr	Thr	Gly	Asp	Ile	Ile	Gly	Asp	Ile	Arg	Gln	Ala	His	Cys				
				325					330					335					
Asn	Ile	Ser	Arg	Gln	Asn	Trp	Asn	Asn	Thr	Leu	Lys	Gln	Ile	Ala	Glu				
			340				345						350						

ES 2 651 124 T3

Lys Leu Arg Glu Gln Phe Gly Asn Lys Thr Ile Val Phe Arg Asn Ser
 355 360 365

Ser Gly Gly Asp Pro Glu Ile Val Met His Thr Phe Asn Cys Ala Gly
 370 375 380

Glu Phe Phe Tyr Cys Asn Thr Ala Glu Leu Phe Asn Ser Thr Trp Tyr
 385 390 395 400

Ala Asn Gly Thr Ile Ser Ile Gly Gly Gly Asn Lys Thr Asn Ile Ile
 405 410 415

Leu Pro Cys Arg Ile Lys Gln Phe Ile Asn Met Trp Gln Glu Val Gly
 420 425 430

Lys Ala Met Tyr Ala Pro Pro Ile Ser Gly Gln Ile Arg Cys Ser Ser
 435 440 445

Asn Ile Thr Gly Leu Leu Leu Thr Arg Asp Gly Gly Arg Gly Asn Gln
 450 455 460

Thr Asp Asn Gln Thr Glu Ile Phe Arg Pro Val Gly Gly Asp Met Lys
 465 470 475 480

Asn Asn Trp Arg Ser Glu Leu Tyr Lys Tyr Lys Val Val Arg Ile Glu
 485 490 495

Pro Leu Gly Ile Ala Pro Thr Arg Ala Lys Arg Arg Val Val Gln Arg
 500 505 510

Glu Lys Arg Ala Val Gly Ile Gly Ala Leu Phe Leu Gly Phe Leu Gly
 515 520 525

Ala Ala Gly Ser Thr Met Gly Ala Ala Ser Met Thr Leu Thr Val Gln
 530 535 540

Ala Arg Leu Leu Leu Ser Gly Ile Val Gln Gln Gln Asn Asn Leu Leu
 545 550 555 560

Arg Ala Ile Glu Ala Gln Gln His Leu Leu Gln Leu Thr Val Trp Gly
 565 570 575

Ile Lys Gln Leu Gln Ala Arg Val Leu Ala Val Glu Arg Tyr Leu Arg
 580 585 590

Asp Gln Gln Leu Leu Gly Ile Trp Gly Cys Ser Gly Lys Leu Ile Cys
 595 600 605

ES 2 651 124 T3

Thr Thr Ala Val Pro Trp Asn Val Ser Trp Asn Asn Arg Ser Val Asp
 610 615 620

Asp Ile Trp Glu Asn Met Thr Trp Met Gln Trp Asp Arg Glu Ile Ser
 625 630 635 640

Asn Tyr Thr Ser Leu Ile Tyr Thr Leu Ile Glu Glu Ser Gln Asn Gln
 645 650 655

Gln Glu Lys Asn Glu Gln Glu Leu Leu Ala Leu Asp Lys Trp Ala Asn
 660 665 670

Leu Trp Asn Trp Phe Asn Ile Thr Glu Trp Leu Trp Tyr Ile Lys Ile
 675 680 685

Phe Ile Met Ile Val Gly Gly Leu Val Gly Leu Arg Ile Val Phe Ala
 690 695 700

Val Leu Ser Ile Val Asn Arg Val Arg Gln Gly Tyr Ser Pro Leu Ser
 705 710 715 720

Phe Gln Thr His Leu Pro Ala Gln Arg Gly Pro Asp Arg Pro Gly Gly
 725 730 735

Ile Glu Glu Glu Gly Gly Glu Ser Asp Arg Asp Arg Ser Gly Arg Leu
 740 745 750

Val Asn Gly Phe Leu Ala Ile Ile Trp Ile Asp Leu Arg Ser Leu Cys
 755 760 765

Leu Phe Ser Tyr His His Leu Arg Asp Leu Leu Leu Ile Val Thr Arg
 770 775 780

Ile Val Glu Ile Leu Gly Arg Arg Gly Trp Glu Ile Leu Lys Tyr Trp
 785 790 795 800

Trp Asn Leu Leu Gln Tyr Trp Ile Gln Glu Leu Lys Asn Ser Ala Val
 805 810 815

Ser Leu Leu Asn Ala Ile Ala Ile Ala Val Gly Glu Gly Thr Asp Arg
 820 825 830

Ile Ile Glu Ala Phe Arg Ser Ile Phe Arg Ala Ile Leu His Ile Pro
 835 840 845

Thr Arg Ile Arg Gln Gly Leu Glu Arg Ser Leu Leu
 850 855 860

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un polipéptido capaz de inducir anticuerpos neutralizantes contra un virus que comprende una variante de gp120 de VIH-1 o un fragmento inmunogénico de la misma en donde el polipéptido o el fragmento inmunogénico del mismo comprende la secuencia SEQ ID NO:4.
- 10 2. Un anticuerpo que se une específicamente a un polipéptido según la reivindicación 1.
3. Un polinucleótido que codifica un polipéptido según la reivindicación 1.
4. Un polinucleótido según la reivindicación 3 que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 3.
5. Un vector de expresión que comprende un polinucleótido según la reivindicación 4.
- 15 6. Una célula huésped que comprende un polipéptido según la reivindicación 1, un polinucleótido según la reivindicación 3 o un vector de expresión según la reivindicación 5.
- 20 7. Una composición inmunogénica o una vacuna que comprende un polipéptido según la reivindicación 1, un polinucleótido según la reivindicación 3 o un vector de expresión según la reivindicación 5.
8. Un polipéptido según la reivindicación 1, un polinucleótido según la reivindicación 3, un vector de expresión según la reivindicación 5 o una composición inmunogénica o vacuna según la reivindicación 7 para uso en medicina.
- 25 9. Un polipéptido según la reivindicación 1, un polinucleótido según la reivindicación 3, un vector de expresión según la reivindicación 5 o una composición inmunogénica o vacuna según la reivindicación 7 para uso en la prevención de una enfermedad causada por una infección de VIH.
- 30 10. Un método para la detección en una muestra de anticuerpos neutralizantes específicos hacia un patógeno determinado que comprende:
- 35 (i) poner en contacto dicha muestra con un polipéptido según la reivindicación 1, y
(ii) detectar la formación de un complejo inmunitario entre dicho polipéptido y dichos anticuerpos neutralizantes.
- 40 11. Un método in vitro para la detección de una respuesta de anticuerpo neutralizante contra una infección de virus en un sujeto que comprende detectar en una muestra de dicho sujeto la presencia de anticuerpos neutralizantes usando un método según la reivindicación 10, en donde la presencia de anticuerpos neutralizantes en dicha muestra con respecto a un sujeto control es indicativa de una respuesta de anticuerpos neutralizantes a una infección de virus en dicho sujeto.
12. Un método según las reivindicaciones 10 o 11 en donde el virus es VIH.
- 45 13. Un método como se define en la reivindicación 12 en donde la muestra es de un paciente infectado con VIH-1 o en donde la muestra es de un receptor de vacuna contra el SIDA.

	130	140	150	16
ENV AC10 SECUENCIADO	KLTPLCVTL	CTDNVGNDS	TNNSRWDRME	KGEIKNCSFN
L1-1 CONTIG ENVY..
L1-2 CONTIG ENV	...Q..D...
L1-3 CONTIG ENVE.....G
L1-4 CONTIG ENVI.
L1-5 CONTIG ENV
L1-6 CONTIG ENVX.
L2-1 CONTIG ENV
L2-2 CONTIG ENVX.....
L2-3 CONTIG ENVI.	..I.....C.
L2-4 CONTIG ENV
L2-5 CONTIG ENV
L3-2 contig env
L3-3 CONTIG ENV
L3-4 CONTIG ENVM.....
L3-5 CONTIG ENV
Contig BR1 CLON1 pcDNA	YN.....
Contig BR1 CLON2 pcDNA	YN.....
Contig BR1 CLON3 pcDNA	YK.....
Contig BR1 CLON4 pcDNA	YK.....
Contig BR1 CLON 1	YN.....G..Y
Contig BR1 CLON 4	YN.....G..Y
Contig BR1 CLON 6	YN.....G..Y

FIG. 1

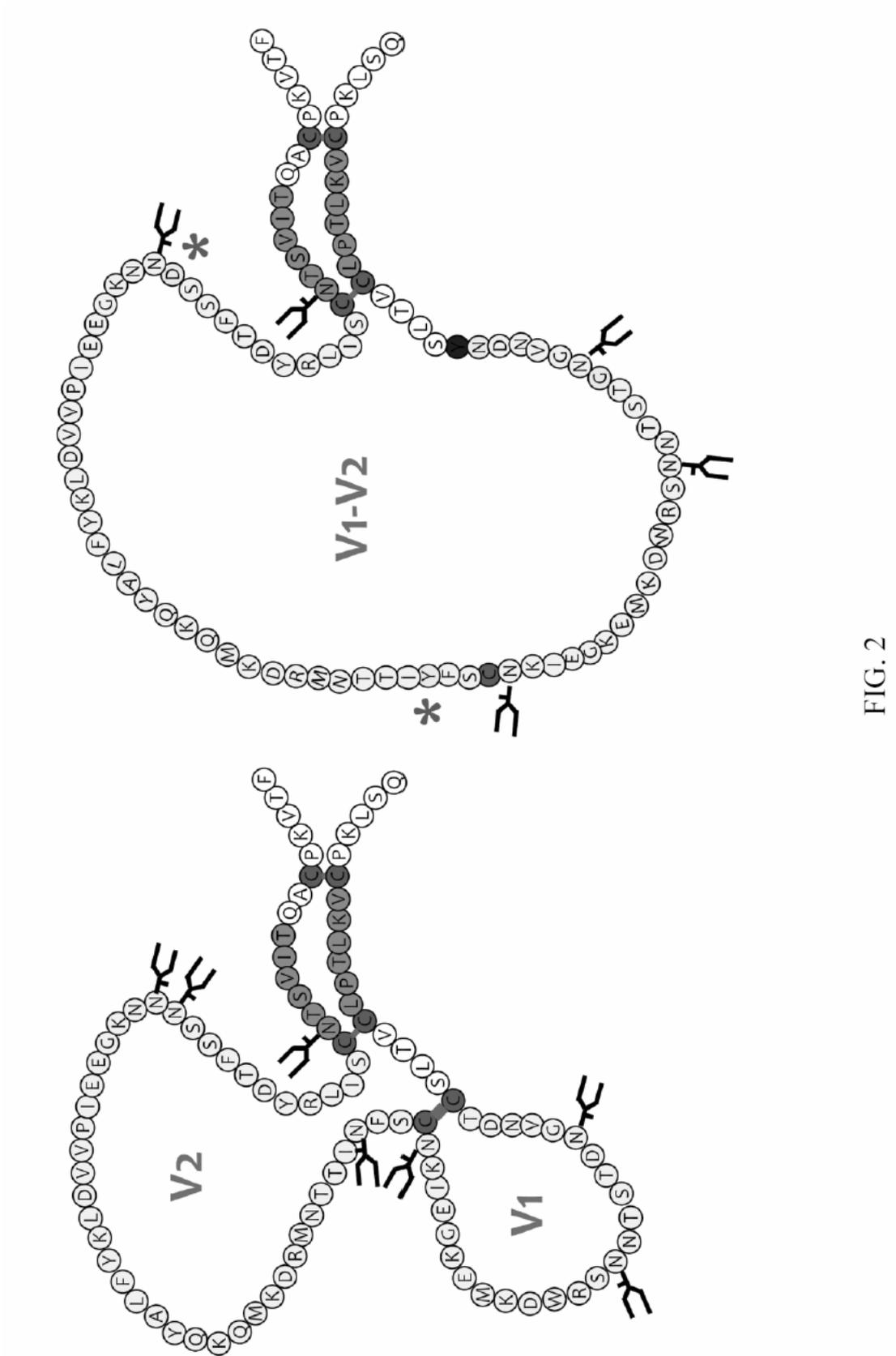


FIG. 2

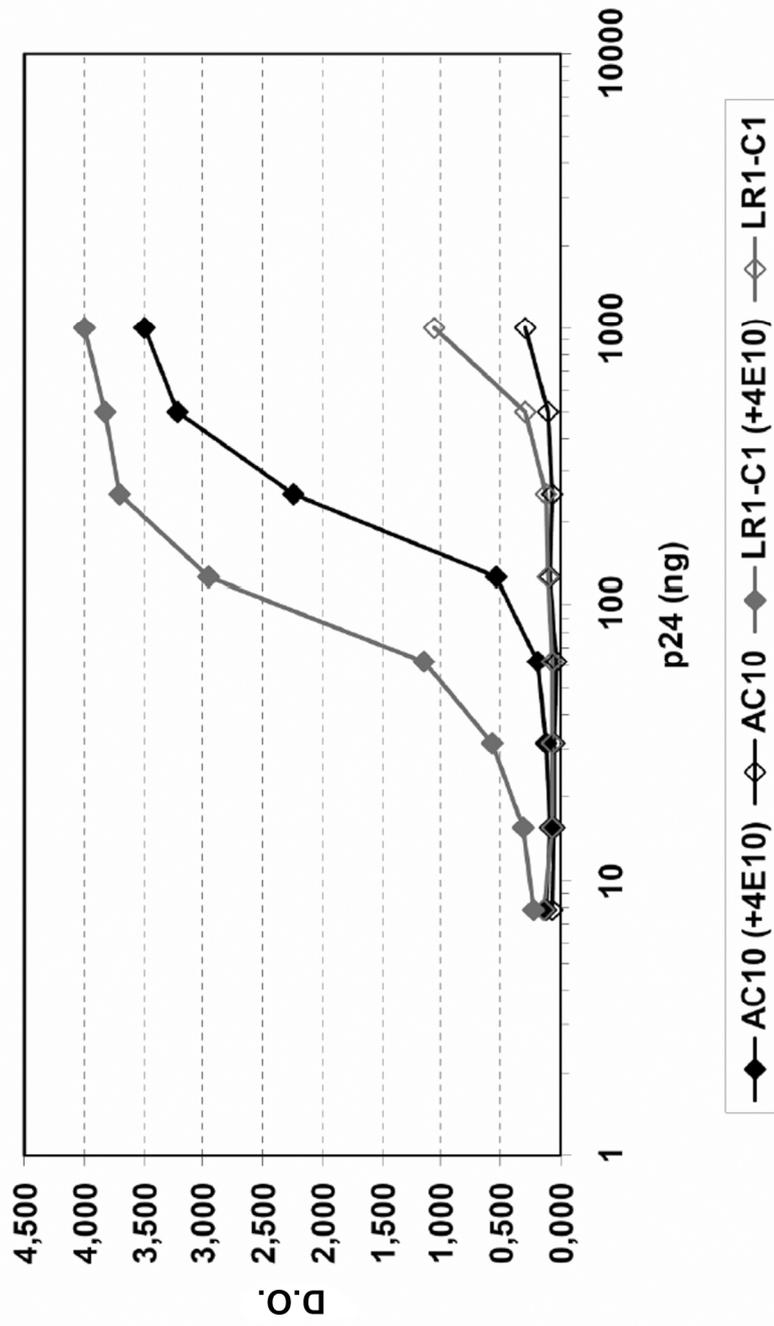


FIG. 3

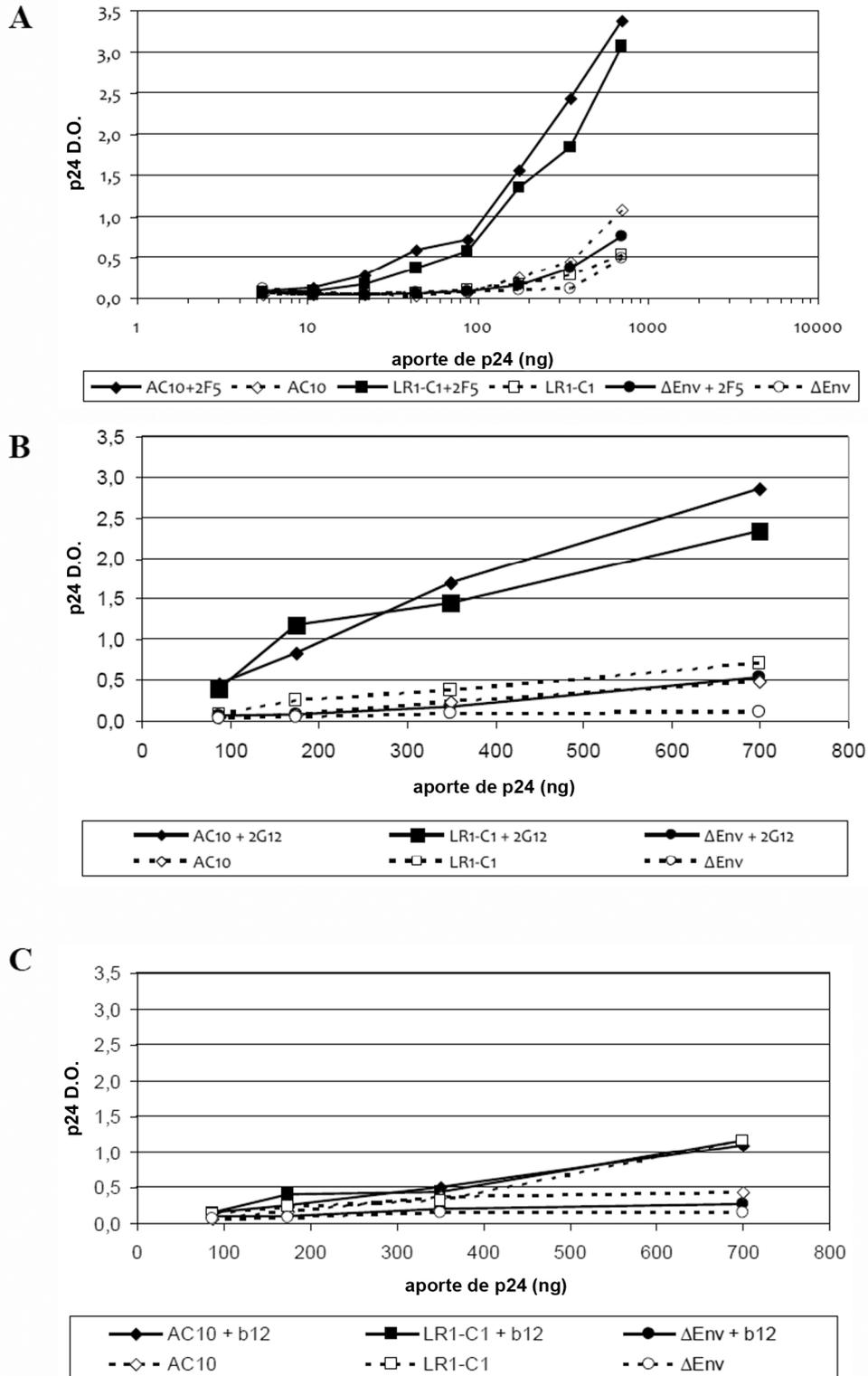


FIG. 4

ENV AC10 SECUENCIADO FG16 CLON 10	90	100	110	120	130	140	150	160

ENV AC10 SECUENCIADO FG16 CLON 10	170	180	190	200	210	220	230	240

ENV AC10 SECUENCIADO FG16 CLON 10	250	260	270	280	290	300	310	320

ENV AC10 SECUENCIADO FG16 CLON 10	330	340	350	360	370	380	390	400

ENV AC10 SECUENCIADO FG16 CLON 10	410	420	430	440	450	460	470	480

ENV AC10 SECUENCIADO FG16 CLON 10	490	500	510	520	530	540	550	560

ENV AC10 SECUENCIADO FG16 CLON 10	570	580	590	600	610	620	630	640

ENV AC10 SECUENCIADO FG16 CLON 10	650	660	670	680	690	700	710	720

FIG. 5

	730	740	750	760	770	780	790	800
ENV AC10 SECUENCIADO
FG16 CLON 10	FQTHLPAQRG PDRFGGIEEE GGEDRDRSG RLVNGFLAI WIDLRSLCLF SYHHLRDLIL IVTRIVEILG RRGWEILKYW							
	810	820	830	840	850	860		
ENV AC10 SECUENCIADO
FG16 CLON 10	WNLLQYWIQE LKNSAVSLIN AIAIATVGEET DRIIEAFRSI FFAILHIPTR IRQGLERSLL *							

FIG. 5 (cont.)