

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 659 875**

51 Int. Cl.:

A61K 39/21 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.10.2009 PCT/US2009/060494**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.04.2010 WO10042942**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.10.2009 E 09820044 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.01.2018 EP 2340038**

54 Título: **Vacuna de trómero de Env VIH-1 bioquímicamente estabilizado**

30 Prioridad:

10.10.2008 US 104449 P

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

19.03.2018

73 Titular/es:

**CHILDREN'S MEDICAL CENTER CORPORATION (50.0%)
55 Shattuck Street
Boston, MA 02115, US y
BETH ISRAEL DEACONESS MEDICAL CENTER, INC. (50.0%)**

72 Inventor/es:

**HARRISON, STEPHEN, C.;
CHEN, BING;
BAROUCH, DAN, H.;
NKOLOLA, JOSEPH, P. y
SEAMAN, MICHAEL, SCOTT**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 659 875 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

Vacuna de trímero de Env VIH-1 bioquímicamente estabilizado

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a nuevas composiciones para generar vacunas (por ejemplo, vacunas de VIH-1).

10 Antecedentes

Los inmunógenos que imitan la estructura trimérica de la envoltura (Env) en el virión del VIH-1 nativo se están buscando activamente como vacunas basadas en anticuerpos. Sin embargo, se ha demostrado que es difícil producir inmunógenos de Env triméricos, bioquímicamente estables e inmunogénicos.

15 La técnica anterior incluye el Journal of Virology, 78, 2004, 4710-9 que describe una forma trimérica de una proteína env del VIH1 sin escindir (de un aislado designado YU-2) con un motivo de trimerización sintético de la proteína de fibrina del fago T4

20 El aislado CZA97.012 de VIH-1 es conocido de Aids Research and Human Retroviruses, 17, 2001, 161-8.

Resumen

La invención a la que pertenece esta especificación se establece en las reivindicaciones adjuntas a la descripción.

25 La presente descripción se basa en parte en el descubrimiento de un trímero estabilizado de una cepa de clado C de VIH-1 y el sorprendente descubrimiento de que un trímero estabilizado de una cepa de clado A y un trímero estabilizado de una cepa de clado C fueron cada uno capaces de inducir una respuesta de anticuerpos ampliamente neutralizante *in vivo*.

30 En ciertos aspectos, se proporciona un método para tratar terapéuticamente un sujeto infectado con VIH, por ejemplo, VIH-1, que incluye poner en contacto un sujeto infectado con VIH con un polipéptido aislado que comprende un trímero estabilizado de una glicoproteína de la envoltura de VIH y producir antisero neutralizante (por ejemplo, ampliamente neutralizante) en el sujeto para tratar terapéuticamente al sujeto. En ciertos aspectos, el método incluye neutralizar el VIH-1 seleccionado a partir de uno o más de clado A, clado B y clado C. En otros aspectos, el método incluye un trímero de gp140. En ciertos aspectos, el trímero de gp140 incluye uno o más péptidos del lazo variable seleccionado del grupo que consiste en V1, V2 y V3. En otros aspectos, el trímero de gp140 se deriva del aislado primario CZA97.012 o 92UG037.8. En ciertos aspectos, el título de VIH en el sujeto infectado con VIH disminuye después de poner en contacto al sujeto con el polipéptido aislado.

40 En ciertos aspectos, se proporciona un método para inhibir una actividad mediada por VIH en un sujeto que lo necesite. El método incluye poner en contacto un sujeto infectado con VIH con un polipéptido aislado que incluye un trímero estabilizado de una glicoproteína de la envoltura de VIH, y producir antiseros neutralizantes (por ejemplo, ampliamente neutralizantes) en el sujeto para inhibir la actividad mediada por VIH. En ciertos aspectos, la actividad mediada por el VIH es la diseminación viral. En otros aspectos, el título de VIH en el sujeto infectado con VIH disminuye después de poner en contacto al sujeto con el polipéptido aislado.

45 En ciertos aspectos, se proporciona un método para prevenir la infección por VIH en un sujeto. El método incluye poner en contacto un sujeto con un polipéptido aislado que comprende un trímero estabilizado de una glicoproteína de la envoltura del VIH, e inducir en el sujeto inmunidad al VIH.

50 En ciertos aspectos, se proporciona una vacuna. La vacuna incluye un trímero estabilizado que comprende un polipéptido de gp140 aislado derivado del aislado primario CZA97.012 o el aislado primario 92UG037.8 y que tiene un dominio de oligomerización. La vacuna induce la producción de antiseros neutralizantes (por ejemplo, ampliamente neutralizantes) contra el VIH después de la inyección en un sujeto.

55 En otros aspectos, se proporciona un trímero de gp140 estabilizado, antigénico, aislado. El trímero estabilizado incluye un polipéptido de gp140 derivado del aislado primario CZA97.012 o el aislado primario 92UG037.8 y un dominio de oligomerización. El trímero estabilizado induce la producción de antiseros neutralizantes (por ejemplo, ampliamente neutralizantes) contra el VIH después de la inyección en un sujeto.

60 Aun en otros aspectos, se proporciona un vector que codifica un polinucleótido que incluye un trímero de gp140 estabilizado, antigénico. El vector incluye un polipéptido de gp140 derivado del aislado primario CZA97.012 o el aislado primario 92UG037.8 y un dominio de oligomerización. En ciertos aspectos, el trímero de gp140 estabilizado incluye uno o más péptidos de lazo variable seleccionados del grupo que consiste en V1, V2 y V3. En otros aspectos, el trímero de gp140 estabilizado comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85%, 90%, 95% o más de identidad de secuencia con la sec con núm. de ident.:7 o la sec con núm. de ident.:8. En otros aspectos, el trímero de gp140

65

estabilizado comprende una secuencia de aminoácidos que incluye la sec con núm. de ident.:7 o la sec con núm. de ident.:8. En ciertos aspectos, el trímero de gp140 estabilizado induce la producción de antisueros ampliamente neutralizantes contra el VIH después de la inyección en un sujeto.

5 Breve descripción de los dibujos

10 **Las Figuras 1A-1B** representan gráficamente los títulos de ELISA contra gp140 en sueros de conejillo de indias. Se evaluaron sueros obtenidos 4 semanas después de cada inmunización en los ELISA de punto final contra los trímeros de clado A y de clado C en los conejillos de indias vacunados (A) clado A y (B) clado C. Los gráficos muestran la media geométrica de los títulos para cada intervalo de tiempo +/- desviación estándar. La línea horizontal indica el umbral del fondo.

15 **Las Figuras 2A-2B** representan gráficamente resúmenes de los títulos de anticuerpos neutralizantes (NAb) contra virus de nivel 2. Se resumen los títulos de NAb contra seis aislados primarios de nivel 2 clado A (rojo), clado B (azul) y clado C (verde) para cada conejillo de indias. (A) pre- y (B) postinmunización. La línea horizontal indica el título >60 de límite de positividad.

20 **Las Figuras 3A-3B** representan gráficamente los datos de neutralización sin procesar de la muestra con IgG purificada contra el virus ZM109F.PB4 clado C de nivel 2. Las diluciones en serie de IgG purificada de conejillo de indias inmunizados con el trímero (A) de clado A o (B) de clado C y animales de control vírgenes se probaron para la actividad de NAb contra el virus ZM109F.PB4 clado C de nivel 2.

25 **Las Figuras 4A-4D** representan respuestas de anticuerpos a péptidos de lazo variable. Sueros pre y post inmunización de animales inmunizados con trímero (A) de clado A y (B) de clado C se evaluaron mediante ELISA contra péptidos de lazo V1, V2 y V3 homólogos y heterólogos. El gráfico representa la media geométrica de los títulos para cada grupo +/- desviación estándar. La línea horizontal indica el umbral de fondo. (C) La IgG purificada obtenida de los sueros de animales representativos inmunizados con los trímeros de clado A (conejillo de indias # 5) y clado C (conejillo de indias # 10) se preincubaron con un lazo V3 lineal o péptidos desordenados y después se probaron en los ensayos de neutralización de TZM.bl contra los virus SF162.LS (nivel 1-B), ZM109F.PB4 (nivel 2-C) y 6535.3 (nivel 2-B). (D) Alineamiento de secuencia de los lazos peptídicos V1-V3 lineales 92UG037.8 (sec. con núms. de ident.:3, 5 y 7) y CZA97012 (sec. con núms. de ident.:4, 6 y 8). Los residuos de aminoácidos resaltados en escala de grises indican homología entre las secuencias en esa posición.

35 **Las Figuras 5A-5D** representan gráficamente los títulos de ELISA contra gp140 a continuación de regímenes de vacunación de sensibilización/refuerzo heterólogos. Se evaluaron mediante los ELISA sueros obtenidos 4 semanas después de cada inmunización en los grupos (A, B) de refuerzo de ADN/proteína y los grupos de ADN/rAd26 (C, D). Los gráficos muestran la media geométrica de los títulos para cada intervalo de tiempo +/- desviación estándar. 3* indica los títulos de ELISA después de 3 inmunizaciones pero antes del refuerzo. La línea horizontal indica el umbral de fondo.

40 **La Figura 6** representa los títulos de neutralización de sueros de conejillo de indias de HIV-1 de nivel 1 y 2 en los ensayos TZM-bl. Se probaron sueros de preinmunización (Pre) y post vacunación 3^{er} trímero (Post) contra paneles de pseudovirus de nivel 1 y nivel 2 clado A, B y C en ensayos de neutralización TZM.bl. Los valores que se muestran son las diluciones de suero que representan los títulos ID₅₀ para cada animal. Los valores resaltados en amarillo indican respuestas positivas definidas como: (i) >3 veces por encima del fondo preinmune (ii) > 2 veces por encima del control del virus de la leucemia murina (MuLv), y (iii) título ID₅₀ absoluto >60.

45 **La Figura 7** representa un resumen de los títulos de NAb contra los virus de clado A, B y C de nivel 2. Se muestran el número y por ciento de las muestras positivas probadas.

50 **La Figura 8** representa la neutralización ID₅₀ de aislados selectos de nivel 1 y 2 con IgG purificada de conejillo de indias. Se analizó la IgG purificada de conejillo de indias individuales en ensayos de neutralización TZM.bl contra un panel selecto de virus de nivel 1 y 2. Los datos se representan como títulos IC₅₀ en µg/ml (los números inferiores reflejan una mejor neutralización). Los valores resaltados en amarillo indican muestras con actividad neutralizante positiva.

55 **La Figura 9** representa los títulos de neutralización de sueros de conejillo de indias de HIV-1 de nivel 1 en ensayos TZM-bl a continuación de los regímenes de vacunación de sensibilización/refuerzo. Los sueros de preinmunización, vacunación post tercer ADN y refuerzo post rAd26/proteína de conejillo de indias se probaron para las respuestas de NAb contra virus de nivel 1 en ensayos de neutralización TZM.bl. Los valores que se muestran son las diluciones de suero que representan los títulos ID₅₀ para cada animal. Los valores resaltados indican respuestas positivas.

60 **La Figura 10** representa un ensayo de resonancia de plasminógeno de superficie de 92UG037.8-gp140-Fd que se une a CD4 (panel izquierdo, K_d = 1,9 nM), y a 2G12 (panel derecho, K_d = 17,9 nM).

65 **La Figura 11** representa un ensayo de resonancia de plasminógeno de superficie de 92UG037.8-gp140-Fd que se une a mAb 17b (panel izquierdo), y a los Clúster I de mAb (panel derecho).

Las Figuras 12A-12B representan las secuencias de aminoácidos del trímero 92UG037.8-gp140-6xHis (A) (sec con núm. de ident.:1) y el trímero CZA97.012-gp140-6xHis (B) (sec con núm. de ident.:2).

La Figura 13 representa esquemáticamente trímeros de gp140 de HIV-1 estabilizados plegados (gp140-Fd). Gp160 es el precursor de longitud completa. Varios segmentos de gp120 y gp41 se designan como sigue: C1-C5, regiones conservadas 1-5; V1-V5, regiones variables 1-5; F, péptido de fusión; HR1, repetición heptad 1; lazo C-C, el lazo inmunodominante con un enlace disulfuro conservado; HR2, repetición heptad 2; MPER, región externa proximal a la membrana; TM, anclaje transmembrana; CT, cola citoplásmica. Gp140-Fd representa el ectodominio no escindido de gp160 con una etiqueta de trimerización plegada de fibritina de T4 y etiqueta de His en su extremo C-terminal.

Descripción detallada

La mayoría de los anticuerpos inducidos por el VIH-1 son ineficaces para prevenir el inicio o la diseminación de la infección, ya que no son neutralizantes o son estrictamente específicos del aislado. Uno de los mayores desafíos en el desarrollo de la vacuna contra el VIH es diseñar un inmunógeno de la envoltura del VIH que pueda inducir anticuerpos protectores y neutralizantes efectivos contra las diversas cepas de VIH-1 que caracterizan a la pandemia global. De hecho, la generación de anticuerpos "ampliamente neutralizantes" que reconocen regiones relativamente conservadas en la glicoproteína de la envoltura es rara. La presente invención se basa en parte en la generación de proteínas de la envoltura de VIH-1 triméricas estabilizadas que sorprendentemente inducen una respuesta de anticuerpos ampliamente neutralizante *in vivo*.

Los compuestos y métodos descritos en la presente descripción pueden usarse para inhibir o disminuir la infectividad de uno o más patógenos (por ejemplo, virus, bacterias, hongos, parásitos y similares) que tienen una o más proteínas de superficie multiméricas. La presente descripción se dirige en parte a conformaciones de oligómero estabilizado (por ejemplo, trímero) de la proteína de la envoltura (por ejemplo, gp41) de un virus de inmunodeficiencia humana (por ejemplo, VIH-1) y a métodos para su uso. En ciertos aspectos, los compuestos y métodos descritos en la presente descripción se usan para inhibir o disminuir una o más actividades mediadas por VIH (por ejemplo, infección, fusión (por ejemplo, entrada de células objetivo y/o formación de sincitios), diseminación viral y similares) en un sujeto, que a su vez puede disminuir el título de VIH.

Como se usa en la presente descripción, los términos "inhibir" o "disminuir" con respecto al VIH se refieren a una inhibición o disminución de una actividad mediada por VIH (por ejemplo, infección, fusión (por ejemplo, entrada de células objetivo y/o formación de sincitios), diseminación viral y similares) y/o una disminución en el título viral. Por ejemplo, una actividad mediada por VIH puede disminuir en 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9% o más.

El VIH es un miembro del género *Lentivirinae*, parte de la familia de *Retroviridae*. Dos especies de VIH infectan a los humanos: HIV-1 y HIV-2. Como se usa en la presente descripción, los términos "virus de inmunodeficiencia humana" y "VIH" se refieren, pero no se limitan a, VIH-1 y VIH-2. En ciertas modalidades ilustrativas, las proteínas de la envoltura descritas en la presente descripción se refieren a las presentes en cualquiera de los cinco serogrupos de lentivirus que se reconocen: primate (por ejemplo, VIH-1, VIH-2, virus de la inmunodeficiencia de simio (SIV)); ovejas y cabras (por ejemplo, virus de visna, virus de la encefalitis por artritis caprina); caballo (virus de la anemia infecciosa equina); gato (por ejemplo, virus de la inmunodeficiencia felina (FIV)); y ganado (por ejemplo, virus de la inmunodeficiencia bovina (BIV)) (Ver descripciones del Comité Internacional de Taxonomía de Virus).

El VIH se clasifica en múltiples clados con un alto grado de divergencia genética. Como se usa en la presente descripción, el término "clado" se refiere a virus de inmunodeficiencia humana relacionados clasificados de conformidad con su grado de similitud genética. Actualmente hay tres grupos de VIH-1 aislados: M, N y O. El grupo M (cepas principales) consiste de al menos diez clados, A hasta J. El grupo O (cepas externas) puede consistir en un número similar de clados. El grupo N es un nuevo aislado de VIH-1 que no se ha clasificado en el grupo M u O. En ciertas modalidades ilustrativas, un anticuerpo ampliamente neutralizante descrito en la presente descripción reconocerá y elevará una respuesta inmune contra dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez o más clados y/o dos o más grupos de VIH.

Como se usa en la presente descripción, el término "glicoproteína de la envoltura" se refiere, pero no se limita a, la glicoproteína que se expresa en la superficie de la envoltura de viriones de VIH y la superficie de la membrana plasmática de células infectadas por VIH. El gen *env* codifica gp160, que se escinde proteolíticamente en gp120 y gp140. La gp120 se une al receptor CD4 en una célula objetivo que tiene dicho receptor, tal como, por ejemplo, una célula T-auxiliadora. La gp41 no se une covalentemente a gp120, y proporciona la segunda etapa por la que el VIH entra a la célula. Originalmente se entierra dentro de la envoltura viral, pero cuando gp120 se une a un receptor CD4, gp120 cambia su conformación y hace que la gp41 quede expuesta, donde puede ayudar a la fusión con la célula huésped.

Como se usa en la presente descripción, el término "oligómero" cuando se usa en el contexto de una proteína y/o polipéptido pretende incluir, pero no se limita a, una proteína o polipéptido que tiene al menos dos subunidades. Los

oligómeros incluyen, pero no se limitan a, dímeros, trímeros, tetrámeros, pentámeros, hexámeros, heptámeros, octámeros, nonámeros, decámeros y similares.

5 Como se usa en la presente descripción, el término "oligómero estabilizado" se refiere, pero no se limita a, un oligómero que incluye una secuencia de proteína y/o polipéptido que aumenta la estabilidad (por ejemplo, mediante la presencia de uno o más dominios de oligomerización) de la estructura oligomérica (por ejemplo, reduce la capacidad del oligómero para disociarse en unidades monoméricas). En ciertas modalidades ilustrativas, un oligómero estabilizado es un trímero estabilizado.

10 Como se usa en la presente descripción, el término "dominio de oligomerización" se refiere, pero no se limita a, una secuencia polipeptídica que puede usarse para aumentar la estabilidad de una proteína oligomérica de la envoltura tal como, por ejemplo, para aumentar la estabilidad de un trímero de gp41 de VIH. Los dominios de oligomerización pueden usarse para aumentar la estabilidad de los polipéptidos homooligoméricos así como de los polipéptidos heterooligoméricos. Los dominios de oligomerización son bien conocidos en la técnica.

15 Como se usa en la presente descripción, los términos "dominio de trimerización" y "etiqueta de trimerización" se refieren a un dominio de oligomerización que estabiliza polipéptidos triméricos (por ejemplo, un polipéptido homotrimérico gp41). Los ejemplos de dominio de trimerización incluyen, pero no se limitan a, el trímero "plegado" de fibrina T4; el trímero superenrollado derivado de GCN4 (Yang y otros (2002) J. Virol. 76:4634); la subunidad catalítica de la aspartato transcarbamoylase de *E. coli* como una etiqueta del trímero (Chen y otros (2004) J. Virol. 78:4508). Los dominios de trimerización son bien conocidos en la técnica.

25 Como se usa en la presente descripción, el término "etiqueta de la proteína" se refiere, pero no se limita a, una secuencia de polipéptido que puede añadirse a otra secuencia de polipéptido para una variedad de propósitos. En ciertas modalidades a modo de ejemplo, una etiqueta de proteína puede eliminarse de una secuencia polipeptídica más grande cuando ya no se necesita. Las etiquetas de proteínas incluyen, pero no se limitan a, etiquetas de afinidad (por ejemplo, etiquetas de poli His, proteína de unión a quitina (CBP), proteína de unión a maltosa (MBP), glutatión-s-transferasa (GST) y similares), etiquetas de solubilización (por ejemplo, incluyen tiorredoxina (TRX), poli(NANP) MBP, GST y similares), etiquetas de cromatografía (por ejemplo, aminoácidos polianiónicos tales como el epítipo FLAG),
30 etiquetas de epítipo (por ejemplo, etiqueta FLAG, etiqueta V5, etiqueta c-myc, etiqueta HA y similares), etiquetas fluorescentes (por ejemplo, proteína fluorescente verde (GFP), proteína fluorescente amarilla (YFP), proteína fluorescente cian (CFP) y similares), etiquetas bioluminiscentes (por ejemplo, luciferasa (por ejemplo, bacterias, luciérnagas, escarabajo del clic, pensamiento de mar (Renilla) y similares), luciferina, aequorina y similares), etiquetas de modificación enzimática (por ejemplo, biotina ligasa y similares) y similares. Las etiquetas de proteínas son bien
35 conocidas en la técnica y sus reactivos frecuentemente están disponibles comercialmente.

Un trímero estabilizado de una glicoproteína de la envoltura descrito en la presente descripción puede administrarse a un sujeto en el que es deseable promover una respuesta inmune. Una secuencia de ácido nucleico que codifica uno o más trímeros estabilizados de una proteína de la envoltura descrita en la presente descripción puede administrarse a un
40 sujeto en el que es deseable promover una respuesta inmune.

Por consiguiente, uno o más oligómeros estabilizados (por ejemplo, trímeros estabilizados) descritos en la presente descripción pueden usarse como inmunógenos para producir anticuerpos antioligómeros (por ejemplo, antitrímeros) en un sujeto, para inhibir o prevenir la infección por VIH y/o para inhibir o prevenir la propagación del VIH en una persona infectada. Uno o más oligómeros estabilizados (por ejemplo, trímeros estabilizados) de una glicoproteína de la envoltura descrita en la presente descripción pueden usarse como un inmunógeno para generar anticuerpos que unen la glicoproteína de la envoltura silvestre (es decir, gp41 y/o gp160) usando técnicas estándar para la preparación de anticuerpos policlonal y monoclonal.

50 Un oligómero estabilizado (por ejemplo, trímero estabilizado) de una glicoproteína de la envoltura es capaz de inducir una respuesta de anticuerpos ampliamente neutralizante en un huésped. Como se usa en la presente descripción, los términos "respuesta de anticuerpo neutralizante" y "respuesta de anticuerpos ampliamente neutralizante" son bien conocidos en la técnica y se refieren a la capacidad de uno o más anticuerpos para reaccionar con un agente infeccioso para destruir o reducir en gran medida la virulencia del agente infeccioso. La presencia de una respuesta de ese tipo
55 tiene el potencial de prevenir el establecimiento de la infección y/o reducir significativamente el número de células que se infectan con el VIH, retrasando potencialmente la propagación viral y permitiendo un mejor control de la replicación viral en el huésped infectado. Un anticuerpo ampliamente neutralizante contra el VIH generalmente se unirá a una variedad de diferentes clados, grupos o mutantes del VIH.

60 Como se usa en la presente descripción, el término "respuesta inmune" pretende incluir, pero no se limita a, respuestas de células T y/o B, es decir, respuestas inmunes celulares y/o humorales. La respuesta inmune de un sujeto puede determinarse, por ejemplo, mediante el ensayo de la producción de anticuerpos, la proliferación de células inmunes, la liberación de citoquinas, la expresión de marcadores de superficie celular, la citotoxicidad y similares. Como se usa en la presente descripción, el término "célula inmune" pretende incluir, pero no se limita a, células que son de origen hematopoyético y juegan un papel en una respuesta inmune. Las células inmunes incluyen, pero no se limitan a,
65

linfocitos, tales como células B y células T; células asesinas naturales; células mieloides, tales como monocitos, macrófagos, eosinófilos, mastocitos, basófilos y granulocitos.

5 Un oligómero estabilizado (por ejemplo, trímero) de una glicoproteína de la envoltura se usa típicamente para preparar anticuerpos inmunizando un sujeto adecuado (por ejemplo, conejo, conejillo de indias, cabra, ratón u otro mamífero) con el inmunógeno. Una preparación inmunogénica apropiada puede contener, por ejemplo, un trímero estabilizado expresado de manera recombinante de una glicoproteína de la envoltura o un trímero estabilizado químicamente sintetizado de una glicoproteína de la envoltura. La preparación puede incluir además un adyuvante, tal como adyuvante completo o incompleto de Freund, adyuvante Ribí o un agente inmunoestimulador similar. La inmunización de un sujeto
10 adecuado con un oligómero inmunogénico estabilizado (por ejemplo, trímero) de una preparación de glicoproteína de la envoltura induce una respuesta de anticuerpo policlonal anti envoltura (por ejemplo, anti-gp41 y/o anti-gp160), por ejemplo, una respuesta de anticuerpo anti-VIH.

15 Se proporcionan anticuerpos trímeros anti-gp41 estabilizados. El término "anticuerpo" como se usa en la presente descripción se refiere a moléculas de inmunoglobulina y porciones inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulinas, es decir, moléculas que contienen un sitio de unión al antígeno que se unen específicamente (inmunoreacciona con) a un antígeno, tal como la glicoproteína de la envoltura (por ejemplo, gp41 y/o gp160). Ejemplos de porciones inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulina incluyen fragmentos F(ab) y F(ab')₂ que pueden generarse tratando el anticuerpo con una enzima tal como pepsina. En ciertos aspectos, se proporcionan anticuerpos policlonales y/o monoclonales que se unen a la glicoproteína de la envoltura (por ejemplo, gp41 y/o gp160).
20 El término "anticuerpo monoclonal" o "composición de anticuerpo monoclonal", como se usa en la presente descripción, se refiere a una población de moléculas de anticuerpo que contienen solo una especie de un sitio de unión a antígeno capaz de inmunoreaccionar con un epítipo particular de la glicoproteína de la envoltura (por ejemplo, gp41 y/o gp160). Típicamente una composición de anticuerpo monoclonal muestra así una afinidad de unión única para una glicoproteína de la envoltura particular (por ejemplo, gp41 y/o gp160) con la que inmunoreacciona.

Los anticuerpos policlonales anti trímero de glicoproteína de la envoltura estabilizado (por ejemplo, gp41 y/o gp160) pueden prepararse como se describió anteriormente inmunizando un sujeto adecuado con un oligómero estabilizado (por ejemplo, trímero) de un inmunógeno de glicoproteína de la envoltura como se describe en la presente descripción.
30 El título de anticuerpo anti trímero estabilizado de glicoproteína de la envoltura en el sujeto inmunizado puede monitorizarse a lo largo del tiempo mediante técnicas estándar, tales como con un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA) usando gp41 inmovilizado. Si se desea, las moléculas de anticuerpo dirigidas contra gp41 pueden aislarse del mamífero (por ejemplo, de la sangre) y purificarse adicionalmente mediante técnicas bien conocidas, tales como cromatografía de proteína A para obtener la fracción de IgG. En un momento apropiado después de la inmunización, por ejemplo, cuando los títulos de anticuerpos anti-gp41 son más altos, pueden obtenerse células productoras de anticuerpos del sujeto y usarse para preparar anticuerpos monoclonales mediante técnicas estándar, tales como la técnica de hibridoma descrita originalmente por Kohler y Milstein (1975) *Nature* 256:495-497) (ver además, Brown y otros (1981) *J. Immunol.* 127:539-46; Brown y otros (1980) *J. Biol. Chem.* 255:4980-83; Yeh y otros (1976) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76:2927-31; y Yeh y otros (1982) *Int. J. Cancer* 29:269-75), la técnica del hibridoma de células B humanas (Kozbor y otros (1983) *Immunol. Today* 4:72), la técnica EBV-hibridoma (Cole y otros (1985), *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., págs. 77-96) o técnicas de trioma. La tecnología para producir hibridomas de anticuerpos monoclonales es bien conocida (ver generalmente R. H. Kenneth, en *Monoclonal Antibodies: A New Dimension In Biological Analyses*, Plenum Publishing Corp., Nueva York, N.Y. (1980); E. A. Lerner (1981) *Yale J. Biol. Med.* 54:387-402; Geffer y otros (1977) *Somatic Cell Genet.* 3:231-36). En resumen, una línea celular inmortal (típicamente un mieloma) se fusiona con linfocitos (típicamente esplenocitos) de un mamífero inmunizado con un trímero estabilizado de un inmunógeno de glicoproteína de la envoltura como se describió anteriormente, y los sobrenadantes de cultivo de las células de hibridoma resultantes se tamizan para identificar un hibridoma que produce un anticuerpo monoclonal que se une a gp41.

50 Cualquiera de los muchos protocolos bien conocidos usados para fusionar linfocitos y líneas celulares immortalizadas pueden aplicarse con el propósito de generar un anticuerpo monoclonal anti trímero de glicoproteína de la envoltura estabilizado (ver, por ejemplo, G. Galfre y otros (1977) *Nature* 266:55052; Geffer y otros *Somatic Cell Genet.*, citado más arriba; Lerner, *Yale J. Biol. Med.* (más arriba); Kenneth, *Monoclonal Antibodies*, (más arriba)). Además, el trabajador ordinario apreciará que hay muchas variaciones de tales métodos que también serían útiles. Típicamente, la línea celular inmortal (por ejemplo, una línea celular de mieloma) se deriva de la misma especie de mamífero que los linfocitos. Por ejemplo, los hibridomas murinos pueden prepararse mediante la fusión de los linfocitos de un ratón inmunizado con una preparación inmunogénica de la presente invención con una línea celular de ratón immortalizada. Líneas celulares inmortales particularmente adecuadas son las líneas celulares de mieloma de ratón que son sensibles al medio de cultivo que contiene hipoxantina, aminopterina y timidina ("medio HAT"). Cualquiera de una serie de líneas de células de mieloma puede usarse como una pareja de fusión de acuerdo con técnicas estándar, por ejemplo, las líneas de mieloma P3-NS1/1-Ag4-1, P3-x63-Ag8.653 o Sp2/O-Ag14. Estas líneas de mieloma están disponibles en ATCC. Típicamente, las células de mieloma de ratón sensibles a HAT se fusionan a esplenocitos de ratón usando polietilenglicol ("PEG"). Las células de hibridoma resultantes de la fusión se seleccionan después usando medio HAT, que destruye las células de mieloma fusionadas y no fusionadas (los esplenocitos no fusionados mueren después de varios días porque no se transforman). Las células de hibridoma que producen un anticuerpo monoclonal de un trímero
60
65

estabilizado de una glicoproteína de la envoltura se detectan mediante el tamizaje de los sobrenadantes de cultivo de hibridoma de anticuerpos que se unen a gp41, por ejemplo, mediante el uso de un ensayo de ELISA estándar.

5 La alternativa para preparar los hibridomas que secretan anticuerpos monoclonales, puede identificarse y aislarse un anticuerpo monoclonal anti- trómero estabilizado de una glicoproteína de la envoltura mediante el tamizaje de una biblioteca de inmunoglobulinas combinatorias recombinantes (por ejemplo, una biblioteca de presentación de anticuerpos en fagos) con una proteína gp41 para de ese modo, aislar los miembros de la biblioteca de inmunoglobulina que se unen a gp41. Los kits para generar y tamizar bibliotecas de presentación en fagos están disponibles comercialmente (por ejemplo, Sistema de Anticuerpo recombinante en Fago, Pfizer, Nueva York, NY, y el SURFZAP™
10 Kit de Presentación de fago, Stratagene, La Jolla, CA). Además, ejemplos de métodos y reactivos particularmente adecuados para usar en la generación y tamizaje de bibliotecas de presentación de anticuerpos pueden encontrarse en, por ejemplo, Ladner y otros. Patente de los EE.UU. núm. 5,223,409; Kang y otros. Publicación Internacional PCT núm. WO 92/18619; Dower y otros. Publicación Internacional PCT núm. WO 91/17271; Winter y otros. Publicación Internacional PCT WO 92/20791; Markland y otros. Publicación Internacional PCT núm. WO 92/15679; Breiting y otros.
15 Publicación Internacional PCT WO93/01288; McCafferty y otros. Publicación Internacional PCT núm. WO 92/01047; Garrard y otros. Publicación Internacional PCT núm. WO 92/09690; Ladner y otros. Publicación Internacional PCT núm. WO 90/02809; Fuchs y otros. (1991) Bio/Technology 9:1370-1372; Hay y otros. (1992) Hum. Antibod. Hybridomas 3:81-85; Huse y otros. (1989) Science 246:1275-1281; Griffiths y otros. (1993) EMBO J. 12:725-734; Hawkins y otros. (1992) J. Mol. Biol. 226:889-896; Clarkson y otros. (1991) Nature 352:624-628; Gram y otros. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:3576-3580; Garrard y otros. (1991) Bio/Technology 9:1373-1377; Hoogenboom y otros. (1991) Nucl. Acid Res. 19:4133-4137; Barbas y otros. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:7978-7982; y McCafferty y otros. (1990) Nature 348:552-554.

25 Además, los anticuerpos recombinantes anti trómero estabilizado de la glicoproteína de la envoltura, tales como anticuerpos monoclonales quiméricos y humanizados, que comprenden porciones tanto humanas como no humanas, que pueden prepararse usando técnicas de ADN recombinante estándar, están dentro del alcance de la invención. Tales anticuerpos monoclonales quiméricos y humanizados pueden producirse por técnicas de ADN recombinante conocidas en la técnica, por ejemplo, usando los métodos descritos en Robinson y otros. Solicitud Internacional núm. PCT/US86/02269; Akira, y otros. Solicitud de Patente Europea 184,187; Taniguchi, M., Solicitud de Patente Europea 171,496; Morrison y otros. Solicitud de Patente Europea 173,494; Neuberger y otros. Publicación Internacional PCT núm. WO 86/01533; Cabilly y otros. Patente de los EE.UU. núm. 4,816,567; Cabilly y otros. Solicitud de Patente Europea 125,023; Better y otros. (1988) Science 240:1041-1043; Liu y otros. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:3439-3443; Liu y otros. (1987) J. Immunol. 139:3521-3526; Sun y otros. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:214-218; Nishimura y otros. (1987) Canc. Res. 47:999-1005; Wood y otros. (1985) Nature 314:446-449; y Shaw y otros. (1988) J. Natl. Cancer Inst. 80:1553-1559; Morrison, S. L. (1985) Science 229:1202-1207; Oi y otros. (1986) BioTechniques 4:214; Winter Patente de los EE.UU. núm. 5,225,539; Jones y otros. (1986) Nature 321:552-555; Verhoeven y otros. (1988) Science 239:1534; y Beidler y otros. (1988) J. Immunol. 141:4053-4060.

40 Se proporcionan composiciones y métodos para mejorar la respuesta inmune de un sujeto a un virus de la inmunodeficiencia humana. Como se usa en la presente descripción, los términos "sujeto" y "huésped" pretenden incluir organismos vivos tales como los mamíferos. Ejemplos de sujetos y huéspedes incluyen, pero no se limitan a, caballos, vacas, ovejas, cerdos, cabras, perros, gatos, conejos, conejillo de indias, ratas, ratones, jerbos, primates no humanos (por ejemplo, macacos), humanos y similares, no mamíferos, que incluyen, por ejemplo, vertebrados no mamíferos, tales como aves (por ejemplo, pollos o patos), peces o ranas (por ejemplo, *Xenopus*), e invertebrados no mamíferos, así como sus especies transgénicas.

50 Se proporcionan vectores tales como, por ejemplo, vectores de expresión, que contienen un ácido nucleico que codifica uno o más trómeros estabilizado de una proteína de la envoltura descrita en la presente descripción. Como se usa en la presente descripción, el término "vector" se refiere a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al que se ha unido. Un tipo de vector es un "plásmido," que se refiere a un lazo de ADN bicatenario circular en el que pueden ligarse segmentos de ADN adicionales. Otro tipo de vector es un vector viral, en donde pueden ligarse segmentos adicionales de ADN en el genoma viral. Determinados vectores son capaces de una replicación autónoma en una célula huésped en la que se introducen (por ejemplo, vectores bacterianos que tienen un origen de replicación bacteriano y vectores episomales de mamífero). Otros vectores (por ejemplo, vectores no episomales de mamífero) se integran en el genoma de una célula huésped tras la introducción en la célula huésped, y de esta manera se replican junto con el genoma del huésped. Por otra parte, determinados vectores son capaces de dirigir la expresión de genes a los cuales se unen operativamente. Tales vectores se refieren en la presente descripción como "vectores de expresión." Generalmente, los vectores de expresión de utilidad en técnicas de ADN recombinante están frecuentemente en forma de plásmidos. En la presente especificación, "plásmido" y "vector" pueden usarse indistintamente. Sin embargo, la descripción pretende incluir otras formas de vectores de expresión, tal como vectores virales (por ejemplo, retrovirus defectivo de replicación, adenovirus y virus adenoasociados), que sirven para funciones equivalentes.

65 En ciertos aspectos, los vectores de expresión recombinantes comprenden una secuencia de ácido nucleico (por ejemplo, una secuencia de ácido nucleico que codifica uno o más trómeros estabilizados de una proteína de la envoltura descrita en la presente descripción) en una forma adecuada para la expresión de la secuencia de ácido nucleico en una célula huésped, lo que significa que los vectores de expresión recombinantes incluyen una o más secuencias

reguladoras, seleccionadas sobre la base de las células huésped que se usan para la expresión, que está operativamente unida a la secuencia de ácido nucleico que se expresa. Dentro de un vector de expresión recombinante, "operativamente unido" pretende significar que la secuencia de nucleótidos que codifica uno o más trómeros estabilizados de una proteína de la envoltura se une a la secuencia reguladora de una manera que permite la expresión de la secuencia de nucleótidos (por ejemplo, en un sistema de transcripción/traducción *in vitro* o en una célula huésped cuando el vector se introduce en la célula huésped). El término "secuencia reguladora" pretende incluir promotores, potenciadores y otros elementos de control de expresión (por ejemplo, señales de poliadenilación). Tales secuencias reguladoras se describen, por ejemplo, en Goeddel; Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990). Las secuencias reguladoras incluyen aquellas que dirigen la expresión constitutiva de una secuencia de nucleótidos en muchos tipos de células huésped y aquellas que dirigen la expresión de la secuencia de nucleótidos solo en ciertas células huésped (por ejemplo, secuencias reguladoras específicas de tejido). Se apreciará por aquellos con experiencia en la técnica que el diseño del vector de expresión puede depender de tales factores como la elección de la célula huésped a transformar, el nivel de expresión de proteína deseado, y similares. Los vectores de expresión descritos en la presente descripción pueden introducirse en células huésped para producir proteínas o porciones de estas, que incluyen proteínas de fusión o porciones de estas, codificadas por ácidos nucleicos como se describe en la presente descripción (por ejemplo, uno o más trómeros estabilizados de una proteína de la envoltura).

En ciertos aspectos, las moléculas de ácido nucleico descritas en la presente descripción pueden insertarse en vectores y usarse como vectores de terapia génica. Los vectores de terapia génica pueden suministrarse a un sujeto mediante, por ejemplo, inyección intravenosa, administración local (ver, por ejemplo, Patente de los EE.UU. núm. 5,328,470), o mediante inyección estereotáctica (ver, por ejemplo, Chen y otros (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 91:3054). La preparación farmacéutica del vector de terapia génica puede incluir el vector de terapia génica en un diluyente aceptable, o puede comprender una matriz de liberación lenta en la que se embebe el vehículo de suministro del gen. Alternativamente, cuando el vector de suministro génico completo puede producirse intacto a partir de células recombinantes, por ejemplo, vectores retrovirales, vectores de virus adenoasociados, y similares, la preparación farmacéutica puede incluir una o más células que producen el sistema de suministro de genes (Ver Gardlik y otros (2005) Med. Sci. Mon. 11:110; Salmons y Gunsberg (1993) Hu. Gene Ther. 4:129; y Wang y otros (2005) J. Virol. 79:10999 para revisiones de vectores de terapia génica).

Los vectores de expresión recombinante pueden diseñarse para la expresión de uno o más que codifican uno o más trómeros estabilizados de una proteína de la envoltura en células procariontas o eucariotas. Por ejemplo, uno o más vectores que codifican uno o más trómeros estabilizados de una proteína de la envoltura pueden expresarse en células bacterianas tales como *E. coli*, células de insecto (por ejemplo, usando vectores de expresión de baculovirus), células de levadura o células de mamífero. Las células huésped adecuadas se discuten además en Goeddel, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990). Alternativamente, el vector de expresión recombinante puede transcribirse y traducirse *in vitro*, por ejemplo usando secuencias reguladoras del promotor T7 y polimerasa T7.

La expresión de proteínas en procariontas se lleva a cabo con mayor frecuencia en *E. coli* con vectores que contienen promotores constitutivos o inducibles que dirigen la expresión de proteínas de fusión o no de fusión. Los vectores de fusión añaden una cantidad de aminoácidos a una proteína codificada en ellos, generalmente al extremo amino de la proteína recombinante. Tales vectores de fusión típicamente tienen tres propósitos: 1) aumentar la expresión de la proteína recombinante; 2) aumentar la solubilidad de la proteína recombinante; y 3) ayudar en la purificación de la proteína recombinante actuando como un ligando en la purificación por afinidad. Frecuentemente, en los vectores de expresión de fusión, se introduce un sitio de escisión proteolítica en la unión de la porción de fusión y la proteína recombinante para permitir la separación de la proteína recombinante de la porción de fusión posterior a la purificación de la proteína de fusión. Tales enzimas, y sus secuencias de reconocimiento afines, incluyen el Factor Xa, trombina y enteroquinasa. Los vectores de expresión de fusión típicos incluyen pGEX (Pharmacia Biotech Inc; Smith, D. B. y Johnson, K. S. (1988) Gene 67:31-40); pMAL (New England Biolabs, Beverly, MA); y pRIT5 (Pharmacia, Piscataway, N.J.) que fusionan glutatión S-transferasa (GST), proteína de unión E a maltosa, o proteína A, respectivamente, a la proteína recombinante objetiva.

En otro aspecto, el vector de expresión que codifica uno o más trómeros estabilizados de una proteína de la envoltura es un vector de expresión de levadura. Ejemplos de vectores para la expresión en levadura *S. cerevisiae* incluye pYepSec1 (Baldari, y otros, (1987) EMBO J. 6:229-234); pMFa (Kurjan y Herskowitz, (1982) Cell 30:933-943); pJRY88 (Schultz y otros, (1987) Gene 54:113-123); pYES2 (Invitrogen Corporation, San Diego, Calif.); y picZ (Invitrogen Corporation).

Alternativamente, uno o más trómeros estabilizados de una proteína de la envoltura pueden expresarse en células de insecto usando vectores de expresión de baculovirus. Los vectores de baculovirus disponibles para la expresión de proteínas en células de insecto cultivadas (por ejemplo, células Sf9) incluyen las series pAc (Smith y otros (1983) Mol. Cell Biol. 3:2156-2165) y las series pVL (Lucklow y Summers (1989) Virology 170:31-39).

En ciertos aspectos, un ácido nucleico descrito en la presente descripción se expresa en células de mamífero usando un vector de expresión de mamífero. Los ejemplos de vectores de expresión de mamíferos incluyen pCDM8 (Seed, B. (1987) Nature 329:840) y pMT2PC (Kaufman y otros (1987) EMBO J. 6:187-195). Cuando se usan en células de

5 mamífero, las funciones de control del vector de expresión frecuentemente se proporcionan por elementos reguladores virales. Por ejemplo, los promotores usados comúnmente se derivan de poliovirus, adenovirus 2, citomegalovirus y virus de simio 40. Para otros sistemas de expresión adecuados para células tanto procariotas como eucariotas, ver los capítulos 16 y 17 de Sambrook, J., Fritsch, E. F., y Maniatis, T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2da, ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989.

10 En ciertos aspectos, el vector de expresión recombinante de mamífero es capaz de dirigir la expresión del ácido nucleico preferentemente en un tipo de célula particular (por ejemplo, se usan elementos reguladores específicos de tejido para expresar el ácido nucleico). Los elementos reguladores específicos de tejido son conocidos en la técnica. Ejemplos no limitantes de promotores específicos de tejido adecuados incluyen promotores específicos linfoides (Calame y Eaton (1988) *Adv. Immunol.* 43:235), en particular promotores de receptores de células T (Winoto y Baltimore (1989) *EMBO J.* 8:729) e inmunoglobulinas (Banerji y otros (1983) *Cell* 33:729; Queen y Baltimore (1983) *Cell* 33:741), promotores específicos de neuronas (por ejemplo, el promotor de neurofilamentos; Byrne y Ruddle (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86:5473), promotores específicos de páncreas (Edlund y otros (1985) *Science* 230:912), y promotores específicos de glándulas mamarias (por ejemplo, promotor de suero lácteo; Patente de los EE.UU. núm. 4,873,316 y Publicación de Solicitud Europea núm. 264,166). Promotores regulados por el desarrollo además se incluyen, por ejemplo, los promotores *hox* murinos (Kessel y Gruss (1990) *Science* 249:374) y el promotor de α -fetoproteína (Campes y Tilghman (1989) *Genes Dev.* 3:537).

20 En ciertos aspectos, se proporcionan células huésped en las que se ha introducido un vector de expresión recombinante de la invención. Los términos "célula huésped" y "célula huésped recombinante" se usan indistintamente en la presente descripción. Se entenderá que tales términos se refieren no solamente a una célula sujeto particular sino a la progenie potencial de una célula de ese tipo. Debido a que ciertas modificaciones pueden ocurrir en las generaciones sucesivas debido a cualquier mutación o influencias ambientales, tal progenie, de hecho, puede no ser idéntica a la célula parental, pero aún así se incluye dentro del alcance del término como se usa en la presente descripción.

30 Una célula huésped puede ser cualquier célula procariota o eucariota. Por ejemplo, uno o más trómeros estabilizados de una proteína de la envoltura pueden expresarse en células bacterianas tales como *E. coli*, células virales tales como células retrovirales, células de insecto, levadura o células de mamífero (tales como células de ovario de hámster chino (CHO) o células COS). Otras células huésped adecuadas se conocen por aquellas persona expertas en la técnica.

35 El suministro de ácidos nucleicos descritos en la presente descripción (por ejemplo, ADN de vector) puede realizarse por cualquier método adecuado en la técnica. Por ejemplo, el suministro puede ser mediante inyección, pistola de genes, mediante la aplicación del ácido nucleico en un gel, aceite o crema, mediante electroporación, usando reactivos de transfección basados en lípidos, o mediante cualquier otro método de transfección adecuado.

40 Como se usa en la presente descripción, los términos "transformación" y "transfección" pretenden referirse a una variedad de técnicas reconocidas en la técnica para introducir ácido nucleico extraño (por ejemplo, ADN) en una célula huésped, que incluyen coprecipitación de fosfato de calcio o cloruro de calcio, transfección mediada por DEAE-dextrano, lipofección (por ejemplo, usando reactivos disponibles comercialmente tales como, por ejemplo, LIPOFECTIN® (Invitrogen Corp., San Diego, CA), LIPOFECTAMINE® (Invitrogen), FUGENE® (Roche Applied Science), Basilea, Suiza), JETPEI™ (Polyplus-transfection Inc., Nueva York, NY), EFFECTENE® (Qiagen, Valencia, CA), DREAMFECT™ (OZ Biosciences, Francia) y similares), o electroporación (por ejemplo, electroporación *in vivo*). Los métodos adecuados para transformar o transfectar células huésped pueden encontrarse en Sambrook y otros. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2da, ed., Cold Spring harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989), y otros manuales de laboratorio adecuados.

50 Aspectos de la descripción se dirigen a un primer ácido nucleico (por ejemplo, una secuencia de ácido nucleico que codifica uno o más trómeros estabilizados de una glicoproteína de la envoltura) o secuencia polipeptídica (por ejemplo, uno o más trómeros estabilizados de una glicoproteína de la envoltura) que tiene una cierta identidad de secuencia o porcentaje de homología con una segunda secuencia de ácido nucleico o polipéptido, respectivamente. Las técnicas para determinar la "identidad de secuencia" de ácidos nucleicos y aminoácidos son conocidas en la técnica. Típicamente, tales técnicas incluyen determinar la secuencia de nucleótidos del ADN genómico, ARNm o ADNc hecho a partir de un ARNm para un gen y/o determinar la secuencia de aminoácidos que lo codifica, y comparar una o ambas de estas secuencias con una segunda secuencia de nucleótido o aminoácido, según corresponda. En general, "identidad" se refiere a una correspondencia exacta de nucleótido a nucleótido o de aminoácido a aminoácido de dos secuencias de polinucleótidos o polipeptídicas, respectivamente. Pueden compararse dos o más secuencias (polinucleótido o aminoácido) mediante la determinación de su "porcentaje de identidad." El porcentaje de identidad de dos secuencias, ya sean secuencias de ácido nucleico o de aminoácidos, es el número de coincidencias exactas entre dos secuencias alineadas divididas por la longitud de las secuencias más cortas y multiplicadas por 100.

60 Se proporciona un alineamiento aproximado de secuencias de ácidos nucleicos por el algoritmo de homología local de Smith y Waterman, *Advances in Applied Mathematics* 2:482-489 (1981). Este algoritmo puede aplicarse a las secuencias de aminoácidos mediante el uso de la matriz de puntuación desarrollada por Dayhoff, *Atlas of Protein Sequences and Structure*, M. O. Dayhoff ed., 5 suppl. 3:353-358, National Biomedical Research Foundation, Washington, D.C., USA, y normalizado por Gribskov (1986) *Nucl. Acids Res.* 14:6745. Una implementación ilustrativa de

este algoritmo para determinar el porcentaje de identidad de una secuencia se proporciona por Genetics Computer Group (Madison, WI) en la aplicación de utilidad "BestFit". Los parámetros predeterminados para este método se describen en el Wisconsin Sequence Analysis Package Program Manual, Version 8 (1995) (disponible en Genetics Computer Group, Madison, WI).

5 Un método para establecer el porcentaje de identidad en el contexto de la presente invención es usar el paquete MPSRCH de programas con derechos de autor de la Universidad de Edimburgo, desarrollado por John F. Collins y Shane S. Sturrok, y distribuido por IntelliGenetics, Inc. (Mountain View, CA). A partir de este conjunto de paquetes, puede emplearse el algoritmo de Smith-Waterman donde se usan parámetros por defecto para la tabla de puntuación (por ejemplo, penalización por apertura de la interrupción de 12, penalización por extensión de la interrupción de uno y una interrupción de seis). A partir de los datos generados, el valor de "coincidencia" refleja la "identidad de secuencia." Otros programas adecuados para calcular el porcentaje de identidad o similitud entre secuencias se conocen generalmente en la técnica, por ejemplo, otro programa de alineación es el BLAST, usado con parámetros predeterminados. Por ejemplo, BLASTN y BLASTP pueden usarse mediante el uso de los siguientes parámetros predeterminados: código genético = estándar; filtro = ninguno; cadena = ambos; corte = 60; esperar = 10; Matriz = BLOSUM62; Descripciones = 50 secuencias; ordenar por = PUNTAJE ALTO; Bases de datos = no redundante, GenBank + EMBL + DDBJ + PDB + traducciones de GenBank CDS + Swiss protein + Spupdate + PIR. Los detalles de estos programas pueden encontrarse en el sitio web de NCBI/NLM.

20 Alternativamente, la homología puede determinarse por hibridación de polinucleótidos en condiciones que forman dúplex estables entre regiones homólogas, seguido por digestión con nucleasas específicas de cadena simple, y determinación del tamaño de los fragmentos digeridos. Dos secuencias de ADN, o dos secuencias polipeptídicas son "esencialmente homólogas" entre sí cuando las secuencias exhiben al menos aproximadamente 80%-85%, al menos aproximadamente 85%-90%, al menos aproximadamente 90%-95%, o al menos aproximadamente 95%-98% de identidad de secuencia en una longitud definida de las moléculas, según se determina usando los métodos anteriores. Como se usa en la presente descripción, esencialmente homólogo se refiere además a secuencias que muestran identidad completa con la secuencia de ADN o polipéptido especificada. Las secuencias de ADN que son esencialmente homólogas pueden identificarse en un experimento de hibridación Southern bajo, por ejemplo, condiciones rigurosas, como se define para ese sistema particular. La definición de condiciones de hibridación apropiadas está dentro de la habilidad de la técnica. Ver por ejemplo, Sambrook y otros, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, segunda edición, (1989) Cold Spring Harbor, NY; Nucleic Acid Hybridization: A Practical Approach, editores B. D. Hames y S. J. Higgins, (1985) Oxford; Washington, D.C.; IRL Press.

35 Se considera que dos fragmentos de ácido nucleico "hibridan selectivamente" como se describe en la presente descripción. El grado de identidad de secuencia entre dos moléculas de ácido nucleico afecta la eficacia y la rigurosidad de los eventos de hibridación entre tales moléculas. Una secuencia de ácido nucleico parcialmente idéntica inhibirá al menos parcialmente una secuencia completamente idéntica a partir de la hibridación a una molécula objetivo. La inhibición de la hibridación de la secuencia completamente idéntica puede evaluarse usando ensayos de hibridación que son bien conocidos en la técnica (por ejemplo, membrana de Southern, membrana de Northern, hibridación en solución, o similares, ver Sambrook, y otros, más arriba). Tales ensayos pueden llevarse a cabo usando diversos grados de selectividad, por ejemplo, usando condiciones diversas desde rigurosidad baja a alta. Si se emplean condiciones de baja rigurosidad, la ausencia de unión no específica puede evaluarse usando una sonda secundaria que carece incluso de un grado parcial de identidad de secuencia (por ejemplo, una sonda que tiene menos de aproximadamente 30% de identidad de secuencia con la molécula objetivo), de manera que, en ausencia de eventos de unión no específicos, la sonda secundaria no se hibridará con el objetivo.

50 Cuando se utiliza un sistema de detección basado en hibridación, se elige una sonda de ácido nucleico que es complementaria a una secuencia de ácido nucleico objetivo y después, mediante la selección de condiciones apropiadas, la sonda y la secuencia objetivo "hibridan selectivamente" o se unen, entre sí para formar una molécula híbrida. Una molécula de ácido nucleico que es capaz de hibridarse selectivamente a una secuencia objetivo en condiciones "moderadamente rigurosas" hibrida típicamente en condiciones que permiten la detección de una secuencia de ácido nucleico objetivo de al menos aproximadamente 10-14 nucleótidos de longitud que tiene al menos aproximadamente 70% de identidad de secuencia con la secuencia de la sonda de ácido nucleico seleccionada. Las condiciones de hibridación rigurosas típicamente permiten la detección de secuencias de ácido nucleico objetivo de al menos aproximadamente 10-14 nucleótidos de longitud que tienen una identidad de secuencia mayor que aproximadamente 90-95% con la secuencia de la sonda de ácido nucleico seleccionada. Las condiciones de hibridación útiles para la hibridación sonda/objetivo donde la sonda y el objetivo tienen un grado específico de identidad de secuencia, pueden determinarse como se conoce en la técnica (ver, por ejemplo *Nucleic Acid Hybridization, más arriba*).

60 Con respecto a las condiciones de rigurosidad para la hibridación, se conoce bien en la técnica que pueden emplearse numerosas condiciones equivalentes para establecer una rigurosidad particular variando, por ejemplo, los siguientes factores: la longitud y naturaleza de las secuencias de la sonda y objetivo, composición de base de las diversas secuencias, concentraciones de las sales y otros componentes de la solución de hibridación, la presencia o ausencia de agentes bloqueantes en las soluciones de hibridación (por ejemplo, formamida, sulfato de dextrano y polietilenglicol), temperatura de reacción de hibridación y parámetros de tiempo, así como diversas condiciones de lavado. La selección

de un conjunto particular de condiciones de hibridación se selecciona siguiendo métodos convencionales en la técnica (ver, por ejemplo, Sambrook y otros, más arriba).

5 Como se usa en la presente descripción, el término "hibrida bajo condiciones rigurosas" pretende describir las condiciones para la hibridación y el lavado en las que las secuencias de nucleótidos al menos 60% idénticas entre sí típicamente permanecen hibridadas entre sí. En un aspecto, las condiciones son de manera que las secuencias al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 85% o 90% o más idénticas entre sí típicamente permanecen hibridadas entre sí. Tales condiciones rigurosas son conocidas por los expertos en la técnica y pueden encontrarse en Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY (1989), 10 6.3.1-6.3.6. Un ejemplo no limitante de condiciones de hibridación rigurosas es la hibridación en cloruro de sodio 6X/citrato de sodio (SSC) a aproximadamente 45 °C, seguido de uno o más lavados en SSC 0,2X, SDS 0,1% a 50 °C, a 55 °C, o a 60 °C o 65 °C.

15 Un primer polinucleótido se "deriva de" un segundo polinucleótido si tiene la misma o esencialmente la misma secuencia de los pares de bases que una región del segundo polinucleótido, su ADNc, complementos de este, o si muestra identidad de secuencia como se describe anteriormente. Un primer polipéptido se deriva de un segundo polipéptido si se codifica por un primer polinucleótido derivado de un segundo polinucleótido, o muestra identidad de secuencia con los segundos polipéptidos como se describió anteriormente. En la presente descripción, cuando una proteína gp41 se "deriva del VIH", la proteína gp41 no necesita ser producida explícitamente por el virus en sí, simplemente se considera 20 que el virus es la fuente original de la proteína gp41 y/o secuencias de ácido nucleico que la codifican. Las proteínas gp41 pueden, por ejemplo, producirse por vía recombinante o sintética, por métodos conocidos en la técnica, o alternativamente, las proteínas gp41 pueden purificarse a partir de cultivos celulares infectados con VIH.

25 En ciertos aspectos, uno o más anticuerpos, uno o más trímeros estabilizados de una proteína de la envoltura y/o secuencias de ácido nucleico que codifican uno o más trímeros estabilizados de una proteína de la envoltura descritos en la presente descripción pueden incorporarse en composiciones farmacéuticas adecuadas para la administración. Tales composiciones típicamente comprenden la molécula de ácido nucleico o proteína y un portador farmacéuticamente aceptable. Como se usa en la presente descripción, el término "portador farmacéuticamente aceptable" pretende incluir cualquiera y todos los solventes, medio de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antimicóticos, agentes isotónicos y de retardo de la absorción, y similares, compatibles con la 30 administración farmacéutica. El uso de tales medios y agentes para las sustancias farmacéuticamente activas es bien conocido en la técnica. Excepto en la medida en que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el compuesto activo, se contempla su uso en las composiciones. Compuestos activos suplementarios pueden incorporarse también en las composiciones.

35 En ciertos aspectos, una composición farmacéutica se formula para que sea compatible con su vía de administración prevista. Los ejemplos de vías de administración incluyen administración parenteral, por ejemplo, intravenosa, intradérmica, subcutánea, oral (por ejemplo, inhalación), transdérmica (tópica), transmucosal y rectal. Las soluciones o suspensiones que se usan para aplicación parenteral, intradérmica o subcutánea pueden incluir los siguientes 40 componentes: un diluyente estéril tal como agua para inyección, solución salina, aceites fijos, polietilenglicoles, glicerina, propilenglicol u otros solventes sintéticos; agentes antibacterianos tales como alcohol bencílico o metil parabenos; antioxidantes tales como ácido ascórbico o bisulfito de sodio; agentes quelantes tales como ácido etilendiaminotetraacético; tampones tales como acetatos, citratos o fosfatos y agentes para el ajuste de la tonicidad tales como cloruro de sodio o dextrosa. El pH puede ajustarse con ácidos o bases, tales como ácido clorhídrico o 45 hidróxido de sodio. La preparación parenteral puede encerrarse en ampollas, jeringas desechables o viales de dosis múltiples hechos de vidrio o plástico.

50 Las composiciones farmacéuticas adecuadas para uso inyectable pueden incluir dispersiones o soluciones acuosas estériles (solubles en agua) y polvos estériles para la preparación extemporánea de dispersiones o soluciones inyectables estériles. Para la administración intravenosa, los portadores adecuados incluyen solución salina fisiológica, agua bacteriostática, CREMOPHOR EL™ (BASF; Parsippany, NJ) o solución salina regulada con fosfato (PBS). En todos los casos, la composición debe ser estéril y fluida hasta el punto que sea fácilmente inyectable. Debería ser estable bajo las condiciones de fabricación y almacenamiento y debería preservarse contra la acción de contaminación de los microorganismos tales como bacteria y hongos. El portador puede ser un medio de dispersión o solvente que 55 contenga, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, y polietilenglicol líquido, y similares), y sus mezclas adecuadas. La fluidez apropiada se puede mantener, por ejemplo, por medio del uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y por medio del uso de tensioactivos. La prevención de la acción de los microorganismos puede lograrse por varios agentes antibacterianos y antimicóticos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal, y similares. En muchos casos, será preferible incluir en la composición, agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol, cloruro de sodio. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede producirse incluyendo en la composición un agente que retarda la absorción, por ejemplo, monoestearato aluminico y gelatina.

60 Las soluciones inyectables estériles pueden prepararse incorporando uno o más anticuerpos, uno o más trímeros estabilizados de una proteína de la envoltura y/o secuencias de ácido nucleico que codifican uno o más trímeros estabilizados de una proteína de la envoltura descrita en la presente descripción en la cantidad requerida en un solvente

5 apropiado con uno o una combinación de ingredientes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido de esterilización filtrada. Generalmente, las dispersiones se preparan mediante la incorporación del compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos de preparación son secado al vacío y liofilización que produce un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente adicional deseado de una solución estéril previamente filtrada de éste.

10 Las composiciones orales incluyen generalmente un diluyente inerte o un portador comestible. Pueden encerrarse en cápsulas de gelatina o comprimirse en tabletas. Para el propósito de la administración terapéutica oral, el compuesto activo puede incorporarse con excipientes y usarse en forma de tabletas, trociscos, o cápsulas. Las composiciones orales pueden prepararse además usando un portador fluido para su uso como un enjuague bucal, en donde el compuesto en el portador fluido se aplica por vía oral. Los agentes de unión farmacéuticamente compatibles, y/o materiales adyuvantes pueden incluirse como parte de la composición. Las tabletas, píldoras, cápsulas, trociscos y similares pueden contener cualquiera de los siguientes ingredientes o compuestos de una naturaleza similar: Un

15 aglutinante tales como celulosa microcristalina, goma de tragacanto o gelatina; un excipiente tales como almidón o lactosa, un agente desintegrante tales como ácido algínico, Primogel o almidón de maíz; un lubricante tales como estearato de magnesio o esterotes; un glidante tal como dióxido de silicio coloidal; un agente edulcorante tales como sacarosa o sacarina; o un agente saborizante tales como menta, salicilato de metilo, o saborizante de naranja.

20 En un aspecto, uno o más anticuerpos, uno o más trímeros estabilizados de una proteína de la envoltura y/o secuencias de ácido nucleico que codifican uno o más trímeros estabilizados de una proteína de la envoltura descritos en la presente descripción se preparan con portadores que protegerán el compuesto contra la eliminación rápida del cuerpo, tal como una formulación de liberación controlada, que incluye implantes y sistemas de suministro microencapsulados. Pueden usarse polímeros biodegradables, biocompatibles, tales como etileno y acetato de vinilo, polianhídridos, ácido

25 poliglicólico, colágeno, poliortoésteres, y ácido poliláctico. Los métodos para la preparación de tales formulaciones serán evidentes para los expertos en la técnica. Los materiales pueden obtenerse además comercialmente de Alza Corporation y Nova Pharmaceuticals, Inc. Las suspensiones liposómicas (que incluyen liposomas dirigidos a células infectadas con anticuerpos monoclonales para antígenos virales) pueden usarse además como portadores farmacéuticamente aceptables. Estos pueden prepararse de acuerdo con los métodos conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo, como se describe en la Patente de los EE.UU. núm. 4,522,811.

Las composiciones nasales generalmente incluyen atomizadores e inhalantes nasales. Los atomizadores y los inhalantes nasales pueden contener uno o más componentes activos y excipientes tales como conservantes, modificadores de la viscosidad, emulsionantes, agentes tamponantes y similares. Los atomizadores nasales pueden aplicarse a la cavidad nasal para uso local y/o sistémico. Los atomizadores nasales pueden dispensarse mediante un dispensador no presurizado adecuado para el suministro de una dosis medida del componente activo. Los inhalantes nasales se pretenden para el suministro a los pulmones mediante inhalación oral para uso local y/o sistémico. Los inhalantes nasales pueden dispensarse mediante un sistema de contenedor cerrado para el suministro de una dosis medida de uno o más componentes activos.

40 En un aspecto, los inhalantes nasales se usan con un aerosol. Esto se logra mediante la preparación de un aerosol acuoso, preparación liposomal o partículas sólidas que contenga el compuesto. Una suspensión no acuosa (por ejemplo, propelente fluocarburo) se podría usar. Los nebulizadores sónicos pueden usarse para minimizar la exposición del agente a cizallamiento, lo que puede resultar en la degradación del compuesto.

45 Normalmente, un aerosol acuoso se elabora mediante formulación de una solución acuosa o suspensión del agente junto con portadores y estabilizadores convencionales farmacéuticamente aceptables. Los portadores y estabilizadores varían con los requerimientos de la composición particular, pero típicamente incluyen tensioactivos no iónicos (Tweens, Plurónicos, o polietilenglicol), proteínas inocuas como albúmina de suero, ésteres de sorbitán, ácido oléico, lecitina, aminoácidos tales como glicina, tampones, sales, azúcares o alcoholes de azúcar. Los aerosoles generalmente se preparan a partir de soluciones isotónicas.

50 La administración sistémica puede ser además por medios transmucosales o transdérmicos. Para la administración transmucosal o transdérmica, se usan en la formulación penetrantes adecuados para la barrera que se penetra. Tales penetrantes son generalmente conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, para administración transmucosal, detergentes, sales biliares y derivados de ácido fusídico. La administración transmucosal puede lograrse a través del uso de atomizadores nasales o supositorios. Para la administración transdérmica, los compuestos activos se formulan en pomadas, ungüentos, geles, o cremas que se conocen generalmente en la técnica.

60 Uno o más anticuerpos, uno o más trímeros estabilizados de una proteína de la envoltura y/o una o más secuencias de ácido nucleico que codifican uno o más trímeros estabilizados de una proteína de la envoltura descritos en la presente descripción pueden prepararse además en forma de supositorios (por ejemplo, con bases de supositorios como la manteca de cacao y otros glicéridos) o enemas de retención para el suministro rectal.

65 En un aspecto, uno o más anticuerpos, uno o más trímeros estabilizados de una proteína de la envoltura y/o una o más secuencias de ácido nucleico que codifican uno o más trímeros estabilizados de una proteína de la envoltura descritos

5 en la presente descripción se preparan con portadores que los protegerán contra la eliminación rápida del cuerpo, tal como una formulación de liberación controlada, que incluye implantes y sistemas de suministro microencapsulados. Pueden usarse polímeros biodegradables, biocompatibles, tales como etileno y acetato de vinilo, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres, y ácido poliláctico. Los métodos para la preparación de tales formulaciones serán
10 evidentes para los expertos en la técnica. Los materiales pueden obtenerse además comercialmente de Alza Corporation y Nova Pharmaceuticals, Inc. Las suspensiones liposómicas (que incluyen liposomas dirigidos a células infectadas con anticuerpos monoclonales para antígenos virales) pueden usarse además como portadores farmacéuticamente aceptables. Estos pueden prepararse de conformidad con los métodos conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo, como se describe en la Patente de los EE. UU. núm. 4,522,811.

15 Es especialmente ventajoso formular las composiciones orales o parenterales en forma de dosis unitaria para facilitar la administración y uniformidad de la dosis. La forma de dosis unitaria como se usa en la presente descripción se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosis unitarias para el sujeto a tratar; cada unidad contiene una cantidad predeterminada del compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el portador farmacéutico requerido. La especificación para las formas de dosis unitarias de la invención se dictan por, y dependen directamente de, las características únicas del compuesto activo y el efecto terapéutico particular que se desea, y las limitaciones inherentes en la técnica de la composición tal como un compuesto activo para el tratamiento de los individuos.

20 La toxicidad y eficacia terapéutica de uno o más anticuerpos, uno o más trímeros estabilizados de una proteína de la envoltura y/o una o más secuencias de ácido nucleico que codifican uno o más trímeros estabilizados de una proteína de la envoltura descrita en la presente descripción pueden determinarse mediante procedimientos farmacéuticos estándar en cultivos celulares o animales de experimentación, por ejemplo, para determinar la LD50 (la dosis letal para el 50% de la población) y la ED50 (la dosis terapéuticamente efectiva en el 50% de la población). La relación de la dosis
25 entre los efectos tóxicos a terapéuticos es el índice terapéutico y puede expresarse como la relación de LD50/ED50. Se prefieren los compuestos que exhiben elevados índices terapéuticos. Aunque pueden usarse compuestos que exhiben efectos secundarios tóxicos, debe tomarse la precaución de diseñar un sistema de suministro que dirija tales agentes al sitio del tejido afectado, para minimizar el daño potencial a las células no infectadas y, de ese modo, reducir los efectos secundarios.

30 Los datos obtenidos de los ensayos de cultivo de células y/o estudios en animales pueden usarse en la formulación de un intervalo de dosificación para su uso en humanos. La dosificación típicamente estará dentro de un intervalo de concentraciones circulantes que incluyen la ED50 con poca o ninguna toxicidad. La dosificación puede variar dentro de este intervalo dependiendo de la forma de dosificación empleada y la vía de administración utilizada. Para cualquier compuesto usado en el método de la invención, la dosis terapéuticamente efectiva puede estimarse inicialmente a partir de ensayos de cultivos celulares. Una dosis puede formularse en modelos animales para lograr un intervalo de concentración de circulación en el plasma que incluya la IC50 (es decir, la concentración de compuesto prueba que logra una inhibición semimáxima de los síntomas) como se determinó en cultivo celular. Esta información se puede usar para determinar con mayor precisión las dosis útiles en humanos. Los niveles en plasma pueden medirse, por ejemplo,
35 mediante cromatografía líquida de alto rendimiento.

40 En ciertos aspectos, un método para el tratamiento de una infección viral, por ejemplo, infección por VIH, incluye la etapa de administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un agente (por ejemplo, uno o más anticuerpos, uno o más trímeros estabilizados de una proteína de la envoltura, una secuencia de ácido nucleico que codifica uno o más trímeros estabilizados de una proteína de la envoltura y similares) que modula (por ejemplo, inhibe) una o más actividades de proteína de la envoltura (por ejemplo, gp41) (por ejemplo, mediación de la fusión viral (por ejemplo entrada viral y/o formación de sincitios) a un sujeto. Como se define en la presente descripción, una cantidad terapéuticamente efectiva de agente (es decir, una dosificación efectiva) varía de aproximadamente 0,001 a 30 mg/kg de peso corporal, de aproximadamente 0,01 a 25 mg/kg de peso corporal, de aproximadamente 0,1 a 20 mg/kg de peso corporal, o de aproximadamente 1 a 10 mg/kg, de 2 a 9 mg/kg, de 3 a 8 mg/kg, de 4 a 7 mg/kg o de 5 a 6 mg/kg de peso corporal. El experto en la técnica apreciará que ciertos factores pueden influir en la dosificación requerida para tratar efectivamente a un sujeto, que incluyen, pero no se limitan a, la gravedad de la enfermedad o trastorno, tratamientos previos, la salud general y/o la edad del sujeto y otras enfermedades presentes. Además, el tratamiento de un sujeto con una cantidad terapéuticamente efectiva de un inhibidor puede incluir un único tratamiento o, en ciertas modalidades
45 ilustrativas, puede incluir una serie de tratamientos. Se apreciará además que la dosificación efectiva de las moléculas usadas para el tratamiento puede aumentarse o disminuirse durante el transcurso de un tratamiento en particular. Los cambios en la dosificación pueden resultar de los resultados de los ensayos de diagnóstico como se describe en la presente descripción. Las composiciones farmacéuticas se pueden incluir en un contenedor, paquete o dispensador junto con instrucciones para su administración.

60 Debe entenderse que las modalidades de la presente invención que se han descrito son meramente ilustrativas de algunas de las aplicaciones de los principios de la presente invención. Los expertos en la técnica pueden realizar numerosas modificaciones basadas en las enseñanzas presentadas en la presente descripción sin apartarse del alcance de la invención.

Se proporcionan los siguientes ejemplos. En lo que se refiere a la invención, tal debe ser visto como ilustrativo de esta. En cualquier otro punto, los ejemplos deben verse como proporcionados solo con propósitos ilustrativos.

5 Ejemplo I

Capacidad de neutralización de los trímeros de gp140 de VIH-1 bioquímicamente estables en un modelo de conejillo de indias.

10 La evaluación preclínica de los inmunógenos candidatos de Env es fundamental para la prueba de conceptos y para la priorización de candidatos de vacunas. Ensayos de neutralización del virus basado en la luciferasa en células TZM.bl (Li y otros (2005) J. Virol. 79:10108; Montefiori (2005) Curr. Prot. Immunol. Capítulo 12:Unidad 1211) se han desarrollado como un ensayo de alto rendimiento que puede estandarizarse (Montefiori (2009) Methods Mol. Biol. 485:395; Polonis y otros (2008) Virology 387:315). Sin embargo, el uso óptimo de este ensayo requirió la generación de paneles de virus estandarizados derivados de múltiples clados y que reflejan virus tanto fáciles de neutralizar (nivel 1) como aislados primarios (nivel 2) (Li y otros, *más arriba*).

Mediante el tamizaje se identificó un panel de aislados primarios de VIH-1, dos virus, CZA97.012 (Clado C)) (Rodenburg y otros (2001) AIDS Res. Hum. Retroviruses 17:161) y 92UG037.8 (Clado A) (Chen y otros, *más arriba*) que produjeron trímeros bioquímicamente homogéneos y estables con propiedades antigénicas bien definidas y uniformes (Burke y otros (2009) Virology 387:147). La adición del dominio de trimerización "plegado" (Fd) de fibritina del bacteriófago T4 aumentó adicionalmente su rendimiento y pureza (Frey y otros (2008) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 105:3739). Como se describe además en la presente descripción, la inmunogenicidad de estos trímeros de gp140 estabilizados de clado A y clado C se evaluó en conejillo de indias usando un panel de aislados de nivel 1 y nivel 2 de los clados A, B y C.

25 Producción de Trímeros de gp 140 de VIH-1 homogéneos, estables

Los trímeros de gp140 env derivados de los aislados primarios 92UG037.8 (clado A) y CZA97.012 (clado C) se estabilizaron con una etiqueta de trimerización C-terminal "plegada" de fibritina T4 (Figura 13) y se produjeron en células *T.ni* (High 5). La pureza y estabilidad bioquímica se determinó de la siguiente manera: El trímero de gp140 de CZA97.012 (clado C) purificado se resolvió por cromatografía de filtración en gel en columnas de Superose 6. La masa molecular aparente se calculó mediante el uso de estándares de tiroglobulina (670 kDa), ferritina (440 kDa) y catalasa (232 kDa). Las fracciones del pico se combinaron y se analizaron mediante SDS-PAGE. El trímero de clado C se trató con varias concentraciones (0, 0,05, 0,25, 0,5, 1, 2, 5 mM) de etilenglicol bis (succinimidilsuccinato). Los productos reticulados se analizaron mediante SDS-PAGE usando un gel al 4%. El estándar molecular fue la fosforilasa b reticulada (Sigma). Similares análisis se han reportado previamente para el trímero de gp140 92UG037.8 de clado A purificado (Frey y otros, *más arriba*). El trímero CZA97.012 (clado C) mostró una pureza y homogeneidad similares según lo determinado por la cromatografía de exclusión por tamaño y la reticulación química que confirmaron que era monodisperso y trimérico.

Se realizó un ensayo del gen reportero de luciferasa en células TZM-bl (una línea celular genéticamente modificada que expresa CD4, CXCR4 y CCR5 y contiene los genes reporteros *Luc* y β -*Gal* inducibles por Tat) basado en una única ronda de infección con virus pseudotipados Env clonados molecularmente. Este ensayo resultó en una alta tasa de éxito en las infecciones de una única ronda, capacidad de ensayo aumentada (por ejemplo, un ensayo de dos días), precisión aumentada (por ejemplo, neutralización de 50% medida con precisión) y un nivel mejorado de estandarización (por ejemplo, una línea celular estable). El ensayo del gen reportero de luciferasa se optimizó y validó.

Respuestas de unión del anticuerpo inducidas por los Trímeros de Clado A y Clado C

50 Se usó un enfoque de múltiples niveles para evaluar las respuestas de anticuerpos neutralizantes inducidas por la vacuna. En el Nivel 1, la(s) cepa(s) de la vacuna y cepas sensibles a la neutralización no se incluyeron en la vacuna. En el Nivel 2, se usó un panel de virus heterólogos que coincidían con el(los) subtipo(s) genético(s) de la vacuna (por ejemplo, 12 virus por panel). Este nivel podría incluir opcionalmente cepas adicionales de los sitios de prueba de la vacuna. En el Nivel 3, se usó un panel de múltiples clados compuesto por seis virus de Nivel 2 evaluados en el Nivel 2. El Nivel 3 podría incluir opcionalmente cepas adicionales de un sitio opcional de prueba de la vacuna.

En un estudio preliminar, se evaluó la inmunogenicidad de un inmunógeno de núcleo de monómero gp120 de 92UG037.8 (clado A) en conejillo de indias, que indujo solo respuestas de anticuerpos neutralizantes (NAb) mínimos contra los virus de nivel 1 sensibles a la neutralización. Se centró la inmunogenicidad de los trímeros 92UG037.8 (clado A) y CZA97.012 (clado C) que se seleccionaron y diseñaron para una estabilidad máxima y homogeneidad conformacional. Estos inmunógenos contuvieron la secuencia de gp140 fusionada al dominio de trimerización plegado de la fibritina T4.

65 Los experimentos preliminares de monómero de gp120 de 92UG037.8 se realizaron como sigue. Se generó un 'núcleo' monomérico de gp120 de 92UG037.8 que estaba desprovisto de las regiones V1-V3 y tuvo truncamientos amino y carboxi terminales. Se inmunizaron los conejillos de indias a intervalos de cuatro semanas con 100 μ g de monómero de

gp120 de 92UG037.8 en adyuvante Ribi. Se obtuvieron sueros cuatro semanas después de cada inmunización, y se probaron contra el antígeno de gp120 de 92UG037.8 en un ensayo ELISA de punto final.

5 Trómeros de gp140 Env derivados de los aislamientos primarios 92UG037.8 (clado A) y CZA97.012 (clado C) se estabilizaron con una etiqueta de trimerización C-terminal plegada de fibritina T4 y se produjeron en células *T.ni* (HIGH FIVE™, Invitrogen, Carlsbad, CA). Los análisis bioquímicos iniciales se realizaron mediante cromatografía de exclusión por tamaño y reticulación química. Los trómeros de gp140-Fd de 92UG037.8 (clado A) y CZA97.012 (clado C) se purificaron hasta homogeneidad y exhibieron picos únicos como se determinó mediante cromatografía de exclusión por tamaño. Se observaron pesos moleculares esperados y estados de oligomerización para tanto los trómeros de 10 92UG037.8 como CZA97.012 mediante tinción con Coomassie y reticulación química, respectivamente. Se determinó el equilibrio de sedimentación de 92UG037.8-gp140-Fd y su escisión *in vitro* con plasmina humana. Se determinó que la masa molecular era 409 +/- 10 kDa (confirmando el valor esperado de aproximadamente 405 kDa).

15 92UG037.8-gp140-Fd fue capaz de unirse tanto CD4 soluble como el anticuerpo monoclonal (mAb) 2G12 (un mAb ampliamente neutralizante que reconoce carbohidratos en la superficie exterior de gp120). 92UG037.8-gp140-Fd además se une al mAb 17b de CD4i (un anticuerpo monoclonal neutralizante inducido por CD4 (CD4i) que tiene un epítipo de unión que se superpone parcialmente con el correceptor del sitio de unión CCR5 de gp120) y los mAb de clúster I (los mAb que son no neutralizantes y reaccionan con la región inmunodominante de gp41 (aminoácidos 579-613); los mAb de clúster II reaccionan con los aminoácidos 644-667 de MPER gp41 y no neutralizan o neutralizan (por ejemplo, los mAb 2F5, 4E10, Z13)).

25 Se inmunizaron los conejillos de indias (n=5/grupo) con 100 µg del trómero de gp140 de clado A o clado C en adyuvante Ribi s.c./i.p. en las semanas 0, 5 y 10. El suero se obtuvo 4 semanas después de cada inmunización. Se evaluaron los anticuerpos de unión específicos de Env mediante ELISA de punto final tanto para gp140 de clado A como de clado C. Se observaron respuestas de unión de anticuerpos de alto título en conejillo de indias inmunizados con trómeros de clado A y de clado C. Se detectaron respuestas después de una única inmunización y se aumentaron a un título medio de 6,5 log a continuación de la segunda y tercera inmunizaciones (Figuras 1A-1B). Las respuestas ELISA fueron comparables a las cepas gp140 homólogas y heterólogas (Figuras 1A-1B).

30 Respuestas de anticuerpos neutralizantes inducidas por los Trómeros de Clado A y Clado C

Para evaluar el perfil de neutralización proporcionado por los trómeros estables de clado A y clado C, se realizaron los ensayos de TZM.bl (Li y otros, *más arriba*; Montefiori y otros, *más arriba*) con el uso de un panel de virus de nivel 1 y nivel 2 con un amplio intervalo de sensibilidades de neutralización a partir de los clados A, B y C. Los criterios se definieron como: (i) >3 veces por encima del fondo preinmune, (ii) >2 veces por encima de un control concurrente del virus de la leucemia murina (MuLv), y (iii) un título absoluto de ID₅₀ >60. Los conejillos de indias inmunizados con trómeros ya sean de clado A o clado C desarrollaron una actividad neutralizante sólida de clado cruzado contra los virus de clado A, B y C de nivel 1 sensibles a la neutralización (DJ263.8, SF162.LS y MW965.26 respectivamente) con títulos ID₅₀ contra MW965.26 en el intervalo de 14,274 a 33,847 (Figura 6). No se observó neutralización contra las cepas de vacunas autólogas. Sin pretender estar limitado por ninguna teoría científica, este resultado presumiblemente reflejó sus fenotipos resistentes a la neutralización inherente.

45 Se evaluaron las respuestas de NAb contra los aislados de virus primarios de nivel 2 más rigurosos. Se detectó una actividad de neutralización de título más bajo pero reproducible contra los virus seleccionados de nivel 2 de los clados A, B y C en los sueros de los animales después de la inmunización (Figura 6). La magnitud y consistencia de las respuestas contra los virus de nivel 2 fueron esencialmente inferiores que contra los virus de nivel 1. Sin embargo, se observó consistentemente un grado de actividad de neutralización de nivel 2. Además, el trómero de clado C indujo respuestas de mayor magnitud y amplitud en comparación con el trómero de clado A. Se muestra en la Figura 2 un resumen gráfico de los títulos de NAb contra los virus de nivel 2 en los sueros pre y postinmunización. En general, el trómero de clado C indujo respuestas NAb detectables contra el 27%, 20% y 47% de los virus de nivel 2 analizados a partir de los clados A, B y C, respectivamente, mientras que el trómero de clado A indujo respuestas detectables de NAb contra el 13%, 7% y el 27% de los virus de nivel 2 analizados a partir de los clados A, B y C, respectivamente (Figura 7). Estos datos demuestran la inmunogenicidad de estos trómeros estables de clado A y clado C y muestran la utilidad de este panel de virus para proporcionar un enfoque nivelado sistemático para evaluar las respuestas de NAb inducidas por los inmunógenos de Env de HIV-1.

Respuestas de anticuerpos neutralizantes de IgG purificada

60 Para confirmar los resultados de los ensayos NAb con el uso de suero, se realizaron ensayos de neutralización adicionales con el uso de IgG purificada a partir del suero de animales inmunizados. La IgG purificada demostró una potente actividad neutralizante contra el panel de los virus de nivel 1 a bajas concentraciones (0,1-0,4 µg/ml para MW965.26) así como, una actividad de neutralización detectable contra un número limitado de virus de nivel 2, incluyendo ZM197M.PB7, ZM109F. PB4, 0439.v5.c1 y 6535.3 (Figura 8). Los datos de neutralización de la muestra de virus sin procesar con el uso de IgG purificada contra el virus de nivel 2 de clado C, ZM109F.PB4, se muestra en la 65 Figura 3. La IgG control de sueros vírgenes no exhibió actividad de neutralización.

Respuestas del péptido de lazo variable

Se evaluaron las respuestas de anticuerpos contra los péptidos V1, V2 y V3 de gp140 de clado A, 92UG037.8, y clado C, CZA97.012. Se utilizó un péptido codificado V3, 92UG037.8, como control negativo. Sueros de conejillos de indias inmunizados con trímeros de clado A y de clado C exhibieron respuestas de ELISA contra péptidos lineales de lazo V3 pero no contra el péptido codificado (Figuras 4A-4B). Estas respuestas se compararon contra las secuencias V3 homólogas y heterólogas, y se observaron títulos de ELISA inferiores contra los péptidos V1 y V2. Se realizaron ensayos de neutralización por competencia de péptidos V3 a partir de animales representativos que recibieron los trímeros de clado A (conejillo de indias #5) y clado C (conejillo de indias #10). La actividad neutralizante contra los virus seleccionados de nivel 1 y nivel 2 se bloqueó parcialmente tanto por péptidos homólogos y heterólogos de lazo V3 pero no por el péptido codificado (Figura 4C), lo que indica que los trímeros de gp140 de clado A y clado C indujeron los NAb dirigidos en parte contra elementos conservados en el lazo V3. La alineación de secuencia de los lazos V3 de 92UG037.8 y CZA97.012 mostró una homología de secuencia sustancial (Figura 4D).

15 Regímenes heterólogos de sensibilización/refuerzo

La sensibilización con ADN seguido del refuerzo con proteínas se ha informado anteriormente para inducir respuestas de anticuerpos de títulos superiores que cualquier enfoque único (Vaine y otros, (2008) J. Virol. 82:7369; Wang y otros, (2006) Virology 350:34). En consecuencia, se exploraron los regímenes de sensibilización de ADN, refuerzo de proteína así como sensibilización de ADN y refuerzo del adenovirus recombinante serotipo 26 (rAd26) que expresan los trímeros de clado A y clado C. Se sensibilizaron conejillos de indias (n=5/grupo) con 0,5 mg de vacunas de ADN por vía intramuscular (i.m.) en las semanas 0, 4 y 8 y después se reforzaron en la semana 36 con una única inmunización de vectores rAd26 o en las semanas 36, 40 y 44 con proteínas trímeras en adyuvante Ribi. Se observaron respuestas de ELISA de alto título después de la inmunización tanto con los regímenes de ADN/proteína (Figuras 5A-5B) como con ADN/rAd26 (Figuras 5C-5D). Los títulos máximos obtenidos después de las tres inmunizaciones de sensibilización con ADN tuvieron un título log promedio de 4,8. El refuerzo con inmunizaciones ya sean una única con rAd26 o tres con la proteína purificada aumentó las respuestas a títulos log promedios de 6,5, que fueron comparables a los inducidos por el régimen con la proteína sola (Figura 1).

Se observaron niveles bajos de respuestas NAb de nivel 1 después de la sensibilización de ADN (Figura 9). Sin embargo, después del refuerzo, los regímenes ADN/rAd26 y ADN/proteína no indujeron respuestas de Nab de nivel 1 de título superior en comparación con el régimen de la proteína sola. Sin pretender estar limitado por la teoría científica, se piensa que las vacunas de ADN pueden haber inducido una variedad de conformémeros u oligómeros de la proteína gp140 que podrían haber sensibilizado respuestas de anticuerpos no neutralizantes. Estos datos sugieren que, en ciertos contextos, los regímenes de vacunación de sensibilización/refuerzo pueden no ser necesariamente superiores a los inmunógenos de la proteína purificada.

Discusión

Los datos presentados en la presente descripción evaluaron la inmunogenicidad de los inmunógenos de trímeros de Env gp140 altamente purificados CZA97.012 (clado C) y 92UG037.8 (clado A) que se seleccionaron y modificaron por ingeniería genética para una estabilidad bioquímica y homogeneidad conformacional óptimas. La mayoría de los inmunógenos del trímero Env reportados hasta la fecha provienen de aislados del clado B, aunque reportes recientes describieron además trímeros de otros clados (Burke y otros, *más arriba*; Kang y otros (2009) Vaccine 37:5120, Epub 28 de junio de 2009). Sin embargo, la homogeneidad conformacional de esas preparaciones no se evaluó totalmente ni frecuentemente. Se utilizó un panel de virus de nivel 1 y nivel 2 de los clados A, B y C con un amplio intervalo de sensibilidades de neutralización para evaluar la neutralización del virus. Los conejillos de indias inmunizados con los trímeros de clado A y C mostraron una actividad neutralizante robusta y cruzada para clado contra los virus de clado A, B y C de nivel 1 sensibles a la neutralización, así como niveles claros pero bajos de actividad neutralizante contra los virus selectivos de nivel 2 clados A, B y C. Se confirmaron las respuestas NAb contra aislados de nivel 2 con el uso de IgG purificada, pero fueron esencialmente inferiores en magnitud y menos consistentes que las respuestas contra los aislados de nivel 1. Las respuestas de anticuerpos inducidas por los trímeros se dirigieron en parte contra los lazos V1, V2 y V3. Se observó la reactividad del lazo V3 contra ambos virus heterólogos, aunque, sin pretender estar limitados por la teoría científica, es probable además, que estuviesen enfocados una variedad de otros epítotos.

Se evaluaron además los regímenes de vacunación heteróloga de sensibilización/refuerzo para su potencial en aumentar la inmunogenicidad de los inmunógenos del trímero de proteína. Los regímenes de ADN/proteína y ADN/rAd26 no condujeron a la magnitud o amplitud mejorada de las respuestas de anticuerpos en comparación con el régimen de la proteína sola. De hecho, los regímenes de sensibilización/refuerzo parecieron inducir respuestas de NAb inferiores a pesar de las respuestas de anticuerpos de unión a ELISA comparables. Estos hallazgos contrastan con los reportes anteriores que destacaban las respuestas humorales mejoradas obtenidas con los regímenes ADN/proteína o ADN/rAd en comparación con los regímenes con proteínas solas en otros sistemas (Seaman y otros (2005) J. Virol. 79:2956; Vaine y otros, *más arriba*; Wang y otros (2005) J. Virol. 79:7933; Wang y otros, *más arriba*). Se hipotetiza que la actividad NAb inferior observada en los regímenes de sensibilización/refuerzo en el presente estudio puede haberse relacionado con una mezcla heterogénea de conformémeros u oligómeros de Env expresados por las vacunas de ADN, lo

que podría haber sesgado las respuestas de anticuerpos hacia epítomos no neutralizantes. En conjunto, estos hallazgos indican que el régimen óptimo puede depender del antígeno particular o sistema utilizado.

En resumen, los resultados descritos en la presente descripción demuestran la inmunogenicidad de los trímeros de clado A y C que se seleccionaron y modificaron por ingeniería genética para una pureza y estabilidad óptimas. Es importante destacar que el panel de virus de nivel 1 y nivel 2 de los clados A, B y C permite una evaluación rápida de perfiles de NAb contra una diversidad de virus y puede ser útil para estudios de inmunogenicidad comparativos de nuevos inmunógenos candidatos de Env del VIH-1.

Ejemplo II

Materiales y Métodos

Trímeros de gp140 de HIV-1

Trímeros de gp140 92UG037.8 (clado A) y CZA97.012 (clado C) con un dominio de trimerización C-terminal de la fibritina del bacteriófago T4 (plegado) y el motivo polihistidina se expresaron en células de insectos con el uso del sistema Bac-to-Bac (Invitrogen) como se describió anteriormente (Chen y otros, (2000) J. Biol. Chem. 275:34946; Frey y otros, *más arriba*). En resumen, se generó un baculovirus recombinante de acuerdo con el protocolo del fabricante y se amplificó en las células de insecto Sf9. Para la producción a gran escala, se infectaron 12 litros de células de *Trichoplusia ni* (Hi-5), (2×10^6 células/ml), a la multiplicidad óptima de la infección. El sobrenadante se recogió a las 68 horas después de la infección mediante centrifugación y se concentró a 2 litros, seguido del intercambio inmediato en solución salina tamponada con fosfato (PBS) en un sistema de filtración de flujo tangencial, ProFlux M 12 (Millipore). Después de un centrifugado clarificante y la adición de imidazol a la concentración final de 15 mM, el sobrenadante se cargó en una columna de níquel a una velocidad de flujo de 1 ml/min, después se lavó con imidazol 15 mM en PBS, seguido de lavados secuenciales adicionales con imidazol 40 mM y 60 mM en PBS. La proteína se eluyó con imidazol 300 mM en PBS. Las fracciones que contenían la proteína purificada se mezclaron, concentraron y purificaron adicionalmente mediante cromatografía de filtración en gel en Superose 6 (GE Healthcare). La proteína se concentró, congeló en nitrógeno líquido y almacenó a -80°C .

Vacunas de ADN

Secuencias génicas optimizadas de codones humanos para los trímeros de gp140 de clado C y clado A con un dominio de trimerización C-terminal de fibritina de bacteriófago T4 (Bower y otros, (2004) J. Virol. 78:4710; Yang y otros, (2002) J. Virol. 76:4634) y el motivo polihistidina se sintetizaron comercialmente (Geneart) y se clonaron en los sitios de restricción *Sall-BamHI* de un vector de expresión eucariota pCMV. Los insertos génicos se verificaron mediante digestiones de restricción diagnóstica, secuenciación de ADN y prueba de expresión en las células 293. Se utilizaron preparaciones libres de toxina de pCMV-CZA97012-gp140 y pCMV-92UG037-gp140 (Qiagen) para los protocolos de inmunización.

Vectores de adenovirus recombinante serotipo 26

Vectores de adenovirus recombinante de serotipo 26 suprimido en E1/E3 de replicación incompetente (rAd26) que expresan trímeros de gp140 de clado A y clado C con un dominio de trimerización C-terminal de fibritina de bacteriófago T4 plegado (Bower y otros, *más arriba*; Yang y otros, *más arriba*) y el motivo de polihistidina se prepararon como se describió anteriormente (Abbink y otros (2007) J. Virol. 81:4654).

Animales e inmunizaciones

Los conejillos de indias Hartley hembras criados (Elm Hill) se alojaron en la Instalación de Investigación Animal del Centro Médico Beth Israel Deaconess bajo los protocolos del Comité Institucional de Cuidado y Uso Animal (IACUC). Se administraron trímeros de proteína en 500 μl de PBS, (100 μg /animal) a intervalos de 4 o 5 semanas con adyuvante Ribi (Sigma) en tres sitios: 2 subcutáneas (sc) (200 μl /sitio) y 1 intraperitoneal (i.p.) (100 μl /sitio). Se administraron las vacunas de ADN libres de endotoxina (500 μg /animal) por vía intramuscular en 500 μl de PBS dividido entre los cuádriceps derecho e izquierdo a intervalos de 4 semanas. Se administraron vectores recombinantes Ad26 (5×10^{10} vp/animal) por vía intramuscular en 500 μl de solución salina dividida entre los cuádriceps derecho e izquierdo. Se obtuvieron muestras de suero de la vena cava de los animales anestesiados.

ELISA

Los títulos de anticuerpos de unión en el suero contra los trímeros de gp140 y los péptidos lineales (péptido de Nueva Inglaterra) se determinaron mediante un ELISA de punto final. Placas de ELISA maxisorp de noventa y seis pocillos (Thermo Fisher Scientific) revestidas durante la noche con 100 μl /pocillo de 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de gp140 clado A, gp140 clado C o lazos de péptidos lineales V1-V3 en PBS se bloquearon durante 3 horas con PBS que contenía BSA al 2% (Sigma) y Tween 20 al 0,05% (Sigma). A continuación, se añadieron sueros de conejillo de indias en diluciones en serie y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Las placas se lavaron tres veces con PBS que contenía Tween 20 al

0,05% y se incubaron durante 1 hora con una dilución 1/2000 de un anticuerpo secundario de cabra anti-conejo de indias conjugado con HRP (Jackson ImmunoResearch Laboratories). Las placas se lavaron tres veces y se revelaron con peroxidasa de micropocillos SureBlue TMB (KPL Research Products), se detuvieron mediante la adición de solución de parada TMB (productos KPL Research) y se analizaron a longitudes de onda dobles 450nm/550nm en un lector de placas Spectramax Plus ELISA (Molecular Devices) con el uso del programa Softmax Pro 4.7.1. Se definieron los títulos de ELISA punto final como la dilución de suero recíproca que produjo la más alta absorbancia > 2 veces el fondo.

Ensayo de neutralización en TZM.bl

Se midieron las respuestas NAb contra pseudovirus de HIV-1 de nivel 1 y nivel 2 con el uso de un ensayo basado en luciferasa en células TZM.bl como anteriormente (Li y otros, *más arriba*; Montefiori y otros, *más arriba*). Este ensayo midió la reducción en la expresión génica del reportero de la luciferasa en células TZM-bl después de una única ronda de infección viral. La CI_{50} se calculó como la concentración que causó una reducción del 50% en unidades de luminiscencia relativa en comparación con los pocillos de control de virus después de la sustracción de las unidades de luminiscencia relativas del control celular. En resumen, se realizaron diluciones 3 veces en serie de las muestras de suero por triplicado (placa de fondo plano de 96 pocillos) en medio de crecimiento DMEM al 10% (100 μ l/pocillo). Se añadió 200 TCID₅₀ de virus a cada pocillo en un volumen de 50 μ l y las placas se incubaron durante 1 hora a 37° C. Después, se añadieron las células TZM.bl (1×10^4 /pocillo en 100 μ l de volumen) en medio de crecimiento DMEM al 10% que contenía DEAE-Dextrano (Sigma) a una concentración final de 11 μ g/ml. Se incluyeron controles negativos del virus de la leucemia murina (MuLV) en todos los ensayos para descartar una inhibición no específica. Se realizaron ensayos confirmatorios utilizando IgG purificada por columnas de proteína A inmovilizada (Pierce). Para probar la reactividad del péptido de lazo variable, se incubaron las muestras de IgG purificadas con los péptidos lineales V1, V2 o V3 durante 1 hora a 37°C antes de la adición del pseudovirus. Un péptido V3 de 92UG037 codificado de control negativo se incluyó también en estos ensayos. Los virus en el panel de nivel 1 fueron: MW965.26 (clado C), DJ123.8 (clado A), SF162.LS (clado B), BaL.26 (clado B), 92UG037.8 (clado A) y CZA97.012 (clado C). Los virus en el panel de nivel 2 clado A fueron: Q769.d22, Q168.a2, Q842.d12, 3718.v3, 0330.v4 y 0439.v5. Los virus en el panel de nivel 2 clado B fueron: WITO4160.33, AC10.0.29, REJO451, 6535.3, SC422661 y TRO.11. Los virus en el panel de nivel 2 clado C fueron: ZM109F.PB4, ZM249M, CAP45.2, Du123.6, Du422.1, y ZM197M.

30 Estructura génica y enzimas de clonación

Enzima de clonación única 5': *Sa*II; secuencia Kozak: GCCACC; enzima de clonación única 3': *Bam*HI; Estructura Génica: *Sa*II-GCCACC-ATG..Parada-*Bam*HI; Optimizar: Sí. La secuencia de aminoácidos del trímero 92UG037 gp140-6xHis (líder de MCONS) se representa en la Figura 12A. La secuencia de aminoácidos del trímero CZA97.012 gp140-6xHis (MCONS líder) se representa en la Figura 12B.

Referencias

- 40 Beddows y otros (2007) *Virology* 360:329
 Li y otros (2006) *J. Virol* 80:1414
 Bower y otros (2006) *Vaccine* 24:5442
 Kim y otros (2005) *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 21:58
 Frey y otros (2008) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105:3739
 Barouch (2008) *Nature* 455:613
 45 Beddows y otros (2007) *Virology* 360:329
 Berger y otros (1999) *Annu. Rev. Immunol.* 17:657
 Berman y otros (2002) *Aids* 8:591
 Binley y otros (2000) *J. Virol.* 74:627
 Bower y otros (2006) *Vaccine* 24:5442
 50 Burton y otros (2004) *Nat. Immunol.* 5:233
 Carrow y otros, (1991) *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 7:831
 Crooks y otros (2007) *Virology* 366:245
 Derby y otros (2007) *Virology* 366:433
 Dey y otros (2007) *J. Virol.* 81:5579
 55 Flynn y otros (2005) *J. Infect. Dis.* 191:654
 Gallo y otros (2003) *Biochim. Biophys. Acta* 1614:36
 Kim y otros (2005) *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 21:58
 Li y otros (2006) *J. Virol.* 80:1414
 Montefiori y otros (2007) *PLoSMed.* 4:e348
 60 Morner y otros (2009) *J. Virol.* 83:540
 Nara y otros (1988) *J. Virol.* 62:2622
 Page y otros (1991) *Vaccine* 9:47
 Pantophle and Burton (2006) *Annu. Rev. Immunol.* 24:739
 Pitisuttithum y otros (2006) *J. Infect. Dis.* 194:1661
 65 Scheid y otros (2009) *Nature* 458:636
 Vogel y otros (1994) *J. Immunol.* 153:1895

Walker y otros (2009) Science 326:285
Wyatt y otros (1998) Nature 393:705
Zhang y otros (2001) J. Biol. Chem. 276:39577
Zolla-Pazner y otros (2008) Virology 372:233

5

10

Reivindicaciones

1. Uso de un trímero de gp140 de HIV estabilizado para la fabricación de un medicamento para inducir un antisuero neutralizante anti-VIH en un sujeto, caracterizado porque el trímero de gp140 de VIH comprende un polipéptido gp140 de VIH que comprende una secuencia de aminoácidos al menos 95% idéntica a la secuencia

5

Met Arg Val Arg Gly Ile Gln Arg Asn Cys Gln His Leu Trp Arg Trp

10

Gly Thr Leu Ile Leu Gly Met Leu Met Ile Cys Ser Ala Ala Glu Asn

15

Leu Trp Val Gly Asn Met Trp Val Thr Val Tyr Tyr Gly Val Pro Val

Trp Thr Asp Ala Lys Thr Thr Leu Phe Cys Ala Ser Asp Thr Lys Ala

20

Tyr Asp Arg Glu Val His Asn Val Trp Ala Thr His Ala Cys Val Pro

Thr Asp Pro Asn Pro Gln Glu Ile Val Leu Glu Asn Val Thr Glu Asn

25

Phe Asn Met Trp Lys Asn Asp Met Val Asp Gln Met His Glu Asp Ile

Ile Ser Leu Trp Asp Gln Ser Leu Lys Pro Cys Val Lys Leu Thr Pro

30

Leu Cys Val Thr Leu His Cys Thr Asn Ala Thr Phe Lys Asn Asn Val

Thr Asn Asp Met Asn Lys Glu Ile Arg Asn Cys Ser Phe Asn Thr Thr

35

Thr Glu Ile Arg Asp Lys Lys Gln Gln Gly Tyr Ala Leu Phe Tyr Arg

Pro Asp Ile Val Leu Leu Lys Glu Asn Arg Asn Asn Ser Asn Asn Ser

40

Glu Tyr Ile Leu Ile Asn Cys Asn Ala Ser Thr Ile Thr Gln Ala Cys

45

Pro Lys Val Asn Phe Asp Pro Ile Pro Ile His Tyr Cys Ala Pro Ala

Gly Tyr Ala Ile Leu Lys Cys Asn Asn Lys Thr Phe Ser Gly Lys Gly

50

55

60

65

ES 2 659 875 T3

Pro Cys Asn Asn Val Ser Thr Val Gln Cys Thr His Gly Ile Lys Pro
5 Val Val Ser Thr Gln Leu Leu Leu Asn Gly Ser Leu Ala Glu Lys Glu
Ile Ile Ile Arg Ser Glu Asn Leu Thr Asp Asn Val Lys Thr Ile Ile
10 Val His Leu Asn Lys Ser Val Glu Ile Val Cys Thr Arg Pro Asn Asn
15 Asn Thr Arg Lys Ser Met Arg Ile Gly Pro Gly Gln Thr Phe Tyr Ala
Thr Gly Asp Ile Ile Gly Asp Ile Arg Gln Ala Tyr Cys Asn Ile Ser
20 Gly Ser Lys Trp Asn Glu Thr Leu Lys Arg Val Lys Glu Lys Leu Gln
25 Glu Asn Tyr Asn Asn Asn Lys Thr Ile Lys Phe Ala Pro Ser Ser Gly
Gly Asp Leu Glu Ile Thr Thr His Ser Phe Asn Cys Arg Gly Glu Phe
30 Phe Tyr Cys Asn Thr Thr Arg Leu Phe Asn Asn Asn Ala Thr Glu Asp
Glu Thr Ile Thr Leu Pro Cys Arg Ile Lys Gln Ile Ile Asn Met Trp
35 Gln Gly Val Gly Arg Ala Met Tyr Ala Pro Pro Ile Ala Gly Asn Ile
40 Thr Cys Lys Ser Asn Ile Thr Gly Leu Leu Leu Val Arg Asp Gly Gly
Glu Asp Asn Lys Thr Glu Glu Ile Phe Arg Pro Gly Gly Gly Asn Met
45 Lys Asp Asn Trp Arg Ser Glu Leu Tyr Lys Tyr Lys Val Ile Glu Leu
50 Lys Pro Leu Gly Ile Ala Pro Thr Gly Ala Lys Arg Arg Val Val Glu
Arg Glu Lys Arg Ala Val Gly Ile Gly Ala Val Phe Leu Gly Phe Leu
55 Gly Ala Ala Gly Ser Thr Met Gly Ala Ala Ser Leu Thr Leu Thr Val
Gln Ala Arg Gln Leu Leu Ser Ser Ile Val Gln Gln Gln Ser Asn Leu
60
65

5 Leu Arg Ala Ile Glu Ala Gln Gln His Met Leu Gln Leu Thr Val Trp
 Gly Ile Lys Gln Leu Gln Thr Arg Val Leu Ala Ile Glu Arg Tyr Leu
 10 Lys Asp Gln Gln Leu Leu Gly Ile Trp Gly Cys Ser Gly Lys Leu Ile
 Cys Thr Thr Asn Val Pro Trp Asn Ser Ser Trp Ser Asn Lys Ser Gln
 15 Thr Asp Ile Trp Asn Asn Met Thr Trp Met Glu Trp Asp Arg Glu Ile
 Ser Asn Tyr Thr Asp Thr Ile Tyr Arg Leu Leu Glu Asp Ser Gln Thr
 20 Gln Gln Glu Lys Asn Glu Lys Asp Leu Leu Ala Leu Asp Ser Trp Lys
 25 Asn Leu Trp Ser Trp Phe Asp Ile Ser Asn Trp Leu Trp Tyr Ile Lys
 Ser Arg Ile Glu Gly Arg Gly Ser Gly Gly Tyr Ile Pro Glu Ala Pro
 30 Arg Asp Gly Gln Ala Tyr Val Arg Lys Asp Gly Glu Trp Val Leu Leu
 35 Ser Thr Phe Leu Gly

40 y,

que comprende el péptido de lazo V3 que consiste en la secuencia Thr Arg Pro Asn Asn Asn Thr Arg Lys Ser Met Arg Ile Gly Pro Gly Gln Thr Phe Tyr Ala Thr Gly Asp Ile Gly Asp Ile Arg Gln Ala Tyr (sec. con núm. de ident.:8); y

45 que comprende el dominio de trimerización plegado de fibritina T4, formando, de ese modo, un trímero estabilizado capaz de inducir la producción de antisueros neutralizantes contra el HIV cuando el trímero estabilizado se administra a un sujeto.

2. Uso de la reivindicación 1, en donde el antisuero neutralizante anti-HIV neutraliza el HIV-1 seleccionado de uno o más de clado A, clado B y clado C.

3. Uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el título de HIV en el sujeto infectado con HIV disminuye después de poner en contacto al sujeto con el polipéptido aislado

4. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el trímero de gp140 de HIV estabilizado comprende un polipéptido de gp140 de HIV que incluye los péptidos de lazo variable V1 y V2, dicho péptido de lazo V1 que consiste en la secuencia Thr Asn Ala Thr Phe Lys Asn Asn Val Thr Asn Asp Met Asn Lys Glu Ile Arg Asn Cys Ser Phe Asn Thr Thr Thr Glu Ile Arg (sec. con núm. de ident.: 4); y dicho péptido de lazo V2 que consiste en la secuencia Ser Phe Asn Thr Thr Thr Glu Ile Arg Asp Lys Lys Gln Gln Gly Tyr Ala Leu Phe Tyr Arg Pro Asp Ile Val Leu Leu Lys Glu Asn Arg Asn Asn Ser Asn Asn Ser Glu Tyr Ile Leu Ile Asn (sec. con núm. de ident.: 6).

5. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el HIV es HIV-1.

6. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el trímero de gp140 de HIV comprende un polipéptido de gp140 de HIV que comprende la secuencia de aminoácidos

5 Met Arg Val Arg Gly Ile Gln Arg Asn Cys Gln His Leu Trp Arg Trp
Gly Thr Leu Ile Leu Gly Met Leu Met Ile Cys Ser Ala Ala Glu Asn
10 Leu Trp Val Gly Asn Met Trp Val Thr Val Tyr Tyr Gly Val Pro Val
15 Trp Thr Asp Ala Lys Thr Thr Leu Phe Cys Ala Ser Asp Thr Lys Ala
Tyr Asp Arg Glu Val His Asn Val Trp Ala Thr His Ala Cys Val Pro
20 Thr Asp Pro Asn Pro Gln Glu Ile Val Leu Glu Asn Val Thr Glu Asn
25 Phe Asn Met Trp Lys Asn Asp Met Val Asp Gln Met His Glu Asp Ile
30 Ile Ser Leu Trp Asp Gln Ser Leu Lys Pro Cys Val Lys Leu Thr Pro

35

40

45

50

55

60

65

5 Leu Cys Val Thr Leu His Cys Thr Asn Ala Thr Phe Lys Asn Asn Val
 Thr Asn Asp Met Asn Lys Glu Ile Arg Asn Cys Ser Phe Asn Thr Thr
 10 Thr Glu Ile Arg Asp Lys Lys Gln Gln Gly Tyr Ala Leu Phe Tyr Arg
 Pro Asp Ile Val Leu Leu Lys Glu Asn Arg Asn Asn Ser Asn Asn Ser
 15 Glu Tyr Ile Leu Ile Asn Cys Asn Ala Ser Thr Ile Thr Gln Ala Cys
 Pro Lys Val Asn Phe Asp Pro Ile Pro Ile His Tyr Cys Ala Pro Ala
 20 Gly Tyr Ala Ile Leu Lys Cys Asn Asn Lys Thr Phe Ser Gly Lys Gly
 25 Pro Cys Asn Asn Val Ser Thr Val Gln Cys Thr His Gly Ile Lys Pro
 Val Val Ser Thr Gln Leu Leu Leu Asn Gly Ser Leu Ala Glu Lys Glu
 30 Ile Ile Ile Arg Ser Glu Asn Leu Thr Asp Asn Val Lys Thr Ile Ile
 Val His Leu Asn Lys Ser Val Glu Ile Val Cys Thr Arg Pro Asn Asn
 35 Asn Thr Arg Lys Ser Met Arg Ile Gly Pro Gly Gln Thr Phe Tyr Ala
 40 Thr Gly Asp Ile Ile Gly Asp Ile Arg Gln Ala Tyr Cys Asn Ile Ser
 Gly Ser Lys Trp Asn Glu Thr Leu Lys Arg Val Lys Glu Lys Leu Gln
 45 Glu Asn Tyr Asn Asn Asn Lys Thr Ile Lys Phe Ala Pro Ser Ser Gly
 50 Gly Asp Leu Glu Ile Thr Thr His Ser Phe Asn Cys Arg Gly Glu Phe
 Phe Tyr Cys Asn Thr Thr Arg Leu Phe Asn Asn Asn Ala Thr Glu Asp
 55 Glu Thr Ile Thr Leu Pro Cys Arg Ile Lys Gln Ile Ile Asn Met Trp
 60 Gln Gly Val Gly Arg Ala Met Tyr Ala Pro Pro Ile Ala Gly Asn Ile
 65

ES 2 659 875 T3

Thr Cys Lys Ser Asn Ile Thr Gly Leu Leu Leu Val Arg Asp Gly Gly
5
Glu Asp Asn Lys Thr Glu Glu Ile Phe Arg Pro Gly Gly Gly Asn Met
Lys Asp Asn Trp Arg Ser Glu Leu Tyr Lys Tyr Lys Val Ile Glu Leu
10
Lys Pro Leu Gly Ile Ala Pro Thr Gly Ala Lys Arg Arg Val Val Glu
Arg Glu Lys Arg Ala Val Gly Ile Gly Ala Val Phe Leu Gly Phe Leu
15
Gly Ala Ala Gly Ser Thr Met Gly Ala Ala Ser Leu Thr Leu Thr Val
Gln Ala Arg Gln Leu Leu Ser Ser Ile Val Gln Gln Gln Ser Asn Leu
20
Leu Arg Ala Ile Glu Ala Gln Gln His Met Leu Gln Leu Thr Val Trp
25
Gly Ile Lys Gln Leu Gln Thr Arg Val Leu Ala Ile Glu Arg Tyr Leu
Lys Asp Gln Gln Leu Leu Gly Ile Trp Gly Cys Ser Gly Lys Leu Ile
30
Cys Thr Thr Asn Val Pro Trp Asn Ser Ser Trp Ser Asn Lys Ser Gln
Thr Asp Ile Trp Asn Asn Met Thr Trp Met Glu Trp Asp Arg Glu Ile
35
Ser Asn Tyr Thr Asp Thr Ile Tyr Arg Leu Leu Glu Asp Ser Gln Thr
Gln Gln Glu Lys Asn Glu Lys Asp Leu Leu Ala Leu Asp Ser Trp Lys
40
Asn Leu Trp Ser Trp Phe Asp Ile Ser Asn Trp Leu Trp Tyr Ile Lys
45
Ser Arg Ile Glu Gly Arg Gly Ser Gly Gly Tyr Ile Pro Glu Ala Pro
Arg Asp Gly Gln Ala Tyr Val Arg Lys Asp Gly Glu Trp Val Leu Leu
50
Ser Thr Phe Leu Gly His His His His His His (SEQ ID NO: 2).

- 55 7. Una vacuna que incluye un trímero de gp140 de HIV estabilizado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde la vacuna induce la producción de sueros neutralizantes contra HIV después de la inyección en un sujeto.
- 60 8. El trímero de gp140 de HIV aislado, antigénico y estabilizado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el trímero de gp140 de HIV estabilizado antigénico induce la producción de antisuero neutralizante contra HIV después de la inyección en un sujeto.

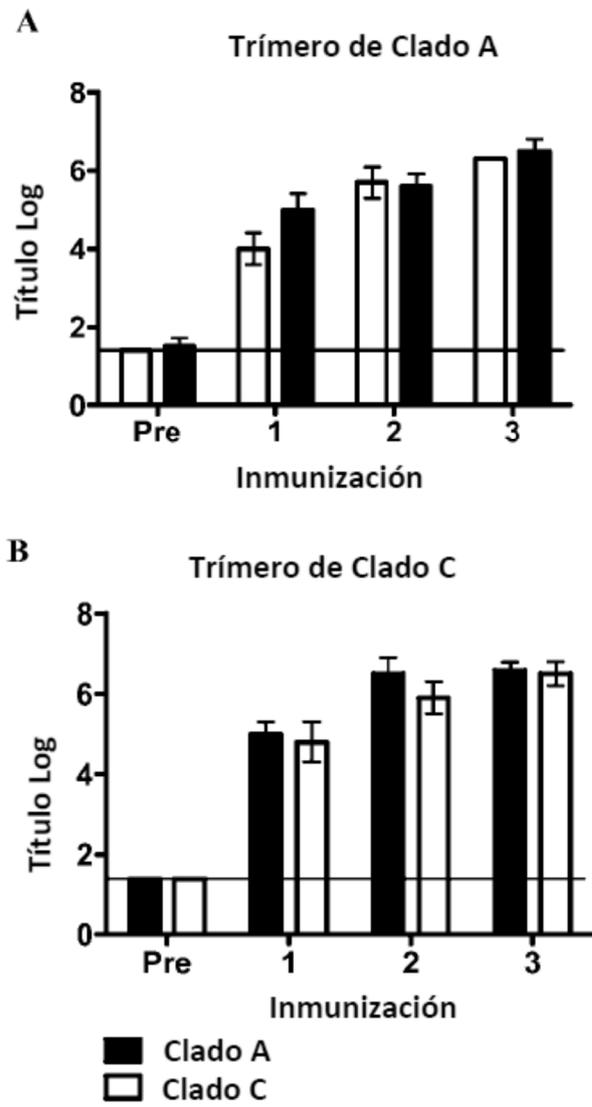


Figura 1

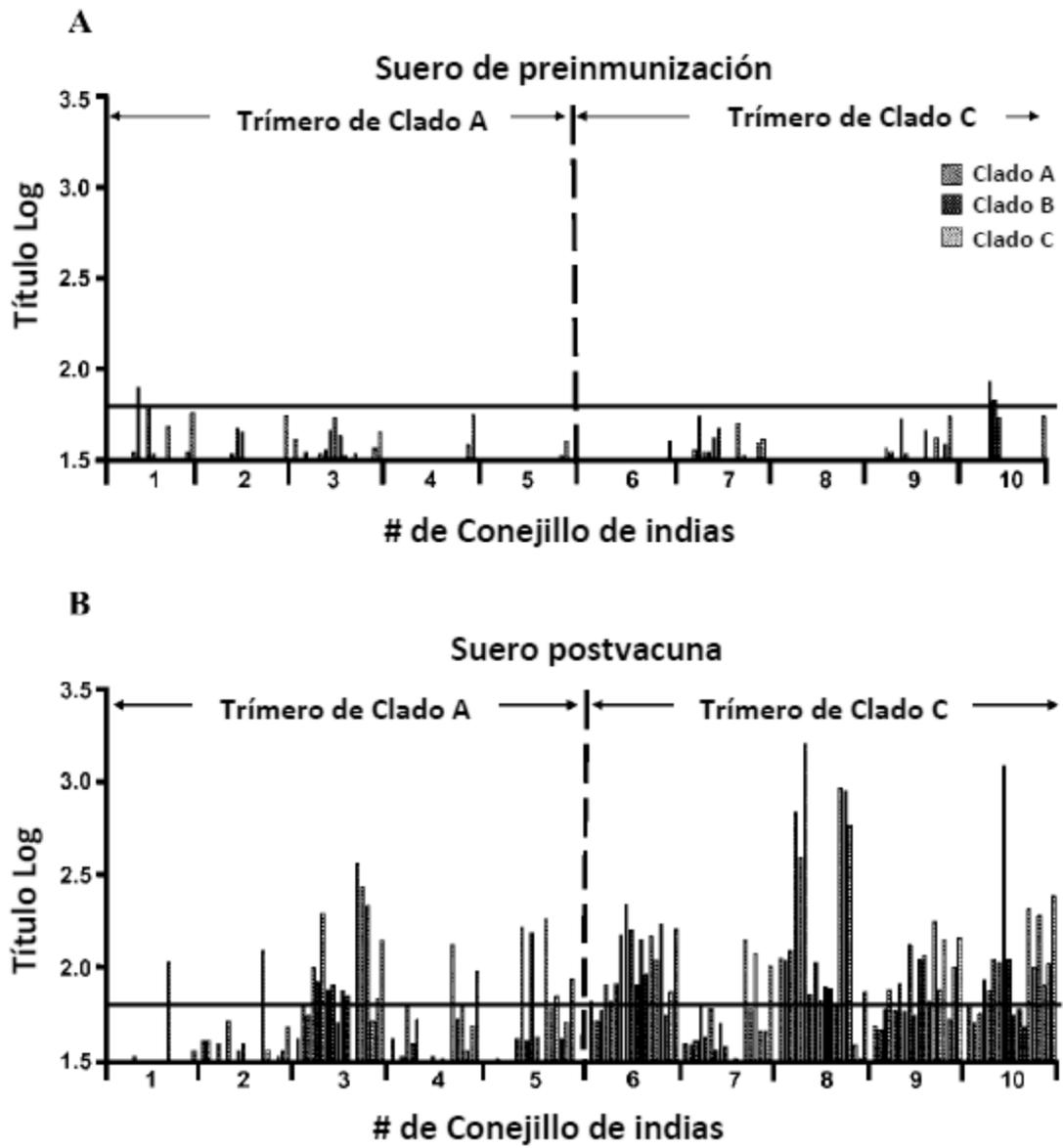
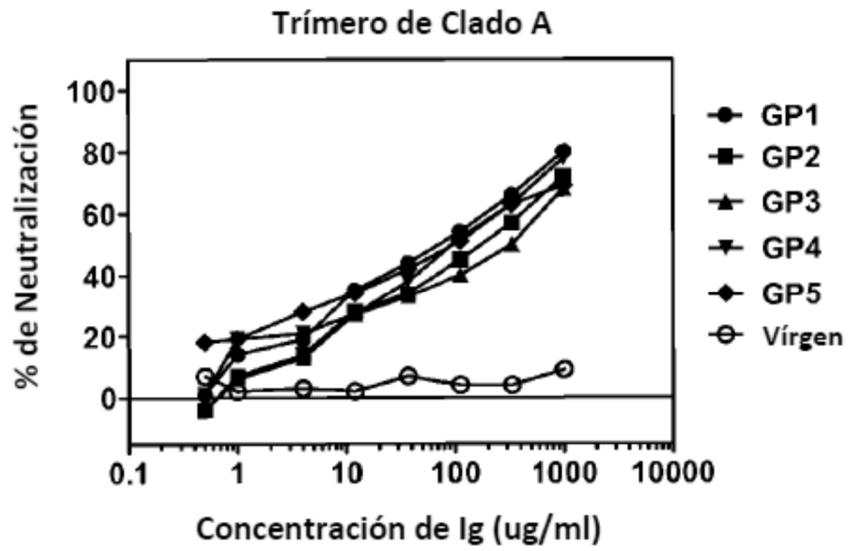


Figura 2

A



B

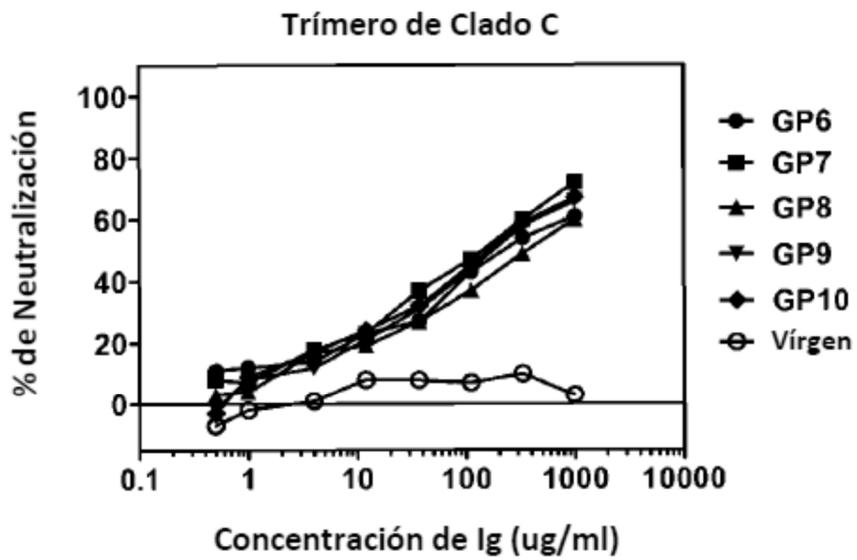
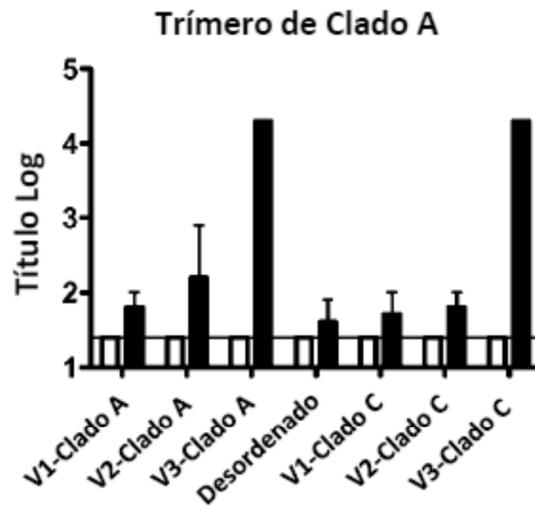


Figura 3

A



B

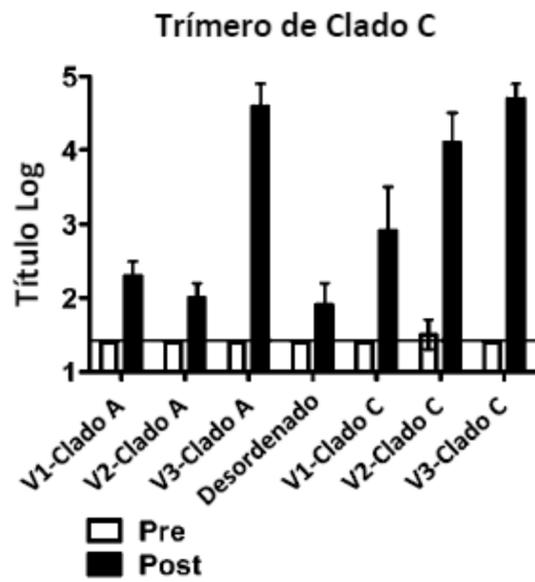
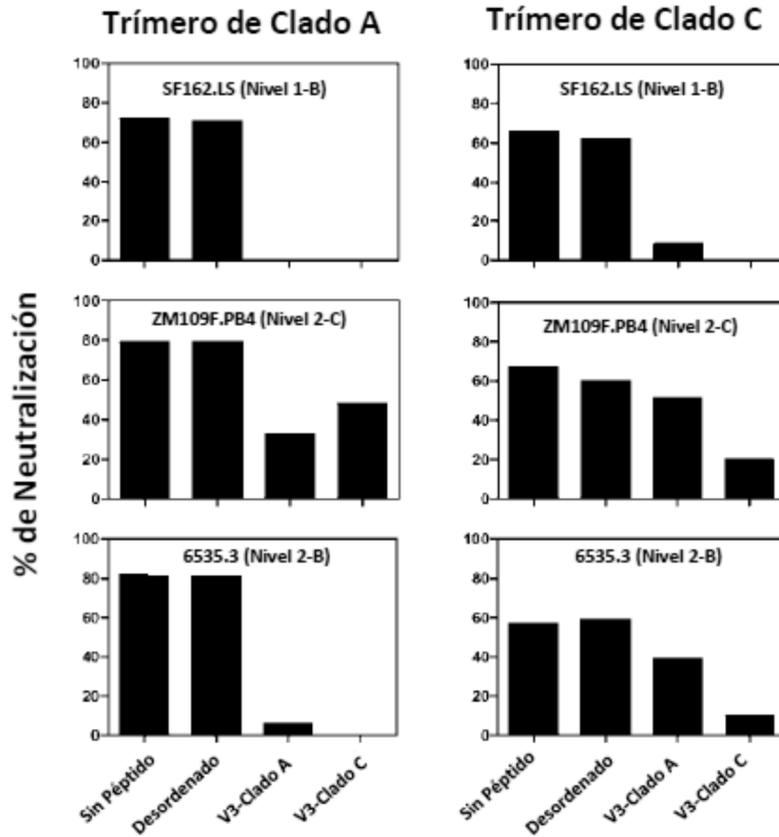


Figura 4

C



D

```

92UG037.8 V1      SYNITNNITNSITNSSVNMREEIK (Sec. con núm. de ident.:3)
CZA97.012 V1      TNATFKNVENDMNKEIR (Sec. con núm. de ident.:4)
92UG037.8 V2      SFNMTTELDRDKNRKVYSLFYKLDVVQIN-NGNNSNL-YRLIN
                  (Sec. con núm. de ident.:5)
CZA97.012 V2      SFNTTTEIRDKKQQGYALFYRPDIVLLKENRNSNNSSEYILIN
                  (Sec. con núm. de ident.:6)
92UG037.8 V3      TRPNNNTRKSVRIGPGQTFYATGDIIGDIRQAH (Sec. con núm. de ident.:7)
CZA97.012 V3      TRPNNNTRKSMRIGPGQTFYATGDIIGDIRQAY (Sec. con núm. de ident.:8)
    
```

Figura 4 (Cont.)

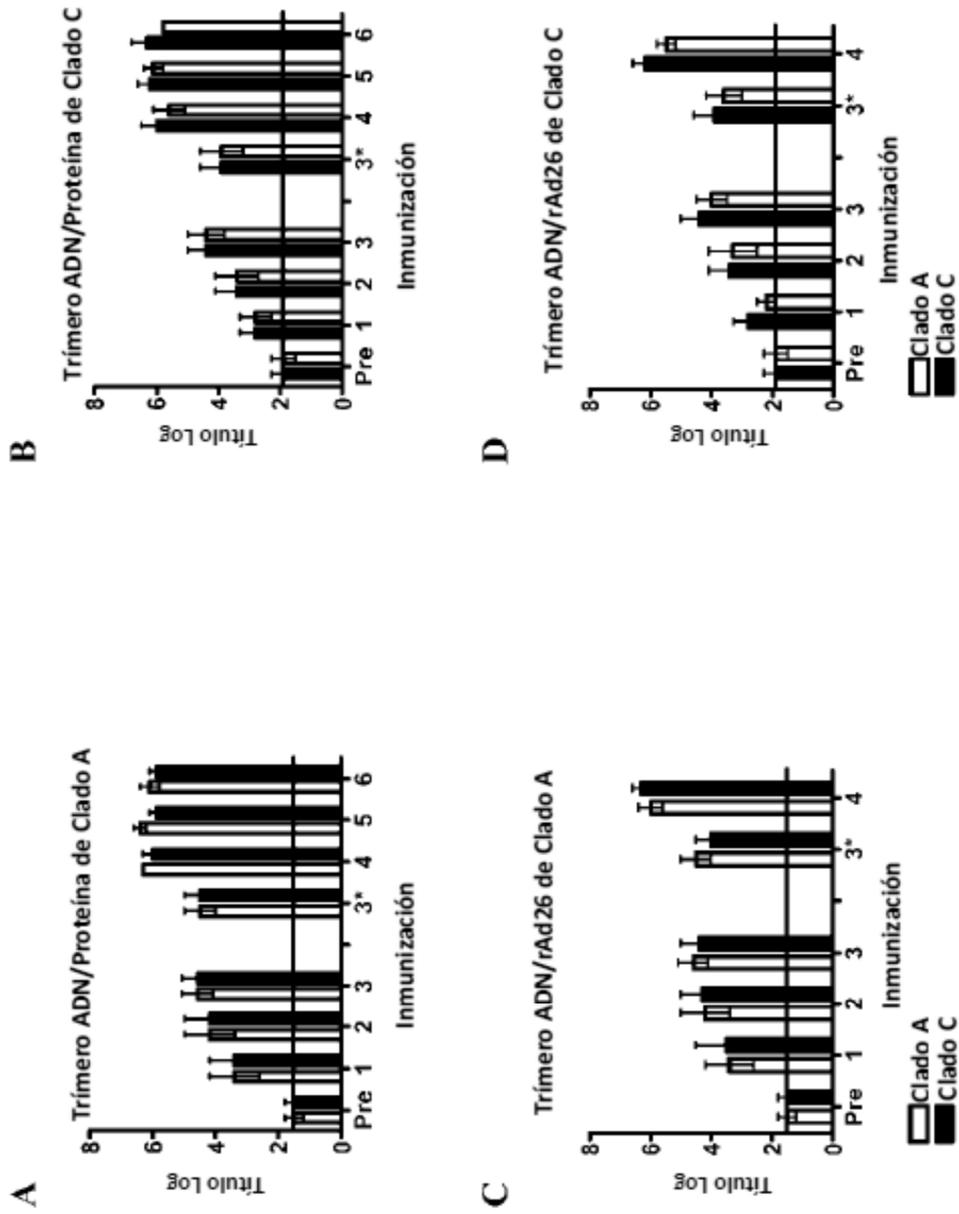


Figura 5

			Títulos de NAb en suero de Nivel 1 (ID50)						Control
Trímero	# de Animal	Intervalo de tiempo	Nivel 1C MW965.26	Nivel 1A DJ263.8	Nivel 1B SF162.LS	Nivel 1B BaL.26	Vacuna 92UG037.8	Vacuna CZA97.012	MuLV
gp140 de clado A	1	Pre	85	58	<20	64	32	24	23
		Post	18.618	2.109	895	32	24	39	<20
	2	Pre	83	58	51	84	33	<20	<20
		Post	20.310	1.622	242	52	35	33	32
	3	Pre	54	48	<20	41	24	72	<20
		Post	17.902	2.143	782	84	55	77	30
	4	Pre	62	46	23	26	32	46	<20
		Post	22.876	1.474	820	48	42	102	29
	5	Pre	36	46	<20	32	23	72	<20
		Post	22.461	4.121	4.450	99	40	30	25
gp140 de clado C	6	Pre	36	35	<20	37	26	54	<20
		Post	33.847	1.813	610	67	54	52	84
	7	Pre	63	35	20	39	42	68	34
		Post	20.654	2.211	544	89	46	33	31
	8	Pre	31	<20	<20	22	<20	<20	24
		Post	16.280	703	678	48	60	40	36
	9	Pre	96	43	43	74	28	<20	24
		Post	14.274	883	1.195	53	64	42	57
	10	Pre	22	<20	<20	<20	33	30	25
		Post	23.726	1.291	1.089	207	90	42	42
			Títulos de NAb en suero de Clado A Nivel 2 (ID50)						Control
Trímero	# de Animal	Intervalo de tiempo	Nivel 2A Q769.d22	Nivel 2A Q168.a2	Nivel 2A Q842.d12	Nivel 2A 3718.v3	Nivel 2A 0330.v4	Nivel 2A 0439.v5	MuLV
gp140 de clado A	1	Pre	20	23	23	30	26	35	23
		Post	<20	<20	<20	23	31	33	<20
	2	Pre	<20	22	21	<20	21	28	<20
		Post	40	40	<20	39	23	51	32
	3	Pre	41	27	35	24	21	34	<20
		Post	41	61	55	99	83	193	30
	4	Pre	23	23	27	<20	<20	20	<20
		Post	41	22	33	64	39	52	29
	5	Pre	<20	27	32	23	31	<20	<20
		Post	42	38	39	58	35	59	25
gp140 de clado C	6	Pre	27	29	23	<20	<20	<20	<20
		Post	65	51	58	80	65	81	84
	7	Pre	29	27	29	36	55	35	34
		Post	39	38	40	83	42	60	31
	8	Pre	<20	<20	<20	<20	<20	<20	24
		Post	111	108	121	686	389	1.602	36
	9	Pre	<20	<20	25	28	37	35	24
		Post	48	46	59	75	58	81	57
	10	Pre	<20	<20	<20	<20	21	<20	25
		Post	62	50	56	85	74	110	42

Figura 6

			Títulos de NAb en suero de Clado B Nivel 2 (ID50)						Control
Trímero	# de Animal	Intervalo de tiempo	Nivel 2B WIT04160.33	Nivel 2B AC10.0.29	Nivel 2B REJO451	Nivel 2B 6535.3	Nivel 2B SC422661	Nivel 2B TRO.11	MuLV
gp140 de clado A	1	Pre	79	31	62	34	25	27	23
		Post	<20	<20	<20	<20	<20	<20	<20
	2	Pre	34	47	45	23	26	22	<20
		Post	<20	35	39	22	<20	<20	32
	3	Pre	36	46	54	43	33	28	<20
		Post	75	79	50	74	69	26	30
	4	Pre	<20	<20	<20	<20	<20	<20	<20
		Post	26	<20	33	<20	32	21	29
	5	Pre	<20	21	24	<20	23	<20	<20
		Post	41	161	40	152	42	30	25
gp140 de clado C	6	Pre	<20	<20	<20	<20	<20	<20	<20
		Post	147	218	166	80	140	91	84
	7	Pre	35	42	47	25	27	25	34
		Post	36	49	37	28	32	20	31
	8	Pre	<20	24	<20	<20	<20	<20	24
		Post	71	105	66	78	76	63	36
	9	Pre	32	53	34	30	29	29	24
		Post	57	131	55	109	115	65	57
	10	Pre	85	67	54	<20	24	<20	25
		Post	105	1,219	110	55	59	47	42
			Títulos de NAb en suero de Clado C Nivel 2 (ID50)						Control
Trímero	# de Animal	Intervalo de tiempo	Nivel 2C ZM109F.PB4	Nivel 2C ZM249M	Nivel 2C CAP45.2	Nivel 2C Du123.6	Nivel 2C Du422.1	Nivel 2C ZM197M	MuLV
gp140 de clado C	1	Pre	48	24	<20	<20	35	57	23
		Post	106	30	<20	<20	22	35	<20
	2	Pre	26	21	<20	<20	28	55	<20
		Post	121	36	31	33	35	47	32
	3	Pre	34	<20	<20	<20	37	45	<20
		Post	360	266	213	51	67	138	30
	4	Pre	<20	<20	<20	24	38	56	<20
		Post	131	52	61	35	48	95	29
	5	Pre	<20	<20	<20	<20	33	40	<20
		Post	182	59	69	41	50	86	25
gp140 de clado C	6	Pre	<20	<20	<20	24	24	40	<20
		Post	146	108	170	55	73	159	84
	7	Pre	50	33	28	<20	39	41	34
		Post	140	59	118	45	45	101	31
	8	Pre	<20	<20	<20	<20	<20	<20	24
		Post	933	884	584	38	32	73	36
	9	Pre	46	24	42	<20	38	55	24
		Post	173	75	140	52	100	142	57
	10	Pre	<20	<20	<20	<20	<20	55	25
		Post	203	100	188	79	103	239	42

Figura 6 (Continuación)

Inmunógeno Trímico	Panel de virus de Nivel 2	% de Positivo
gp 140 de clado A	Clado A	(4/30) 13%
	Clado B	(2/30) 7%
	Clado C	(8/30) 27%
gp 140 de clado C	Clado A	(8/30) 27%
	Clado B	(6/30) 20%
	Clado C	(14/30) 47%

Figura 7

Trímero	# de Animal	Nivel 1C MW965.26	Nivel 1A DJ263.8	Nivel 1B SF162.LS	Nivel 2C ZM197M/PB7	Nivel 2C ZM109F/PB4	Nivel 2C CAP45.Z.00.G3	Nivel 2A 0439.V5.61	Nivel 2A 3718.V3.C11	Nivel 2B AC10.0.Z9	Nivel 2B E535.3
gp140 de clado A	1	0.2	2.0	16.6	>500	96	>500	>500	>500	>500	159
	2	0.1	2.5	26.5	>500	89	>500	>500	>500	>500	178
	3	0.1	2.7	31.4	>250	132	>1,000	>1,000	>250	>500	143
	4	0.3	7.1	21.6	>1,000	178	>1,000	>1,000	>1,000	>1,000	>1,000
	5	0.1	2.3	6.8	>1,000	97	>1,000	>1,000	>1,000	>500	100
gp140 de clado C	6	0.2	7.4	49.6	>500	132	>1,000	>1,000	>1,000	>500	>250
	7	0.1	2.4	18.9	>500	92	>500	>500	>500	>500	>500
	8	0.3	6.8	29.6	134	104	>1,000	238	>250	>250	>250
	9	0.4	13.4	39.1	>1,000	147	>1,000	>1,000	>1,000	>1,000	883
Control virgen	>1,000	>1,000	>1,000	>500	>1,000	>1,000	>1,000	>1,000	>500	>1,000	>1,000

Figura 8

Trimestro	# de Animal	Intervalo de tiempo	Títulos de NAh en suero de Nivel 1 (ID50)					Vacuna 92UG037.8	Vacuna CZA97.012	Control MuLV
			Nivel IC MW965.26	Nivel IA DJ263.8	Nivel IB SF162.LS	Nivel IB BAL.20				
gp140 de clado C	11	Pre	49	38	<20	27	29	<20	34	
		Post ADN	31	36	<20	66	48	36	43	
		Post rAd26	219	119	<20	<20	<20	<20	30	
	12	Pre	27	25	<20	29	29	<20	34	
		Post ADN	<20	<20	<20	21	<20	<20	27	
		Post rAd26	125	75	25	21	31	23	25	
	13	Pre	32	48	<20	<20	21	<20	32	
		Post ADN	30	53	<20	64	49	<20	36	
		Post rAd26	67	204	<20	<20	27	<20	38	
	14	Pre	48	37	<20	32	34	<20	43	
		Post ADN	42	40	21	107	93	69	71	
		Post rAd26	468	322	201	55	76	47	52	
	15	Pre	79	38	<20	44	46	<20	30	
		Post ADN	99	120	29	105	154	81	29	
		Post rAd26	434	75	<20	<20	22	<20	34	
gp140 de clado A	21	Pre	31	51	<20	<20	34	26	63	
		Post ADN	54	107	22	83	99	88	136	
		Post rAd26	100	381	37	<20	27	<20	31	
	22	Pre	25	31	<20	<20	23	22	32	
		Post ADN	800	186	36	60	76	61	94	
		Post rAd26	10,275	1,118	120	36	36	<20	73	
	23	Pre	35	40	<20	<20	42	24	44	
		Post ADN	209	78	47	69	83	70	94	
		Post rAd26	5,231	695	56	<20	22	<20	31	
	24	Pre	46	87	<20	51	66	58	73	
		Post ADN	1,607	75	24	45	71	35	73	
		Post rAd26	43,822	1,053	70	59	54	61	52	
	25	Pre	39	50	<20	<20	55	33	23	
		Post ADN	3,713	251	25	59	83	58	67	
		Post rAd26	11,078	693	<20	<20	27	<20	64	

Figura 9

Trímerno	# de Animal	Intervalo de tiempo	Títulos de NAb en suero de Nivel 1 (ID50)						Control MuLV
			Nivel IC MW965.26	Nivel 1A UJ263.8	Nivel 1B SP162.15	Nivel 1B BaL.26	Vacuna 92UGU3/.8	Vacuna UZAY/.012	
gp140 de clado C	16	Pre	<20	37	<20	<20	22	<20	40
		Post ADN	459	85	<20	31	43	21	37
		Post proteína	1,477	45	<20	<20	<20	<20	<20
	17	Pre	24	32	26	<20	24	<20	47
		Post ADN	44	32	<20	26	38	<20	40
		Post proteína	343	82	<20	<20	<20	<20	<20
	18	Pre	31	74	21	45	57	47	61
		Post ADN	92	34	<20	40	70	21	48
		Post proteína	1,965	109	66	<20	<20	<20	<20
	19	Pre	47	65	31	26	38	22	46
		Post ADN	45	52	<20	<20	34	20	40
		Post proteína	1,702	168	<20	<20	20	<20	<20
	20	Pre	47	107	<20	35	58	43	48
		Post ADN	75	58	<20	40	63	28	27
		Post proteína	1,334	109	<20	<20	35	28	23
gp140 de clado A	26	Pre	53	48	25	26	50	33	43
		Post ADN	209	68	<20	<20	25	25	42
		Post proteína	3,571	161	27	21	<20	<20	<20
	27	Pre	36	39	<20	<20	47	25	36
		Post ADN	250	103	<20	33	59	42	66
		Post proteína	7,431	569	120	<20	<20	<20	<20
	28	Pre	53	64	<20	33	64	43	55
		Post ADN	52	49	51	65	83	72	92
		Post proteína	588	156	49	42	47	31	53
	29	Pre	78	81	37	38	66	44	47
		Post ADN	219	127	22	47	58	55	70
		Post proteína	3,501	123	<20	<20	<20	<20	<20
	30	Pre	69	52	<20	<20	<20	<20	22
		Post ADN	202	153	<20	53	112	62	74
		Post proteína	15,157	531	125	28	20	<20	<20

Figura 9 (Continuación)

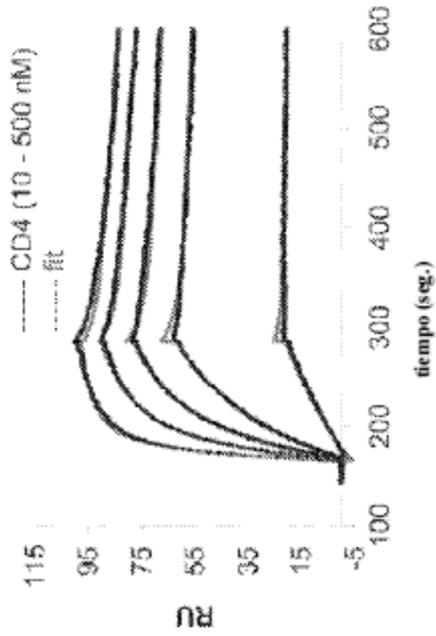
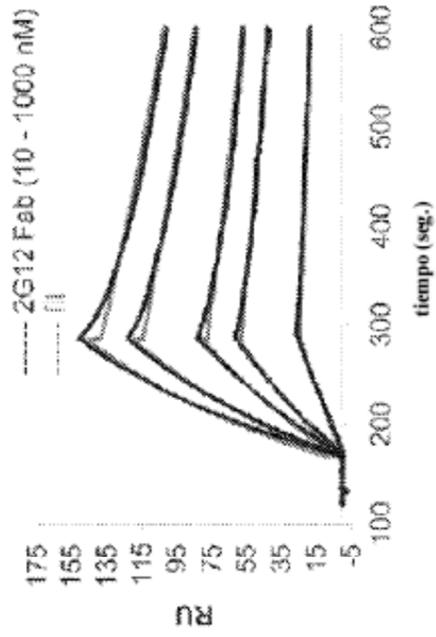


Figura 10

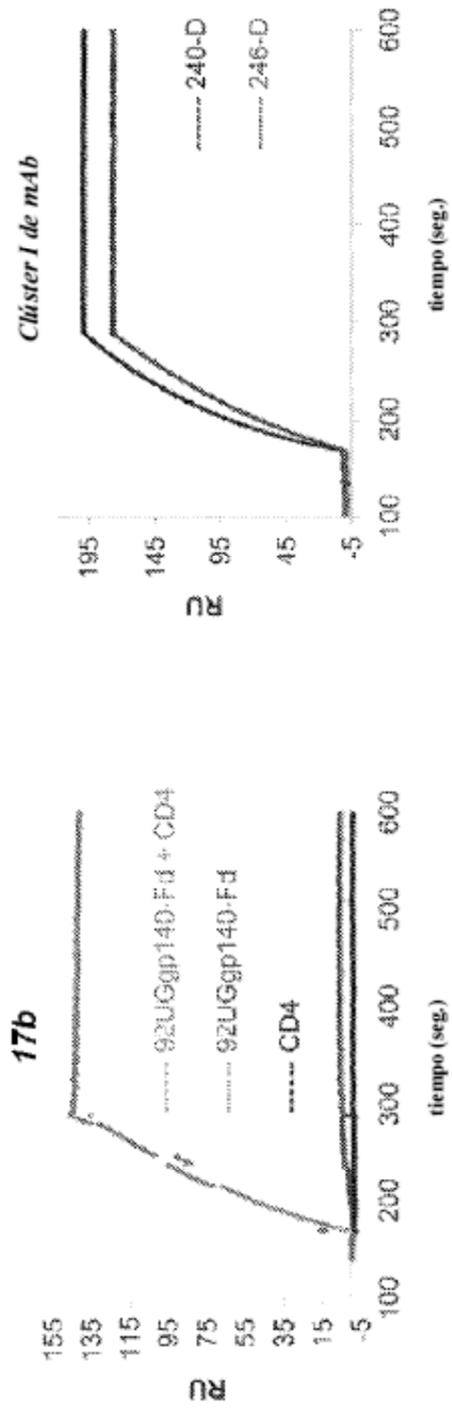


Figura 11

A

M R V R G I Q R R N C Q H L W W R W G T L I L G
 M L M A I C T A L F A C N A T S D D A V A K P A Y Y E I T D Y E M I D E I P V L V G
 K D W A A E Q T S B S A S L Q R I N C W N D M N S R I V S L A G I E W I K
 V E D I C L T F V S V R C W N D M N S R I V S L A G I E W I K
 T B I S D S A S L Q R I N C W N D M N S R I V S L A G I E W I K
 W N C L T F V S V R C W N D M N S R I V S L A G I E W I K
 N I S B S A S L Q R I N C W N D M N S R I V S L A G I E W I K
 K L T F V S V R C W N D M N S R I V S L A G I E W I K
 A T F V S V R C W N D M N S R I V S L A G I E W I K
 N G I V S V R C W N D M N S R I V S L A G I E W I K
 G V S V R C W N D M N S R I V S L A G I E W I K
 I V S V R C W N D M N S R I V S L A G I E W I K
 H Y F N N S R I V S L A G I E W I K
 Y F N N S R I V S L A G I E W I K
 F N N S R I V S L A G I E W I K
 N N S R I V S L A G I E W I K
 S R I V S L A G I E W I K
 R I V S L A G I E W I K
 V V I R R K W L A G I E W I K
 S L R R K W L A G I E W I K
 A G I E W I K
 G I E W I K
 E D G E W V L L S T F L G H H H H H A

Figura 12

B

M R V R G C I Q R N C Q L H L W R N W G R W G T V L I L G Y
 M L V P I W C W S T A D A A K N T L W L C V C P A T N K P Q V A Y E H D I E T
 G R V D E L V H N N W N V T V W E D A A A T H E N L C T A M C W P N A T D D M S D P V T
 R L V E L I I S T V T W Q A D W E D R A A A N Q N E K T F S C N T H N L Q L T A M K H W L C W P
 V M P V E I I S T V T W Q A D W E D R A A A N Q N E K T F S C N T H N L Q L T A M K H W L C W P
 R I V H N S R C W N N V L I S T V T W Q A D W E D R A A A N Q N E K T F S C N T H N L Q L T A M K
 G C W N N V L I S T V T W Q A D W E D R A A A N Q N E K T F S C N T H N L Q L T A M K H W L C W P
 I S T V T W Q A D W E D R A A A N Q N E K T F S C N T H N L Q L T A M K H W L C W P
 Q A D W E D R A A A N Q N E K T F S C N T H N L Q L T A M K H W L C W P
 R A A A N Q N E K T F S C N T H N L Q L T A M K H W L C W P
 N E K T F S C N T H N L Q L T A M K H W L C W P
 C N T H N L Q L T A M K H W L C W P
 Q L T A M K H W L C W P
 H W L C W P
 L V F V K C
 W G C P N V
 R N A T D D K
 W M S D M L
 G W D P V T
 T V T N D P
 L T K P Q L
 I V A Q M C
 L Y Y E H V
 G Y D I E T
 N R N Y C L T E Q Q T N G G G A V A I T S S G L
 R Y I H P L K R R L I N Q T G L G T E A C M D W G L
 I F L I G L V T I K E N W I G P I L I L I N E L S V
 E L I P K Q N N D E L F M N P K G T A V L N L N G W
 K A Y I G T D N G K D L N S R L V L R R K W L K R E
 N Y E P S S T N I V G R I K F E A S L T G I R W G G
 M G S D F V L P I R G T I C I I R A L Q S D Y S E D
 D Q N F T V N R D K S T Q T E V K A N L C T I D I K
 N Q N N K P E T G L S N K I E K E G S Q G Q T L R R
 T K S V N K S C T T P C I N T Y R M Q K W S D A S V
 V K N K N I R V A E A Y R G K K E T Q I I K T L K Y
 N D N P C G I I Y N F F C A N Y V S Q G G N Y L I A
 N R R C K H I E F W K F P I D L V G V W L S N D Y Q
 K I N A L T I V T K I E L P E R R A I V L W S K W G
 F E E Q I C E S Q S T G T P G S R A S T Q S I E L D
 P E E Q I C E S Q S T G T P G S R A S T Q S I E L D
 T T K T A Q K K G K R I A G R K G S L Q S E N W R H
 A T L I Y V E N P S N C T Y D W A L L Q D N R K N P H
 N T L T G T A L G I N N E M R N G F L L K W D E S A G
 T N V S A S L H I N N F D A V D T G Q M L P W Q I E L
 C F I A P V S V R C Y S E R L K P L R H Y V E Q D P F
 H S D N A N G I M Y N H T G L M A F A Q R N M T F I T
 L C P C C N N I S A E T A V L N I V Q Q E T W Q W Y S

Figura 12 (Continuación)

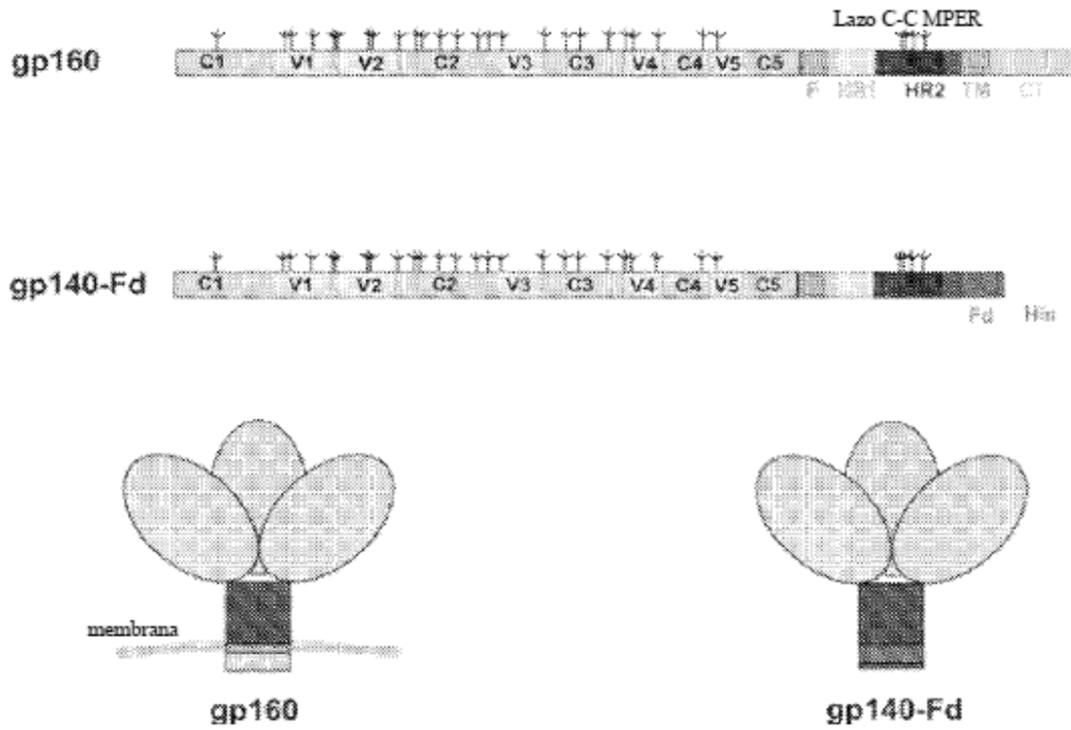


Figura 13