

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 678 145**

51 Int. Cl.:

C07K 16/10 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.08.2011 PCT/US2011/048910**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.03.2012 WO12027440**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.08.2011 E 11749323 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.04.2018 EP 2609114**

54 Título: **Anticuerpos específicos contra la proteína del núcleo del VIH y usos de los mismos**

30 Prioridad:

24.08.2010 US 376590 P

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

09.08.2018

73 Titular/es:

**ABBOTT LABORATORIES (100.0%)
100 Abbott Park Road
Abbott Park, IL 60064-3500, US**

72 Inventor/es:

**BELK, JONATHAN;
BROPHY, SUSAN;
HUANG, DAGANG;
TIEMAN, BRYAN;
SCHEFFEL, JAMES;
TYNER, JOAN y
ZIEMANN, ROBERT**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 678 145 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

Anticuerpos específicos contra la proteína del núcleo del VIH y usos de los mismos**5 Referencia cruzada a solicitudes relacionadas**

Esta solicitud reivindica prioridad sobre la Solicitud de Patente de los Estados Unidos Núm. 61/376.590 presentada el 24 de agosto de 2010.

10 Campo de la invención

La presente invención se refiere a anticuerpos que se unen específicamente al antígeno o a los antígenos del núcleo del Virus de la Inmunodeficiencia Humana 1 (VIH-1) y al Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH-2) con una alta afinidad de unión, a métodos para producir y seleccionar dichos anticuerpos, a inmunoensayos para la detección del Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH) que emplean estos anticuerpos y a composiciones terapéuticas que contienen estos anticuerpos.

Antecedentes

20 El Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) es un lentivirus (un miembro de la familia de los retrovirus) (Gonda et al. (1985) *Science*, 227: 173-177; Stephan et al. (1986) *Science*, 231: 589-594). La infección por VIH puede conducir al Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA). La transmisión del VIH generalmente se produce a través de relaciones sexuales sin protección, agujas contaminadas, leche materna y de una madre infectada a su bebé al nacer.

25 El VIH es un retrovirus que tiene dos copias de ARN de hebra sencilla positivo encerrado en una cápside cónica. P24 es la principal proteína estructural de la cápside con aproximadamente 2000 copias de p24 por cápside. (McGovern et al. (2002) *J. Med. Chem.*, 45 (8): 1712-1722). El genoma del virus contiene varios genes que incluyen los genes *gag*, *pol* (que codifica la polimerasa), *env* (que codifica la glicoproteína de la envoltura). El gen *gag* codifica un precursor del núcleo llamado Pr55^{Gag}, que se escinde para proporcionar p17 (proteína gag miristilada), p24 (proteína estructural principal), p7 (proteína de unión a ácido nucleico) y p9 (proteína rica en prolina).

30 El marcador más común para el diagnóstico del antígeno del VIH son las proteínas de la estructura viral. Como principal proteína estructural de la cápside, la prueba del antígeno p24 es ampliamente utilizada en la prueba del antígeno del VIH junto con la prueba de anticuerpos para ayudar a diagnosticar la infección temprana por VIH. Los niveles de antígeno p24 aumentan significativamente en 1 a 3 semanas después de la infección.

35 Las principales proteínas componentes de los virus del Grupo M de VIH-1, el Grupo O de VIH-1, y VIH-2 son antigénicamente similares debido a la alta homología de secuencia de aminoácidos. Las proteínas del núcleo del Grupo M de VIH-1, del Grupo O de VIH-1 y de VIH-2 están relacionadas, pero no son idénticas. La determinación de la variabilidad genética del VIH no se ha pronosticado, pero se ha basado en observaciones empíricas. Un epítipo compartido entre especies y subtipos de VIH puede existir o no. El anticuerpo monoclonal (mAb) de VIH 115B-151-423 se une específicamente al Grupo M de VIH-1 y al grupo O de VIH-1, y reacciona de forma cruzada con VIH-2.

40 Los ensayos de unión a ligando, tales como los inmunoensayos para medir el antígeno p24 están disponibles comercialmente. El Ensayo Combinado de VIH actual en aparatos ARCHITECT® y PRISM® (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL) utiliza anticuerpos monoclonales (mAb) 115B-151-423 de VIH como producto conjugado en un inmunoensayo de formato sándwich para la detección de antígeno p24. El mAb 115B-151-423 de VIH se une específicamente al Grupo M de VIH-1 y al Grupo O de VIH-1, y tiene reactividad cruzada con VIH-2.

45 La Patente de Estados Unidos Núm. 7.531.642 (en lo sucesivo denominada la patente "642") describe anticuerpos aislados de VIH que son monoespecíficamente reactivos con diversos epítopos en p24. Más concretamente, la patente '642 describe anticuerpos monoclonales aislados 115-151-423 de VIH. El anticuerpo monoclonal 115-151-423 de VIH es producido por la línea celular que tiene el Núm. de Depósito de la A.T.C.C. PTA-2809. La patente '642 también describe el uso de los anticuerpos en inmunoensayos con el fin de determinar la presencia de uno o más antígenos seleccionados del grupo que consiste en el antígeno de VIH-1 y el antígeno de VIH-2 en una muestra biológica.

50 Aunque el inmunoensayo de VIH más predominante actual tiene una alta sensibilidad con un límite de detección de aproximadamente 10 pg de antígeno p24 por 1 ml de muestra de paciente (Abbott VIH Ab/Ag Combo Assay), su sensibilidad es todavía 500 ~ 1000 veces menor que la de la prueba de ácidos nucleicos (NAT) (Johanson et al. (2001) *J. Virological Meth.*, 95: 81-92). El ensayo combinado de Ab/Ag de VIH de Abbott incubaba muestras de pacientes con microesferas durante 18 minutos. Algunas otras publicaciones informaron sobre una mayor sensibilidad de ~ 1 pg/ml (Ondoa et al. (2009) *Cytometry Parte B (Clinical Cytometry)* 76B: 231-236; Ishikawa et al.

(1998) J. Clin. Lab. Anal., 12(6): 343-350) con un tiempo de incubación mucho más largo, tal como 20 horas (Ishikawa et al. (1998) más arriba). Entre todos los medios que se están estudiando para aumentar la sensibilidad del inmunoensayo, el aumento de la afinidad de unión por el antígeno del anticuerpo del producto conjugado puede conducir directamente a la mejora de la sensibilidad mediante la unión de más antígenos dentro de un marco temporal específico. Un inmunoensayo con una sensibilidad mejorada puede competir con el NAT incluyendo las ventajas un tiempo de procesamiento de muestras más rápido y un coste menor.

La especificidad y la sensibilidad de los anticuerpos utilizados en los inmunoensayos, tales como los inmunoensayos de VIH, son muy importantes. Una forma de aumentar tanto la especificidad como la sensibilidad de uno o más anticuerpos es mejorar la afinidad de unión de un anticuerpo por su diana deseada (es decir, un antígeno). Los anticuerpos que tienen una afinidad de unión mejorada para sus dianas deseadas deberían exhibir una mayor especificidad y sensibilidad.

Compendio

Esta invención se refiere a la identificación de nuevos anticuerpos que se unen a los antígenos del núcleo del VIH. En ciertos aspectos, se proporciona un anticuerpo aislado que se une a una proteína del núcleo del VIH-1 y/o VIH-2, exhibiendo el anticuerpo una mayor afinidad de unión al antígeno que el mAb 115B-151-423 de VIH a la proteína del núcleo del VIH-1 (p24) y/o a la proteína del núcleo del VIH-2 (p26). En ciertas realizaciones, el anticuerpo se une inmuno-específicamente a p24 con una constante de disociación en equilibrio (K_D) de menos de 7 pM, menos de aproximadamente 5 pM, más preferiblemente menos de aproximadamente 1 pM. En diversos aspectos, el anticuerpo comprende un dominio variable de cadena ligera que comprende regiones determinantes de la complementariedad L1, L2 y L3, y un dominio variable de cadena pesada que comprende regiones determinantes de la complementariedad H1, H2 y H3 donde las secuencias de aminoácidos de una o más de las CDR L1, L2, o L3 del dominio variable de cadena ligera comprenden las secuencias de aminoácidos respectivamente de las CDR L1, L2 y/o L3 de un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en 115B-151-423 AM1 y 115B-151-423 AM2; y/o las secuencias de aminoácidos de una o más de las CDR H1, H2 o H3 del dominio variable de cadena pesada comprenden las secuencias de aminoácidos respectivamente de las CDR H1, H2 y H3 de un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en 115B-151-423 AM1 y 115B-151-423 AM2. En ciertos aspectos, la CDR L3 del anticuerpo comprende la secuencia de aminoácidos de la CDR L3 de un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en 115B-151-423 AM1 y 115B-151-423 AM2; y/o las CDR H2 y/o H3 del anticuerpo comprenden las secuencias de aminoácidos respectivamente de las CDR H2 y H3 de un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en 115B-151-423 AM1 y 115B-151-423 AM2. En ciertos aspectos, las CDR H2 y H3 del anticuerpo comprenden las secuencias de aminoácidos respectivamente de las CDR H2 y H3 de un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en 115B-151-423 AM1 y 115B-151-423 AM2. En ciertos aspectos, las CDR H1, H2 y H3 del anticuerpo comprenden las secuencias de aminoácidos respectivamente de las CDR H1, H2 y H3 de un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en 115B-151-423 AM1 y 115B-151-423 AM2; y/o las CDR L1, L2 y L3 del anticuerpo comprenden las secuencias de aminoácidos respectivamente de las CDR L1, L2 y L3 de un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en 115B-151-423 AM1 y 115B-151-423 AM2. En ciertos aspectos, las CDR H1, H2 y H3 del anticuerpo comprenden las secuencias de aminoácidos respectivamente de las CDR H1, H2 y H3 de un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en 115B-151-423 AM1 y 115B-151-423 AM2. En ciertos aspectos, las CDR L1, L2 y L3 del anticuerpo comprenden las secuencias de aminoácidos respectivamente de las CDR L1, L2 y L3 de un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en 115B-151-423 AM1 y 115B-151-423 AM2. En ciertos aspectos, las CDR H1, H2 y H3 del anticuerpo comprenden las secuencias de aminoácidos respectivamente de las CDR H1, H2 y H3 de 115B-151-423 AM1; y las CDR L1, L2 y L3 del anticuerpo comprenden las secuencias de aminoácidos respectivamente de las CDR L1, L2 y L3 de 115B-151-423 AM1. En ciertos aspectos, las CDR H1, H2 y H3 del anticuerpo comprenden las secuencias de aminoácidos respectivamente de las CDR H1, H2 y H3 de 115B-151-423 AM2; y las CDR L1, L2 y L3 del anticuerpo comprenden las secuencias de aminoácidos respectivamente de las CDR L1, L2 y L3 de 115B-151-423 AM2.

En diversas realizaciones, el anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo multiespecífico, un anticuerpo animal y un recombinante. En ciertas realizaciones, la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del anticuerpo comprende una secuencia de cadena pesada mostrada en las Figuras 1-4. En ciertas realizaciones, la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera del anticuerpo comprende una secuencia de cadena ligera mostrada en las Figuras 1-4. En ciertas realizaciones, la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del anticuerpo comprende una secuencia de cadena pesada mostrada en las Figuras 1-4; y la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera del anticuerpo comprende una secuencia de cadena ligera mostrada en las Figuras 1-4. En ciertas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal de ratón. En ciertas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo quimérico de ratón-humano. En ciertas realizaciones, el anticuerpo está anclado a un sustrato sólido.

En diversos aspectos, se proporcionan ácidos nucleicos en los que los ácidos nucleicos codifican uno o más de los anticuerpos descritos en la presente memoria. En diversos aspectos, el ácido nucleico está en un casete de expresión. Las células transfectadas con tales ácidos nucleicos se describen cuando las células expresan el

anticuerpo codificado por el ácido nucleico. En ciertas realizaciones, la célula es una célula seleccionada del grupo que consiste en una célula de mamífero, una célula de insecto y una célula fúngica. En ciertos aspectos, la célula es una célula de mamífero (p.ej., una célula CHO).

5 En diversas realizaciones, se proporcionan métodos para detectar la presencia de uno o más antígenos seleccionados del grupo que consiste en el antígeno del VIH-1 y el antígeno del VIH-2, en una muestra de prueba. Los métodos implican típicamente poner en contacto la muestra de prueba con al menos un anticuerpo descrito en la presente memoria que se une a la proteína p24 del virus de la inmunodeficiencia humana 1 y/o la proteína p26 del virus de inmunodeficiencia humana 2 durante un tiempo y en condiciones suficientes para la formación de un
10 complejo de anticuerpo/antígeno; y detectar el complejo de anticuerpo/antígeno, donde la presencia del complejo indica la presencia de al menos un antígeno de VIH-1 o VIH2 en la muestra de prueba. En ciertas realizaciones, el anticuerpo está marcado y la detección comprende detectar la marca. En ciertas realizaciones, el método implica adicionalmente poner en contacto un producto conjugado con el complejo de anticuerpo/antígeno durante un tiempo y en condiciones suficientes para permitir que el producto conjugado se una al antígeno unido que comprende el
15 complejo, donde el producto conjugado comprende un segundo anticuerpo anclado a un compuesto generador de señal capaz de generar una señal detectable; y detectar la presencia de antígeno presente en la muestra de prueba detectando una señal generada por el compuesto generador de señal, indicando la presencia o intensidad de la señal la presencia de al menos un antígeno seleccionado del grupo que consiste en antígeno de VIH-1 y antígeno de VIH-2 en la muestra de prueba.

20 En ciertas realizaciones, se proporcionan métodos para detectar la presencia de uno o más antígenos seleccionados del grupo que consiste en antígeno de VIH-1 y antígeno de VIH-2, en una muestra de prueba donde los métodos implican poner en contacto la muestra de prueba con al menos un primer anticuerpo que se une a la proteína p24 del virus de la inmunodeficiencia humana 1 y/o a la proteína p26 del virus de la inmunodeficiencia humana 2 durante
25 un tiempo y en condiciones suficientes para la formación de un complejo de anticuerpo/antígeno; y añadir un producto conjugado al complejo de anticuerpo/antígeno resultante durante un tiempo y en condiciones suficientes para permitir que el producto conjugado se una al antígeno unido, donde el producto conjugado comprende un anticuerpo como se describe en la presente memoria anclado (o anclable a) a un compuesto generador de señal capaz de generar una señal detectable; y detectar la presencia del antígeno que puede estar presente en la
30 muestra de prueba detectando una señal generada por el compuesto generador de señal, indicando la presencia o cantidad de la señal la presencia de al menos un antígeno seleccionado del grupo que consiste en antígeno VIH-1 y Antígeno VIH-2 en la muestra de prueba.

35 En ciertos aspectos, se proporcionan métodos para detectar la presencia de uno o más antígenos seleccionados del grupo que consiste en antígeno de VIH-1 y antígeno VIH-2, en una muestra de prueba donde los métodos implican poner en contacto: 1) un primer anticuerpo que se une al antígeno p24 de VIH-1 y/o al antígeno p26 de VIH-2 unidos a un soporte sólido, 2) la muestra de prueba, y 3) un reactivo indicador que comprende un segundo anticuerpo que se une al antígeno p24 de VIH-1 y/o al antígeno p26 de VIH-2 al cual está anclado un compuesto generador de señal, para formar una mezcla, donde el primer anticuerpo y/o el segundo anticuerpo son anticuerpos descritos en la
40 presente memoria; incubar la mezcla durante un tiempo y en condiciones suficientes para formar un complejo de anticuerpo/antígeno/anticuerpo; y detectar la presencia de una señal medible generada por el compuesto generador de señal, indicando la presencia o cantidad de la señal la presencia de uno o más antígenos en la muestra de prueba seleccionados del grupo que consiste en antígeno de VIH-1 y antígeno de VIH-2. En ciertos aspectos, el primer anticuerpo y/o el segundo anticuerpo son anticuerpos descritos en la presente memoria.

45 En diversas realizaciones, se proporcionan kits para detectar la presencia de uno o más antígenos seleccionados del grupo que consiste en el antígeno del VIH-1 y el antígeno del VIH-2, en una muestra de prueba. En ciertas realizaciones, los kits comprenden un primer anticuerpo que se une al antígeno p24 de VIH-1 y/o al antígeno p26 de VIH-2; y/o un reactivo indicador que comprende un segundo anticuerpo que se une al antígeno p24 de VIH-1 y/o al antígeno p26 de VIH-2 al cual está anclado un compuesto generador de señal; donde el primer anticuerpo y/o el segundo anticuerpo son anticuerpos descritos en la presente memoria.

Definiciones

55 Los términos "polipéptido", "péptido" y "proteína" se utilizan indistintamente en la presente memoria para referirse a un polímero de residuos de aminoácidos. Los términos se aplican a polímeros de aminoácidos en los que uno o más residuos de aminoácido son análogos químicos artificiales de un aminoácido natural correspondiente, así como a polímeros de aminoácidos de origen natural. El término también incluye variantes en el enlace peptídico tradicional que une los aminoácidos que forman el polipéptido. Los "péptidos", "polipéptidos" y "proteínas" preferidos son
60 cadenas de aminoácidos cuyos carbonos alfa están conectados a través de enlaces peptídicos. En ciertas realizaciones, los residuos de aminoácidos que comprenden el péptido son residuos de aminoácidos en forma "L", sin embargo, se reconoce que en diversas realizaciones, los aminoácidos "D" pueden incorporarse al péptido. Los péptidos también incluyen polímeros de aminoácidos en los que uno o más residuos de aminoácido son análogos químicos artificiales de un aminoácido natural correspondiente, así como a polímeros de aminoácidos de origen

natural. Además, el término se aplica a los aminoácidos unidos por un enlace peptídico o por otros "enlaces modificados" (p.ej., donde el enlace peptídico se reemplaza por un α -éster, un β -éster, una tioamida, fosfonamida, carbamato, hidroxilato y similares (véase, p.ej., Spatola et al. (1983) Chem. Biochem. Aminoacids and proteins 7: 267-357), donde la amida se reemplaza por una amina saturada (véanse, p.ej., Skiles et al., Patente de Estados Unidos Núm. 4.496.542, que se incorpora a la presente memoria como referencia, y Kaltenbronn et al., (1990) pág. 969-970 en el Proc. XI American Peptide Symposium, ESCOM Science Publishers, Países Bajos, y similares)).

Según se utiliza en la presente memoria, un "anticuerpo" se refiere a una proteína que consiste en uno o más polipéptidos sustancialmente codificados por genes de inmunoglobulina o fragmentos de genes de inmunoglobulina o proteínas derivadas de tales "precursores" (p.ej., mediante maduración de afinidad, barajado de cadenas, etc.). Los genes de inmunoglobulina reconocidos incluyen los genes de la región constante kappa, lambda, alfa, gamma, delta, épsilon y mu, así como una miríada de genes de la región variable de inmunoglobulina. Las cadenas ligeras se clasifican como kappa o lambda. Las cadenas pesadas se clasifican como gamma, mu, alfa, delta o épsilon, que a su vez definen las clases de inmunoglobulinas, IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, respectivamente.

Según se utilizan en la presente memoria, los términos "anticuerpo" y "anticuerpos" incluyen anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales, anticuerpos multiespecíficos, anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados (total o parcialmente humanizados), anticuerpos animales (p.ej., derivados de un mamífero, incluyendo un no primate (por ejemplo, una vaca, cerdo, camello, llama, caballo, cabra, conejo, oveja, hámster, cobaya, gato, perro, rata, ratón), un primate no-humano (por ejemplo, un mono, tal como un mono cinomolgo, un chimpancé, etc.), anticuerpos recombinantes, anticuerpos quiméricos, Fv de cadena sencilla (scFv), anticuerpos de cadena sencilla, anticuerpos de dominio único, fragmentos Fab, fragmentos F(ab')₂, Fv unido por disulfuro (sdFv), Fv químicamente conjugado (ccFv), y anticuerpos antiidiotípicos (anti-Id) (incluyendo, por ejemplo, anticuerpos anti-Id para anticuerpos de la presente invención) y fragmentos de unión a epítomos funcionalmente activos de cualquiera de los anteriores. En ciertas realizaciones, los anticuerpos también incluyen Aficuerpos, nanoanticuerpos y unicuerpos. En ciertas realizaciones concretas, los anticuerpos incluyen moléculas de inmunoglobulina y fragmentos inmunológicamente activos de moléculas de inmunoglobulina, a saber, moléculas que contienen un sitio de unión a antígeno. Las moléculas de inmunoglobulina pueden ser de cualquier tipo (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY), clase (por ejemplo, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ e IgA₂) o subclase.

Según se utiliza en la presente memoria, los términos "velocidad de asociación", " k_{on} " o " k_a " utilizados indistintamente en la presente memoria, se refiere al valor que indica la fuerza de unión (grado) de un anticuerpo a su antígeno diana o la velocidad de formación de complejo entre mAb y antígeno como se muestra a continuación:



Los métodos para determinar las constantes de asociación (k_a) son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, se puede utilizar resonancia de plasmón superficial, tal como un ensayo BIACORE® (GE Healthcare, NJ). Además, también se puede utilizar un ensayo KINEXA® (Kinetic Exclusion Assay), disponible en Sapidyne Instruments (Boise, Idaho).

Según se utiliza en la presente memoria, los términos "velocidad de disociación", " k_{off} " o " k_d " utilizados indistintamente en la presente memoria, se refieren al valor que indica la fuerza de disociación (grado) de un anticuerpo a partir de su antígeno diana o la separación del complejo Ab-Ag a lo largo del tiempo en mAb y antígeno libres como se muestra a continuación:



Los métodos para determinar las constantes de asociación (k_d) son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, se puede utilizar resonancia de plasmón superficial, tal como un ensayo BIACORE® (GE Healthcare, NJ). Además, también se puede utilizar un ensayo KINEXA® (Kinetic Exclusion Assay), disponible en Sapidyne Instruments (Boise, Idaho).

Según se utiliza en la presente memoria, los términos "constante de disociación en equilibrio" o " K_D " utilizados indistintamente en la presente memoria se refieren al valor obtenido al dividir la velocidad de disociación (k_{off}) por la velocidad de asociación (k_{on}). La velocidad de asociación, la velocidad de disociación y la constante de disociación en equilibrio se utilizan para representar la afinidad de unión de un anticuerpo a un antígeno.

Según se utiliza en la presente memoria, el término "epítopo" o "epítomos" se refiere a sitios o fragmentos de un polipéptido o proteína que tienen actividad antigénica o inmunogénica en un sujeto. Un epítopo que tiene actividad inmunogénica es un sitio o fragmento de un polipéptido o proteína que provoca una respuesta de anticuerpos en un animal. Un epítopo que tiene actividad antigénica es un sitio o fragmento de un polipéptido o proteína al que se une un inmunoespecíficamente anticuerpo según se determina por cualquier método bien conocido por los expertos en la técnica, por ejemplo mediante inmunoensayos.

Según se utiliza en la presente memoria, el término anticuerpo humanizado se refiere a una variante de inmunoglobulina o fragmento de la misma, que es capaz de unirse a un antígeno predeterminado y que comprende regiones marco que tienen sustancialmente la secuencia de aminoácidos de una inmunoglobulina humana y CDR que tienen sustancialmente la secuencia de aminoácidos de una inmunoglobulina no humana. Habitualmente, un anticuerpo humanizado tiene uno o más residuos de aminoácidos introducidos en él a partir de una fuente que no es humana. En general, el anticuerpo humanizado incluirá sustancialmente al menos uno, y típicamente dos, dominios variables (p.ej., Fab, Fab', F(ab')₂, Fv) en los que todas o sustancialmente todas las regiones CDR corresponden a las de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones FR son las de una secuencia consenso de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado comprende óptimamente al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente la de una inmunoglobulina humana. Generalmente, el anticuerpo contendrá tanto la cadena ligera como al menos el dominio variable de una cadena pesada. El anticuerpo humanizado se puede seleccionar entre cualquier clase de inmunoglobulinas, incluyendo IgM, IgG, IgD, IgA e IgE, y cualquier isotipo, incluyendo IgG₁, IgG₂, IgG₃ e IgG₄. El anticuerpo humanizado puede comprender secuencias de más de una clase o isotipo, y la selección de dominios constantes concretos para optimizar las funciones efectoras deseadas está al alcance de los expertos en la técnica.

Según se utilizan en la presente memoria, las frases "se une inmuno-específicamente a un epítipo p24", "se une inmuno-específicamente a p24" y términos análogos de las mismas se refieren a péptidos, polipéptidos, proteínas, proteínas de fusión y anticuerpos que se unen específicamente a p24 o al fragmento p24 y no se unen específicamente a otros péptidos. Las frases "se une inmuno-específicamente a un epítipo p26", "se une inmuno-específicamente a p26" y términos análogos de las mismas se refieren a péptidos, polipéptidos, proteínas, proteínas de fusión y anticuerpos que se unen específicamente a p26 o al fragmento p26 y no se unen específicamente a otros péptidos. Según se utilizan en la presente memoria, las frases "se une inmuno-específicamente a un epítipo p24 y/o a un epítipo p26", "se une inmuno-específicamente a p24 y/o a p26" y términos análogos de las mismas se refieren a péptidos, polipéptidos, proteínas, proteínas de fusión y anticuerpos que se unen específicamente a p24 o un fragmento de p24 o un epítipo de p24 y/o a p26, un fragmento de p26 y/o a un epítipo de p26 y no se unen específicamente a otros péptidos. En ciertas realizaciones, un péptido, polipéptido, proteína o anticuerpo que se une inmuno-específicamente a p24, p26, o p24 y/o p26 o fragmentos o epítopos de los mismos se pueden unir a otros péptidos, polipéptidos o proteínas con una afinidad de unión inferior determinada por ejemplo mediante inmunoensayos, BIAcore u otros ensayos conocidos en la técnica.

Según se utiliza en la presente memoria, el término "aislado" en el contexto de moléculas de ácido nucleico se refiere a una molécula de ácido nucleico que está separada de otras moléculas de ácido nucleico que están presentes en la fuente natural de la molécula de ácido nucleico. Además, una molécula de ácido nucleico aislada, tal como una molécula de ADNc, puede estar sustancialmente libre de otro material celular, o medio de cultivo cuando se produce por técnicas recombinantes, o sustancialmente libre de precursores químicos u otros agentes químicos cuando se sintetiza químicamente. En un aspecto, se aíslan las moléculas de ácido nucleico. En otro aspecto, se aísla la molécula de ácido nucleico que codifica un anticuerpo de la invención.

Según se utiliza en la presente memoria, el término "condiciones rigurosas" se refiere a la hibridación con ADN unido a un filtro en 6 x cloruro de sodio/citrato de sodio (SSC) a aproximadamente 45°C seguido de uno o más lavados en 0,2 x SSC/SDS al 0,1% a aproximadamente 50-65°C. El término "bajo condiciones altamente rigurosas", se refiere a la hibridación con ácido nucleico unido a un filtro en 6 x SSC a aproximadamente 45°C seguido de uno o más lavados en 0,1 x SSC/SDS al 0,2% a aproximadamente 68°C, o bajo otras condiciones de hibridación rigurosas que son conocidas por los expertos en la técnica (véanse, por ejemplo, Ausubel et al., eds. (1989) Current Protocols in Molecular Biology, vol. I, Green Publishing Associates, Inc. y John Wiley & Sons, Inc., Nueva York en las páginas 6.3.1-6.3.6 y 2.10.3).

Según se utiliza en la presente memoria, los términos "sujeto" y "paciente" se utilizan indistintamente. Según se utilizan en la presente memoria, los términos "sujeto" y "sujetos" se refieren a un mamífero no humano (p.ej., canino, felino, porcino, ungulado, canino, lagomorfo, primate no humano (por ejemplo, un mono, tal como un mono cinomolgo, chimpancé)) o a un ser humano.

Según se utiliza en la presente memoria, el término "muestra de prueba" se refiere a una muestra biológica derivada de una célula o tejido de un organismo, preferiblemente un mamífero. Las muestras ilustrativas incluyen, pero no se limitan a, muestras que contienen o derivan de suero, plasma, sangre completa, linfa, fluido del SNC, orina u otros fluidos corporales de un sujeto. La muestra de prueba puede prepararse utilizando mecanismos de rutina conocidos por los expertos en la técnica.

Según se utiliza en la presente memoria, el término "cantidad terapéuticamente eficaz" o "cantidad farmacéuticamente eficaz" significa una cantidad de anticuerpo o porción de anticuerpo eficaz, a dosificaciones y durante períodos de tiempo necesarios, para lograr el resultado terapéutico deseado. La dosis exacta podrá ser comprobada por un experto en la técnica. Como se conoce en la técnica, pueden ser necesarios ajustes basados en la edad, peso corporal, sexo, raza, dieta, tiempo de administración, interacción del fármaco y gravedad de la

enfermedad, y serán comprobables con experimentación rutinaria por los expertos en la técnica. También es una cantidad terapéuticamente eficaz aquella en la que los efectos terapéuticamente beneficiosos superan cualquier efecto tóxico o perjudicial del anticuerpo o fragmento de anticuerpo. Una "cantidad profilácticamente eficaz" se refiere a una cantidad eficaz, a dosificaciones y durante períodos de tiempo necesarios para lograr el resultado profiláctico deseado. Típicamente, dado que se usa una dosis profiláctica en sujetos antes o en una etapa más temprana de la enfermedad, la cantidad profilácticamente eficaz será menor que la cantidad terapéuticamente eficaz.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada (VH) (SEQ ID NO: 1) y la cadena ligera (VL) del anticuerpo 115B-151-423 AM1mG1k.

La Figura 2 muestra la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada (VH) (SEQ ID NO: 2) y la cadena ligera (VL) del anticuerpo 115B-151-423 AM2 mG1k.

La Figura 3 muestra la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada (VH) (SEQ ID NO: 3) y la cadena ligera (VL) del anticuerpo 115B-151-423 AM1 hG1k.

La Figura 4 muestra la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada (VH) (SEQ ID NO: 4) y la cadena ligera (VL) del anticuerpo 115B-151-423 AM2 hG1k.

Descripción detallada

En ciertos aspectos, se proporcionan nuevos anticuerpos del VIH que muestran una afinidad de unión sustancialmente mayor por las proteínas del núcleo del VIH-1 y/o VIH-2 (p24 y/o p26). Los anticuerpos se obtuvieron mediante mutaciones de ingeniería genética en el mAb 115B-151-423 (anticuerpo secretado por la línea celular PTA-2809, véase la Patente de Estados Unidos Núm. 7.531.640) para producir anticuerpos que muestran una mejora de aproximadamente 10 veces o más en la afinidad de unión al antígeno.

Sin estar limitados por una teoría concreta, se cree que los nuevos anticuerpos se unen al mismo epítopo o a los mismos epítopos a los que se une 115B-151-423 de VIH. Más concretamente, se cree que los nuevos anticuerpos se unen específicamente al Grupo M de VIH-1 y al Grupo O de VIH-1, y reaccionan de manera cruzada con VIH-2 (véase, p.ej., el Ejemplo 1, en la presente memoria).

Los anticuerpos descritos en la presente memoria tienen altas afinidades (valores de K_{eq}) suficientes para detectar cantidades femtomolares diagnósticamente relevantes de la proteína del núcleo del VIH. Se cree, sin embargo, que también poseen amplia especificidad (es decir, reactividad compartida) para la detección de cantidades equivalentes de proteínas del núcleo relacionadas, pero no idénticas, del Grupo M de VIH-1, del Grupo O de VIH-1 y VIH-2.

Los anticuerpos son muy adecuados para la detección de uno o varios antígenos del Grupo M de VIH-1, Grupo O de VIH-1, y VIH-2 en una muestra. Los anticuerpos también se pueden usar para el aislamiento o la purificación de las proteínas del núcleo del VIH. Los anticuerpos también encuentran uso en aplicaciones terapéuticas y/o profilácticas.

I. Anticuerpos.

Como se indicó anteriormente, en ciertos aspectos se proporcionan nuevos anticuerpos aislados que se unen específicamente (unión inmuno-específica) a una proteína del núcleo del VIH. Se cree que los anticuerpos se unen a la proteína del núcleo del VIH-1 (p24) y/o a la proteína del núcleo del VIH-2 (p26). Los anticuerpos muestran una especificidad de unión sustancialmente mayor a uno o más antígenos diana que el mAb 115B-151-423 descrito en la Patente de Estados Unidos Núm.: 7.531.640 (producido por la línea celular PTA-2809). En ciertos aspectos, los anticuerpos se unen a la proteína del núcleo del VIH-1 y/o proteína del núcleo del VIH-2 con una afinidad de al menos aproximadamente 1,5 veces, preferiblemente al menos aproximadamente 2 veces, más preferiblemente al menos aproximadamente 4 veces o al menos aproximadamente 8 veces, y lo más preferiblemente con al menos aproximadamente 10 veces mayor afinidad de unión que el mAb 115B-151-423 de VIH. En ciertas realizaciones, los anticuerpos unen a p24 y/o p26 con una constante de disociación en equilibrio (K_D) de menos de aproximadamente 7 pM, y en ciertas realizaciones, con una K_D entre aproximadamente 7 pM y aproximadamente 100 fM.

Además, en ciertos aspectos, también se proporcionan composiciones que comprenden los anticuerpos anti-VIH descritos en la presente memoria anclados a un sustrato o a un efector (p.ej., una marca detectable, un segundo anticuerpo, una citocina, etc.). Cuando el efector comprende un segundo (o más) anticuerpos, se proporciona un anticuerpo biespecífico (o poliespecífico).

Las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de cadena pesada y ligera de dos anticuerpos prototípicos (CDR2 de 115B-151-423 AM1 y 115B-151-423 AM2) que tienen afinidad de unión sustancialmente mayor para p24 y/o p26 que mAb 115B-151-423 se muestran en las Tablas 1 y 2, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos de los dominios VH y VL completos de estos anticuerpos se muestran en las Figuras 1-4.

Notablemente, las Figuras 1 y 2, respectivamente, muestran la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo AM1 murino y quimérico de ratón-humano (IgG1 kappa)], mientras que las Figuras 3 y 4, respectivamente, muestran la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo AM2 murino y quimérico de ratón-humano (IgG1 kappa)].

- 5 Tabla 1. Secuencia de aminoácidos de las CDR de cadena pesada y ligera de anticuerpo 115B-151-423 AM1 con comparación con el tipo salvaje (anticuerpo 115B-151-423 (véase, p.ej., la Patente de los Estados Unidos 7.531.642).

CDR 115B-151-423 AM1	SEQ ID NO
CDR H1:	
Gly-Tyr-Thr-Phe-Thr-Ser-Tyr-Trp-Ile-Glu (GYTFTSYWIE)	5
CDR H2:	
Glu-Ile-Leu-Pro-Gly- <u>Ala</u> -Gly-Ser-Leu-Asn-Asn-Asn- Glu-Lys-Phe-Arg-Asp (EILP <u>G</u> AGSLNNNEKFRD)	6
CDR H2 tipo salvaje:	
Glu-Ile-Leu-Pro-Gly- <u>Thr</u> -Gly-Ser-Leu-Asn-Asn-Asn- Glu-Lys-Phe-Arg-Asp (EILP <u>G</u> TGSLNNNEKFRD)	7
CDR H3:	
Gly-Tyr-Arg-Tyr-Asp-Gly- <u>Ile-Met-Phe</u> -Tyr (GYRYDGIMFY)	8
CDR H3 tipo salvaje:	
Gly-Tyr-Arg-Tyr-Asp-Gly- <u>Trp-Phe-Ala</u> -Tyr (GYRYDG <u>W</u> FAY)	9
CDR L1:	
Arg-Thr-Ser-Glu-Asn-Ile-Tyr-Ser-Tyr-Leu-Ala (RTSENIYSYLA)	10
CDR L2:	
Asn-Thr-Lys-Thr-Leu-Ala-Glu (NTKTLAE)	11
CDR L3:	
Gln-His-His-Tyr-Asp- <u>Glu-Val</u> -Leu-Thr (QH H YDE <u>V</u> LT)	12
CDR L3 tipo salvaje:	
Gln-His-His-Tyr-Asp- <u>Ser-Pro</u> -Leu-Thr (QH H YDS <u>P</u> LT)	13

- 10 Tabla 2. Secuencias de aminoácidos de CDR de cadena pesada y ligera del anticuerpo 115B-151-423 AM2 en comparación con el tipo salvaje (MAb 115B-151-423)

115B-151-423 AM2 CDR2	Seq ID No
CDR H1:	

115B-151-423 AM2 CDR2	Seq ID No
Gly-Tyr-Thr-Phe-Thr-Ser-Tyr-Trp-Ile-Glu (GYTFTSYWIE)	14
CDR H2:	
Glu-Ile-Leu-Pro-Gly-Thr-Gly-Ser-Leu-Asn-Asn-Asn- Glu-Lys-Phe-Arg-Asp (EILPGTGSLNNEKFRD)	15
CDR H3:	
Gly-Tyr-Arg-Tyr-Asp-Gly- <u>Ile-Met-Phe</u> -Tyr (GYRYDGFMIY)	16
<i>CDR H3 tipo salvaje:</i>	
Gly-Tyr-Arg-Tyr-Asp-Gly- <u>Trp-Phe-Ala</u> -Tyr (GYRYDG <u>WFA</u> Y)	17
CDR L1:	
Arg-Thr-Ser-Glu-Asn-Ile-Tyr-Ser-Tyr-Leu-Ala (RTSENIYSYLA)	18
CDR L2:	
Asn-Thr-Lys-Thr-Leu-Ala-Glu (NTKTLAE)	19
CDR L3:	
Gln-His-His-Tyr-Asp- <u>Glu-Val</u> -Leu-Thr (QH HYDEVLT)	20
CDR L3 tipo salvaje:	
Gln-His-His-Tyr-Asp- <u>Ser-Pro</u> -Leu-Thr (QH HYDSPLT)	21

5 Por consiguiente, en ciertos aspectos se contemplan anticuerpos donde el anticuerpo comprende un dominio variable de cadena ligera que comprende regiones determinantes de la complementariedad L1, L2 y L3, y un dominio variable de cadena pesada que comprende regiones determinantes de la complementariedad H1, H2 y H3 en donde: las secuencias de aminoácidos de una o más de las CDR L1, L2 o L3 del dominio variable de cadena ligera comprenden las secuencias de aminoácidos respectivamente de las CDR L1, L2 y/o L3 de un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en 115B-151-423 AM1 y 115B-151-423 AM2; y/o las secuencias de aminoácidos de una o más de las CDR H1, H2 o H3 del dominio variable de la cadena pesada comprenden las secuencias de aminoácidos respectivamente de las CDR H1, H2 y H3 de un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en 115B-151-423 AM1 y 115B-151-423 AM2. En ciertos aspectos, la CDR L3 del anticuerpo comprende la secuencia de aminoácidos de la CDR L3 de un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en 115B-151-423 AM1 y 115B-151-423 AM2; y/o las CDR H2 y/o H3 del anticuerpo comprenden las secuencias de aminoácidos respectivamente de las CDR H2 y H3 de un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en 115B-151-423 AM1 y 115B-151-423 AM2.

15 En ciertos aspectos, las CDR H2 y H3 del anticuerpo comprenden las secuencias de aminoácidos respectivamente de las CDR H2 y H3 de un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en 115B-151-423 AM1 y 115B-151-423 AM2. En ciertos aspectos, las CDR H1, H2 y H3 del anticuerpo comprenden las secuencias de aminoácidos respectivamente de las CDR H1, H2 y H3 de un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en 115B-151-423 AM1 y 115B-151-423 AM2; y/o las CDR L1, L2 y L3 del anticuerpo comprenden las secuencias de aminoácidos respectivamente de las CDR L1, L2 y L3 de un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en 115B-151-423 AM1 y 115B-151-423 AM2.

25 En ciertos aspectos, las CDR H1, H2 y H3 del anticuerpo comprenden las secuencias de aminoácidos respectivamente de las CDR H1, H2 y H3 de un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en 115B-151-423 AM1 y 115B-151-423 AM2.

En ciertos aspectos, las CDR L1, L2 y L3 del anticuerpo comprenden las secuencias de aminoácidos respectivamente de las CDR L1, L2 y L3 de un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en 115B-151-423 AM1 y 115B-151-423 AM2.

5 En ciertos aspectos, las CDR H1, H2 y H3 del anticuerpo comprenden las secuencias de aminoácidos respectivamente de las CDR H1, H2 y H3 de 115B-151-423 AM1; y las CDR L1, L2 y L3 del anticuerpo comprenden las secuencias de aminoácidos respectivamente de las CDR L1, L2 y L3 de 115B-151-423 AM1.

10 En ciertos aspectos, las CDR H1, H2 y H3 del anticuerpo comprenden las secuencias de aminoácidos respectivamente de las CDR H1, H2 y H3 de 115B-151-423 AM2; y las CDR L1, L2 y L3 del anticuerpo comprenden las secuencias de aminoácidos respectivamente de las CDR L1, L2 y L3 de 115B-151-423 AM2.

15 En diversos aspectos, el anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo multiespecífico, un anticuerpo humano, un anticuerpo completamente humanizado, un anticuerpo parcialmente humanizado, un anticuerpo animal, un anticuerpo recombinante, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo de cadena sencilla, un Fv de cadena sencilla, un anticuerpo de dominio único, un fragmento Fab, un fragmento F(ab')₂, un Fv unido a disulfuro, un anticuerpo antiidiotípico y un fragmento de unión a epítipo funcionalmente activo del mismo.

20 En varios aspectos, el anticuerpo es un anticuerpo Fv en el que los dominios pesado variable (VH) y ligero variable (VL) están químicamente conjugados (p.ej., a través de un PEG u otro conector) o son una proteína de cadena sencilla (scFv) y los dominios VH y VL están unidos por un conector peptídico. En ciertos aspectos, la longitud del conector varía de aproximadamente 1, 2 o 3 aminoácidos a aproximadamente 30, 40 o 50 aminoácidos. En ciertos aspectos, la longitud del conector peptídico varía de aproximadamente 4 a aproximadamente 30, preferiblemente de aproximadamente 8 a aproximadamente 24 aminoácidos de longitud. Los conectores ilustrativos incluyen, pero no se limitan a, los conectores peptídicos mostrados en la Tabla 3.

Tabla 3. Conectores peptídicos ilustrativos para unir dominios VH y VL en un péptido de cadena sencilla.

Conector	Seq ID NO
GGGGS	22
GGGGS GGGGS	23
GGGGS GGGGS GGGGS	24
GGGGS GGGGS GGGGS GGGGS	25
GPAKELTPLKEAKVS	26
GSTSGSGKSSEGKG	27
RPLSYRPPFPFGFSPVRP	28
YPRSIYIRRRHPSPSLTT	29
TPSHLSHILPSFGLPTFN	30
RPVSPFTFPRLSNSWLPA	31
SPA AHFPRSIPRPGPIRT	32
APGPSAPSHRSLPSRAFG	33
PRNSIHFLHPLLVAPLGA	34
MPSLSGVLQVRYLSPPDL	35
SPQYPSPLTLTPPHPSL	36
NPSLNPPSYLHRAPSRIS	37
LPWRTSLLPSLPLRRRPS	38
PPLFAKGPVGLLSRSFPP	39
VPPAPVVSLRSAHARPPY	40
LRPTPPRVSYTCCPTP	41
PNVAHVLP LLTVPWDNLR	42

Conector	Seq ID NO
CNPLLPLCARSPAVRTFP	43

En ciertos aspectos, se contemplan anticuerpos derivados o variantes que comprenden al menos una mutación (tal como delecciones, adiciones y/o sustituciones) en al menos una de las regiones determinantes de la complementariedad ("CDR") de la cadena pesada (por ejemplo, la CDR 1 de cadena pesada, la CDR 2 de cadena pesada o la CDR 3 de cadena pesada), al menos una mutación (tal como delecciones, adiciones y/o sustituciones) en las regiones CDR de cadena ligera (por ejemplo, la CDR 1 de cadena ligera, la CDR 2 de cadena ligera, o la CDR 3 de cadena ligera cuando se compara con la secuencia de aminoácidos de los anticuerpos cuyas CDR se muestran en las Tablas 1 y 2 y/o cuyas cadenas pesada y ligera se muestran en las Figuras 1-4. Los mecanismos convencionales conocidos por los expertos en la técnica se pueden utilizar para introducir mutaciones (tales como delecciones, adiciones y/o sustituciones) en la molécula de ácido nucleico que codifica un anticuerpo de la presente invención, incluyendo, por ejemplo, mutagénesis dirigida al sitio y mutagénesis mediada por PCR que da como resultado sustituciones de aminoácidos. En un aspecto, los derivados incluyen menos de 10 sustituciones de aminoácidos, menos de 5 sustituciones de aminoácidos, menos de 4 sustituciones de aminoácidos, menos de 3 sustituciones de aminoácidos o menos de 2 sustituciones de aminoácidos con respecto a los anticuerpos cuyas CDR se muestran en las Tablas 1 y 2 y/o cuyas cadenas pesadas y ligeras se muestran en las Figuras 1-4.

En un aspecto, se preparan derivados tienen sustituciones de aminoácidos conservativas en uno o más residuos de aminoácidos no esenciales pronosticados (es decir, residuos de aminoácidos que no son críticos para que el anticuerpo se una inmunoespecíficamente a la proteína de VIH (p.ej., p24, p26)). Una "sustitución de aminoácidos conservativa" es una en la que el residuo de aminoácido se reemplaza por el residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral con una carga similar. Las familias de residuos de aminoácidos que tienen cadenas laterales con cargas similares se han definido en la técnica. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales alcalinas (p.ej., lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (p.ej., ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares sin carga (p.ej., glicina, asparragina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadenas laterales no polares (p.ej., alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano), cadenas laterales beta-ramificadas (p.ej., treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (p.ej., tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). Alternativamente, las mutaciones pueden introducirse aleatoriamente a lo largo de toda o parte de la secuencia codificante, por ejemplo mediante mutagénesis de saturación, y se puede escrutar la actividad biológica los mutantes resultantes para identificar mutantes que exhiben una mayor afinidad de unión a p24 o un fragmento de p24 y/o a p26 o un fragmento p26. Después de la mutagénesis, el anticuerpo codificado se puede expresar y se puede determinar la actividad del anticuerpo.

A) Identificación de otros anticuerpos que se unen al mismo o a los mismos epítopos que 115B-151-423 AM1 y/o 115B-151-423 AM2.

No es necesario que los anticuerpos de esta descripción se limiten al uso de los anticuerpos concretos cuyas CDR se enumeran en las Tablas 1-2 y/o cuya secuencia se muestra en las Figuras 1-4 y/o sustituciones en las mismas como se describió anteriormente. En efecto, cada uno de estos anticuerpos identifica un epítipo diana en las proteínas del núcleo del VIH-1 y/o VIH-2 (p24 y p26) y estos anticuerpos se pueden utilizar fácilmente para identificar otros anticuerpos que se unen a los mismos epítopos con mayor afinidad. Por tanto, en ciertos aspectos, los anticuerpos de esta invención comprenden uno o más anticuerpos que se unen específicamente a un epítipo específicamente unido por un anticuerpo cuyas CDR se enumeran en las Tablas 1-2 y/o cuya secuencia se muestra en las Figuras 1-4 (p.ej., 115B-151-423 AM1 y/o 115B-151-423 AM2).

Dichos anticuerpos se identifican fácilmente escrutando anticuerpos completos, fragmentos de anticuerpos o anticuerpos de cadena sencilla para determinar su capacidad para competir con los anticuerpos enumerados anteriormente por su capacidad para unirse a las proteínas o proteínas que comprenden el epítipo diana. En otras palabras, los anticuerpos candidatos se pueden escrutar para determinar su reactividad cruzada con los anticuerpos 115B-151-423 AM1 y/o 115B-151-423 AM2 contra la proteína o las proteínas del núcleo del VIH diana. Los medios para someter a ensayo la reactividad cruzada son bien conocidos por los expertos en la técnica (véase, p.ej., Dowbenko et al. (1988) J. Virol. 62: 4703-4711).

Por ejemplo, en ciertos aspectos se puede determinar la reactividad cruzada proporcionando una proteína del núcleo del VIH (o fragmento que comprende el epítipo deseado) anclada a un soporte sólido y sometiendo a ensayo la capacidad de un anticuerpo de prueba para competir con 115B-151-423 AM1 y/o 115B-151-423 AM2 para unirse a la proteína diana. Por lo tanto, los inmunoensayos en un formato de unión competitiva se pueden utilizar para determinaciones de reactividad cruzada. Por ejemplo, en una realización, la proteína o proteínas del núcleo del VIH o fragmentos de las mismas se inmovilizan en un soporte sólido. Los anticuerpos que se deben probar (p.ej., generados mediante selección de una biblioteca de presentación en fagos, o generados en una biblioteca de anticuerpos completos) se añaden al ensayo para que compitan con uno o más de los anticuerpos enumerados cuyas CDR se enumeran en las Tablas 1-2 y/o cuya secuencia se muestra en las Figuras 1-4 para determinar la

unión al polipéptido inmovilizado. Se compara la capacidad de los anticuerpos de prueba para competir por la unión de estos anticuerpos "prototipo" a la proteína inmovilizada. A continuación se puede calcular el porcentaje de reactividad cruzada de las proteínas utilizando cálculos convencionales. Si el anticuerpo de prueba compite con uno o más de los anticuerpos "prototipo" con una afinidad de unión comparable o mayor, el anticuerpo es muy adecuado para usar en la presente invención.

En un aspecto ilustrativo, la reactividad cruzada se realiza utilizando resonancia de plasmón superficial en un BIAcore. En una celda de flujo BIAcore, la proteína o las proteínas p24 y/o p26 o fragmentos de las mismas se acoplan a un chip sensor. Con una velocidad de flujo típica de 5 ml/min, se inyecta una titulación de anticuerpo 100 nM a 1 μ M sobre la superficie de la celda de flujo durante aproximadamente 5 minutos para determinar una concentración de anticuerpo que da como resultado una saturación cercana de la superficie. A continuación, se evalúa el mapeo de epítomos o la reactividad cruzada utilizando pares de anticuerpos a concentraciones que dan como resultado una saturación próxima y al menos 100 UR de anticuerpo unido. La cantidad de anticuerpo unido se determina para cada miembro de un par, y a continuación los dos anticuerpos se mezclan entre sí para proporcionar una concentración final igual a la concentración utilizada para las mediciones de los anticuerpos individuales. Los anticuerpos que reconocen diferentes epítomos muestran un aumento esencialmente aditivo de las UR unidas cuando se inyectan juntos, mientras que los anticuerpos que reconocen epítomos idénticos muestran solo un incremento mínimo de UR. En un aspecto particularmente preferido, se dice que los anticuerpos presentan reacción cruzada si, cuando se "inyectan" juntos, muestran un aumento esencialmente aditivo (preferiblemente un aumento de al menos un factor de aproximadamente 1,4, más preferiblemente un aumento de al menos un factor de aproximadamente 1,6, y lo más preferiblemente un aumento de al menos un factor de aproximadamente 1,8 o 2, o 4, u 8, o 10).

Reactividad cruzada en los epítomos reconocidos por los anticuerpos enumerados descritos en la presente memoria (p.ej., 115B-151-423 AM1 y/o 115B-151-423 AM2) se puede determinar mediante una serie de otras técnicas convencionales (véase, p.ej., Geysen et al. (1987) J. Immunol. Meth. 102: 259-274).

Además, los anticuerpos 115B-151-423 AM1 y/o 115B-151-423 AM2 se han secuenciado (véanse, p.ej., Tablas 1 y 2 y/o las Figuras 1-4). Por lo tanto, se conocen las secuencias de aminoácidos que comprenden las regiones determinantes de la complementariedad (CDR). Utilizando esta información de secuencia, se pueden modificar genéticamente las mismas regiones determinantes complementariedad o similares en otros anticuerpos para producir anticuerpos quiméricos completos y/o fragmentos de anticuerpos, p.ej., para asegurar la compatibilidad de las especies, para aumentar la semivida en suero, y similares. Los expertos en la técnica conocen un gran número de métodos para generar anticuerpos quiméricos (véanse, p.ej., las Patente de Estados Unidos Núm.: 5.502.167, 5.500.362, 5.491.088, 5.482.856, 5.472.693, 5.354.847, 5.292.867, 5.231.026, 5.204.244, 5.202.238, 5.169.939, 5.081.235, 5.075.431 y 4.975.369).

B) Métodos de presentación en fagos para seleccionar otros anticuerpos anti-VIH "relacionados".

1) Métodos de barajado de cadenas.

Un enfoque para crear repertorios modificados de genes de anticuerpos de cadena sencilla (scFv) ha sido reemplazar el gen V_H o V_L original por un repertorio de genes V para crear nuevos compañeros (barajado de cadenas) (Clackson et al. (1991) Nature. 352: 624-628). Utilizando el barajado de cadenas y la presentación en fagos, aumentó la afinidad de un fragmento de anticuerpo scFv humano que se unía al hapteno feniloxazolona (phOx) de 300 nM a 1 nM (300 veces) (Marks et al. (1992) Bio/Technology 10: 779-783).

Por lo tanto, por ejemplo, para alterar la afinidad de un anticuerpo anti-VIH (p.ej., 115B-151-423 AM1 y/o 115B-151-423 AM2, etc.), se crea un repertorio de genes scFv mutantes que contiene una gen V_H que comprende CDR1 (H1) y/o CDR2 (H2), y/o CDR3 (H3) de los anticuerpos 115B-151-423 AM1 y/o 115B-151-423 AM2 y un repertorio de genes V_L humanos (barajado de cadenas ligeras). El repertorio del gen scFv se puede clonar en un vector de presentación en fagos, p.ej., pHEN-1 (Hoogenboom et al. (1991) Nucleic Acids Res., 19: 4133-4137) u otros vectores y, después de la transformación, se obtiene una biblioteca de transformantes. A continuación, esta biblioteca se puede escrutar frente a las dianas de proteínas del núcleo del VIH-1 y/o VIH-2 para identificar miembros con la afinidad de unión deseada. Se pueden seleccionar y secuenciar agentes de unión de alta afinidad según se desee.

De manera similar, para el barajado de cadenas pesadas, se crea un repertorio de genes scFv mutantes que contiene un gen V_L que comprende CDR1 (L1) y/o CDR2 (L2) y/o CDR3 (L3) de los anticuerpos 115B-151-423 AM1 y/o 115B-151-423 AM2 y un repertorio de genes V_H humanos. El repertorio de genes scFv se puede clonar en un vector de presentación en fagos, p.ej., pHEN-1 (Hoogenboom et al. (1991) Nucleic Acids Res., 19: 4133-4137) u otros vectores y, después de la transformación, se obtiene una biblioteca de transformantes. A continuación, esta biblioteca se puede escrutar frente a las dianas de proteínas del núcleo del VIH-1 y/o VIH-2 para identificar miembros con la afinidad de unión deseada. Se pueden seleccionar y secuenciar agentes de unión de alta afinidad

según se desee. Para descripciones detalladas del barajado de cadenas para aumentar la afinidad de anticuerpos, véase Schier et al. (1996) J. Mol. Biol., 255: 28-43, y similares.

2) Mutagénesis dirigida al sitio para mejorar la afinidad de unión.

La mayoría de las cadenas laterales de aminoácidos que entran en contacto con antígenos se localizan típicamente en las regiones determinantes de la complementariedad (CDR), tres en la V_H (CDR1 (H1), CDR2 (H2) y CDR3 (H3)) y tres en la V_L (CDR1 (L1), CDR2 (L2) y CDR3 (L3)) (Chothia et al. (1987) J. Mol. Biol., 196: 901-917; Chothia et al. (1986) Science, 233: 755-758; Nhan et al. (1991) J. Mol. Biol., 217: 133-151) Estos residuos típicamente contribuyen a la mayoría de las energías de unión responsables de la afinidad del anticuerpo por el antígeno. En otras moléculas, se ha demostrado que los aminoácidos mutantes que entran en contacto con el ligando son un medio eficaz para aumentar la afinidad de una molécula de proteína por su compañero de unión (Lowman et al. (1993) J. Mol. Biol., 234: 564-578; Wells (1990) Biochemistry, 29: 8509-8516). La mutagénesis dirigida al sitio de las CDR y el escrutinio contra la proteína o las proteínas del núcleo del VIH-1 y/o VIH-2 pueden producir anticuerpos que tienen una mejor afinidad de unión.

3) Aleatorización de CDR para producir scFv humano de mayor afinidad.

En una extensión de la mutagénesis simple dirigida al sitio, pueden crearse bibliotecas de anticuerpos mutantes donde las CDR parciales o completas son aleatorizadas (V_L CDR1 (L1), CDR2 (L2) y/o CDR3 (L3), y/o V_H CDR1 (H1), CDR2 (H2) y/o CDR3 (H3)). En una realización, cada CDR se aleatoriza en una biblioteca separada, utilizando un anticuerpo conocido (p.ej., 115B-151-423 AM1 y/o 115B-151-423 AM2) como molde. Las secuencias de CDR de los mutantes de mayor afinidad de cada biblioteca de CDR se combinan para obtener un aumento aditivo de afinidad. Se ha utilizado un enfoque similar para aumentar la afinidad de la hormona del crecimiento humana (hGH) por el receptor de la hormona del crecimiento más de 1500 veces desde $3,4 \times 10^{-10}$ a $9,0 \times 10^{-13}$ M (Lowman et al. (1993) J. Mol. Biol., 234: 564-578).

La CDR3 de V_H a menudo ocupa el centro del bolsillo de unión, y por lo tanto es probable que las mutaciones en esta región den como resultado un aumento de afinidad (Clackson et al. (1995) Science, 267: 383-386). En una realización, se aleatorizan cuatro residuos de CDR3 de V_H a la vez utilizando los nucleótidos NNS (véanse, p.ej., Schier et al. (1996) Gene, 169: 147-155; Schier y Marks (1996) Human Hybridomas and Hybridomas. 7: 97-105, 1996; y Schier et al. (1996) J. Mol. Biol. 263: 551-567).

Por ejemplo, para aumentar adicionalmente la afinidad de unión, los segmentos V_H y V_L de 115B-151-423 AM1 y/o 115B-151-423 AM2 pueden mutarse aleatoriamente, en algunas realizaciones preferiblemente dentro de la región CDR2 de V_H , y/o la región CDR1 y/o la región CDR2 de V_L en un proceso análogo al proceso de mutación somática *in vivo* responsable de la maduración por afinidad de anticuerpos durante una respuesta inmunitaria natural. Esta maduración de afinidad *in vitro* se puede lograr reemplazando una porción de cada CDR por un oligonucleótido de hebra sencilla degenerado que codifica tres aminoácidos dentro de la CDR a la que se dirige. El reemplazo de una porción de cada CDR por una nueva secuencia aleatorizada se puede lograr mediante recombinación homóloga en levadura. Estos segmentos V_H y V_L mutados aleatoriamente pueden analizarse para determinar la unión al fragmento de p24 y/o p26 en el contexto de un scFv. Los scFv preferidos exhiben una afinidad por el epítipo de interés con al menos aproximadamente una mejora de dos veces, al menos aproximadamente una mejora de tres veces, al menos aproximadamente una mejora de cinco veces, al menos una mejora de aproximadamente diez veces, al menos aproximadamente una mejora de quince veces, al menos aproximadamente una mejora de veinte veces, al menos aproximadamente una mejora de veinticinco veces, al menos aproximadamente una mejora de treinta veces, al menos aproximadamente una mejora de treinta y cinco veces, al menos aproximadamente una mejora de cuarenta veces, al menos aproximadamente una mejora de cuarenta y cinco veces, al menos aproximadamente una mejora de cincuenta veces, al menos aproximadamente una mejora de cincuenta y cinco veces, al menos aproximadamente una mejora de sesenta veces, al menos aproximadamente una mejora de setenta veces o al menos aproximadamente una mejora de setenta y cinco veces de su constante de disociación en equilibrio (K_D) en comparación con el anticuerpo 115B-151-423 producido por la línea celular de hibridoma PTA-2809 (como se describe en la Patente de Estados Unidos Núm. 7.531.640).

C) Creación de otras formas de anticuerpos.

Utilizando las secuencias conocidas y/o identificadas (p.ej. secuencias V_H y/o V_L) de los anticuerpos proporcionados en la presente memoria se pueden crear fácilmente otras formas de anticuerpos. Tales formas incluyen, pero no están limitadas a anticuerpos multivalentes, anticuerpos completos, scFv, (scFv)₂, Fab, (Fab')₂, anticuerpos quiméricos, y similares.

1) Creación de Homodímeros.

Por ejemplo, para crear anticuerpos (scFv)₂, se unen dos scFv, ya sea directamente, o a través de un conector

(p.ej., un enlazador de carbono, un péptido, etc.), o a través de un enlace disulfuro entre, por ejemplo, dos cisteínas. De este modo, por ejemplo, para crear scFv unidos por disulfuro, se puede introducir un residuo de cisteína mediante mutagénesis dirigida al sitio en el extremo carboxi de los anticuerpos descritos en la presente memoria.

5 A partir de este constructo se puede expresar un scFv, purificar por IMAC y analizar mediante filtración en gel. Para producir dímeros (scFv)₂, la cisteína se reduce por incubación con 3-mercaptoetanol 1 mM, y la mitad del scFv se bloquea mediante la adición de DTNB. Los scFv bloqueados y no bloqueados se incuban juntos para formar (scFv)₂ y el material resultante se puede analizar mediante filtración en gel. La afinidad del dímero resultante se puede determinar utilizando métodos convencionales, p.ej. mediante BIAcore.

10 En un aspecto ilustrativo, el dímero (scFv)₂ se crea uniendo los fragmentos scFv' a través de un conector enlazador, p.ej., un conector péptido. Esto se puede lograr mediante una amplia variedad de medios bien conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, Holliger et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 6444-6448 (véase también el documento WO 1994/013804) describen un enfoque.

15 Se observa que utilizando las secuencias de V_H y/o V_L proporcionadas en la presente memoria también se pueden preparar fácilmente Fab y dímeros (Fab')₂. Fab es una cadena ligera unida a V_H-CO_H1 mediante un enlace disulfuro y puede crearse fácilmente utilizando métodos convencionales conocidos por los expertos en la técnica. El F(ab')₂ se puede producir mediante dimerización del Fab, p.ej. como se describió anteriormente para el dímero (scFv)₂.

20 **2) Anticuerpos quiméricos.**

25 Los anticuerpos de esta invención también incluyen anticuerpos "quiméricos" en los que una porción de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie concreta o perteneciente a una clase o subclase de anticuerpo concreta, mientras que el resto de la cadena o de las cadenas es idéntico u homólogo a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otra especie o pertenecientes a otra clase o subclase de anticuerpos, así como a fragmentos de tales anticuerpos, siempre que muestren la actividad biológica deseada (véase, p.ej., Patente de Estados Unidos Núm. 4.816.567; Morrison et al. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. 81: 6851-6855, etc.).

30 Los anticuerpos quiméricos son anticuerpos que comprenden porciones de dos especies diferentes (p.ej. una porción humana y una no humana). Típicamente, la región de combinación de antígeno (o región variable) de un anticuerpo quimérico se obtiene de una fuente de una especie y la región constante del anticuerpo quimérico (que confiere función efectora biológica a la inmunoglobulina) se obtiene de otra fuente. Un gran número de métodos para generar anticuerpos quiméricos es bien conocido por los expertos en la técnica (véanse, p.ej., la Patente de Estados Unidos Núm.: 5.502.167, 5.500.362, 5.491.088, 5.482.856, 5.472.693, 5.354.847, 5.292.867, 5.231.026, 5.204.244, 5.202.238, 5.169.939, 5.081.235, 5.075.431 y 4.975.369).

35 En general, los procedimientos utilizados para producir anticuerpos quiméricos consisten en las siguientes etapas (el orden de algunas etapas puede intercambiarse): (a) identificar y clonar el segmento de gen correcto que codifica la porción de unión a antígeno de la molécula de anticuerpo; este segmento génico (conocido como VDJ, regiones variable, de diversidad y de unión para las cadenas pesadas o VJ, regiones variables, de unión para las cadenas ligeras, o simplemente V o región variable o regiones V_H y V_L) puede estar en forma de ADNc o genómica; (b) clonar los segmentos génicos que codifican la región constante humana o la parte deseada de la misma; (c) ligar la región variable a la región constante de manera que el anticuerpo quimérico completo se codifique en una forma transcribible y traducible; (d) ligar esta construcción a un vector que contiene un marcador seleccionable y regiones de control génico tales como promotores, potenciadores y señales de adición de poli (A); (e) amplificar esta construcción en una célula anfitriona (p.ej., bacterias); (f) introducir el ADN en células eucariotas (transfección) con mayor frecuencia en linfocitos de mamífero; y cultivar la célula anfitriona en condiciones adecuadas para la expresión del anticuerpo quimérico.

40 Se han manipulado anticuerpos de varias especificidades de unión a antígeno distintas por medio de estos protocolos para producir proteínas quiméricas (p.ej., anti-TNP: Boulianne et al. (1984) Nature, 312: 643; y antígenos antitumorales: Sahagan et al. (1986) J. Immunol., 137: 1066). Del mismo modo, se han logrado varias funciones efectoras diferentes conectando nuevas secuencias a las que codifican la región de unión al antígeno. Algunas de estas incluyen enzimas (Neuberger et al. (1984) Nature 312: 604), regiones constantes de inmunoglobulina de otras especies y regiones constantes de otra cadena de inmunoglobulina (Sharon et al. (1984) Nature 309: 364; Tan y col., (1985) J. Immunol. 135: 3565-3567).

45 **3) Anticuerpos humanos intactos.**

50 En otro aspecto, esta invención describe anticuerpos intactos, completamente humanos (o completamente no humanos). Tales anticuerpos se pueden producir fácilmente de una manera análoga a la preparación de anticuerpos humanos quiméricos. En este caso, en lugar de utilizar una función de reconocimiento derivada, p.ej. de murino se

utiliza en la presente memoria la función de reconocimiento completamente humana (p.ej., V_H y V_L) de los anticuerpos descritos.

4) Diacuerpos.

En ciertos aspectos, esta invención contempla diacuerpos que comprenden dominios V_H y/o V_L que comprenden una o más de las CDR descritas en la presente memoria. En ciertos aspectos, los dominios V_H y/o V_L comprenden las tres (CDR1, CDR2, CDR3) CDR que comprenden los dominios V_H y/o V_L de 115B-151-423 AM1 y/o 115B-151-423 AM2. El término "diacuerpos" se refiere a fragmentos de anticuerpos que tienen típicamente dos sitios de unión a antígeno. Los fragmentos generalmente comprenden un dominio variable de cadena pesada (V_H) conectado a un dominio variable de cadena ligera (V_L) en la misma cadena polipeptídica (V_H - V_L). Al utilizar un conector que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena, se fuerza el emparejamiento de los dominios con los dominios complementarios de otra cadena y se crean dos sitios de unión al antígeno. Los diacuerpos se describen más completamente, p.ej., en los documentos EP 404.097; WO 93/11161 y Holliger et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448.

5) Unicuerpos

En ciertos aspectos, los anticuerpos anti-VIH se modifican genéticamente como anticuerpos. Los unicuerpos proporcionan una tecnología de anticuerpos que produce un formato de anticuerpo más pequeño, estable con una ventana terapéutica más larga anticipada que ciertos formatos de anticuerpos pequeños. En ciertos aspectos, los unicuerpos se producen a partir de anticuerpos IgG4 eliminando la región bisagra del anticuerpo. A diferencia del anticuerpo IgG4 completo, el fragmento de la mitad de la molécula es muy estable y se denomina unicuerpo. La reducción a la mitad de la molécula de IgG4 deja solo una zona en el unicuerpo que se puede unir a una diana. Los métodos de producción de unicuerpos se describen en detalle en la Publicación PCT WO 2007/059782, que se incorpora a la presente memoria como referencia en su totalidad (véase también, Kofschoten et al. (2007) Science 317: 1554-1557).

En ciertos aspectos, se genera una biblioteca de unicuerpos aleatorizada y se escruta para determinar la especificidad de unión y la afinidad por p24 y/o p26 comparables con o mayores que 115B-151-423 AM1 y/o 115B-151-423 AM2. En ciertos aspectos, las CDR identificadas anteriormente se modifican genéticamente para formar un marco/estructura de unicuerpo.

6) Aficuerpos.

En ciertos aspectos, los anticuerpos anti-VIH descritos en la presente memoria se modifican genéticamente como aficuerpos. Las moléculas de aficuerpo son clases de proteínas de afinidad basadas en un dominio de proteína de 58 residuos de aminoácidos, derivado de uno de los dominios de unión a IgG de la proteína A estafilocócica. Este dominio de haz de tres hélices se ha utilizado como armazón para la construcción de bibliotecas de fagémidos combinatorias, a partir de la cual se pueden seleccionar las variantes de Aficuerpos que se dirigen a las moléculas deseadas utilizando la tecnología de presentación en fagos (véanse, p.ej., Nord et al. (1997) Nat. Biotechnol. 15: 772-777; Ronmark et al. (2002) Eur. J. Biochem., 269: 2647-2655). Los detalles de los Aficuerpos y los métodos de producción son conocidos por los expertos en la técnica (véase, p.ej., la Patente de Estados Unidos Núm. 5.831.012).

En ciertos aspectos, se genera una biblioteca de aficuerpos aleatorizada y se escruta para determinar la especificidad de unión y la afinidad por p24 y/o p26 comparables con o mayores que 115B-151-423 AM1 y/o 115B-151-423 AM2. En ciertos aspectos, las CDR identificadas anteriormente se modifican genéticamente para formar una estructura de aficuerpo.

7) Nanoanticuerpos.

En ciertos aspectos, los anticuerpos contra VIH descritos en la presente memoria pueden modificarse genéticamente como nanoanticuerpos (anticuerpos V_H H). Los métodos para preparar V_H H (nanoanticuerpos) también son bien conocidos por los expertos en la técnica. Los anticuerpos de cadena pesada de camélidos se encuentran como homodímeros de una única cadena pesada, dimerizada a través de sus regiones constantes. Los dominios variables de estos anticuerpos de cadena pesada de camélidos se conocen como dominios V_{HH} o V_{HH} y se pueden utilizar *per se* como nanoanticuerpos y/o como punto de partida para obtener nanoanticuerpos. Los V_{HH} aislados retienen la capacidad de unirse al antígeno con alta especificidad (véase, p.ej., Hamers-Casterman et al. (1993) Nature 363: 446-448). En ciertos aspectos tales dominios V_{HH} , o secuencias de nucleótidos que los codifican, se pueden obtener de anticuerpos producidos en especies de Camelidae, por ejemplo, en camello, dromedario, llama, alpaca y guanaco. Otras especies además de Camelidae (p.ej. tiburón, pez globo) pueden producir anticuerpos de cadena pesada de unión a antígeno funcionales, a partir de los cuales (secuencias de nucleótidos codificantes) se pueden obtener tales V_{HH} de origen natural, p.ej. utilizando los métodos descritos en la Publicación de Patente de los

Estados Unidos US 2006/0211088.

En ciertos aspectos, se genera una biblioteca de nanoanticuerpos aleatorizada y se escruta para determinar la especificidad de unión y la afinidad por p24 y/o p26 comparable con o mayor que 115B-151-423 AM1 y/o 115B-151-423 AM2. En ciertos aspectos, las CDR identificadas anteriormente se modifican genéticamente para formar una estructura de nanoanticuerpo.

En resumen, utilizando métodos rutinarios, los anticuerpos cuyas CDR se enumeran en las Tablas 1-2 y/o cuya secuencia se muestra en las Figuras 1-4 se pueden usar fácilmente para generar o identificar otros anticuerpos (completos, fragmentos de anticuerpos, cadena sencilla, y similares) que se unen al mismo epítipo. De forma similar, estos se pueden utilizar fácilmente para generar otros anticuerpos que tienen las mismas o similares regiones determinantes de la complementariedad (CDR), pero proporcionan una mayor especificidad y/o afinidad por sus epítopos p24 y/o p26.

II. Ácidos nucleicos que codifican anticuerpos anti-VIH.

En un aspecto, se proporcionan las moléculas de ácido nucleico aisladas que codifican cualquiera de los anticuerpos descritos anteriormente. Así, por ejemplo, se describe una molécula de ácido nucleico aislada que codifica un anticuerpo que se une a un epítipo p26 y/o p24 con al menos aproximadamente una mejora de dos veces, al menos aproximadamente una mejora de tres veces, al menos aproximadamente una mejora de cuatro veces, al menos aproximadamente una mejora de cinco veces, al menos aproximadamente una mejora de seis veces, al menos aproximadamente una mejora de siete veces, al menos aproximadamente una mejora de ocho veces, al menos aproximadamente una mejora de nueve veces, al menos aproximadamente una mejora de diez veces, al menos aproximadamente una mejora de once veces, al menos aproximadamente una mejora de doce veces, al menos aproximadamente una mejora de trece veces, al menos aproximadamente una mejora de catorce veces, al menos aproximadamente una mejora de quince veces, o al menos aproximadamente una mejora de aproximadamente veinte veces de su constante de disociación en equilibrio (K_D) cuando se compara con el mAb 115B-151-423 de VIH (línea celular PTA-2809) descrito en la Patente de Estados Unidos Núm. 7.531.640 (véase, p.ej., columna 8) y depositado en la American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard Manassas, VA 20110 bajo los términos del tratado de Budapest del 4 de diciembre de 2001).

También se describe una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de nucleótidos que hibrida, en condiciones rigurosas, con la molécula de ácido nucleico descrita en la presente memoria que codifica un anticuerpo que se une a un epítipo p26 y/o p24 con al menos aproximadamente una mejora de dos veces, al menos aproximadamente una mejora de tres veces, al menos aproximadamente una mejora de cuatro veces, al menos aproximadamente una mejora de cinco veces, al menos aproximadamente una mejora de seis veces, al menos aproximadamente una mejora de siete veces, al menos aproximadamente una mejora de ocho veces, al menos aproximadamente una mejora de nueve veces, al menos aproximadamente una mejora de diez veces, al menos aproximadamente una mejora de once veces, al menos aproximadamente una mejora de doce veces, al menos aproximadamente una mejora de aproximadamente trece veces, al menos aproximadamente una mejora de aproximadamente catorce veces, al menos aproximadamente una mejora de quince veces, o al menos aproximadamente una mejora de veinte veces de su constante de disociación en equilibrio (K_D) cuando se compara con el mAb 115B-151-423 de VIH descrito anteriormente.

En ciertos aspectos, el ácido nucleico codifica un anticuerpo que se une inmunoespecíficamente a p24 y/o a p26 con una constante de disociación en equilibrio (K_D) de menos de aproximadamente 10 pM, más preferiblemente menos de aproximadamente 9 pM, aún más preferiblemente menos de aproximadamente 8 pM, y en ciertas realizaciones, con una K_D entre aproximadamente 7 pM y aproximadamente 100 fM.

Por consiguiente, en ciertos aspectos, se contemplan ácidos nucleicos aislados que codifican un anticuerpo que comprende un dominio variable de cadena ligera que comprende regiones determinantes de la complementariedad L1, L2 y L3, y un dominio variable de cadena pesada que comprende regiones determinantes de la complementariedad H1, H2 y H3 en donde: las secuencias de aminoácidos de una o más de las CDR L1, L2 o L3 del dominio variable de cadena ligera comprenden las secuencias de aminoácidos respectivamente de las CDR L1, L2 y/o L3 de un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en 115B-151-423 AM1 y 115B-151-423 AM2; y/o las secuencias de aminoácidos de una o más de las CDR H1, H2 o H3 del dominio variable de la cadena pesada comprenden las secuencias de aminoácidos respectivamente de las CDR H1, H2 y H3 de un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en 115B-151-423 AM1 y 115B-151-423 AM2. En ciertos aspectos, la CDR L3 del anticuerpo comprende la secuencia de aminoácidos de la CDR L3 de un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en 115B-151-423 AM1 y 115B-151-423 AM2; y/o las CDR H2 y/o H3 del anticuerpo comprenden las secuencias de aminoácidos respectivamente de las CDR H2 y H3 de un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en 115B-151-423 AM1 y 115B-151-423 AM2.

En ciertos aspectos, el ácido nucleico codifica un anticuerpo en el que las CDR H2 y H3 del anticuerpo comprenden

las secuencias de aminoácidos respectivamente de las CDR H2 y H3 de un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en 115B-151-423 AM1 y 115B-151-423. AM2. En ciertos aspectos, las CDR H1, H2 y H3 del anticuerpo comprenden las secuencias de aminoácidos respectivamente de las CDR H1, H2 y H3 de un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en 115B-151-423 AM1 y 115B-151-423 AM2; y/o las CDR L1, L2 y L3 del anticuerpo comprenden las secuencias de aminoácidos respectivamente de las CDR L1, L2 y L3 de un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en 115B-151-423 AM1 y 115B-151-423 AM2.

En ciertos aspectos, el ácido nucleico codifica un anticuerpo en el que las CDR H1, H2 y H3 del anticuerpo comprenden las secuencias de aminoácidos respectivamente de las CDR H1, H2 y H3 de un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en 115B-151-423 AM1 y 115B- 151-423 AM2.

En ciertos aspectos, el ácido nucleico codifica un anticuerpo en el que las CDR L1, L2 y L3 del anticuerpo comprenden las secuencias de aminoácidos respectivamente de las CDR L1, L2 y L3 de un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en 115B-151-423 AM1 y 115B -151-423 AM2.

En ciertos aspectos, el ácido nucleico codifica un anticuerpo en el que las CDR H1, H2 y H3 del anticuerpo comprenden las secuencias de aminoácidos respectivamente de las CDR H1, H2 y H3 de 115B-151-423 AM1; y las CDR L1, L2 y L3 del anticuerpo comprenden las secuencias de aminoácidos respectivamente de las CDR L1, L2 y L3 de 115B-151-423 AM1.

En ciertos aspectos, el ácido nucleico codifica un anticuerpo en el que las CDR H1, H2 y H3 del anticuerpo comprenden las secuencias de aminoácidos respectivamente de las CDR H1, H2 y H3 de 115B-151-423 AM2; y las CDR L1, L2 y L3 del anticuerpo comprenden las secuencias de aminoácidos respectivamente de las CDR L1, L2 y L3 de 115B-151-423 AM2.

En ciertos aspectos, el ácido nucleico codifica un anticuerpo como se muestra en las Figuras 1-4.

En ciertos aspectos, el ácido nucleico codifica anticuerpos. Los anticuerpos derivados o variantes de la presente invención comprenden al menos una mutación (tal como deleciones, adiciones y/o sustituciones) en al menos una de las regiones determinantes de la complementariedad de la cadena pesada ("CDR") (por ejemplo, la CDR 1 de la cadena pesada, CDR 2 de la cadena pesada o CDR 3 de la cadena pesada), al menos una mutación (tal como deleciones, adiciones y/o sustituciones) en las regiones CDR de la cadena ligera (por ejemplo, la CDR 1 de la cadena ligera, la CDR 2 de la cadena ligera, o la CDR 3 de la cadena ligera) como se describió anteriormente.

III. Preparación de moléculas de anticuerpo.

Los anticuerpos descritos en la presente memoria (p.ej., anticuerpos completos, anticuerpos biespecíficos, anticuerpos poliespecíficos, anticuerpos de cadena sencilla, unicuerpos, nanoanticuerpos, aficuerpos, anticuerpos de cadena sencilla, anticuerpos quiméricos y fragmentos de unión inmunoespecífica de los mismos) descritos en la presente memoria pueden prepararse por métodos bien conocidos por los expertos en la técnica.

A) Síntesis química.

Utilizando la información de secuencia proporcionada en la presente memoria, por ejemplo, los anticuerpos de esta invención (p.ej., 115B-151-423 AM1 y/o 115B-151-423 AM2, etc.) o variantes de los mismos, pueden sintetizarse químicamente utilizando métodos bien conocidos de síntesis de péptidos. La síntesis en fase sólida en la que el aminoácido C-terminal de la secuencia se ancla a un soporte insoluble seguido de la adición secuencial de los aminoácidos restantes de la secuencia es un método preferido para la síntesis química de anticuerpos de cadena sencilla. Las técnicas para la síntesis en fase sólida son descritas por Barany y Merrifield, *Solid Phase Peptide Synthesis*; pág. 3-284 en *The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology*. Vol. 2: *Special Methods in Peptide Synthesis*, Parte A., Merrifield et al. (1963) *J. Am. Chem. Soc.*, 85: 2149-2156 y Stewart et al. (1984) *Solid Phase Peptide Synthesis*, 2ª ed. Pierce Chem. Co., Rockford, Ill.

B) Expresión recombinante de anticuerpos.

Los anticuerpos de esta invención (p.ej., 115B-151-423 AM1 y/o 115B-151-423 AM2, etc.), o variantes de los mismos, se preparan utilizando mecanismos convencionales bien conocidos por los expertos en la técnica. Utilizando la información de secuencia proporcionada en la presente memoria, los ácidos nucleicos que codifican el anticuerpo deseado se pueden sintetizar químicamente de acuerdo con una serie de métodos convencionales conocidos por los expertos en la técnica. La síntesis de oligonucleótidos se lleva a cabo preferiblemente en máquinas de síntesis de oligonucleótidos en fase sólida comercialmente disponibles (Needham-VanDevanter et al. (1984) *Nucleic Acids Res.* 12: 6159-6168) o se sintetizan manualmente utilizando el método del triéster de fosforamidita en fase sólida descrito por Beaucage *et. al.* (Beaucage et. al. (1981) *Tetrahedron Letts.* 22(20): 1859-1862).

Alternativamente, los ácidos nucleicos que codifican el anticuerpo se pueden amplificar y/o clonar de acuerdo con métodos convencionales. Por lo tanto, los anticuerpos descritos en la presente memoria se pueden preparar por expresión recombinante de, p.ej., ácidos nucleicos que codifican cadenas ligeras y pesadas en una célula anfitriona. Para expresar el anticuerpo de forma recombinante, la célula anfitriona se transfecta con uno o más vectores de expresión recombinantes que portan moléculas de ácido nucleico que codifican el anticuerpo de modo que la proteína del anticuerpo expresada se exprese en la célula anfitriona y, preferiblemente, se secrete al medio en el que se cultivan las células anfitrionas, de cuyo medio se puede recuperar el anticuerpo. Los mecanismos de clonación molecular para lograr estos fines son conocidos en la técnica. Una amplia variedad de métodos para producir y amplificación *in vitro* es adecuada para la construcción de ácidos nucleicos recombinantes. Los ejemplos de estos mecanismos y las instrucciones suficientes para dirigir a los expertos a través de muchos ejercicios de clonación se encuentran en Berger y Kimmel, *Guide to Molecular Cloning Techniques, Methods in Enzymology* volumen 152 Academic Press, Inc., San Diego, CA (Berger); Sambrook et al. (1989) *Molecular Cloning - A Laboratory Manual* (2ª ed.) Vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Press, NY, (Sambrook); y *Current Protocols in Molecular Biology*, F.M. Ausubel et al., eds., *Current Protocols*, una empresa conjunta entre Greene Publishing Associates, Inc. and John Wiley & Sons, Inc., (Suplemento de 1994) (Ausubel). Los métodos para producir inmunoglobulinas recombinantes también se conocen en la técnica. Véanse Cabilly, Patente de Estados Unidos Núm. 4.816.567; y Queen et al. (1989) *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 86: 10029-10033. Además, los protocolos detallados para la expresión de anticuerpos también son proporcionados por Liu et al. (2004) *Cancer Res.* 64: 704-710, Poul et al. (2000) *J. Mol. Biol.* 301: 1149-1161, y similares.

Para expresar los anticuerpos de la invención, se obtienen primero una o varias moléculas de ácido nucleico que codifican el dominio o los dominios de anticuerpo (p.ej., las regiones de cadena ligera y pesada). Estas moléculas de ácido nucleico se pueden obtener a partir de una línea celular de hibridoma que expresa un anticuerpo monoclonal 115B-151-423 (descrito en la Patente de Estados Unidos Núm. 7.531.640) y modificar por medios bien conocidos en la técnica (tales como mutagénesis dirigida al sitio) para generar anticuerpos de la presente invención.

En varios aspectos, la secuencia o secuencias de ácido nucleico que codifican el anticuerpo se pueden sintetizar químicamente u obtener mediante amplificación por PCR y/o expresión recombinante de acuerdo con métodos convencionales bien conocidos por los expertos en la técnica.

Una vez que se obtienen los ácidos nucleicos que codifican el anticuerpo, estos fragmentos de ácido nucleico se pueden manipular adicionalmente mediante técnicas de ADN recombinante convencionales, p.ej. para convertir los genes de la región variable en un anticuerpo (tal como, pero no limitado a, genes de una cadena de anticuerpo completa, genes del fragmento Fab o un gen de scFv). En estas manipulaciones, un fragmento de ácido nucleico que codifica VL o VH se conecta operativamente a otro fragmento de ácido nucleico que codifica otra proteína, tal como la región constante del anticuerpo o un conector flexible. Se pretende que el término "conectado operativamente", según se utiliza en este contexto, signifique que los dos fragmentos de ácido nucleico están unidos de manera que las secuencias de aminoácidos codificadas por los dos fragmentos de ácido nucleico permanecen en marco.

En un método alternativo, se puede construir un gen de scFv con regiones CDR de tipo salvaje (tales como las del anticuerpo monoclonal 115B-151-423) y a continuación mutar utilizando mecanismos conocidos en la técnica.

La molécula de ácido nucleico aislada que codifica la región VH se puede convertir en un gen de cadena pesada completo conectando operativamente la molécula de ácido nucleico que codifica VH a otra molécula de ácido nucleico que codifica regiones constantes de cadena pesada (CH1, CH2 y CH3). Las secuencias de los genes de la región constante de la cadena pesada humana se conocen en la técnica (véase, por ejemplo, Kabat et al. (1991) *Sequences of Proteins of Biological Interest*, quinta edición, Departamento de Salud y Servicios Humanos de EE. UU., Publicación NIH Núm. 91-3242). En otro aspecto, los anticuerpos descritos en la presente memoria incluyen todas las regiones constantes de cadenas pesadas humanas conocidas, incluyendo, pero no se limitan a, todos los alotipos conocidos de la región constante de la cadena pesada humana. Los fragmentos de ácido nucleico que abarcan estas regiones se pueden obtener mediante amplificación por PCR convencional. La región constante de la cadena pesada puede ser, por ejemplo, una región constante IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM o IgD.

La molécula de ácido nucleico aislada que codifica la región VL puede convertirse en un gen de cadena ligera completo (así como un gen de cadena ligera Fab) conectando operativamente la molécula de ácido nucleico que codifica VL a otra molécula de ácido nucleico que codifica la región constante de la cadena ligera, CL. Las secuencias de los genes de la región constante de la cadena ligera humana se conocen en la técnica (véase p.ej., Kabat *et al.* más arriba). En diversos aspectos, los anticuerpos descritos en la presente memoria incluyen todas las regiones constantes de cadenas ligeras humanas conocidas, incluyendo, pero no limitadas a, todos los alotipos conocidos de la región constante de la cadena ligera humana. Los fragmentos de ácido nucleico que abarcan estas regiones se pueden obtener mediante amplificación por PCR convencional. La región constante de cadena ligera puede ser una región constante kappa o lambda, pero más preferiblemente es una región constante kappa.

Se debe entender que las denominaciones específicas de regiones marco (FR) y CDR dentro de una región particular de cadena pesada o ligera pueden variar dependiendo de la convención o sistema de numeración utilizados para identificar tales regiones (p.ej. Chothia, Kabat, soporte lógico de modelado de *AbM* de Oxford Molecular, etc., todos los cuales son conocidos por los expertos en la técnica). Para los fines de la presente descripción, se usa el sistema de numeración de Kabat.

Para crear un gen de scFv, los fragmentos de ácido nucleico que codifican VH y VL se conectan operativamente directamente entre sí o entre sí a través del ácido nucleico que codifica un conector flexible. Los conectores ilustrativos se muestran anteriormente en la Tabla 3 e incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, el conector (Gly4Ser) (SEC ID NO: 24), el conector GPAKELTPLKEAKVS (SEC ID NO: 26) (véase, la Publicación de Patente de Estados Unidos Núm. 2004-0175379 A1), y similares. Los ejemplos de otras secuencias de conectores que se pueden utilizar son bien conocidos por los expertos en la técnica. (véase, p.ej., Bird et al. (1988) *Science* 242: 423-426; Huston et al. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 85: 5879-5883; McCafferty et al. (1990) *Nature*, 348: 552-554; Huston et al. (1991) *Meth. Enzymol.*, 203: 46-88; Johnson y Bird (1991) *Meth. Enzymol.*, 203: 88-89; y similares).

Para expresar los anticuerpos, o porciones de anticuerpos, las moléculas de ácido nucleico que codifican regiones de anticuerpo parciales o completas obtenidas como se describió anteriormente, se insertan en vectores de expresión de manera que los genes se conectan operativamente a secuencias de control de la transcripción y la traducción. En este contexto, se pretende que el término "conectado operativamente" signifique que un gen de anticuerpo se liga en un vector de modo que las secuencias de control de la transcripción y la traducción dentro del vector cumplan su función prevista de regular la transcripción y la traducción del gen de anticuerpo. El vector de expresión y las secuencias de control de la expresión se seleccionan para que sean compatibles con la célula anfitriona de expresión utilizada. El gen de la cadena ligera del anticuerpo y el gen de la cadena pesada del anticuerpo pueden insertarse en vectores separados o, más típicamente, ambos genes se insertan en el mismo vector de expresión. Los genes del anticuerpo se insertan en el vector de expresión por medio de métodos convencionales (por ejemplo, ligación de sitios de restricción complementarios en el fragmento del gen del anticuerpo y el vector, o ligación de extremos romos si no están presentes sitios de restricción). Antes de la inserción de las secuencias de cadena ligera o pesada, el vector de expresión ya puede portar secuencias de la región constante del anticuerpo. Por ejemplo, un enfoque para convertir las secuencias VH y VL en genes de anticuerpo completos consiste en insertarlas en vectores de expresión que ya codifican regiones constantes de cadena pesada y constantes de cadena ligera, respectivamente, de manera que el segmento VH esté conectado operativamente al "segmento" CH dentro del vector y el segmento VL está conectado operativamente al segmento CL dentro del vector. Adicionalmente o alternativamente, el vector de expresión recombinante puede codificar un péptido señal que facilita la secreción de la cadena de anticuerpo desde una célula anfitriona. El gen de la cadena del anticuerpo se puede clonar en el vector de manera que el péptido señal se conecte en marco al extremo amino del gen de la cadena del anticuerpo. En ciertas realizaciones, el péptido individual puede ser un péptido señal de inmunoglobulina o un péptido señal heterólogo (p.ej., un péptido señal de una proteína que no sea inmunoglobulina).

Además de los genes de la cadena del anticuerpo, los vectores de expresión recombinantes pueden llevar secuencias reguladoras que controlan la expresión de los genes de la cadena del anticuerpo en una célula anfitriona. Se pretende que el término "secuencia reguladora" incluya promotores, potenciadores y otros elementos de control de la expresión (p.ej., señales de poliadenilación) que controlan la transcripción o traducción de los genes de la cadena del anticuerpo. Tales secuencias reguladoras son descritas, por ejemplo, por Goeddel (1990) *Gene Expression Technology. Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, California. Los expertos en la técnica apreciarán que el diseño del vector de expresión, incluyendo la selección de secuencias reguladoras, puede depender de factores tales como la elección de la célula anfitriona que se vaya a transformar, el nivel de expresión de proteínas deseado, etc. Ciertas secuencias reguladoras preferidas para la expresión de células anfitrionas de mamíferos pueden incluir elementos virales que dirigen altos niveles de expresión de proteínas en células de mamífero, tales como promotores y/o potenciadores derivados de citomegalovirus ("CMV") (tales como el promotor/potenciador de CMV), Virus de simio 40 ("SV40") (tal como el promotor/potenciador de SV40), adenovirus (tal como el promotor tardío principal de adenovirus ("AdMLP")) y polioma. Para una descripción más detallada de los elementos reguladores virales, y sus secuencias, véanse p.ej., las Patentes de Estados Unidos Núm. 5.168.062, 4.510.245 y 4.968.615.

Además de los genes de la cadena del anticuerpo y las secuencias reguladoras, los vectores de expresión recombinantes pueden llevar secuencias adicionales, tales como secuencias que regulan la replicación del vector en células anfitrionas (p.ej., orígenes de replicación) y genes marcadores seleccionables. El gen marcador seleccionable facilita la selección de células anfitrionas en las que se ha introducido el vector (véase, p.ej., las Patente de Estados Unidos Núm.4.399.216, 4.634.665 y 5.179.017). Por ejemplo, típicamente el gen marcador seleccionable confiere resistencia a fármacos, tales como G418, higromicina o metotrexato, a una célula anfitriona en la que se ha introducido el vector. Los genes marcadores seleccionables ilustrativos incluyen, pero no se limitan a, el gen de dihidrofolato reductasa ("DHFR") para su uso en células anfitrionas dhfr con selección/amplificación de metotrexato y el gen de neomicina ("neo") para la selección con G418.

Para la expresión de las cadenas ligera y pesada, los vectores de expresión que codifican las cadenas pesada y ligera se transfectan en una célula anfitriona mediante técnicas convencionales. Se pretende que las diversas formas del término "transfección" abarquen una amplia variedad de técnicas usadas comúnmente para la introducción de ADN exógeno en una célula anfitriona procariótica o eucariótica, p.ej., electroporación, precipitación con fosfato cálcico, transfección con DEAE-dextrano y similares. Aunque teóricamente es posible expresar los anticuerpos de la invención en células anfitrionas procarióticas o eucarióticas, la expresión de anticuerpos en células eucarióticas, y lo más preferiblemente células anfitrionas de mamífero, es la más preferida debido a que es más probable que tales células eucarióticas, y en particular la células de mamífero, son más propensas que las células procarióticas a ensamblarse y secretar un anticuerpo intacto inmunológicamente activo y adecuadamente plegado. Se ha informado de que la expresión procariótica de genes de anticuerpos es ineficaz para la producción de altos rendimientos de anticuerpos activos (Véase, Boss, M. A. y Wood, C. R, Immunology Today 6: 12-13 (1985)).

Las células anfitrionas de mamífero adecuadas para expresar los anticuerpos recombinantes de la invención incluyen, pero no se limitan a, las células de ovario de hámster chino ("CHO") (incluyendo células CHO dhfr-, descritas por Urlaub y Chasin (1980) Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 77: 4216-4220, utilizadas con un marcador seleccionable DHFR, por ejemplo, como describen Kaufman y. Sharp (1982) Mol. Biol., 159: 601-621), células de mieloma NSO, células COS, y células de mieloma SP2/0. Cuando se introducen vectores de expresión recombinantes que codifican genes de anticuerpos en células anfitrionas de mamífero, los anticuerpos se producen cultivando las células anfitrionas durante un periodo de tiempo suficiente para permitir la expresión del anticuerpo en las células anfitrionas o, más preferiblemente, la secreción del anticuerpo al medio de cultivo en el que se cultivan las células anfitrionas. Los anticuerpos se pueden recuperar del medio de cultivo utilizando métodos convencionales de purificación de proteínas.

Las células anfitrionas también se pueden utilizar para producir porciones de anticuerpos intactos, tales como fragmentos Fab, fragmentos F(ab')₂ o moléculas scFv. Se entenderá que las variaciones del procedimiento anterior están dentro del alcance de la presente invención. Por ejemplo, puede ser deseable transfectar una célula anfitriona con una molécula de ácido nucleico que codifica la cadena ligera o la cadena pesada (pero no ambas) de un anticuerpo de la presente invención. La tecnología de ADN recombinante también se puede usar para eliminar algunas o todas las moléculas de ácido nucleico que codifican una o ambas cadenas ligeras y pesadas que no son necesarias para unirse a la proteína del VIH (p.ej., p24 y/o p26). Las moléculas expresadas a partir de tales moléculas de ácido nucleico truncado también están incluidas en los anticuerpos de la invención.

En un sistema ilustrativo para expresión recombinante de un anticuerpo, o porción de unión a antígeno del mismo, se introduce un vector de expresión recombinante que codifica tanto la cadena pesada del anticuerpo como la cadena ligera del anticuerpo en células CHO dhfr- (p.ej., mediante transfección mediada por fosfato de calcio). Dentro del vector de expresión recombinante, los genes de la cadena pesada y ligera del anticuerpo están cada uno conectados operativamente a los elementos reguladores del potenciador de CMV/promotor AdMLP para conducir a altos niveles de transcripción de los genes. El vector de expresión recombinante también puede portar un gen DHFR, que permite la selección de células CHO que se han transfectado con el vector. Las células se pueden cultivar en medio sin hipoxantina y timidina para obtener las células CHO que han adquirido el gen DHFR del vector de transfección.

Los métodos de escrutinio específicos de antígenos se pueden utilizar para identificar aquellos clones que expresan la mayor cantidad de anticuerpo. Esos clones individuales se expanden y se pueden volver a escrutar y se pueden seleccionar líneas celulares preferidas. Las células anfitrionas transformantes seleccionadas se cultivan para permitir la expresión de las cadenas ligera y pesada del anticuerpo y el anticuerpo intacto se recupera del medio de cultivo. Las técnicas de biología molecular convencionales se utilizan para preparar el vector de expresión recombinante, transfectar las células anfitrionas, seleccionar los transformantes, cultivar las células anfitrionas y recuperar el anticuerpo del medio de cultivo.

También se reconocerá que, en ciertos aspectos, los sistemas de expresión de fagos y levaduras también se pueden utilizar para expresar y recuperar anticuerpos, particularmente anticuerpos de cadena sencilla.

Los métodos anteriores son ilustrativos y no se pretende que sean limitantes. Utilizando las enseñanzas proporcionadas en la presente memoria, estarán disponibles para un experto en la técnica otros métodos para expresar anticuerpos, o fragmentos de anticuerpos descritos en la presente memoria.

IV. Inmunoensayos.

En diversas realizaciones, los anticuerpos descritos en la presente memoria o fragmentos de anticuerpos de los mismos se pueden utilizar en inmunoensayos para la detección de proteínas del núcleo del VIH-1 o fragmentos de proteínas (Grupos M y O), VIH-2 o VIH-1 y VIH-2 simultáneamente en una muestra. Un "fragmento" de anticuerpo es una subunidad del anticuerpo que reacciona de la misma manera, funcionalmente, que el anticuerpo completo con respecto a las propiedades de unión (p.ej., tiene sustancialmente la misma especificidad y/o afinidad). Los

inmunoensayos pueden realizarse utilizando cualquier formato conocido en la técnica, tal como, pero no limitado a, un formato sándwich, un formato de inhibición competitiva (incluyendo ensayos de inhibición competitiva directa o inversa), un formato de polarización de fluorescencia y similares.

5 Se cree que cuando los anticuerpos descritos en la presente memoria se utilizan combinados en un inmunoensayo, por ejemplo, en un ensayo en sándwich, se puede detectar mínimamente el antígeno del núcleo (p24) de los subtipos A, B, C, D, E, F, G y O de grupos M y O de VIH-1, y el antígeno del núcleo de VIH-2 (p26) en una muestra del paciente. También se cree que se pueden detectar cantidades de 25 picogramos (es decir, picogramos de antígeno del núcleo/ml de suero o plasma) del antígeno p24 de VIH-1 y el antígeno p26 de VIH-2 utilizando las combinaciones de anticuerpos descritas anteriormente.

10 En ciertos inmunoensayos para la detección cualitativa de la proteína del núcleo del VIH-1 (p24) y/o la proteína del núcleo del VIH-2 (p26) o fragmentos de las mismas en una muestra de prueba, al menos un anticuerpo anti-VIH descrito en la presente memoria se pone en contacto con al menos una muestra de prueba que se sospecha que contiene o que se sabe que contiene la proteína del núcleo de VIH o fragmento de proteína para formar un complejo inmunitario de anticuerpo-proteína del núcleo de VIH. Los anticuerpos descritos en la Sección I de la presente memoria se pueden utilizar en tales inmunoensayos para formar tales complejos inmunitarios de anticuerpo-proteína del núcleo de VIH en al menos una muestra de prueba. Estos complejos inmunitarios se pueden detectar a continuación utilizando mecanismos rutinarios conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, el anticuerpo anti-VIH se puede marcar con una marca detectable para detectar la presencia de un complejo de anticuerpo-proteína del núcleo de VIH. Alternativamente, las proteínas del núcleo del VIH-1 y/o VIH-2 o fragmentos de las mismas en la muestra de prueba se pueden marcar con una marca detectable y los complejos inmunitarios de anticuerpo-proteína de VIH resultantes se pueden detectar utilizando mecanismos rutinarios conocidos por los expertos en la técnica. Las marcas detectables y su anclaje a los anticuerpos se comentan con más detalle más abajo.

15 Alternativamente, se puede añadir un segundo anticuerpo que se une a p24 y/o p26 y/o fragmentos de las mismas y que contiene una marca detectable a la muestra de prueba y se usa para detectar la presencia del complejo de anticuerpo-proteína del VIH. Se puede utilizar cualquier marca detectable conocida en la técnica. Las marcas detectables y su anclaje a los anticuerpos se comentan con más detalle más abajo.

20 En general, los ensayos tipo sándwich para la detección cualitativa o cuantitativa de las proteínas del núcleo del VIH-1 y/o VIH-2 (p24 y/o p26) o fragmentos de las mismas, utilizan un primer anticuerpo para capturar la proteína o fragmento de proteína de VIH-1 y/o VIH-2 que forma un inmunocomplejo de anticuerpo/proteína de VIH que a continuación se une a un segundo anticuerpo que comprende una marca detectable (p.ej., un compuesto generador de señal capaz de generar una señal detectable), o una etiqueta que captura una marca detectable. O bien el primer anticuerpo (de captura) o el segundo anticuerpo pueden comprender uno o más anticuerpos anti-VIH descritos en la presente memoria. La detección de la señal indica, por lo tanto, la presencia de los complejos y, por lo tanto, la presencia del antígeno en la muestra. La cantidad de antígeno o antígenos en la muestra de prueba también se puede calcular, ya que la señal generada es proporcional a la cantidad de antígeno en la muestra (véase, p.ej., la Patente de Estados Unidos Núm.: 6.015.662). En diversas realizaciones, el primer anticuerpo (de captura) se adsorbe sobre una fase (p.ej., una micropartícula, un pocillo de microtitulación, un cordón, etc.) sólida o semisólida (p.ej., gel), o forma un complejo con un fluido que se puede separar p.ej., a través de una separación de partición. Los ejemplos de fases sólidas usadas en inmunoensayos incluyen, pero no se limitan a, materiales porosos y no porosos, partículas de látex, partículas magnéticas, micropartículas, esferas, membranas, pocillos de microtitulación. tiras de prueba y tubos de plástico.

25 En una realización ilustrativa, se proporcionan 115B-151-423 AM1 y 115B-151-423 AM2 o un fragmento de los mismos adsorbidos sobre una fase sólida o gel. La muestra de prueba se pone en contacto a continuación con el anticuerpo o fragmento del mismo de manera que, si el antígeno p24 y/o el antígeno p26 están presentes en la muestra del paciente, se forman complejos anticuerpo/antígeno como una primera mezcla. Por ejemplo, se pueden formar complejo tanto de anticuerpo/antígeno p24 como de anticuerpo/antígeno p26 si el sujeto/muestra tienen tanto VIH-1 como VIH-2. A continuación, se agrega un producto conjugado que comprende un anticuerpo sonda, que se une a un epítipo distinto y compatible con el epítipo al que se han unido 115B-151-423 AM1 o 115B-151-423 AM2 y un compuesto generador de señal. Los complejos de anticuerpo/antígeno/sonda de anticuerpo se forman a continuación como una segunda mezcla. A continuación, se detecta el antígeno de VIH-1 y/o VIH-2 en la muestra al detectar la presencia de la señal generada y, por lo tanto, los complejos de anticuerpo/antígeno/sonda de anticuerpo.

30 Otra forma de detectar los complejos formados es utilizar un producto conjugado que comprende un tercer anticuerpo anclado a un compuesto generador de señal. En particular, una vez que se han formado los complejos de anticuerpo/antígeno/anticuerpo descritos anteriormente (es decir, siendo el último anticuerpo el segundo anticuerpo que no está marcado), se puede añadir un producto conjugado que se une al segundo anticuerpo no marcado en la solución. El producto conjugado puede comprender, por ejemplo, un antígeno o anti-anticuerpo capaz de unirse al

segundo anticuerpo unido anclado a un compuesto generador de señal capaz de generar una señal detectable. La detección de la señal indica, por lo tanto, la presencia de los complejos y, por lo tanto, la presencia del antígeno en la muestra.

5 El diseño del ensayo depende de las afinidades y especificidades de los anticuerpos utilizados, la precisión de los resultados obtenidos, la conveniencia, la naturaleza de la fase sólida, etc. (Véase la Patente de Estados Unidos Núm. 5.104.790 para una discusión de diferentes formatos de ensayo de antígeno.) Además, también se debe observar que el anticuerpo de captura inicial utilizado en el inmunoensayo puede estar anclado covalentemente o no covalentemente (p.ej., iónico, hidrófobo, etc.) a la fase sólida o gel. El anticuerpo (o anticuerpos) se puede unir al soporte sólido o soporte de gel mediante adsorción, mediante enlace covalente utilizando un agente de acoplamiento químico o mediante otros medios conocidos en la técnica, siempre que tal unión no interfiera en la capacidad del anticuerpo para unirse al analito objetivo (p.ej., proteína del núcleo del VIH). Además, si es necesario, el soporte sólido se puede transformar químicamente para permitir la reactividad con diversos grupos funcionales en el anticuerpo. Dicha transformación química puede implicar el uso de ciertos agentes de acoplamiento tales como, pero no limitados a, anhídrido maleico, N-hidroxisuccinimida y 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida.

Como se indicó anteriormente, en ciertas realizaciones el producto conjugado (o reactivo indicador) comprenderá un anticuerpo (o quizás anti-anticuerpo, dependiendo del ensayo), anclado a un compuesto generador de señal o marca. Este compuesto generador de señal o "marca" es en sí mismo detectable o se puede hacer reaccionar con uno o más compuestos adicionales para generar un producto detectable. Los ejemplos de compuestos generadores de señal incluyen cromógenos, radioisótopos (p.ej., ^{125}I , ^{131}I , ^{32}P , ^3H , ^{35}S y ^{14}C), compuestos quimioluminiscentes (p.ej., acridinio), partículas (visibles o fluorescentes), puntos cuánticos, nanopartículas, ácidos nucleicos, agentes complejantes o catalizadores tales como enzimas (p.ej., fosfatasa alcalina, fosfatasa ácida, peroxidasa de rábano picante, beta-galactosidasa y ribonucleasa). En el caso del uso de enzimas (p.ej., fosfatasa alcalina o peroxidasa de rábano picante), la adición de un sustrato cromó-, fluoro-, o lumo-génico da como resultado la generación de una señal detectable. Otros sistemas de detección tales como la fluorescencia resuelta en el tiempo, la fluorescencia de reflexión interna, la amplificación (p.ej., la reacción en cadena de la polimerasa) y la espectroscopía Raman también son útiles.

30 Otro ensayo ilustrativo en el que se pueden utilizar los anticuerpos descritos en la presente memoria implica poner en contacto simultáneamente: 1) un anticuerpo (unido a un soporte sólido), 2) la muestra de prueba y 3) un reactivo indicador que comprende un anticuerpo o fragmento del mismo (p.ej., 115B-151-423 AM1 o 115B-151-423 AM2) a los que se une un compuesto generador de señal, para formar una mezcla. La mezcla se incuba a continuación durante un tiempo y en condiciones suficientes para formar complejos de anticuerpo/antígeno/anticuerpo. La presencia, si la hay, de antígeno de VIH-1 y/o VIH-2 presente en la muestra de prueba y capturado en la fase sólida se determina detectando la señal medible generada por el compuesto generador de señal. La cantidad de antígeno presente en la muestra de prueba es proporcional a la señal generada. En este ensayo o los descritos anteriormente, los anticuerpos descritos en la presente memoria se pueden utilizar como fase de captura o como parte del reactivo indicador en solución (es decir, el reactivo que comprende un anticuerpo y un compuesto generador de señal).

En un formato competitivo directo, se utiliza una alícuota de proteína del núcleo de VIH-1 y/o VIH-2 marcada, o fragmentos de la misma, de una concentración conocida para competir con p24 y/o p26 o fragmentos de las mismas en una muestra de prueba para unirse al anticuerpo de VIH-1 (tal como un anticuerpo de la presente invención). En la técnica se conocen los péptidos de la proteína del núcleo del VIH-1 y/o del VIH-2, o fragmentos de los mismos y los métodos para producir tales péptidos.

En un ensayo de competición directa, un anticuerpo inmovilizado (tal como un anticuerpo anti-VIH de la presente invención) puede ponerse en contacto secuencial o simultáneamente con la muestra de prueba y una proteína del núcleo de VIH-1 y/o VIH-2 marcada o fragmento de la misma. La proteína del núcleo del VIH-1 y/o VIH-2, o fragmentos de la misma, se pueden marcar con cualquier marca detectable conocida por los expertos en la técnica, incluyendo aquellas marcas detectables comentadas anteriormente en relación con el formato de ensayo sándwich. En este ensayo, el anticuerpo de la presente invención se puede inmovilizar sobre un soporte sólido utilizando las técnicas descritas previamente en la presente memoria. Alternativamente, el anticuerpo de la presente invención se puede acoplar a un anticuerpo, tal como un anticuerpo antiespecie, que se ha inmovilizado sobre un soporte sólido, tal como una micropartícula.

La proteína del núcleo de VIH-1 y/o VIH-2 marcada, o fragmentos de la misma, la muestra de prueba y el anticuerpo se incuban en condiciones similares a las descritas anteriormente en relación con el formato de ensayo sándwich. A continuación se generan dos especies diferentes de complejos de anticuerpo-proteína de VIH. Específicamente, uno de los complejos de anticuerpo-proteína de VIH generados contiene una marca detectable mientras que el otro complejo de anticuerpo-proteína de VIH no contiene una marca detectable. El complejo de anticuerpo-proteína del VIH se puede separar, pero no necesariamente, del resto de la muestra de prueba antes de la cuantificación de la marca detectable. Independientemente de si el complejo de anticuerpo-proteína de VIH se separa del resto de la

muestra de prueba, la cantidad de marca detectable en el complejo de anticuerpo-proteína de VIH se cuantifica a continuación. La concentración de la proteína del núcleo de VIH-1 y/o VIH-2, o fragmentos de la misma, en la muestra de prueba se puede determinar a continuación comparando la cantidad de marca detectable en el complejo de anticuerpo-proteína de VIH con una curva patrón. La curva patrón se puede generar utilizando diluciones seriadas de la proteína del núcleo del VIH-1 y/o VIH-2, o fragmentos de la misma, mediante espectroscopía de masas, graviméricamente y mediante otros mecanismos conocidos en la técnica.

El complejo de anticuerpo-proteína de VIH se puede separar de la muestra de prueba uniendo el anticuerpo a un soporte sólido, tal como los soportes sólidos comentados anteriormente en conexión con el formato de ensayo sándwich, y a continuación retirando el resto de la muestra de prueba del contacto con el soporte sólido

En ciertos aspectos, también se puede utilizar un ensayo de competición inversa, utilizando los anticuerpos anti-VIH descritos en la presente memoria.

En ciertas realizaciones, se proporciona un ensayo de polarización de fluorescencia. En una realización, un anticuerpo anti-VIH (p.ej., como se describe en la presente memoria) o fragmento funcionalmente activo del mismo se pone en contacto primero con una muestra de prueba no marcada que se sospecha que contiene proteínas de VIH-1 y/o VIH-2 o fragmentos de las mismas para formar un complejo de proteína de VIH-anticuerpo no marcado. El complejo de proteína de VIH-anticuerpo no marcado se pone a continuación en contacto con una proteína de VIH, un fragmento de proteína de VIH o un análogo de la proteína de VIH de la misma marcados fluorescentemente. La proteína de VIH, el fragmento de proteína de VIH o el análogo de la proteína de VIH marcados compiten con cualquier proteína de VIH o fragmento de proteína de VIH no marcados en la muestra de prueba por la unión al anticuerpo o fragmento funcionalmente activo del mismo. Se determina la cantidad de complejo de proteína de VIH-anticuerpo marcado formado y se determina la cantidad de proteína de VIH-1 y/o VIH-2 en la muestra de prueba, p.ej., mediante el uso de una curva patrón.

En los diversos ensayos descritos en la presente memoria, la detección de marcas detectables es por medios bien conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, si se usa una marca enzimática, el complejo marcado se hace reaccionar con un sustrato para la marca que proporciona una reacción cuantificable tal como el desarrollo del color. Si la marca es una marca radioactiva, la marca se cuantifica utilizando un contador de centelleo. Si la marca es una marca fluorescente, la marca se cuantifica estimulando la marca con una luz de un color (que se conoce como "longitud de onda de excitación") y detectando otro color (que se conoce como "longitud de onda de emisión") que es emitido por la marca en respuesta a la estimulación. Si la marca es una marca quimioluminiscente, la marca se cuantifica detectando la luz emitida visualmente o mediante el uso de luminómetros, película de rayos X, película fotográfica de alta velocidad, una cámara CCD, etc. Si se ha cuantificado la cantidad de la marca en el complejo, se puede determinar la concentración del analito diana en la muestra de prueba, p.ej., mediante el uso de una curva patrón que se ha generado utilizando diluciones seriadas de proteínas del núcleo de VIH-1 y/o VIH-2 o fragmentos de las mismas de concentración conocida. Aparte de utilizar diluciones seriadas del analito o los analitos diana, la curva patrón se puede generar graviméricamente, mediante espectroscopía de masas y mediante otros mecanismos conocidos en la técnica.

Se pretende que los inmunoensayos descritos en la presente memoria sean ilustrativos y no limitantes. Utilizando las enseñanzas proporcionadas en la presente memoria, estarán disponibles muchos otros inmunoensayos para un experto en la técnica. Dichos procedimientos de ensayo, incluyendo los descritos anteriormente y a continuación, son bien conocidos en la técnica (véanse *Immunological Methods*, vols. I y II, 1979 y 1981, Eds., Lefkovits y Pernis, Academic Press, Nueva York; *Antibodies*, 1982, eds., Kennett et al., Plenum Press, Nueva York; y *Handbook of Experimental Immunology*, 1978, ed., Weir, Blackwell Scientific Publications, St. Louis, Mo.).

Se debe observar que los anticuerpos de la presente invención preferiblemente se pueden utilizar solos como un único anticuerpo de captura, o solos como una única sonda y/o anticuerpo conjugado. Sin embargo, también se pueden utilizar en pares o en tríos en los ensayos descritos en la presente memoria. Adicionalmente, las combinaciones de los anticuerpos de la presente invención (y fragmentos de los mismos) se pueden utilizar con otros anticuerpos que tienen especificidades por epítopos de VIH-1 y/o VIH-2, distintas de las especificidades de los epítopos de los anticuerpos de la presente invención. Por lo tanto, los presentes anticuerpos pueden actuar como componentes en una mezcla o "cóctel" de anticuerpos de VIH-1 y/o VIH-2. Así, por ejemplo, este cóctel puede incluir un anticuerpo de la presente invención que detecta p24 de VIH-1 y p26 de VIH-2 y un anticuerpo que detecta un determinante antigénico de la envoltura del VIH en la proteína transmembrana o glicoproteína extracelular. De esta manera, es posible detectar varios determinantes antigénicos de diferentes proteínas de uno o más virus (p.ej., VIH-1 y VIH-2) simultáneamente.

Además, debe observarse que los anticuerpos de la presente invención se pueden utilizar en un ensayo combinado que detecta: 1) antígenos, tales como los descritos anteriormente (p.ej., p24 y p26) y 2) anticuerpos contra VIH (mediante el uso de, por ejemplo, antígenos de la envoltura (p.ej., gp41 del grupo M y O de VIH-1 y gp36 de VIH-2). Se considera que cualquiera de tales ensayos combinados, que utiliza los anticuerpos de la presente invención, está

dentro del alcance de la invención.

Los ejemplos de fluidos biológicos que pueden someterse a prueba mediante los inmunoensayos anteriores incluyen, pero no se limitan a, plasma, suero, fluido cerebroespinal, saliva, lágrimas, lavados nasales o extractos acuosos de tejidos y células. Las muestras de prueba también pueden comprender un virus completo inactivado o un antígeno p24 o p26 parcialmente purificado o recombinante.

También se debe observar que, en ciertas realizaciones, los anticuerpos mencionados anteriormente se pueden utilizar, cuando se marcan apropiadamente, como sondas competitivas contra anticuerpos del núcleo de VIH-1 y -2 en muestras de suero para unirse a p24 de VIH-1 y p26 de VIH-2 obtenidas recombinantemente.

Adicionalmente, los anticuerpos de la presente invención o fragmentos de los mismos se pueden utilizar en sistemas de detección que utilizan células fijadas o tejidos fijados, con un marcaje apropiado de cada anticuerpo. En particular, la muestra de tejido se pone en contacto con un producto conjugado que comprende un compuesto generador de señal anclado a uno de los anticuerpos de la presente invención con el fin de formar una mezcla. La mezcla se incuba a continuación durante un tiempo y en condiciones suficientes para que se formen los complejos de antígeno/anticuerpo. La presencia del antígeno presente en la muestra se determina al detectar la señal generada. Los anticuerpos también se pueden utilizar para purificar antígeno p24 de VIH-1 y antígeno p26 de VIH-2 mediante, por ejemplo, cromatografía de afinidad.

Además, en ciertos aspectos, los anticuerpos de la invención se pueden unir a matrices y utilizar para la purificación por afinidad de antígenos de VIH-1 y/o VIH-2 específicos de, por ejemplo, cultivos celulares, o tejidos biológicos tales como sangre e hígado. Los anticuerpos, por ejemplo, se pueden anclar a, o inmovilizar sobre, un sustrato o soporte. La solución que contiene los determinantes antigénicos de VIH se pone a continuación en contacto con el anticuerpo inmovilizado durante un tiempo y en condiciones adecuadas para la formación de complejos inmunitarios entre el anticuerpo y los polipéptidos que contienen los determinantes p24 y p26. El material no unido se separa de los complejos inmunitarios unidos. Los complejos o fragmentos antigénicos se separan a continuación del soporte.

Los anticuerpos anti-VIH descritos en la presente memoria también pueden servir como herramientas de investigación para el mapeo de epítomos de las proteínas p24 y p26 de VIH. Adicionalmente, se debe observar que no solo los anticuerpos anti-VIH descritos en la presente memoria se unen a proteínas y precursores de proteínas de productos aislados clínicos de VIH que contienen la región o regiones elegidas como diana de determinantes antigénicos, además, los anticuerpos se unen a proteínas recombinantes y análogos sintéticos de las proteínas que contienen el determinante o los determinantes antigénicos. De este modo, por ejemplo, los anticuerpos descritos en la presente memoria se pueden utilizar en experimentos de unión que implican proteínas recombinantes y análogos sintéticos de p24 de VIH-1 y p26 de VIH-2.

Adicionalmente, los anticuerpos descritos en la presente memoria que no están marcados se pueden utilizar en ensayos de aglutinación o se pueden utilizar combinados con anticuerpos marcados que son reactivos con el anticuerpo, tales como anticuerpos específicos para inmunoglobulina.

V. Composiciones farmacéuticas y administración farmacéutica.

Los anticuerpos descritos en la presente memoria pueden incorporarse a composiciones farmacéuticas adecuadas para su administración a un sujeto. Típicamente, la composición farmacéutica comprende una cantidad terapéutica o farmacéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-VIH descrito en la presente memoria junto con un portador o excipiente farmacéuticamente aceptables.

Los anticuerpos se pueden administrar en la forma "nativa" o, si se desea, en forma de sales, ésteres, amidas, profármacos, derivados y similares, con la condición de que la sal, éster, amida, profármaco o derivado sean adecuados farmacológicamente, es decir, eficaces en el presente o los presentes métodos. Las sales, ésteres, amidas, profármacos y otros derivados de los agentes activos pueden prepararse utilizando procedimientos convencionales conocidos por los expertos en la técnica de la química orgánica sintética y descritos, por ejemplo, por March (1992) *Advanced Organic Chemistry; Reactions, Mechanisms and Structure*, 4^a Ed. N.Y. Wiley-Interscience.

Los métodos para formular tales derivados son conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, las sales disulfuro de una serie de agentes de suministro se describen en la Publicación PCT WO 2000/059863. De forma similar, se pueden preparar sales ácidas de péptidos, peptoides u otros miméticos terapéuticos, a partir de la base libre utilizando metodología convencional que típicamente implica la reacción con un ácido adecuado. Generalmente, la forma de base del fármaco se disuelve en un disolvente orgánico polar tal como metanol o etanol y el ácido se agrega al mismo. La sal resultante precipita o puede sacarse de la solución mediante la adición de un disolvente menos polar. Los ácidos adecuados para preparar sales de adición de ácido incluyen, pero no se limitan a, ácidos orgánicos, por ejemplo, ácido acético, ácido propiónico, ácido glicólico, ácido pirúvico, ácido oxálico, ácido

málico, ácido malónico, ácido succínico, ácido maleico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido benzoico, ácido cinámico, ácido mandélico, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido p-toluenosulfónico, ácido salicílico y similares, así como ácidos inorgánicos, p.ej., ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico y similares. Una sal de adición de ácido se puede reconvertir a la base libre por tratamiento con una base adecuada. Ciertas sales de adición de ácido particularmente preferidas de los agentes activos de la presente memoria incluyen sales haluros, tales como las que se pueden preparar utilizando ácidos clorhídrico o bromhídrico. Por el contrario, la preparación de sales alcalinas de los agentes activos de esta invención se forma de manera similar utilizando una base farmacéuticamente aceptable tal como hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, hidróxido de amonio, hidróxido de calcio, trimetilamina o similares. En ciertas realizaciones, las sales alcalinas incluyen sales de metales alcalinos, p.ej., la sal de sodio y sales de cobre.

Para la preparación de formas salinas de fármacos alcalinos, el pKa del contraión es preferiblemente al menos aproximadamente 2 pH más bajo que el pKa del fármaco. De forma similar, para la preparación de formas de sales de fármacos ácidos, el pKa del contraión es preferiblemente al menos aproximadamente 2 pH más alto que el pKa del fármaco. Esto permite que el contraión lleve el pH de la solución a un nivel más bajo que el $pH_{máx}$ para alcanzar la meseta de sal, a la que la solubilidad de la sal prevalece sobre la solubilidad del ácido o base libres. Se pretende que la regla de diferencia generalizada en unidades de pKa del grupo ionizable en el ingrediente farmacéutico activo (API) y en el ácido o base haga que la transferencia de protones sea energéticamente favorable. Cuando los pKa del API y el contraión no son significativamente diferentes, se puede formar un complejo sólido pero se puede desproporcionar rápidamente (es decir, descomponerse en las entidades individuales de fármacos y contraiones) en un ambiente acuoso.

En aspectos típicos, el contraión es un contraión farmacéuticamente aceptable. Las formas de sal aniónica adecuadas incluyen, pero no están limitadas a acetato, benzoato, bencilato, bitartrato, bromuro, carbonato, cloruro, citrato, edetato, edisilato, estolato, fumarato, gluceptato, gluconato, hidrobromuro, hidrocioruro, yoduro, lactato, lactobionato, malato, maleato, mandelato, mesilato, bromuro de metilo, sulfato de metilo, mucato, napsilato, nitrato, pamoato (embonato), fosfato y difosfato, salicilato y desalicilato, estearato, succinato, sulfato, tartrato, tosilato, trietioduro, valerato, y similares, mientras que las formas de sal catiónica adecuadas incluyen, pero sin limitación, aluminio, benzatina, calcio, etilendiamina, lisina, magnesio, meglumina, potasio, procaína, sodio, trometamina, cinc y similares.

En diversos aspectos, la preparación de ésteres implica típicamente la funcionalización de grupos hidroxilo y/o carboxilo que están presentes dentro de la estructura molecular del agente activo. En ciertas realizaciones, los ésteres son típicamente derivados sustituidos con acilo de grupos alcohol libres, es decir, radicales que derivan de ácidos carboxílicos de la fórmula $RCOOH$ donde R es alquilo, y preferiblemente es alquilo inferior. Los ésteres se pueden reconvertir a los ácidos libres, si se desea, utilizando procedimientos convencionales de hidrogenólisis o hidrólisis.

Las amidas también se pueden preparar utilizando mecanismos conocidos por los expertos en la técnica o descritos en la bibliografía pertinente. Por ejemplo, las amidas se pueden preparar a partir de ésteres, utilizando reactivos de amina adecuados, o se pueden preparar a partir de un anhídrido o un cloruro de ácido mediante reacción con amoníaco o una alquilamina inferior.

Como se indicó anteriormente, en ciertos aspectos, la composición farmacéutica comprende una cantidad terapéutica o farmacéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-VIH descrito en la presente memoria junto con un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable. Según se utiliza en la presente memoria, "portador farmacéuticamente aceptable" o "excipiente farmacéuticamente aceptable" incluyen cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, recubrimiento, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardadores de la absorción, y similares que son fisiológicamente compatibles.

Los portadores farmacéuticamente aceptables pueden contener uno o más compuestos fisiológicamente aceptables que actúan, por ejemplo, para estabilizar la composición o para aumentar o disminuir la absorción del agente o los agentes activos. Los compuestos fisiológicamente aceptables pueden incluir, por ejemplo, carbohidratos, tales como glucosa, sacarosa o dextranos, antioxidantes, tales como ácido ascórbico o glutatión, agentes quelantes, proteínas de bajo peso molecular, protectores y potenciadores de la captación tales como lípidos, composiciones que reducen la eliminación o hidrólisis de los agentes activos, o excipientes u otros estabilizadores y/o tampones.

Otros compuestos fisiológicamente aceptables, particularmente de uso en la preparación de comprimidos, cápsulas, cápsulas de gelatina, y similares incluyen, pero no se limitan a, aglutinantes, diluyentes/cargas, disgregantes, lubricantes, agentes de suspensión y similares.

En ciertos aspectos para fabricar una forma de dosificación oral (p.ej., un comprimido), se añaden un excipiente (p.ej., lactosa, sacarosa, almidón, manitol, etc.), un disgregante opcional (p.ej. carbonato de calcio, carboximetilcelulosa cálcica, glicolato almidón sódico, crospovidona etc.), un aglutinante (p.ej. alfa-almidón, goma

arábica, celulosa microcristalina, carboximetilcelulosa, polivinilpirrolidona, hidroxipropilcelulosa, ciclodextrina, etc.) y un lubricante opcional (p.ej., talco, estearato de magnesio, polietilenglicol 6000, etc.), por ejemplo, al componente o componentes activos (p.ej., péptido activo) y la composición resultante se comprime. Cuando sea necesario, el producto comprimido se recubre, p.ej., mediante métodos conocidos para enmascarar el sabor o para la disolución entérica o la liberación sostenida. Los materiales de recubrimiento adecuados incluyen, pero no se limitan a, etilcelulosa, hidroximetilcelulosa, polioxietilenglicol, acetato ftalato de celulosa, ftalato de hidroxipropilmetilcelulosa y Eudragit (Rohm & Haas, Alemania, copolímero metacrílico-acrílico).

Otros compuestos fisiológicamente aceptables incluyen agentes humectantes, agentes emulsionantes, agentes dispersantes o conservantes que son particularmente útiles para prevenir el crecimiento o la acción de microorganismos. Diversos conservantes son bien conocidos e incluyen, por ejemplo, fenol y ácido ascórbico. Un experto en la técnica apreciaría que la elección de portador o portadores farmacéuticamente aceptables, incluyendo un compuesto fisiológicamente aceptable, depende, por ejemplo, de la ruta de administración del agente o los agentes activos y de las características fisicoquímicas concretas del agente o los agentes activos.

En ciertos aspectos, los excipientes son estériles y generalmente no contienen materia no deseable. Estas composiciones se pueden esterilizar mediante técnicas de esterilización convencionales y bien conocidas. Para diversos excipientes de formas de dosificación oral tales como comprimidos y cápsulas, no se requiere esterilidad. Normalmente ser suficiente el patrón USP/NF.

Las composiciones farmacéuticas pueden estar en una variedad de formas. Éstas incluyen, por ejemplo, formas de dosificación líquidas, semisólidas y sólidas, tales como soluciones líquidas (p.ej. soluciones inyectables e infusibles), dispersiones o suspensiones, comprimidos, píldoras, polvos, liposomas y supositorios. La forma preferida depende del modo de administración y la aplicación terapéutica deseados. Las composiciones preferidas típicas están en forma de soluciones inyectables o infusibles, tales como composiciones similares a las utilizadas para la inmunización pasiva de seres humanos con otros anticuerpos. Un modo típico de administración es parenteral (p.ej., intravenoso, subcutáneo, intraperitoneal, intramuscular). En ciertas realizaciones, el anticuerpo se administra por infusión o inyección intravenosa. En otra realización, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo se administra por inyección intramuscular o subcutánea.

Los anticuerpos de la presente invención se pueden administrar mediante una variedad de métodos conocidos en la técnica, aunque para muchas aplicaciones terapéuticas, la ruta/modo de administración preferido es la inyección o infusión intravenosa. Como apreciarán los expertos en la técnica, la ruta y/o el modo de administración variarán dependiendo de los resultados deseados. En ciertos aspectos, el compuesto activo se puede preparar con un portador que protegerá el compuesto contra la liberación rápida, tal como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes, parches transdérmicos y sistemas de suministro microencapsulados. Se pueden utilizar polímeros biodegradables, biocompatibles, tales como etilvinilacetato, polianhídridos, poli(ácido glicólico), colágeno, poliortoésteres y ácido poliláctico. Muchos métodos para la preparación de tales formulaciones están patentados o son conocidos en general por los expertos en la técnica (véase, p.ej., Robinson ed. (1978). Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, Marcel Dekker, Inc., Nueva York).

En ciertos aspectos, el anticuerpo se puede administrar por vía oral, por ejemplo, con un diluyente inerte o un portador comestible asimilable. El compuesto (y otros ingredientes, si se desea) también se puede incluir en una cápsula de gelatina de cubierta dura o blanda, comprimirse en comprimidos, comprimidos bucales, trociscos, cápsulas, elixires, suspensiones, jarabes, obleas y similares. Para administrar un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la invención por una administración diferente a la parenteral, puede ser necesario recubrir el compuesto con, o coadministrar el compuesto con, un material para evitar su inactivación.

También se pueden incorporar a las composiciones compuestos activos complementarios. En ciertas realizaciones, el anticuerpo o porción de anticuerpo se co-formulan y/o se co-administran con uno o más agentes terapéuticos adicionales. Tales terapias combinadas pueden utilizar ventajosamente dosificaciones más bajas de los agentes terapéuticos administrados, evitando así posibles toxicidades o complicaciones asociadas con monoterapias o, alternativamente, actúan de forma sinérgica o aditiva para potenciar el efecto terapéutico.

Los regímenes de dosificación pueden ajustarse para proporcionar la respuesta óptima deseada (p.ej., una respuesta terapéutica o profiláctica). Por ejemplo, se puede administrar un único bolo, se pueden administrar varias dosis divididas a lo largo del tiempo o se puede reducir o aumentar proporcionalmente la dosis según lo indicado por las exigencias de la situación terapéutica. Es especialmente ventajoso formular composiciones parenterales en forma de unidad de dosificación para facilidad de administración y uniformidad de dosificación. Según se utiliza en la presente memoria forma unitaria de dosificación se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para los sujetos mamíferos que se van a analizar; conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el portador farmacéutico requerido. La especificación para las formas de unidades de dosificación de la presente invención está dictada por y depende directamente de (a) las características únicas del compuesto activo y el efecto

terapéutico o profiláctico particular que debe lograrse y (b) las limitaciones inherentes en la técnica de composición de tal compuesto activo para el tratamiento de la sensibilidad en individuos.

5 Un intervalo ilustrativo, no limitante para una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de un anticuerpo o porción de anticuerpo de la invención es 0,1-20 mg/kg, más preferiblemente 0,5-10 mg/kg. Debe tenerse en cuenta que los valores de dosificación pueden variar de acuerdo con el tipo y la gravedad de la afección que se vaya a aliviar. Se debe entender adicionalmente que para cualquier sujeto concreto, los regímenes de dosificación específicos deben ajustarse a lo largo del tiempo de acuerdo con la necesidad individual y el criterio profesional de la persona que administra o supervisa la administración de las composiciones, y que los intervalos de dosificación establecidos en la presente memoria son meramente ilustrativos y no se pretende que limiten el alcance o la práctica de la composición reivindicada.

VI. Kits.

15 En otra realización, estos kits se proporcionan para la práctica de cualquiera de los métodos descritos en la presente memoria. Los kits típicamente comprenden un recipiente que contiene uno o más de los anticuerpos descritos en la presente memoria. En ciertas realizaciones, los anticuerpos se marcan con una marca detectable. En ciertas realizaciones, los anticuerpos se proporcionan en una formulación farmacéutica (p.ej. una formulación de dosificación unitaria tal como un supositorio, comprimido, comprimido oblongo, parche, etc.) y/o se pueden combinar opcionalmente con uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.

20 En ciertas realizaciones, los kits incluyen adicionalmente uno o más reactivos adicionales para poner en práctica los métodos descritos en la presente memoria. Tales reactivos incluyen, pero sin limitación, anticuerpos conjugados con marcas detectables, sustratos para compuestos generadores de señales, tampones, sustratos que tienen anticuerpos anclados a los mismos, diluciones seriadas de proteínas de VIH-1 y/o VIH-2 y similares.

25 Además, los kits incluyen opcionalmente materiales de marcaje y/o instructivos que proporcionan directrices (es decir, protocolos) para la práctica de los métodos o el uso de los "agentes terapéuticos" o "agentes profilácticos" o reactivos de detección de esta invención. Ciertos materiales instructivos describen el uso de uno o más agentes activos de esta invención para inhibir o prevenir la infección terapéutica o profilácticamente. Los materiales instructivos también pueden, opcionalmente, ilustrar dosificaciones/regímenes terapéuticos preferidos, contraindicaciones y similares. Ciertos materiales instructivos proporcionan protocolos para poner en práctica uno o más de los ensayos descritos en la presente memoria.

30 Si bien los materiales instructivos comprenden típicamente materiales escritos o impresos, no están limitados a ellos. En esta invención se contempla cualquier medio capaz de almacenar tales instrucciones y comunicarlas a un usuario final. Tales medios incluyen, pero no están limitados a, medios de almacenamiento electrónicos (p.ej., discos magnéticos, cintas, cartuchos, chips), medios ópticos (p.ej., CD ROM) y similares. Tales medios pueden incluir direcciones de sitios de Internet que proporcionan tales materiales instructivos.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos se ofrecen para ilustrar, pero no para limitar la invención reivindicada.

Ejemplo 1

Determinación de la afinidad de unión del anticuerpo a los antígenos

50 Se recubrieron esferas de azlactona (obtenidas de Pierce, Rockford, IL) con antígenos de VIH mezclando 50 mg de esferas, 80 µg de antígenos de VIH (Grupo M de VIH-1, Grupo O de VIH-1, o rp26 de VIH-2), 100 µL de tampón de carbonato 0,5 M, pH 10, y 900 µL de agua destilada y mediante rotación de 1 hora a temperatura ambiente. Las esferas se centrifugaron a continuación en una centrifuga durante 30 s a 14.000 xg y el sobrenadante se aspiró. Las esferas se resuspendieron en 900 µL de tampón Trizma HCl 1 M y 100 µL de BSA al 10% y se hicieron rotar durante 2 horas a temperatura ambiente para bloquear puntos de unión de antígeno libres. Las esferas se lavaron dos veces con PBS a pH 7,4 y finalmente se resuspendieron en 30 ml de PBS a pH 7,4.

60 Las soluciones de muestra que contenían los mAb anti-VIH (concentración fija) y series de antígenos de VIH con diversas concentraciones se prepararon de la siguiente manera. Los mAb anti-VIH se diluyeron a 1 pM en PBS a pH 7,4 con BSA al 1%. Los antígenos del VIH se diluyeron en 20 ml de mAb anti-VIH 1 pM para alcanzar una concentración final de 100 pM. Se prepararon series de diluciones 1:2 de antígenos anti-VIH mezclando volúmenes iguales de antígeno en solución de mAb anti-VIH 1 pM y solución de los mAb anti-VIH 1 pM. La serie resultante de mAb anti-VIH y antígenos de VIH incluía concentraciones de antígeno de 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,13, 1,56, 0,79, 0,39, 0,20, 0,10 y 0,05 pM. Las soluciones de muestra de antígeno-mAb se incubaron durante 8 horas a temperatura ambiente para permitir que la unión alcanzara el equilibrio antes del ensayo en un aparato denominado KinExA

(Sapidyne Instruments Inc., Boise, ID) para determinar la cantidad relativa de los mAb libres en la fase de solución. Las esferas de azlactona recubiertas con antígeno de VIH se cargaron en el depósito de microesferas KinExA. El aparato extrajo automáticamente 467 μL de suspensión de esferas del depósito de esferas y empaquetó las esferas en su celda de flujo. Las líneas de muestra del aparato se colocaron en soluciones de muestra de antígeno-mAb. El aparato procesó a continuación 4 mL de solución de muestra sobre las esferas empaquetadas. Las esferas recubiertas con antígeno de VIH capturaron una pequeña porción de mAb libre en la solución de muestra sin perturbar el equilibrio de unión. Después de lavar las esferas con PBS a pH 7,4, el aparato procesó 1,5 ml de producto conjugado de anti-Cy5 de ratón de cabra o anti-Cy5 humano de cabra de 1 $\mu\text{g/ml}$ sobre las esferas para unirse a los mAb capturados sobre las esferas. Las diferencias en la fluorescencia antes de la captura de mAb y después de la unión del producto conjugado fueron referidas como señales.

Los datos de la señal frente a la concentración de antígeno se ajustaron matemáticamente utilizando el enfoque de mínimos cuadrados mediante el soporte lógico proporcionado con el aparato. Se calculó y se informó sobre la constante de disociación (K_D) (véase la Tabla 4).

Tabla 4. K_D , k_{on} y k_{off} calculadas para anticuerpos de VIH.

	Antígeno						
	Grupo M de VIH-1			Grupo O de VIH-1			rp26 de VIH2
Ab	K_D (pm)	k_{on} ($M^{-1}s^{-1}$)	k_{off} (s^{-1})	K_D (pm)	k_{on} ($M^{-1}s^{-1}$)	k_{off} (s^{-1})	K_D (pm)
WT	8,8	$0,81 \times 10^7$	$7,1 \times 10^{-5}$	10,0	$1,4 \times 10^7$	$1,4 \times 10^{-4}$	10,8
AM1	0,96	$1,1 \times 10^7$	$1,1 \times 10^{-5}$	0,27	$1,7 \times 10^7$	$4,6 \times 10^{-6}$	0,84
AM2	0,62	$1,1 \times 10^7$	$6,8 \times 10^{-6}$	0,58	$1,7 \times 10^7$	$9,9 \times 10^{-6}$	0,79

* Las velocidades de disociación (k_{off}) se calculan a partir de K_D y k_{on} . ND: no determinado. N/A: no aplicable

LISTA DE SECUENCIAS

(SEQ ID NO: 44) 115B-151-423 AM1 mG1k

5 **Secuencia de nucleótidos de la cadena pesada**
 CAGGTT CAGCTGCAGCAGTCTGGAGCTGAACTGATGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGATA
 TCCTGCAAGGCTTCTGGATACACATTCACTAGCTACTGGATAGAGTGGATAAAACAGAGG
 CCTGGACATGGCCTTGAGTGGATTGGAGAGATTTTGCCTGGAGCTGGTAGTCTTAACAAC
 AATGAGAAGTTCAGGGACAAGGCCACATTCAGTCTGATACTTCCTCCAACACAGCCTAC
 ATGCAACTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCCGTCTATTACTGTGCAAGAGGTTAC
 CGTTACGACGGCATCATGTTCTATTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCGAGCC
 AAAACGACACCCCCATCTGTCTATCCACTGGCCCCCTGGATCTGCTGCCCAAACCTAACTCC
 ATGGTGACCCCTGGGATGCCTGGTCAAGGGCTATTTCCCTGAGCCAGTGACAGTGACCTGG
 AACTCTGGATCCCTGTCCAGCGGTGTGCACACCTTCCAGCTGTCTGCGAGTCTGACCTC
 TACTCTGAGCAGCTCAGTGACTGTCCCTCCAGCACCTGGCCAGCGAGACCGTCCACC
 TGCAACGTTGCCACCCGGCCAGCAGCACCAAGGTGGACAAGAAAATTGTGCCAGGGAT
 TGTGGTTGTAAGCCTTGCATATGTACAGTCCCAGAAGTATCATCTGTCTTCATCTTCCCC
 CCAAAGCCCAAGGATGTGCTCACCATTACTCTGACTCCTAAGGTCACGTGTGTTGTGGTA
 GACATCAGCAAGGATGATCCCAGGTTCCAGTTCAGCTGGTTTTGTAGATGATGTGGAGGTG
 CACACAGCTCAGACGCAACCCCGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACTTTCCGCTCAGTCACT
 GAACTTCCCATCATGCACCAGGACTGGCTCAATGGCAAGGAGTTCAAATGCAGGGTCAAC
 AGTGCAGCTTTCCCTGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAACCAAAGGCAGACCGAAG
 GCTCCACAGGTGTACACCATTCCACCTCCCAAGGAGCAGATGGCCAAGGATAAAGTCACT
 CTGACCTGCATGATAACAGACTTCTTCCCTGAAGACATTACTGTGGAGTGGCAGTGGAAAT
 GGGCAGCCAGCGGAGAATAACAAGAACTCAGCCCATCATGGACACAGATGGCTCTTAC
 TTCGTCTACAGCAAGCTCAATGTGCAGAAAGCAACTGGGAGGCAGGAAATACTTTCCACC
 TGCTCTGTGTTACATGAGGGCCTGCACAACCACCTACTGAGAAGAGCCTCTCCACTCT
 CCTGGTAAATAA

(SEQ ID NO: 45) Secuencia de nucleótidos de la cadena ligera

GACATCCAGATGACTCAGTCTCCAGCCTCCCTATCTGCATCTGTGGGAGAACTGTCACC
 ATCAGATGTCGAACAAGTGAGAATATTTACAGTTATTTAGCATGGTATCAGCAGAAACCG
 GGAAAATCTCCTCACCTCCTGGTCTATAATACAAAGACCTTAGCAGAAGGTGTGCCATCT
 AGGTTCACTGGCAGTGGATCAGGAACACAATTTTCTCTGAAGATCAACAGCCTGCAGCCT
 GAAGATTTTGGGAGTTATTACTGTCAACATCATTATGATGAGGTGCTGACGTTCCGTTCT
 GGGACCAAGCTGGAACGAAACGGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATCTTCCACCA
 TCCAGTGGCAGTTAACATCTGGAGGTGCCTCAGTCGTGTGCTTCTTGAACAACCTTCTAC
 CCCAAAGACATCAATGTCAAGTGAAGATTGATGGCAGTGAACGACAAAATGGCGTCCCTG
 AACAGTTGGACTGATCAGGACAGCAAAGACAGCACCTACAGCATGAGCAGCACCCCTCAG
 TTGACCAAGGACGAGTATGAACGACATAACAGCTATACCTGTGAGGCCACTCACAAGACA
 TCAACTTCACCCATTGTCAAGAGCTTCAACAGGAATGAGTGTTAA

10

(SEQ ID NO: 46) 115B-151-423 AM1 mG1k

Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada

QVQLQQSGAELMKPGASVKISCKASGYTFTSYWIEWIKQRPHGLEWIGEILPGAGSLNN
 NEKFRDKATFTADTSSNTAYMQLSLLTSEDSAVYYCARGYRYDGMIFYWGQGLVTVSAA
 KTTPPSVYPLAPGSAAQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFFPAVLQSDL
 YTLSSSVTVPSSTWVSETVTCNVAHPASSTKVDKIVPRDCGCKPCICTVPEVSSVFIFP
 PKPKDVLTIITLTPKVTVCVVVDISKDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQTQPREEQFNSTFRSVS
 ELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAAFPAPIEKTISKTKGRPKAPQVYTIPPPKEQMAKDKVS
 LTCMITDFFPEDITVEWQWNGQPAENYKNTQPIMDTDGSYFVYSKLVNQKSNWEAGNTFT
 CSVLHEGLHNNHTEKSLSHSPGK

15 (SEQ ID NO: 47) Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera

DIQMTQSPASLSASVGETVITTCRTSENIYSYLAWYQQKPGKSPHLLVYNTKTLAEGVPS
 RFSGSGSGTQFSLKINSIQPEDFGSYQCQHHYDEVLTFGSGTKLELKRADAAPTVSIFPP
 SSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSERQNGVLNSWTDQDSKDYSTYSMSSTLT
 LTKDEYERHNSYTCEATHKTTSTSPIVKSFNRNEC

(SEQ ID NO: 48) **115B-151-423 AM2 mG1k**

Secuencia de nucleótidos de la cadena pesada

CAGGTTTCAGCTGCAGCAGTCTGGAGCTGAACTGATGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGATA
 TCCTGCAAGGCTTCTGGATACACATTCAGTACTGAGTGGATAAAAACAGAGG
 CCTGGACATGGCCTTGAGTGGATTGGAGAGATTTTGCCTGGAAGTGGTAGTCTTAACAAC
 AATGAGAAGTTCAGGGACAAGGCCACATTCAGTCTGATACTTCCCTCAACACAGCCTAC
 ATGCAACTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCCGTCTATTACTGTGCAAGAGGTTAC
 CGTTACGACGGCATCATGTTCTATTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCAGCC
 AAAACGACACCCCCATCTGTCTATCCACTGGCCCCCTGGATCTGCTGCCCAAATACTCC
 ATGGTGACCCCTGGGATGCCTGGTCAAGGGCTATTTCCCTGAGCCAGTGACAGTGACCTGG
 AACTCTGGATCCCTGTCCAGCGGTGTGCACACCTTCCCAGCTGTCTGCAGTCTGACCTC
 TACACTCTGAGCAGCTCAGTGACTGTCCCCTCCAGCACCTGGCCCAGCGAGACCCTCACC
 TGCAACGTTGCCACCCGGCCAGCAGCACCAAGGTGGACAAGAAAATTGTGCCCAGGGAT
 TGTGGTTGTAAGCCTTGACATATGTACAGTCCAGAAAGTATCATCTGTCTTTCATCTTCCCC
 CCAAAGCCCAAGGATGTGCTCACCATTACTCTGACTCCTAAGGTACAGTGTGTTGTGGTA
 GACATCAGCAAGGATGATCCCAGGTCCAGTTCAGCTGGTTTGTAGATGATGTGGAGGTG
 CACACAGCTCAGACGCAACCCCGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACTTTCCGCTCAGTCACT
 GAACTTCCCATCATGCACCAGGACTGGCTCAATGGCAAGGAGTTCAAATGCAGGGTCAAC
 AGTGACGCTTTCCCTGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAACCAAAGGCAGACCAGG
 GCTCCACAGGTGTACACCATTCCACCTCCAAGGAGCAGATGGCCAAGGATAAAGTCAGT
 CTGACCTGCATGATAACAGACTTCTTCCCTGAAGACATTACTGTGGAGTGGCAGTGGAAAT
 GGGCAGCCAGCGGAGAATAACAAGAACTCAGCCCATCATGGACACAGATGGCTCTTAC
 TTCGTCTACAGCAAGCTCAATGTGCAGAAGAGCAACTGGGAGGCAGGAAATACTTTACC
 TGCTCTGTGTTACATGAGGGCCTGCACAACCACCATACTGAGAAGAGCCTCTCCACTCT
 CCTGGTAAATAA

5 (SEQ ID NO: 49) **Secuencia de nucleótidos de la cadena ligera**

GACATCCAGATGACTCAGTCTCCAGCCTCCCTATCTGCATCTGTGGGAGAACTGTCACC
 ATCAGATGTCGAACAAGTGAGAATATTTACAGTTATTTAGCATGGTATCAGCAGAAACCG
 GGAAAATCTCTCACCTCCTGGTCTATAATACAAAGACCTTAGCAGAAGGTGTGCCATCT
 AGGTTCAAGTGGCAGTGGATCAGGAACACAATTTTCTCTGAAGATCAACAGCCTGCAGCCT
 GAAGATTTTGGGAGTTATTACTGTCAACATCATTATGATGAGGTGCTGACGTTCCGTTCT
 GGGACCAAGCTGGAAGTGAACCGGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATCTTCCCACCA
 TCCAGTGAGCAGTTAACATCTGGAGGTGCCTCAGTCTGTGCTTCTTGAACAACCTTCTAC
 CCCAAAGACATCAATGTCAAGTGAAGATTGATGGCAGTGAACGACAAAATGGCGTCCCTG
 AACAGTTGGACTGATCAGGACAGCAAAGACAGCACCTACAGCATGAGCAGCACCCTCAGG
 TTGACCAAGGACGAGTATGAACGACATAACAGCTATACCTGTGAGGCCACTCACAAAGACA
 TCAACTTCACCCATTGTCAAGAGCTTCAACAGGAATGAGTGTTAA

(SEQ ID NO: 50) **115B-151-423 AM2 mG1k**

Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada

QVQLQQSGAELMKPGASVKISCKASGYTFTSYWIEWIKQRPGHGLEWIGEILPGTGLNN
 NEKFRDKATFTADTSSNTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARGYRYDGMIFYWGQGLVTVSAA
 KTTPPSVYPLAPGSAQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDL
 YTLSSSVTVPSSTWVPSSTWVPSSTWVPSSTWVPSSTWVPSSTWVPSSTWVPSSTWVPS
 PKPKDVLITITLTPKVTCTVVDISKDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQTQPREEQFNSTFRSVS
 ELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAAFPAPIEKTISKTKGRPKAPQVYTIPPPKEQMAKDKVS
 LTCMITDFFPEDITVEWQWNGQPAENYKNTQPIMDTDGSYFVYSKLVNQKSNWEAGNTFT
 10 CSVLHEGLHNNHTEKSLSHSPGK

(SEQ ID NO: 51) **Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera**

DIQMTQSPASLSASVGETVTITCRTSENIYSYLAWYQQKPGKSPHLLVYNTKTLAEGVPS
 RFGSGSGTQFSLKINSLQPEDFGSYQCQHHYDEVLTFGSGTKLELKRADAAPTVSIFPP
 SSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSRQNGVLNSWTDQDSKDYSTYSMSSTLT
 LTKDEYERHNSYTCETHKTSSTSPIVKSFNRNEC

15 (SEQ ID NO: 52) **115B-151-423 AM1 hG1k**

Secuencia de nucleótidos de la cadena pesada

CAGGTT CAGTGCAGCAGTCTGGAGCTGAACTGATGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGATA
 TCCTGCAAGGCTTCTGGATACACATTCAGTACTGGATAGAGTGGATAAAACAGAGG
 CCTGGACATGGCCTTGAGTGGATTGGAGAGATTTTGCCTGGAGCTGGTAGTCTTAACAAC
 AATGAGAAGTTCAGGGACAAGGCCACATTCAGTCTGATACTTCTCCAACACAGCCTAC
 ATGCAACTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCCGTCTATTACTGTGCAAGAGGTTAC
 CGTTACGACGGCATCATGTTCTATTGGGGCCAAGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCAGCG
 TCGACCAAGGGCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGC
 ACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGG
 AACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTTACAGTCCCTCAGGA
 CTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTACCCTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTAC
 ATCTGCAACGTGAATCACAAGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAA
 TCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCCTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCG
 TCAGTCTTCTTCTCCCCCAAAACCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAG
 GTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTAC
 GTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGC
 ACGTACCGTGTGGTACGCTCCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAG
 TACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAA
 GCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGAGGAGATG
 ACCAAGAACCAGGTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCC
 GTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCTCCCGTGTG
 GACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAG
 CAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAG
 AAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA

(SEQ ID NO: 53) Secuencia de nucleótidos de la cadena ligera

GACATCCAGATGACTCAGTCTCCAGCCTCCCTATCTGCATCTGTGGGAGAAAACCTGTCACC
 ATCACATGTGCAACAAGTGAGAATATTTACAGTTATTTAGCATGGTATCAGCAGAAACCG
 GGAAAATCTCCTCACCTCCTGGTCTATAATACAAAGACCTTAGCAGAAGGTGTGCCATCT
 AGGTT CAGTGGCAGTGGATCAGGAACACAATTTTCTCTGAAGATCAACAGCCTGCAGCCT
 GAAGATTTTGGGAGTTATTACTGTCAACATCATTATGATGAGGTGCTGACGTTCCGTTCT
 GGGACCAAGCTGGAACGAAACGGCGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCC
 CCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACGCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTC
 TATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCC
 CAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTG
 ACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAAACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAG
 GGCTGAGCTCGCCCGTCAAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTGA

5

(SEQ ID NO: 54) 115B-151-423 AM1 hG1k

Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada

QVQLQQSGAELMKPGASVKISCKASGYTFTSYWIEWIKQRPGHGLEWIGEILPGAGSLNN
 NEKFRDKATFTADTSSNTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARGYRYDGMIFYWGQGLVTVSAA
 STKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSG
 LYSLSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTCPPELLEGGP
 SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS
 TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM
 TKNQVSLTCLVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ
 QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

10

(SEQ ID NO: 55) Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera

DIQMTQSPASLSASVGETVTITCRTSENIYSYLAWYQQKPGKSPHLLVYNTKTLAEGVPS
 RFGSGSGTQFSLKINSLQPEDFGSYQCQHHYDEVLTFGSGTKLELKRRTVAAPSVFIFP
 PSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTL
 TLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

(SEQ ID NO: 56) 115B-151-423 AM2 hG1k

Secuencia de nucleótidos de la cadena pesada

CAGGTT CAGCTGCAGCAGTCTGGAGCTGAACTGATGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGATA
 TCCTGCAAGGCTTCTGGATACACATTCACTAGCTACTGGATAGAGTGGATAAAAACAGAGG
 CCTGGACATGGCCTTGAGTGGATTGGAGAGATTTTGCCTGGAAGTGGTAGTCTTAACAAC
 AATGAGAAGTT CAGGGACAAGGCCACATTCAGTCTGATACTTCCCAACACAGCCTAC
 ATGCAACTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCCGTCTATTACTGTGCAAGAGGTTAC
 CGTTACGACGGCATCATGTTCTATTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCAGCG
 TCGACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGC
 ACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAAGGACTACTTCCCCGAAACCGGTGACGGTGTCTGTG
 AACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGACACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGA
 CTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTAC
 ATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAA
 TCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCG
 TCAGTCTTCTTCCCCCAAAACCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAG
 GTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTAC
 GTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGC
 ACGTACCGTGTGGT CAGCGTCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAG
 TACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAA
 GCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGCGAGGAGATG
 ACCAAGAACCAGGT CAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCC
 GTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAAC TACAAGACCACGCTCCCGTGCTG
 GACTCCGACGGCTCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAG
 CAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAG
 AAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA

(SEQ ID NO: 57) Secuencia de nucleótidos de la cadena ligera

GACATCCAGATGACTCAGTCTCCAGCCTCCCTATCTGCATCTGTGGGAGAAAAC TGT CACC
 ATCACATGTCGAACAAGTGAGAATATTTACAGTTATTTAGCATGGTATCAGCAGAAACCG
 GGAAAACTCCTCACCTCCTGGTCTATAATACAAAGACCTTAGCAGAAGGTGTGCCATCT
 AGGTT CAGTGGCAGTGGATCAGGAACACAATTTTCTCTGAAGATCAACAGCCTGCAGCCT
 GAAGATTTTGGGAGTTATTACTGTCAACATCATTATGATGAGGTGCTGACGTTCCGTTCT
 GGGACCAAGCTGGAAGTGAACCGGCTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCC
 CCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTC
 TATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCC
 CAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTG
 ACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAG
 GGCTGAGCTCGCCCGTACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT TGA

5

(SEQ ID NO: 58) 115B-151-423 AM2 hG1k

Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada

QVQLQQSGAELMKPGASVKISCKASGYTFTSYWIEWIKQRPGHLEWIGEILPGTGLNN
 NEKFRDKATFTADTSSNTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARGYRYDGMFYWGQGLVTVSAA
 STKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG
 LYSLSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGP
 SVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS
 TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEM
 TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ
 QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

10

(SEQ ID NO: 59) Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera

DIQMTQSPASLSASVGETVTITCRTSENIYSYLAWYQQKPGKSPHLLVYNTKTLAEGVPS
 RFSGSGSGTQFSLKINSIQPEDFGSYQCQHHYDEVLTFGSGTKLELKRRTVAAPSVFIFP
 PSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTL
 TLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un anticuerpo aislado que se une a una proteína del núcleo de VIH-1 y VIH-2, en donde dicho anticuerpo comprende
- (a) una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 54 o SEQ ID NO: 58 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 55 o SEQ ID NO: 59, o
- (b) una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 46 o SEQ ID NO: 50 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 47 o SEQ ID NO: 51,
- 10 donde dicho anticuerpo se une inmunoespecíficamente a p24 con una constante de disociación en equilibrio (K_D) de menos de 7 pM.
- 15 2. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo multiespecífico y un anticuerpo animal, y un anticuerpo recombinante.
3. El anticuerpo de acuerdo con las reivindicaciones 1 [[,] o 2, en donde dicho anticuerpo es un anticuerpo monoclonal de ratón.
- 20 4. El anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, o 3, en donde dicho anticuerpo está anclado a un sustrato sólido.
5. El anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, o 3 para su uso en la detección de la presencia de uno o más antígenos seleccionados del grupo que consiste en el antígeno del VIH-1 y el antígeno del VIH-2, en una muestra de prueba, comprendiendo dicho método:
- 25 poner en contacto dicha muestra de prueba con dicho anticuerpo que se une a la proteína p24 del Virus de la Inmunodeficiencia Humana 1 y a la proteína p26 del Virus de la Inmunodeficiencia Humana 2 durante un tiempo y en condiciones suficientes para la formación de un complejo de anticuerpo/antígeno; y
- 30 detectar dicho complejo de anticuerpo/antígeno, donde la presencia de dicho complejo indica la presencia de al menos un antígeno VIH-1 o VIH2 en dicha muestra de prueba.
- 35 6. El anticuerpo para el uso de acuerdo con la reivindicación 5, en donde dicho anticuerpo está marcado y dicha detección comprende detectar dicha marca.
7. El anticuerpo para el uso de acuerdo con la reivindicación 5, que comprende adicionalmente:
- 40 poner en contacto un producto conjugado con dicho complejo de anticuerpo/antígeno durante un tiempo y en condiciones suficientes para permitir que dicho producto conjugado se una al antígeno unido que comprende dicho complejo, en donde dicho producto conjugado comprende un segundo anticuerpo anclado a un compuesto generador de señal capaz de generar una señal detectable; y
- 45 detectar presencia de antígeno presente en dicha muestra de prueba detectando una señal generada por dicho compuesto generador de señal, indicando la presencia o intensidad de dicha señal la presencia de al menos un antígeno seleccionado del grupo que consiste en antígeno de VIH-1 y antígeno de VIH-2 en dicha muestra de prueba.
- 50 8. Un kit para detectar la presencia de uno o más antígenos seleccionados del grupo que consiste en el antígeno del VIH-1 y el antígeno del VIH-2, en una muestra de prueba, comprendiendo dicho kit:
- un primer anticuerpo que se une al antígeno p24 de VIH-1 y al antígeno p26 de VIH-2; y/o
- un reactivo indicador que comprende un segundo anticuerpo que se une al antígeno p24 de VIH-1 y al antígeno p26 de VIH-2 al que está anclado un compuesto generador de señal; en donde dicho primer anticuerpo y/o dicho segundo anticuerpo son anticuerpos de acuerdo con una cualquiera de las
- 55 reivindicaciones 1, 2, o 3.
9. El anticuerpo aislado de la reivindicación 1, que comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 54 o SEQ ID NO: 58 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 55 o SEQ ID NO: 59.
- 60 10. El anticuerpo aislado de la reivindicación 1, que comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 46 o SEQ ID NO: 50 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 47 o SEQ ID NO: 51.

Anticuerpo: 115B-151-423 AM1 mG1k

Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada

QVQLQQSGAELMKPGASVKISCKASGYTFTSYWIEWIKQRPGHGLEWIGEILPGAGSLNNN
Fr1 *CDR1* *Fr2* *CDR2*
EKFRDKATFTADTSSNTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARGGYRYDGIMFYWGQGLVTVSAAKT
Fr3 *CDR3* *Fr4*
 TPFSVYPLAPGSAAQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFFPAVLQSDLYTL
 SSSVTVPSSTWTPSETVTCNVAHPASSTKVDKIVPRDCGCKPCICTVPEVSSVFIFPPKPK
 DVLTIITLTPKVTCTVVVDISKDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQTQPREEQFNSTFRSVSELPIM
 HQDWLNGKEFKCRVNSAAFPAIEKTI SKTKGRPKAPQVYTI PPPKEQMAKDKVSLTCMIT
 DFFPEDITVEWQWNGQPAENYKNTQPIMDTDGSYFVYSKLVQKSNWEAGNTFTCSVLHEG
 LHNHHTEKSLSHSPGK

Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera

DIQMTQSPASLSASVGETVTITCRTSENIYSYLAWYQQKPGKSPHLLVYNTKTLAEGVPSR
Fr1 *CDR1* *Fr2* *CDR2*
 FSGSGSGTQFSLKINSLQPEDFGSYYCQHHYDEVLTFGSGTKLELKRADAAPTIVSIFPPSS
Fr3 *CDR3* *Fr4*
 EQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSRQNGVLNSWTDQDSKDYSTYSMSSTLTLTK
 DEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNREK

Fig. 1

115B-151-423 AM1 hG1k

Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada:

QVQLQQSGAELMKPGASVKISCKASGYTFTSYWIEWIKQRPGHGLEWIGEILPGAGSLNNN
Fr1 *CDR1* *Fr2* *CDR2*
EKFRDKATFTADTSSNTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARGGYRYDGYMIFYWGQGLVTVSAAST
Fr3 *CDR3* *Fr4*
 KGPSVFPFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS
 LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFL
 FPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
 SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVS
 LTCLVKGFIYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS
 SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera:

DIQMTQSPASLSASVGETVTITCRTSENIYSYLAWYQOKPGKSPHLLVYNTKTLAEGVPSR
Fr1 *CDR1* *Fr2* *CDR2*
 FSGSGSGTQFSLKINSLOPEDFGSYYCQHHYDEVLTFGSGTKLELKRRTVAAPSVFIFPPS
Fr3 *CDR3* *Fr4*
 DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLS
 KADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Fig.3

