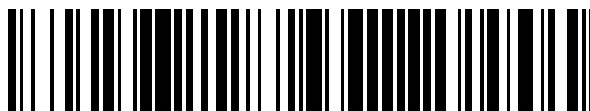


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 768 957**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 39/42 (2006.01)

C07K 16/10 (2006.01)

C07K 16/46 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.09.2016 PCT/US2016/053599**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.03.2017 WO17053906**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.09.2016 E 16778163 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.10.2019 EP 3352791**

54 Título: **Composiciones de anticuerpos contra el VIH y métodos de uso**

30 Prioridad:

24.09.2015 US 201562232279 P

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

24.06.2020

73 Titular/es:

**ABVITRO LLC (100.0%)
400 Dexter Avenue North, Suite 1200
Seattle, WA 98109, US**

72 Inventor/es:

**VIGNEAULT, FRANCOIS;
BRIGGS, ADRIAN WRANGHAM;
GOLDFLESS, STEPHEN JACOB y
TIMBERLAKE, SONIA**

74 Agente/Representante:

**INGENIAS CREACIONES, SIGNOS E
INVENCIONES, SLP**

ES 2 768 957 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

Composiciones de anticuerpos contra el VIH y métodos de uso

5 Campo de la invención

Esta invención se refiere a anticuerpos contra el Virus de Inmunodeficiencia Humana ("VIH").

Antecedentes de la invención

10 El VIH causa el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), una condición en seres humanos caracterizada por síndromes de desgaste, degeneración del sistema nervioso central e inmunodepresión que da lugar a infecciones y tumores malignos que ponen en peligro la vida. El VIH tipo 1 (VIH-1) ha dado lugar a más de 25 millones de muertes desde su descubrimiento y se predice que 20-60 millones de personas se infectarán en las próximas dos décadas.

15 Por lo tanto, se necesitan agentes terapéuticos y métodos para tratar o inhibir la infección por VIH.

El suero de algunos individuos infectados con VIH muestra anticuerpos ampliamente neutralizantes (bNAbs, de sus siglas en inglés) del isotipo IgG. Sin embargo, la especificidad y actividad de estos anticuerpos sigue siendo en gran medida desconocida. La transferencia pasiva de anticuerpos neutralizantes puede contribuir a la protección contra la

20 exposición al virus en modelos animales.

El éxito de la mayoría de las vacunas depende de los anticuerpos, y los anticuerpos contra el VIH se correlacionaron con la protección en un reciente ensayo de vacuna anti-VIH. Aunque algunos pacientes desarrollaron anticuerpos ampliamente neutralizantes contra gp160 años después de la infección, la capacidad de los virus autólogos de mutar

25 impidió la protección contra la infección por VIH. No obstante, la actividad ampliamente neutralizante aplica presión selectiva sobre el virus; permitiendo la transferencia pasiva de (bNAbs) a macacos para proteger contra la infección por VIH. Por lo tanto, las vacunas que provocan dichos anticuerpos pueden proteger a los seres humanos contra la infección por VIH. Se han descrito previamente anticuerpos ampliamente neutralizantes contra el VIH-1 (véase, por ejemplo, Anila et al., Retrovirology, vol. 11, n.º 41 (2014) y Walker et al., 477:466-470 (2011)).

30

Sumario

La invención proporciona un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que comprende

- 35 (a) una CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 17;
- (b) una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 18;
- (c) una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 19;
- (d) una CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 20;
- (e) una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 21; y
- 40 (f) una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 22.

Descripción detallada de la invención

Esta invención se refiere en algunos aspectos a anticuerpos anti-VIH ampliamente neutralizantes.

45

En un aspecto, se proporciona un anticuerpo anti-VIH, tal como un anticuerpo anti-VIH aislado, en donde el anticuerpo anti-VIH se une a o es capaz de unirse a un epítipo de N-polisacáridos de un VIH con una afinidad de 1 nM o menos. En algunas realizaciones, el anticuerpo neutraliza o es capaz de neutralizar el VIH. En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo ampliamente neutralizante. En otras realizaciones, el VIH es VIH-1. En realizaciones adicionales, el VIH es el grupo M del VIH-1. El VIH puede ser VIH-1 del subtipo A (que incluye A1 y/o A2), B, C, D, E, F (que incluye F1 y/o F2), G, H, I, J, K o cualquier combinación, subtipo o derivado recombinante (incluida la forma recombinante circulante (CRF, de sus siglas en inglés)) del mismo. En algunas realizaciones, los subtipos recombinantes del VIH-1 (en algunas realizaciones denominadas formas recombinantes circulantes (CRF)) están representados por una combinación de los dos subtipos de los que proceden. En algunas realizaciones, las CRF

55

ejemplares incluyen AB, AC, AG, DF, BC, etc.

En algunas realizaciones, el anticuerpo ha sido glucomanipulado para modificar los oligosacáridos en la región Fc y en donde el anticuerpo tiene una función efectora de ADCC aumentada en comparación con un anticuerpo no glucomanipulado. En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo humano, humanizado o quimérico. En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo de clase IgG de longitud completa. En otras realizaciones, el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo. En realizaciones adicionales, el anticuerpo es un fragmento variable de cadena sencilla (scFv, de sus siglas en inglés).

60

En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende una secuencia V_H que tiene al menos un 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1; una secuencia V_L que tiene al menos un 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2; o una secuencia V_H como en (a) y una

65

secuencia V_L como en (b).

En un aspecto, se proporciona un ácido nucleico aislado que codifica el anticuerpo. En un aspecto, se proporciona un vector que comprende el ácido nucleico. En un aspecto, se proporciona una célula hospedadora que comprende el vector.

Se describe un método para producir el anticuerpo que comprende cultivar una célula hospedadora que comprende un ácido nucleico que codifica el anticuerpo para que se produzca el anticuerpo.

En un aspecto, se proporciona un inmunoconjugado que comprende el anticuerpo y un agente citotóxico.

En un aspecto, se proporciona una formulación farmacéutica que comprende el anticuerpo y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En un aspecto, se proporciona en el presente documento el anticuerpo o inmunoconjugado para su uso como medicamento.

En un aspecto, se proporciona en el presente documento el anticuerpo o inmunoconjugado para tratar la infección por VIH o SIDA.

Se describe cualquiera de los anticuerpos o inmunoconjugados descritos en el presente documento para su uso en la fabricación de un medicamento. En algunas realizaciones, el medicamento es para el tratamiento de la infección por VIH o SIDA. En otras realizaciones, el medicamento es para neutralizar el VIH. En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo ampliamente neutralizante. En algunas realizaciones, el VIH es VIH-1. En realizaciones adicionales, el VIH es el grupo M del VIH-1. El VIH puede ser VIH-1 del subtipo A (que incluye A1 y/o A2), B, C, D, E, F (que incluye F1 y/o F2), G, H, I, J, K, o cualquier subtipo de combinación, o derivado recombinante (incluida la forma recombinante circulante (CRF)) del mismo. En algunas realizaciones, los subtipos recombinantes del VIH-1 (en algunas realizaciones denominadas formas recombinantes circulantes (CRF)) están representados por una combinación de los dos subtipos de los que proceden. En algunas realizaciones, las CRF ejemplares incluyen AB, AC, AG, DF, BC, etc.

La invención se refiere al tratamiento de un individuo que tiene infección por VIH o SIDA que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz de cualquiera de los anticuerpos o inmunoconjugados descritos en el presente documento. Esto puede comprender además administrar un agente terapéutico. En algunas realizaciones, el agente terapéutico es un agente antivírico.

Se describe un ensayo inmunohistoquímico de VIH que comprende poner en contacto una muestra con cualquiera de los anticuerpos o inmunoconjugados descritos en el presente documento en condiciones permisivas para la formación de un complejo anticuerpo-VIH entre el anticuerpo y el VIH presente en la muestra, y detectar la presencia o ausencia del complejo mediante un método de inmunodetección. En algunas realizaciones, la muestra es una muestra de sangre o una muestra de tejido.

Se describe un método para fabricar un anticuerpo anti-VIH o un fragmento del mismo que comprende cultivar una célula hospedadora que comprende un ácido nucleico que codifica cualquiera de los anticuerpos descritos en el presente documento en un medio en condiciones que permitan la expresión de un polipéptido codificado por el vector y el ensamblaje de un anticuerpo o fragmento del mismo; y purificar el anticuerpo o fragmento a partir de la célula hospedadora o del medio de la célula hospedadora.

Se describe un kit que comprende una unidad de dosificación farmacéuticamente aceptable de una cantidad farmacéuticamente eficaz de al menos un anticuerpo anti-VIH aislado o inmunoconjugado descrito en el presente documento. El kit puede comprender además una unidad de dosificación farmacéuticamente aceptable de una cantidad farmacéuticamente eficaz de un agente anti-VIH. En algunas realizaciones, el agente anti-VIH es uno seleccionado del grupo que consiste en un inhibidor de transcriptasa inversa no nucleósido, un inhibidor de proteasa, un inhibidor de entrada o de fusión y un inhibidor de integrasa.

Se describe un kit para el diagnóstico, pronóstico o monitoreo del tratamiento de una infección por VIH o SIDA en un sujeto que comprende al menos un anticuerpo anti-VIH aislado o inmunoconjugado descrito en el presente documento, y uno o más reactivos de detección que se unen específicamente a los anticuerpos anti-VIH. El kit puede comprender además reactivos para realizar PCR. En algunas realizaciones, el kit comprende además reactivos para realizar espectrometría de masas.

En un aspecto, la proteína de fusión o conjugado comprende el anticuerpo. En algunas realizaciones, la proteína de fusión o conjugado es o comprende un receptor quimérico, que opcionalmente es un receptor antigénico quimérico (CAR, de sus siglas en inglés).

En algunas realizaciones, un receptor antigénico quimérico (CAR) comprende el anticuerpo descrito en el presente documento. El receptor antigénico quimérico puede ser un CAR que además comprende un dominio de señalización

intracelular que comprende un motivo ITAM. En otras realizaciones, el receptor antigénico quimérico es un CAR que además comprende un dominio de señalización intracelular de CD3 ζ . En algunas realizaciones, el receptor antigénico quimérico es un CAR que comprende además un dominio de señalización intracelular de una molécula coestimuladora seleccionada del grupo que consiste en CD28, CD137, ICOS y OX40.

5

Breve descripción de los dibujos

Las nuevas características descritas en el presente documento se exponen con particularidad en las reivindicaciones adjuntas. Se obtendrá una mejor comprensión de las características y ventajas de las características descritas en el presente documento haciendo referencia a la siguiente descripción detallada que expone ejemplos ilustrativos, en los que se utilizan los principios de las características descritas en el presente documento, y los dibujos adjuntos de los cuales:

10

La **Figura 1** representa un gráfico con los resultados de un examen por similitud de CDR3 de cadena pesada. La similitud de coincidencia observada en un voluntario sano sugiere un "umbral de significancia" (límite permisivo inicial para candidatos de anticuerpos en cadenas pesadas de un donante).

15

La **Figura 2** representa un diagrama que muestra que los anticuerpos descubiertos se segregan filogenéticamente con los BNAbs Pt17 conocidos. Se recogieron secuencias de BNAbs del donante 17. Se determinaron nuevos anticuerpos filogenéticamente intercalados con estos BNAbs y que probablemente surgen del mismo linaje. La relación filogenética con los BNAbs se utilizó para identificar nuevos anticuerpos ampliamente neutralizantes.

20

La **Figura 3** representa un diagrama de Ac conocidos y nuevos procedentes del donante 17. Los nuevos pares de anticuerpos se intercalan con los BNAbs conocidos (tanto la cadena pesada como ligera).

La **Figura 4** representa un diagrama que muestra los pares de cadena pesada y ligera de anticuerpos conocidos y descubiertos.

25

La **Figura 5** representa un alineamiento de las secuencias de región variable de los anticuerpos AbV1-9 en comparación con las secuencias de región variable del anticuerpo de la línea germinal.

La **Figura 6A** representa alineamientos de secuencia de la línea germinal y variantes clonales de AbV1-9. (A) Alineamiento de aminoácidos de las cadenas pesadas (IgH) de los anticuerpos AbV1-9, y de V_H de la línea germinal (GL, de sus siglas en inglés) para variantes clonales. Se muestra la numeración de aminoácidos basada en estructuras cristalinas, marco (FWR, de sus siglas en inglés) y regiones determinantes de complementariedad (CDR, de sus siglas en inglés) según lo definido por Kabat (J Exp Med 132(2):21 1-250).

30

La **Figura 6B** representa alineamientos de secuencia de la línea germinal y variantes clonales de AbV1-9. Alineamiento de aminoácidos de las cadenas ligeras (IgL) de los anticuerpos AbV1-9, y de V_L de la línea germinal (GL) para variantes clonales. Se muestra la numeración de aminoácidos basada en estructuras cristalinas, marco (FWR, de sus siglas en inglés) y regiones determinantes de complementariedad (CDR, de sus siglas en inglés) según lo definido por Kabat (J Exp Med 132(2):21 1-250).

35

La **Figura 7** ejemplifica los resultados de un método de descubrimiento de bNAbs del VIH. Los linfocitos B de un controlador élite del VIH se introdujeron en emulsión y se recuperaron pares BCR. (**Figura 7A**) Distribución del isotipo de la cadena pesada de los 38.620 pares de V_HV_L recuperados, donde una proporción rara de las cadenas de IgG se alinearon bien con los bNAbs previamente conocidos ("tipo PGT"). (**Figura 7B**) Árboles filogenéticos de secuencias completas de aminoácidos VDJ de bNAbs conocidos más los recién recuperados (conectados por líneas, marcados con un código de barras de gotas), con cadenas pesadas (izquierda) y ligeras (derecha) trazadas por separado. Los anticuerpos potencialmente no coincidentes son PGT122.pesada y PGT123.ligera, y PCT123.pesada y PGT122.ligera. (**Figura 7C**) Actividad de neutralización (CI₅₀, µg/ml) de las 8 variantes similares a PGT recientemente descubiertas contra diez cepas de VIH, en comparación con una reserva de control de PGT121.

40

45

Descripción detallada adicional de la invención

En algunos aspectos, la invención se basa, al menos en parte, en un descubrimiento inesperado de una nueva categoría de anticuerpos ampliamente neutralizantes (bNAbs) contra el VIH que, en algunos aspectos, pueden reconocer epítomos dependientes de hidratos de carbono, tal como N-polisacárido de tipo complejo, por ejemplo, en gp120.

50

Entre los anticuerpos proporcionados se encuentran anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos y anticuerpos polirreactivos) y fragmentos de anticuerpos. Los anticuerpos incluyen conjugados de anticuerpos y moléculas que comprenden los anticuerpos, tales como moléculas quiméricas; receptores quiméricos que comprenden uno o más dominios estimuladores, de señalización y/o coestimuladores; y receptores antigénicos quiméricos (CAR). Por lo tanto, un anticuerpo incluye, pero no se limita a, anticuerpos naturales y de longitud completa, así como fragmentos y porciones de los mismos que retienen las especificidades de unión de los mismos, tal como cualquier porción de unión específica del mismo, incluidos aquellos que tienen cualquier número de, clases y/o isotipo de inmunoglobulina (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA, IgD, IgE e IgM); y fragmentos biológicamente relevantes (unión a antígeno) o porciones de unión específicas de los mismos, que incluyen, pero no se limitan a, Fab, F(ab')₂, Fv y scFv (cadena única o entidad relacionada). Un anticuerpo monoclonal es generalmente uno dentro de una composición de anticuerpos sustancialmente homogéneos; por lo tanto, cualquier anticuerpo individual comprendido dentro de la composición de anticuerpos monoclonales es idéntico,

55

60

65

excepto por posibles mutaciones de origen natural que pueden estar presentes en cantidades menores. Un anticuerpo policlonal es una preparación que incluye diferentes anticuerpos de secuencias variables que generalmente se dirigen contra dos o más determinantes (epítomos) diferentes.

- 5 También se proporcionan moléculas tales como moléculas quiméricas y/o de fusión, que incluyen receptores, tales como receptores recombinantes, que incluyen el anticuerpo de cualquiera de las realizaciones (por ejemplo, contenidas en o parte de un dominio extracelular) y dominios adicionales, tales como dominios de señalización intracelulares, espaciadores, enlazadores y dominios transmembrana. En algunas realizaciones, el receptor es un receptor antigénico quimérico, que comprende una porción extracelular que comprende el anticuerpo o fragmento de
- 10 cualquiera de las realizaciones y un dominio de señalización intracelular.

Por lo tanto, el término "anticuerpo" en el presente documento se usa en el sentido más amplio e incluye anticuerpos policlonales y monoclonales, que incluyen anticuerpos intactos y fragmentos de anticuerpos funcionales (de unión a antígeno) de los mismos, incluidos fragmentos (Fab) de unión a antígeno, fragmentos F(ab')₂, fragmentos Fab',

15 fragmentos Fv, fragmentos de IgG recombinante (rIgG, de sus siglas en inglés), fragmentos de anticuerpos de cadena sencilla, incluidos fragmentos variables de cadena sencilla (sFv o scFv) y fragmentos de anticuerpos de dominio único (por ejemplo, sdAb, sdFv, nanocuerpo). El término abarca formas genéticamente manipuladas y/o modificadas de otra manera de inmunoglobulinas, tales como intracuerpos, peptidocuerpos, anticuerpos quiméricos, anticuerpos completamente humanos, anticuerpos humanizados y anticuerpos heteroconjugados, multiespecíficos, por ejemplo,

20 biespecíficos, anticuerpos, diacuerpos, triacuerpos y tetracuerpos, di-scFv en tándem, tri-scFv en tándem. Salvo que se indique de otra manera, el término "anticuerpo" debe entenderse que abarca fragmentos de anticuerpo funcionales del mismo. El término también abarca anticuerpos intactos o de longitud completa, incluidos anticuerpos de cualquier clase o subclase, que incluyen IgG y subclases de los mismos, IgM, IgE, IgA e IgD.

- 25 Las expresiones "región determinante de complementariedad" y "CDR", que son sinónimos de "región hipervariable" o "HVR", son conocidas en la técnica por referirse a secuencias no contiguas de aminoácidos dentro de regiones variables de anticuerpos, que confieren especificidad de antígeno y/o afinidad de unión. En general, hay tres CDR en cada región variable de cadena pesada (CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3) y tres CDR en cada región variable de cadena ligera (CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3). Las "regiones marco" y "FR" se conocen en la técnica por referirse a las porciones
- 30 no CDR de las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras. En general, hay cuatro FR en cada región variable de cadena pesada de longitud completa (FR-H1, FR-H2, FR-H3 y FR-H4), y cuatro FR en cada región variable de cadena ligera de longitud completa (FR-L1, FR-L2, FR-L3 y FR-L4).

Los límites exactos de la secuencia de aminoácidos de una CDR o FR dada se pueden determinar fácilmente usando cualquiera de una serie de esquemas bien conocidos, incluidos los descritos por Kabat et al. (1991), "Sequences of Proteins of Immunological Interest", 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (esquema de numeración "Kabat"), Al-Lazikani et al., (1997) JMB 273:927-948 (esquema de numeración "Chothia"), MacCallum et al., J. Mol. Biol. 262:732-745 (1996), "Antibody-antigen interactions: Contact analysis and binding site topography", J. Mol. Biol. 262, 732-745". (Esquema de numeración "Contact"), Lefranc MP et al., "IMGT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor variable domains and Ig superfamily V-like domains", Dev Comp Immunol, enero de 2003;27(1):55-77 (esquema de numeración "IMGT"), y Honegger A y Plückthun A, "Yet another numbering scheme for immunoglobulin variable domains: an automatic modeling and analysis tool", J Mol Biol, 8 de junio de 2001;309(3):657-70, (Esquema de numeración "Aho").

40

- 45 Los límites de una CDR o FR dada pueden variar según el esquema utilizado para la identificación. Por ejemplo, el esquema Kabat se basa en alineamientos estructurales, mientras que el esquema Chothia se basa en información estructural. La numeración tanto para los esquemas de Kabat como de Chothia se basa en las longitudes de secuencia de región de anticuerpo más comunes, con inserciones acomodadas por letras de inserción, por ejemplo, "30a" y delecciones que aparecen en algunos anticuerpos. Los dos esquemas colocan determinadas inserciones y delecciones ("indeles") en diferentes posiciones, lo que da como resultado una numeración diferencial. El esquema Contact se basa en el análisis de estructuras cristalinas complejas y es similar en muchos aspectos al esquema de numeración de Chothia.
- 50

La Tabla A, a continuación, enumera los límites de posición ejemplares de CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3 y CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3 identificados por los esquemas Kabat, Chothia y Contact, respectivamente. Para CDR-H1, la numeración de restos se enumera utilizando los esquemas de numeración de Kabat y Chothia. Las FR están ubicadas entre CDR, por ejemplo, con FR-L1 ubicada entre CDR-L1 y CDR-L2, y así sucesivamente. Se observa que debido a que el esquema de numeración de Kabat que se muestra coloca inserciones en H35A y H35B, el final del bucle Chothia CDR-H1, cuando se numera usando la convención de numeración de Kabat que se muestra, varía entre H32 y H34,

60 dependiendo de la longitud del bucle.

Tabla A

CDR	Kabat	Chothia	Contact
CDR-L1	L24--L34	L24--L34	L30--L36
CDR-L2	L50--L56	L50--L56	L46--L55
CDR-L3	L89--L97	L89--L97	L89--L96
CDR-H1 (Numeración de Kabat ¹)	H31--H35B	H26--H32..34	H30--H35B
CDR-H1 (Numeración de Chothia ²)	H31--H35	H26--H32	H30--H35
CDR-H2	H50--H65	H52--H56	H47--H58
CDR-H3	H95--H102	H95--H102	H93--H101
1 - Kabat et al. (1991), "Sequences of Proteins of Immunological Interest", 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD			
2 - Al-Lazikani et al., (1997) JMB 273.927-948			

Por lo tanto, salvo que se especifique otra cosa, una "CDR" o "región determinante de complementariedad", o CDR individuales especificadas (por ejemplo, "CDR-H1, CDR-H2), de un anticuerpo dado o región del mismo, tal como una región variable del mismo, debe entenderse que abarca una región determinante de complementariedad (o la específica) como se define por cualquiera de los esquemas mencionados anteriormente. Por ejemplo, cuando se afirma que una CDR particular (por ejemplo, una CDR-H3) contiene la secuencia de aminoácidos de una CDR correspondiente en una secuencia de aminoácidos V_H o V_L dada, se entiende que dicha CDR tiene una secuencia de la CDR correspondiente (por ejemplo, CDR-H3) dentro de la región variable, como se define por cualquiera de los esquemas mencionados anteriormente. En algunas realizaciones, se especifican secuencias de CDR especificadas.

De forma análoga, salvo que se especifique otra cosa, se debe entender que una FR o FR(s) individuales especificadas (por ejemplo, FR-H1, FR-H2), de un anticuerpo dado o región del mismo, tal como una región variable del mismo, abarca una región marco (o la específica) como se define por cualquiera de los esquemas conocidos. En algunos casos, se especifica el esquema para la identificación de una CDR, FR en particular o las FR o CDR, tal como la CDR como se define por el método Kabat, Chothia o Contact. En otros casos, se proporciona la secuencia de aminoácidos particular de una CDR o FR.

La expresión "región variable" o "dominio variable" se refiere al dominio de una cadena ligera o pesada de anticuerpo que está implicada en la unión del anticuerpo al antígeno. Los dominios variables de la cadena pesada y la cadena ligera (V_H y V_L , respectivamente) de un anticuerpo natural tienen generalmente estructuras similares, y cada dominio comprende cuatro regiones marco conservadas (FR) y tres CDR. (Véase, por ejemplo, Kindt et al. *Kuby Immunology*, 6ª ed., W.H. Freeman and Co., página 91 (2007). Un solo dominio V_H o V_L puede ser suficiente para conferir especificidad de unión a antígeno. Además, los anticuerpos que se unen a un antígeno particular se pueden aislar usando un dominio V_H o V_L de un anticuerpo que se une al antígeno para seleccionar una biblioteca de dominios V_L o V_H complementarios, respectivamente. Véase, por ejemplo, Portolano et al., *J. Immunol.* 150:880-887 (1993); Clarkson et al., *Nature* 352:624-628 (1991).

Entre los anticuerpos proporcionados se encuentran fragmentos de anticuerpos. Un "fragmento de anticuerpo" se refiere a una molécula distinta de un anticuerpo intacto que comprende una porción de un anticuerpo intacto que se une al antígeno al que se une el anticuerpo intacto. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen, pero no se limitan a, Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂; diácuerpos; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpos de cadena sencilla (por ejemplo, scFv o sFv); y anticuerpos multispecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo. En realizaciones particulares, los anticuerpos son fragmentos de anticuerpos de cadena sencilla que comprenden una región variable de cadena pesada y/o una región variable de cadena ligera, tal como scFv.

Los anticuerpos de un solo dominio son fragmentos de anticuerpos que comprenden todo o una porción del dominio variable de cadena pesada o todo o una porción del dominio variable de cadena ligera de un anticuerpo. En determinadas realizaciones, un anticuerpo de un solo dominio es un anticuerpo de un solo dominio humano.

Los fragmentos de anticuerpo pueden prepararse mediante diversas técnicas, incluyendo, pero sin limitación, digestión proteolítica de un anticuerpo intacto así como la producción mediante células hospedadoras recombinantes. En algunas realizaciones, los anticuerpos son fragmentos producidos de forma recombinante, tales como fragmentos que comprenden disposiciones que no se producen de manera natural, tales como aquellos con dos o más regiones o cadenas de anticuerpos unidas mediante enlazadores sintéticos, por ejemplo, enlazadores peptídicos, y/o aquellos que no se producen mediante digestión enzimática de un anticuerpo intacto de origen natural. En algunos aspectos, los fragmentos de anticuerpos son scFv.

Un anticuerpo "humanizado" es un anticuerpo en el que todos o sustancialmente todos los restos de aminoácidos de la CDR proceden de CDR no humanas y todos o sustancialmente todos los restos de aminoácidos de la FR proceden de FR humanas. Un anticuerpo humanizado puede incluir opcionalmente al menos una porción de una región constante de anticuerpo procedente de un anticuerpo humano. Una "forma humanizada" de un anticuerpo no humano

se refiere a una variante del anticuerpo no humano que se ha sometido a la humanización, normalmente para reducir la inmunogenicidad en seres humanos, mientras se conserva la especificidad y afinidad del anticuerpo parental no humano. En algunas realizaciones, algunos restos de FR en un anticuerpo humanizado se sustituyen con los restos correspondientes de un anticuerpo no humano (por ejemplo, el anticuerpo del que proceden los restos de CDR), por ejemplo, para restaurar o mejorar la especificidad o afinidad del anticuerpo.

Entre los anticuerpos proporcionados se encuentran anticuerpos humanos. Un "anticuerpo humano" es un anticuerpo con una secuencia de aminoácidos que corresponde con la de un anticuerpo producido por un ser humano o una célula humana o una fuente no humana que utiliza repertorios de anticuerpo humanos u otras secuencias codificantes de anticuerpo humanas, incluidas las bibliotecas de anticuerpos humanos. El término excluye formas humanizadas de anticuerpos no humanos que comprenden regiones de unión a antígenos no humanas, tal como aquellos en los que todas o sustancialmente todas las CDR son no humanas.

Los anticuerpos humanos se pueden preparar mediante la administración de un inmunógeno a un animal transgénico que se ha modificado para producir anticuerpos humanos intactos o anticuerpos intactos con regiones variables humanas en respuesta a la exposición antigénica. Dichos animales normalmente contienen todos o una parte de los loci humanos de inmunoglobulina, que reemplazan los loci endógenos de inmunoglobulina, o que están presentes extracromosómicamente o integrados aleatoriamente en los cromosomas del animal. En dichos animales transgénicos, los loci endógenos de inmunoglobulina generalmente se han desactivado. Los anticuerpos humanos también pueden proceder de bibliotecas de anticuerpos humanos, incluyendo la presentación en fagos y bibliotecas libres de células, que contienen secuencias de codificación de anticuerpos procedentes de un repertorio humano.

Entre los anticuerpos proporcionados se encuentran anticuerpos monoclonales, incluidos fragmentos de anticuerpos monoclonales. La expresión "anticuerpo monoclonal" tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de o dentro de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos, excepto por las posibles variantes que contienen mutaciones de origen natural o que surgen durante la producción de una preparación de anticuerpos monoclonales, estando presentes dichas variantes generalmente en cantidades menores. A diferencia de las preparaciones de anticuerpos policlonales, que incluyen normalmente diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes epítopos, cada anticuerpo monoclonal de una preparación de anticuerpos monoclonales está dirigido contra un solo epítipo en un antígeno. El término no debe interpretarse como que requiere la producción del anticuerpo por ningún método particular. Un anticuerpo monoclonal puede fabricarse mediante una variedad de técnicas, que incluyen, pero no se limitan a, la generación a partir de un hibridoma, métodos de ADN recombinante, presentación en fagos y otros métodos de presentación de anticuerpos.

Los términos "polipéptido" y "proteína" se usan indistintamente para referirse a un polímero de restos de aminoácidos, y no se limitan a una longitud mínima. Los polipéptidos, incluidos los anticuerpos y cadenas de anticuerpos proporcionados y otros péptidos, por ejemplo, enlazadores y péptidos de unión, pueden incluir restos de aminoácidos que incluyen restos de aminoácidos naturales y/o no naturales. Los términos también incluyen modificaciones posteriores a la expresión del polipéptido, por ejemplo, glucosilación, sialilación, acetilación, fosforilación, y similares. En algunos aspectos, los polipéptidos pueden contener modificaciones con respecto a una secuencia nativa o natural, siempre que la proteína mantenga la actividad deseada. Estas modificaciones pueden ser deliberadas, como a través de mutagénesis dirigida al sitio, o pueden ser accidentales, como a través de mutaciones de hospedadores que producen las proteínas o errores debidos a la amplificación por PCR.

El porcentaje (%) de identidad de secuencia con respecto de la secuencia polipeptídica de referencia es el porcentaje de restos de aminoácidos en una secuencia candidata que son idénticos a los restos de aminoácidos en la secuencia polipeptídica de referencia, después de alinear las secuencias e introducir huecos, si es necesario, para lograr el porcentaje máximo de identidad de secuencia y sin considerar ninguna sustitución conservativa como parte de la identidad de secuencia. El alineamiento con el propósito de determinar el porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos se puede lograr de varias maneras que se conocen, por ejemplo, usando programas informáticos disponibles de manera pública, tales como los programas BLAST, BLAST-2, ALIGN o Megalign (DNASTAR). Los parámetros apropiados para alinear secuencias se pueden determinar, incluyendo cualquier algoritmo necesario para lograr un alineamiento máximo a lo largo de la longitud completa de las secuencias que se estén comparando. Para fines del presente documento, sin embargo, los valores de % de identidad de secuencia de aminoácidos se generan usando el programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2. El programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2 fue programado por Genentech, Inc., y el código fuente, junto con la documentación para usuarios, se han depositado en la Oficina de Derechos de Autor de los Estados Unidos (U.S. Copyright Office), Washington D.C., 20559, donde está registrada con el n.º de Registro de Derechos de Autor de los Estados Unidos TXU510087. El programa ALIGN-2 está disponible al público a través de Genentech, Inc., South San Francisco, California, o tal vez compilado a partir del código fuente. El programa ALIGN-2 debe compilarse para su uso en un sistema operativo UNIX, incluyendo UNIX V4.0D digital. Todos los parámetros de comparación de secuencia se establecen por el programa ALIGN-2 y no varían.

En las situaciones donde se emplea ALIGN-2 para comparaciones de secuencias de aminoácidos, el % de identidad de secuencia de aminoácidos de una secuencia de aminoácidos dada A para, con o contra una secuencia de

aminoácidos dada B (que puede, como alternativa, citarse como una secuencia de aminoácidos A que tiene o comprende un % determinado de identidad de secuencia para, con o frente a una secuencia de aminoácidos B) se calcula del modo siguiente: 100 veces la fracción X/Y, donde X es el número de restos de aminoácidos puntuados como pares idénticos por el programa de alineación de secuencia ALIGN-2 en la alineación del programa de A y B y donde Y es el número total de restos de aminoácidos en B. Se apreciará que cuando la longitud de la secuencia de aminoácidos A no es igual a la longitud de la secuencia de aminoácidos B, el % de identidad de secuencia de aminoácidos de A respecto de B no será igual al % de identidad de secuencia de aminoácidos de B respecto de A. A menos que se afirme específicamente lo contrario, todos los valores de % de identidad de secuencia de aminoácidos usados en el presente documento se obtienen como se describe en el párrafo inmediatamente precedente usando el programa informático ALIGN-2.

COMPOSICIONES

La invención en algunas realizaciones proporciona anticuerpos anti-VIH (que incluyen, pero no se limitan a, fragmentos de anticuerpos y conjugados de unión a antígeno, y/o proteínas de fusión de los anticuerpos, por ejemplo, fragmentos, tales como proteínas quiméricas, o receptores quiméricos, por ejemplo, receptores antigénicos quiméricos (CAR) que contienen uno o más de los anticuerpos). Dichos anticuerpos, proteínas de fusión y/o conjugados encuentran uso en el tratamiento, diagnóstico y/o pronóstico del VIH. Entre los anticuerpos proporcionados (y las proteínas de fusión y conjugados de los mismos) están aquellos que pueden neutralizar el VIH. Los anticuerpos pueden ser anticuerpos ampliamente neutralizantes. En algunas realizaciones, los anticuerpos de la invención pueden neutralizar VIH-1 o VIH-2. Por ejemplo, en algunas realizaciones, los anticuerpos de la invención pueden neutralizar VIH-1 del grupo M, VIH-1 del grupo N, VIH-1 del grupo O y/o VIH-1 del grupo P. En algunas realizaciones, los anticuerpos de la invención pueden neutralizar el VIH-1 del subtipo A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K o cualquier combinación, subtipo o derivado recombinante (incluida la forma recombinante circulante (CRF, de sus siglas en inglés)) del mismo. En algunas realizaciones, se proporcionan anticuerpos que se unen a una glucoproteína del VIH. En algunas realizaciones, se proporcionan anticuerpos con función efectora mejorada que se unen al VIH. Entre las proteínas de fusión y conjugados proporcionados, que incluyen receptores quiméricos tales como los receptores antigénicos quiméricos (CAR), se encuentran proteínas y conjugados que incluyen uno o más de los anticuerpos proporcionados, solos o en combinación.

Ejemplos de anticuerpos anti-VIH

En un aspecto, la invención proporciona anticuerpos, tales como anticuerpos aislados, que se unen al VIH. El VIH puede ser VIH-1. El VIH puede ser VIH-2. El VIH puede ser VIH-1 del grupo M. El VIH puede ser VIH-1 del grupo N, VIH-1 del grupo O, y/o VIH-1 del grupo P. El VIH puede ser VIH-1 de subtipo A (incluyendo A1 y/o A2), B, C, D, E, F (que incluye F1 y/o F2), G, H, I, J, K o cualquier combinación, subtipo o derivado recombinante (incluida la forma recombinante circulante (CRF, de sus siglas en inglés)) del mismo. En algunas realizaciones, los subtipos recombinantes del VIH-1 (en algunas realizaciones denominadas formas recombinantes circulantes (CRF)) están representados por una combinación de los dos subtipos de los que proceden. En algunas realizaciones, las CRF ejemplares incluyen AB, AC, AG, DF, BC, etc. En particular, los anticuerpos anti-VIH proporcionados se unen a una glucoproteína de envoltura del VIH. Un anticuerpo aislado es uno que se ha separado a partir de un componente de su entorno natural. En algunas realizaciones, un anticuerpo se purifica a más de un 95 % o 99 % de pureza según lo determinado por, por ejemplo, medios electroforéticos (por ejemplo, SDS-PAGE, enfoque isoelectrico (IEF, de sus siglas en inglés), electroforesis capilar) o cromatográficos (por ejemplo, intercambio iónico o HPLC de fase inversa). (Véase, por ejemplo, Flatman et al., J. Chromatogr. B 848:79-87 (2007)).

En particular, los anticuerpos anti-VIH proporcionados se unen a un epítipo de N-polisacárido de tipo complejo del VIH humano. En particular, los anticuerpos anti-VIH proporcionados se unen a la gp120 del VIH humano. Los anticuerpos anti-VIH de la invención se unen a un epítipo presente en el dominio gp120 del VIH humano que comprende un N-polisacárido tipo.

En algunas realizaciones, la invención proporciona anticuerpos aislados que pueden neutralizar el VIH. Un anticuerpo neutralizante puede ser un anticuerpo que inhibe la infectividad de un virus. En otras realizaciones, la invención proporciona anticuerpos aislados que pueden neutralizar ampliamente el VIH. Un anticuerpo ampliamente neutralizante puede ser un anticuerpo que inhibe la infectividad de dos o más cepas o subtipos de un virus. El VIH puede ser VIH-1. El VIH puede ser VIH-2. El VIH puede ser VIH-1 del grupo M. El VIH puede ser VIH-1 del grupo N, VIH-1 del grupo O, y/o VIH-1 del grupo P. El VIH puede ser VIH-1 de subtipo A (incluyendo A1 y/o A2), B, C, D, E, F (que incluye F1 y/o F2), G, H, I, J, K o cualquier combinación, subtipo o derivado recombinante (incluida la forma recombinante circulante (CRF, de sus siglas en inglés)) del mismo.

En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-VIH inducen la lisis de las células que expresan el VIH. La lisis puede ser inducida mediante cualquier mecanismo, tal como mediante la mediación de una función efectora, tal como la unión a C1q y la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC); unión al receptor Fc; citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo (ADCC, de sus siglas en inglés); fagocitosis; regulación por defecto de los receptores de la superficie celular (por ejemplo, receptor de linfocitos B); activación de linfocitos B o inducción directa de apoptosis celular.

En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-VIH está genomanipulado para tener al menos un aumento en la función efectora en comparación con el anticuerpo anti-VIH original no genomanipulado. Las funciones efectoras son actividades biológicas atribuibles a la región Fc de un anticuerpo, que varían con el isotipo de anticuerpo. Los ejemplos de funciones efectoras de anticuerpo incluyen: unión a C1q y citotoxicidad dependiente de complemento (CDC); unión al receptor Fc; citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo (ADCC, de sus siglas en inglés); fagocitosis; regulación por defecto de los receptores de la superficie celular (por ejemplo, receptor de linfocitos B); y activación de linfocitos B. Por ejemplo, el anticuerpo anti-VIH se puede glucomanipular para tener al menos un aumento en la función efectora en comparación con el anticuerpo anti-VIH original no glucomanipulado. La citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC) es el resultado de la formación de un complejo entre la porción Fab de IgG del anticuerpo con la proteína vírica en la superficie celular y la unión de la porción Fc a los receptores Fc (FcγR), en células efectoras. El aumento en la función efectora puede ser el aumento de la afinidad de unión a un receptor Fc, aumento de la ADCC; aumento de la fagocitosis; aumento de la inmunidad mediada por células; aumento de la unión a los linfocitos T CD8 citotóxicos; aumento de la unión a las células NK; aumento de la unión a macrófagos; aumento de la unión a células polimorfonucleares; aumento de la unión a monocitos; aumento de la unión a macrófagos; aumento de la unión a linfocitos granulares grandes; aumento de la unión a granulocitos; señalización directa que induce apoptosis; aumento de la maduración de células dendríticas; o aumento de cebado de linfocitos T. Los anticuerpos anti-VIH glucomanipulados proporcionan un beneficio de supervivencia en sujetos que padecen cánceres que expresan el VIH en comparación con los anticuerpos no glucomanipulados dirigidos al mismo epítipo del VIH.

En un aspecto, un anticuerpo anti-VIH comprende una secuencia V_H que tiene al menos un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, una secuencia V_H que tiene al menos un 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad contiene sustituciones (por ejemplo, sustituciones conservadoras), inserciones o deleciones relativas a la secuencia de referencia, pero un anticuerpo anti-VIH que comprende esa secuencia conserva la capacidad de unirse al VIH. El anticuerpo anti-VIH puede conservar la capacidad de unirse al VIH-1. El anticuerpo anti-VIH puede conservar la capacidad de unirse al VIH-2. El anticuerpo anti-VIH puede conservar la capacidad de unirse al grupo M del VIH-1. El anticuerpo anti-VIH puede conservar la capacidad de unirse al grupo N del VIH-1, el grupo O del VIH y/o el grupo P del VIH-1. El anticuerpo anti-VIH puede conservar la capacidad de unirse al subtipo A del VIH-1 (incluidos A1 y/o A2), B, C, D, E, F (que incluye F1 y/o F2), G, H, I, J, K o cualquier combinación, subtipo o derivado recombinante (incluida la forma recombinante circulante (CRF, de sus siglas en inglés)) del mismo. En algunas realizaciones, un total de 1 a 10 aminoácidos se han sustituido, insertado y/o eliminado en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, las sustituciones, inserciones o deleciones se producen en regiones fuera de las CDR (por ejemplo, en las FR). Opcionalmente, el anticuerpo anti-VIH comprende la secuencia V_H de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, incluidas las modificaciones postraduccionales de esa secuencia.

En un aspecto, se proporciona un anticuerpo anti-VIH, en donde el anticuerpo comprende un dominio variable de cadena ligera (V_L) que tiene al menos un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2. En algunas realizaciones, una secuencia V_L que tiene al menos un 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad contiene sustituciones (por ejemplo, sustituciones conservadoras), inserciones o deleciones relativas a la secuencia de referencia, pero un anticuerpo anti-VIH que comprende esa secuencia conserva la capacidad de unirse al VIH. En algunas realizaciones, un total de 1 a 10 aminoácidos se han sustituido, insertado y/o eliminado en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2. En algunas realizaciones, las sustituciones, inserciones o deleciones se producen en regiones fuera de las CDR (por ejemplo, en las FR). Opcionalmente, el anticuerpo anti-VIH comprende la secuencia V_L de SEQ ID NO: 2, incluidas las modificaciones postraduccionales de esa secuencia.

En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti-VIH que comprende al menos una o ambas regiones variables seleccionadas de (a) V_H que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 y (b) V_L que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2.

En un aspecto, un anticuerpo anti-VIH comprende una secuencia V_H que tiene al menos un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, una secuencia V_H que tiene al menos un 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad contiene sustituciones (por ejemplo, sustituciones conservadoras), inserciones o deleciones relativas a la secuencia de referencia, pero un anticuerpo anti-VIH que comprende esa secuencia conserva la capacidad de unirse al VIH. En algunas realizaciones, un total de 1 a 10 aminoácidos se han sustituido, insertado y/o eliminado en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, las sustituciones, inserciones o deleciones se producen en regiones fuera de las CDR (por ejemplo, en las FR). Opcionalmente, el anticuerpo anti-VIH comprende la secuencia V_H de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, incluidas las modificaciones postraduccionales de esa secuencia.

En un aspecto, se proporciona un anticuerpo anti-VIH, en donde el anticuerpo comprende un dominio variable de cadena ligera (V_L) que tiene al menos un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2. En algunas realizaciones, una secuencia V_L que tiene al menos un 95

%, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad contiene sustituciones (por ejemplo, sustituciones conservadoras), inserciones o deleciones relativas a la secuencia de referencia, pero un anticuerpo anti-VIH que comprende esa secuencia conserva la capacidad de unirse al VIH. En algunas realizaciones, un total de 1 a 10 aminoácidos se han sustituido, insertado y/o eliminado en una cualquiera de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2. En algunas realizaciones, las sustituciones, inserciones o deleciones se producen en regiones fuera de las CDR (por ejemplo, en las FR). Opcionalmente, el anticuerpo anti-VIH comprende la secuencia V_L de SEQ ID NO: 2, incluidas las modificaciones postraduccionales de esa secuencia.

En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-VIH es un anticuerpo quimérico procedente de cualquiera de los anticuerpos humanos mencionados anteriormente. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-VIH es un anticuerpo humanizado. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-VIH es un anticuerpo humano.

En un aspecto adicional, un anticuerpo anti-VIH de acuerdo con cualquiera de las realizaciones anteriores puede incorporar cualquiera de las características, por separado o en combinación, como se describe a continuación.

PROPIEDADES DE LOS ANTICUERPOS

Frecuencia de mutación

Los anticuerpos de la invención pueden comprender una secuencia de cadena pesada con una frecuencia de mutación de al menos aproximadamente un 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 11 %, 12 %, 13 %, 14 %, 15 %, 16 %, 17 %, 18 %, 19 % o 20 %, o más de una secuencia de línea germinal. Los anticuerpos de la invención pueden comprender una región CDR3 que es una secuencia de cadena ligera con una frecuencia de mutación de al menos aproximadamente un 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 11 %, 12 %, 13 %, 14 %, 15 %, 16 %, 17 %, 18 %, 19 % o 20 %, o más de una secuencia de línea germinal. Los anticuerpos de la invención pueden comprender una secuencia de cadena pesada y cadena ligera con una frecuencia de mutación de al menos aproximadamente un 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 11 %, 12 %, 13 %, 14 %, 15 %, 16 %, 17 %, 18 %, 19 % o 20 %, o más de una secuencia de línea germinal.

Longitudes de cadena pesada y ligera

Los anticuerpos de la invención pueden comprender una región CDR3 que tiene una longitud de al menos aproximadamente 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 aminoácidos de longitud. Los anticuerpos de la invención pueden comprender una región CDR3 que tiene al menos aproximadamente 18 aminoácidos de longitud.

Los anticuerpos de la invención pueden comprender una deleción en un extremo de una cadena ligera. Los anticuerpos de la invención pueden comprender una deleción de 3 o más aminoácidos en un extremo de la cadena ligera. Los anticuerpos de la invención pueden comprender una deleción de 7 o menos aminoácidos en un extremo de la cadena ligera. Los anticuerpos de la invención pueden comprender una deleción de 3, 4, 5, 6 o 7 aminoácidos en un extremo de la cadena ligera.

Los anticuerpos de la invención pueden comprender una inserción en una cadena ligera. Los anticuerpos de la invención pueden comprender una inserción de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10, o más aminoácidos en la cadena ligera. Los anticuerpos de la invención pueden comprender una inserción de 3 aminoácidos en la cadena ligera.

Afinidad

Afinidad es la fuerza de la suma total de interacciones no covalentes entre un solo sitio de unión de una molécula (por ejemplo, un anticuerpo) y su compañero de unión (por ejemplo, un antígeno). A menos que se indique otra cosa, tal como se usa en el presente documento, la "afinidad de unión" se refiere a la afinidad de unión intrínseca que refleja una interacción 1:1 entre miembros de un par de unión (por ejemplo, anticuerpo y antígeno). La afinidad de una molécula X por su ligando Y puede estar representada en general por la constante de disociación (K_d). La afinidad se puede medir mediante cualquiera de varios métodos conocidos, incluidos los comúnmente utilizados y/o los descritos en el presente documento. A continuación se describen realizaciones específicas ilustrativas y ejemplares para medir la afinidad de unión.

En algunas realizaciones, un anticuerpo proporcionado en el presente documento tiene una constante de disociación (K_D) de aproximadamente 1 μ M, 100 nM, 10 nM, 5 nM, 2 nM, 1 nM, 0,5 nM, 0,1 nM, 0,05 nM, 0,01 nM o 0,001 nM o menos (por ejemplo, 10^{-8} M o menos, por ejemplo, de 10^{-8} M a 10^{-13} M, por ejemplo, de 10^{-9} M a 10^{-13} M) para la diana del anticuerpo. La diana del anticuerpo puede ser una diana del VIH. La diana del anticuerpo puede ser una diana del VIH-1. La diana del anticuerpo puede ser una diana del VIH-2. La diana del anticuerpo puede ser una diana del grupo M del VIH-1. La diana del anticuerpo puede ser una diana del grupo N del VIH-1, una diana del grupo O del VIH-1 y/o una diana del grupo P del VIH-1. La diana del anticuerpo puede ser una diana del subtipo A del VIH (incluidos A1 y/o A2), B, C, D, E, F (que incluye F1 y/o F2), G, H, I, J, K o cualquier combinación, subtipo o derivado recombinante (incluida la forma recombinante circulante (CRF, de sus siglas en inglés)) del mismo. Otro aspecto de la invención proporciona un anticuerpo anti-VIH con una mayor afinidad por su diana de VIH, por ejemplo, un anticuerpo anti-VIH

madurado por afinidad. Un anticuerpo madurado por afinidad es un anticuerpo con una o más alteraciones en una o más de las regiones hipervariables (HVR, de sus siglas en inglés), en comparación con un anticuerpo parental que no posee dichas alteraciones, dando como resultado dichas alteraciones una mejora en la afinidad del anticuerpo por el antígeno. Estos anticuerpos pueden unirse al VIH con una K_D de aproximadamente 5×10^{-9} M, 2×10^{-9} M, 1×10^{-9} M, 5×10^{-10} M, 2×10^{-9} M, 1×10^{-10} M, 5×10^{-11} M, 1×10^{-11} M, 5×10^{-12} M, 1×10^{-12} M, o menos. En algunas realizaciones, la invención proporciona un anticuerpo anti-VIH que tiene una afinidad aumentada de al menos 1,5 veces, 2 veces, 2,5 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 10 veces, 20 veces o más en comparación con un anticuerpo anti-VIH de línea germinal que contiene la secuencia de cadena pesada de SEQ ID NO: 69, la secuencia de cadena ligera de SEQ ID NO: 70 o ambas. En otras realizaciones, se proporciona un anticuerpo que compite por unirse al mismo epítipo que un anticuerpo anti-VIH como se describe en el presente documento. En algunas realizaciones, el anticuerpo que se une al mismo epítipo, y/o compite por unirse al mismo epítipo que un anticuerpo anti-VIH exhibe actividades de función efectora, tales como, por ejemplo, citotoxicidad celular mediada por Fc, incluida la actividad ADCC.

La K_D se puede medir mediante cualquier ensayo adecuado. Por ejemplo, la K_D se puede medir mediante un ensayo de unión a antígeno radiomarcado (RIA) (véase, por ejemplo, Chen et al., *J. Mol. Biol.* 293:865-881 (1999); Presta et al., *Cancer Res.* 57:4593-4599 (1997)). Por ejemplo, la K_d se puede medir usando ensayos de resonancia de plasmón superficial (por ejemplo, usando un BIACORE®-2000 o un BIACORE®-3000).

Fragmentos de anticuerpo

Un fragmento de anticuerpo comprende una porción de un anticuerpo intacto, tal como la unión al antígeno o la región variable del anticuerpo intacto. En un aspecto adicional de la invención, un anticuerpo anti-VIH de acuerdo con cualquiera de las realizaciones anteriores es un anticuerpo monoclonal, que incluye un anticuerpo quimérico, humanizado o humano. Los fragmentos de anticuerpos incluyen, pero no se limitan a, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂, Fv, diacuerpo, anticuerpos lineales, anticuerpos multispecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos y fragmentos scFv, y otros fragmentos descritos a continuación. En otra realización, el anticuerpo es un anticuerpo de longitud completa, por ejemplo, un anticuerpo IgG1 intacto u otra clase de anticuerpo o isotipo como se describe en el presente documento. (Véase, por ejemplo, Hudson et al. *Nat. Med.* 9:129-134 (2003); Pluckthiin, *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, pág. 269-315 (1994); Hollinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6444-6448 (1993); el documento WO93/01161; y las patentes de Estados Unidos n.º 5.571.894, 5.869.046, 6.248.516 y 5.587.458). Un anticuerpo de longitud completa, un anticuerpo intacto o un anticuerpo completo es un anticuerpo que tiene una estructura sustancialmente similar a una estructura de anticuerpo natural o que tiene cadenas pesadas que contienen una región Fc como se define en el presente documento. Los fragmentos de anticuerpo pueden prepararse mediante diversas técnicas, incluyendo, pero sin limitación, digestión proteolítica de un anticuerpo intacto así como la producción mediante células hospedadoras recombinantes (por ejemplo, *E. coli* o fago), tal como se describe en el presente documento.

Un Fv es el fragmento de anticuerpo mínimo que contiene un sitio de reconocimiento de antígeno y de unión a antígeno completo. Este fragmento contiene un dímero de un dominio de región variable de cadena pesada y uno ligero en asociación estrecha, no covalente. Del plegamiento de estos dos dominios emanan seis bucles hipervariables (tres bucles cada uno de la cadena H y L) que contribuyen con los restos de aminoácidos para la unión a antígeno y confieren al anticuerpo especificidad de unión a antígeno. Sin embargo, incluso una única región variable (o la mitad de un Fv que comprende solo tres CDR específicas para un antígeno) tiene la capacidad de reconocer y unirse al antígeno, aunque con una afinidad menor que el sitio de unión completo.

Un Fv de cadena sencilla (sFv o scFv) es un fragmento de anticuerpo que comprende los dominios de anticuerpo V_H y V_L conectados en una cadena de polipéptidos única. El polipéptido Fv puede además comprender un enlazador polipeptídico entre los dominios V_H y V_L que permite que el scFv forme la estructura deseada para la unión a antígeno. (Véase, por ejemplo, Pluckthun en *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer- Verlag, Nueva York, pág. 269-315 (1994); Borrebaeck 1995, *infra*. En algunas realizaciones, el sFv puede estar presente en un receptor antigénico quimérico (CAR).

Un diacuerpo es un fragmento de anticuerpo pequeño preparado mediante la construcción de un fragmento sFv con un enlazador corto (aproximadamente 5-10 restos) entre los dominios V_H y V_L de tal manera que se logra el emparejamiento entre cadenas pero no dentro de la cadena de los dominios V, lo que da como resultado un fragmento bivalente. Los diacuerpos biespecíficos son heterodímeros de dos fragmentos cruzados sFv en los que los dominios V_H y V_L de los dos anticuerpos están presentes en diferentes cadenas polipeptídicas. (Véase, por ejemplo, los documentos EP 404.097; WO 93/11161; y Hollinger et al, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 90:6444-6448 (1993)).

Los anticuerpos de dominio (dAb, de sus siglas en inglés), que pueden producirse de forma completamente humana, son los fragmentos de anticuerpos de unión a antígeno más pequeños conocidos, que varían de aproximadamente 11 kDa a aproximadamente 15 kDa. Los dAb son las regiones variables consistentes de las cadenas pesadas y ligeras de las inmunoglobulinas (V_H y V_L, respectivamente). Están altamente expresados en cultivos de células microbianas, muestran propiedades biofísicas favorables que incluyen, por ejemplo, pero sin limitación, la solubilidad y la estabilidad de la temperatura, y se adaptan bien a la selección y maduración por afinidad mediante sistemas de selección *in vitro* tales como, por ejemplo, presentación en fagos. Los dAb son bioactivos como monómeros y, debido a su pequeño

tamaño y estabilidad inherente, pueden formarse en moléculas más grandes para crear fármacos con semividas séricas prolongadas u otras actividades farmacológicas. (Véase, por ejemplo, los documentos WO9425591 y US20030130496).

Fv y sFv son especies con sitios de combinación intactos que están desprovistos de regiones constantes. Por lo tanto, pueden ser adecuados para la unión inespecífica reducida durante su uso *in vivo*. Las proteínas de fusión sFv pueden construirse para producir la fusión de una proteína efectora en el extremo amino o carboxi de un sFv. El fragmento de anticuerpo también puede ser un "anticuerpo lineal". (Véase, por ejemplo, la Patente de EE.UU. n.º 5.641.870). Dichos fragmentos de anticuerpo lineal pueden ser monoespecíficos o biespecíficos.

Receptores antigénicos quiméricos (CAR)

Los ejemplos de receptores antigénicos, incluidos los CAR, y los métodos para genomanipular e introducir dichos receptores en las células, incluyen aquellos descritos, por ejemplo, en la publicación de solicitud de patente internacional número WO200014257, WO2013126726, WO2012/129514, WO2014031687, WO2013/166321, WO2013/071154, WO2013/123061, la publicación de solicitud de patente de EE.UU. número US2002131960, US2013287748, US20130149337, las patentes de EE.UU. n.º: 6.451.995, 7.446.190, 8.252.592, 8.339.645, 8.398.282, 7.446.179, 6.410.319, 7.070.995, 7.265.209, 7.354.762, 7.446.191, 8.324.353 y 8.479.118 y la solicitud de patente europea número EP2537416, y/o aquellas descritas por Sadelain et al., *Cancer Discov.* abril de 2013; 3(4): 388-398; Davila et al. (2013) *PLoS ONE* 8(4): e61338; Turtle et al., *Curr. Opin. Immunol.*, octubre de 2012; 24(5): 633-39; Wu et al., *Cancer*, 18 de marzo de 2012 (2): 160-75. En algunos aspectos, los receptores de antígeno incluyen un CAR como se describe en la Patente de EE.UU. n.º: 7.446.190, y aquellos descritos en la Publicación de la Solicitud de Patente Internacional n.º: WO/2014055668 A1. Los ejemplos de CAR incluyen CAR como se desvelan en cualquiera de las publicaciones mencionadas anteriormente, tales como los documentos WO2014031687, US 8.339.645, US 7.446.179, US 2013/0149337, la patente de EE.UU. n.º: 7.446.190, la patente de EE.UU. n.º: 8.389.282, Kochenderfer et al., 2013, *Nature Reviews Clinical Oncology*, 10, 267-276 (2013); Wang et al. (2012) *J. Immunother.* 35(9): 689-701; y Brentjens et al., *Sci Transl Med.* 2013 5(177). Véase también los documentos WO2014031687, US 8.339.645, US 7.446.179, US 2013/0149337, la patente de EE.UU. n.º: 7.446.190 y la patente de EE.UU. n.º: 8.389.282. Los receptores quiméricos, tales como los CAR, generalmente incluyen un dominio de unión a antígeno extracelular, tal como una porción de una molécula de anticuerpo, generalmente una región variable de cadena pesada (V_H) y/o región variable de cadena ligera (V_L) del anticuerpo, por ejemplo, un fragmento de anticuerpo scFv.

En algunas realizaciones, un receptor antigénico quimérico (CAR) puede comprender un dominio intracelular que comprende un dominio intracelular de un receptor de linfocitos T, y una porción extracelular que comprende una porción de unión a antígeno de un anticuerpo, por ejemplo, un sFv de un anticuerpo. En general, un receptor quimérico (por ejemplo, un CAR) comprende un enlazador o dominio espaciador entre la porción de unión a antígeno y el dominio transmembrana. En algunas realizaciones, el enlazador o separador procede de una región bisagra de inmunoglobulina. En algunas realizaciones, un ácido nucleico que codifica una construcción CAR, en algunas realizaciones, un vector CAR, además de codificar un dominio intracelular que comprende un dominio intracelular de un receptor de linfocitos T, y una porción extracelular que comprende una porción de unión a antígeno de un anticuerpo, por ejemplo, un sFv de un anticuerpo, puede comprender un promotor. Por ejemplo, un promotor puede ser un promotor sintético que contiene una región U3 de una MoMuLV LTR modificada con potenciador del virus del sarcoma mieloproliferativo. En otras realizaciones, un promotor puede ser un promotor EF1a o un promotor EF1. En algunas realizaciones, un CAR puede comprender un dominio intracelular que comprende un dominio coestimulador y un dominio intracelular de un receptor de linfocitos T, y una porción extracelular que comprende un anticuerpo, tal como uno o más anticuerpos proporcionados en el presente documento, que puede ser un anticuerpo de cadena sencilla o fragmento del mismo. En algunas realizaciones, el anticuerpo es o comprende un sFv o un scFv. En algunas realizaciones, el CAR puede incluir además porciones extracelulares adicionales, tales como un separador y/o región bisagra.

En cualquiera de las realizaciones anteriores, el anticuerpo dentro de la molécula quimérica, por ejemplo, el receptor quimérico, por ejemplo, CAR, tal como el sFv, puede comprender un dominio V_H y un dominio V_L de un anticuerpo. Por ejemplo, un sFv puede comprender un dominio V_H de uno cualquiera de AbV-1, AbV-2, AbV-3, AbV-4, AbV-5, AbV-6, AbV-7, AbV-8, AbV-9, AbV-9a o AbV-9b en combinación con un dominio V_L de uno cualquiera de Ab-V1, AbV-2, AbV-3, AbV-4, AbV-5, AbV-6, AbV-7, AbV-8, AbV-9, AbV-9a o AbV-9b. Por ejemplo, se puede crear un sFv mediante la síntesis de secuencias optimizadas por codones para las cadenas pesadas y ligeras separadas por uno de varios enlazadores.

En algunos aspectos, los enlazadores ricos en glicina y serina (y/o treonina) incluyen al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de dichos aminoácidos. En algunas realizaciones, incluyen al menos o aproximadamente un 50 %, 55 %, 60 %, 70 % o 75 % de glicina, serina y/o treonina. En algunas realizaciones, el enlazador está compuesto sustancial o completamente de glicina, serina y/o treonina. Los enlazadores generalmente tienen de aproximadamente 5 aminoácidos a aproximadamente 50 aminoácidos de longitud, normalmente entre, a o aproximadamente 10 aminoácidos y a o aproximadamente 30 aminoácidos, por ejemplo, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, o 30 aminoácidos, y en algunos ejemplos entre 10 aminoácidos y 25 aminoácidos de longitud. Los enlazadores ejemplares incluyen enlazadores que

tienen varios números de repeticiones de la secuencia GGGGS (4GS) o GGGG (3GS), tales como de 2, 3, 4, a 5 repeticiones de dicha secuencia. Los enlazadores ejemplares incluyen aquellos que tienen o consisten en una GGGGSGGGGSGGGGS. Los enlazadores ejemplares incluyen además aquellos que tienen o consisten en la secuencia GSTSGSGKPGSGEGSTKG.

En algunas realizaciones, el dominio de señalización intracelular incluye dominios de señalización intracelulares de receptores coestimuladores tales como CD28, CD137 (4-1 BB), OX40, y/o ICOS. En algunas realizaciones, el CAR incluye una secuencia de señalización citoplasmática primaria que regula la activación primaria del complejo TCR. Las secuencias de señalización citoplasmáticas primarias que actúan de manera estimuladora pueden contener motivos de señalización que se conocen como motivos de activación de inmunorreceptores basados en tirosina o ITAM. Los ejemplos de ITAM que contienen secuencias de señalización citoplasmáticas primarias incluyen las procedentes de TCR ζ , FcR γ , FcR β , CD3 γ , CD3 δ , CD3 ϵ , CD8, CD22, CD79a, CD79b y CD66d. En algunas realizaciones, las moléculas de señalización citoplasmáticas en el CAR contienen un dominio de señalización citoplásmico, una porción del mismo o una secuencia procedente de CD3 ζ .

Un vector CAR ejemplar (que incluye un ácido nucleico que codifica un CAR) se puede transfectar en linfocitos T. Los linfocitos T pueden ser linfocitos T CD8+. En algunas realizaciones, los linfocitos T CD8+ que se transfectaron y expresan el CAR pueden reconocer las células infectadas para la proliferación, destrucción y/o supresión de la replicación vírica. En otras realizaciones, el linfocito T transfectado con un CAR puede ser un linfocito T CD4+. En algunas realizaciones, los linfocitos T CD4+ modificados con CAR pueden modificarse adicionalmente de modo que ya no expresen CD4. En algunas realizaciones, un linfocito T transfectado con un CAR puede modificarse adicionalmente para carecer de correceptores implicados en la infección por VIH, tales como CCR2b, CCR3, CXCR4 y/o CCR5. Por ejemplo, los linfocitos T se pueden transfectar con reactivos, tales como ARNip, para disminuir o atenuar la expresión de uno o más correceptores implicados en la infección por VIH, tales como CCR2b, CCR3, CXCR4 y/o CCR5. En algunas realizaciones, la expresión de uno o más de estos correceptores implicados en la infección por VIH se puede disminuir o atenuar mediante una herramienta de edición del genoma dirigida, como una nucleasa con dedos de zinc (ZFN, de sus siglas en inglés), una nucleasa efectora activadora de la transcripción (TALEN, de sus siglas en inglés), el sistema CRISPR/Cas, las endonucleasas guiadas por ARN y/o la endonucleasa de asentamiento regonomanipulada de meganucleasa genomanipulada.

Anticuerpos quiméricos y humanizados

En algunas realizaciones, un anticuerpo proporcionado en el presente documento es un anticuerpo quimérico (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. n.º 4.816.567; y Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 81:6851-6855 (1984)). Un anticuerpo quimérico se refiere generalmente a un anticuerpo en el que una porción de la cadena pesada y/o ligera procede de una fuente o especie particular, mientras que el resto de la cadena pesada y/o ligera procede de una fuente o especie diferente. En un ejemplo, un anticuerpo quimérico comprende una región variable no humana (por ejemplo, una región variable procedente de un ratón, rata, hámster, conejo o primate no humano, tal como un mono) y una región constante humana. En un ejemplo adicional, un anticuerpo quimérico es un anticuerpo de "cambio de clase" en el que la clase o subclase se ha cambiado de la del anticuerpo original. Los anticuerpos quiméricos incluyen fragmentos de unión a antígeno de los mismos.

En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo humanizado (véase, por ejemplo, Almagro y Fransson, Front. Bios- ci.13:1619-1633 (2008); Riechmann et al., Nature 332:323-329 (1988); Queen et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 86:10029-10033 (1989); las patentes de EE.UU. n.º 5.821.337, 7.527.791, 6.982.321 y 7.087.409; Kashmiri et al., Methods 36:25-34 (2005); Padlan, Mol. Immunol.28:489-498 (1991); Dall'Acqua et al., Methods 36:43-60 (2005); Osbourn et al., Methods 36:61-68 (2005); y Klimka et al., Br. J. Cancer, 83:252-260 (2000)).

Un anticuerpo no humano se puede humanizar para reducir la inmunogenicidad en humanos, mientras se conserva la especificidad y afinidad del anticuerpo no humano parental. Un anticuerpo humanizado puede comprender uno o más dominios variables que comprenden una o más CDR, o porciones de las mismas, procedentes de un anticuerpo no humano. Un anticuerpo humanizado puede comprender uno o más dominios variables que comprenden una o más FR, o porciones de las mismas, procedentes de secuencias de anticuerpos humanos. Un anticuerpo humanizado puede comprender opcionalmente al menos una porción de una región constante humana. En algunas realizaciones, uno o más restos de FR en un anticuerpo humanizado se sustituyen con los restos correspondientes de un anticuerpo no humano (por ejemplo, el anticuerpo del que proceden los restos de CDR), por ejemplo, para restaurar o mejorar la especificidad o afinidad del anticuerpo.

Las regiones marco humanas que pueden usarse para la humanización incluyen, pero no se limitan a: regiones marco seleccionadas usando un método de "mejor ajuste"; regiones marco procedentes de la secuencia consenso de anticuerpos humanos de un subgrupo particular de regiones variables de cadena ligera o pesada; regiones marco humanas maduras (mutadas somáticamente) o regiones marco de línea germinal humana; y regiones marco procedentes de la selección de bibliotecas FR (véase, por ejemplo, Sims et al. J. Immunol. 151:2296 (1993); Carter et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285 (1992); Presta et al. J. Immunol., 151:2623 (1993); Baca et al., J. Biol. Chem. 272:10678-10684 (1997); y Rosok et al., J. Biol. Chem. 271:22611-22618 (1996)).

Anticuerpos humanos

En algunas realizaciones, un anticuerpo proporcionado en el presente documento es un anticuerpo humano. Los anticuerpos humanos se pueden producir usando varias técnicas conocidas (véase, por ejemplo, van Dijk y van de Winkel, Curr. Opin. Pharmacol. 5: 368-74 (2001); y Lonberg, Curr. Opin. Immunol. 20:450-459 (2008)). En algunos aspectos, los anticuerpos humanos se pueden preparar mediante la administración de un inmunógeno (por ejemplo, un inmunógeno del VIH) a un animal transgénico que se ha modificado para producir anticuerpos humanos intactos o anticuerpos intactos con regiones variables humanas en respuesta a la exposición antigénica. (Véase, por ejemplo, Lonberg, Nat. Biotech. 23:1117-1125 (2005); las patentes de EE.UU. n.º 6.075.181, 6.150.584, 5.770.429 y 7.041.870; y la publicación de solicitud de patente de EE.UU. n.º US 2007/0061900). Las regiones variables humanas a partir de anticuerpos intactos generados mediante dichos animales pueden modificarse adicionalmente, por ejemplo, mediante la combinación con una región constante humana diferente.

En algunos aspectos, los anticuerpos humanos también se pueden elaborar mediante métodos basados en hibridoma. Por ejemplo, los anticuerpos humanos se pueden producir a partir de líneas celulares de mieloma humano y heteromieloma ratón-humano, usando tecnología de hibridoma de linfocitos B humanos y otros métodos (véase, por ejemplo, Kozbor J. Immunol., 133: 3001 (1984); Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pág. 51-63 (1987); Boerner et al., J. Immunol., 147: 86 (1991); Li et al., Proc. Natl. Acad., 103:3557-3562 (2006); la patente de EE.UU. n.º 7.189.826; Ni, Xiandai Mianyixue, 26(4):265-268 (2006); Vollmers y Brandlein, Histology and Histopathology, 20(3):927-937 (2005); Y Vollmers y Brandlein, Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology, 27(3): 185-91 (2005)). Los anticuerpos humanos también pueden generarse mediante el aislamiento de secuencias de dominio variable de clon Fv seleccionadas de bibliotecas de presentación en fagos procedentes de seres humanos. Dichas secuencias de dominio variable pueden combinarse luego con un dominio constante humano deseado.

Obtención de bibliotecas

Los anticuerpos pueden aislarse mediante la selección de bibliotecas combinatorias para anticuerpos con la actividad o actividades deseadas. (Véase, por ejemplo, en Hoogenboom et al., Methods in Molecular Biology 178:1-37 (2001); McCafferty et al., Nature 348:552-554; Clackson et al., Nature 352: 624-628 (1991); Marks et al., J. Mol. Biol. 222: 581-597 (1992); Marks y Bradbury, Methods in Molecular Biology 248:161-175 (2003); Sidhu et al., J. Mol. Biol. 338(2): 299-310 (2004); Lee et al., J. Mol. Biol. 340(5): 1073-1093 (2004); Fellouse, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101(34): 12467-12472 (2004); y Lee et al., J. Immunol. Methods 284(1-2): 119-132 (2004)). Los repertorios de genes V_H y V_L pueden clonarse por separado (por ejemplo, mediante PCR) y recombinarse aleatoriamente en bibliotecas (por ejemplo, bibliotecas de fagos), y seleccionarse (véase, por ejemplo, Winter et al., Ann. Rev. Immunol., 12: 433-455 (1994)). Alternativamente, el repertorio indiferenciado se puede clonar (por ejemplo, a partir de seres humanos) para proporcionar una única fuente de anticuerpos contra una amplia gama de antígenos no propios y propios sin ninguna inmunización (véase, por ejemplo, Griffiths et al., EMBO J, 12: 725-734 (1993)). Alternativamente, las bibliotecas indiferenciadas se pueden hacer sintéticamente clonando segmentos génicos V no reorganizados a partir de células madre, y codificando las regiones CDR3 usando cebadores aleatorios o para reorganizar los segmentos génicos V *in vitro* (véase, por ejemplo, Hoogenboom y Winter, J. Mol. Biol., 227: 381-388 (1992); la patente de EE.UU. n.º 5.750.373, y las publicaciones de patente de EE.UU. n.º US 2005/0079574, US 2005/0119455, US 2005/0266000, US 2007/0117126, US 2007/0160598, US 2007/0237764, US 2007/0292936 y US 2009/0002360. Los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos aislados de bibliotecas de anticuerpos humanos se consideran anticuerpos humanos o fragmentos de anticuerpos humanos en el presente documento.

Multiespecificidad

En algunas realizaciones, un anticuerpo proporcionado en el presente documento es un anticuerpo multispecífico, por ejemplo, un anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos multispecíficos son generalmente anticuerpos monoclonales que tienen especificidades de unión para al menos dos sitios diferentes (véase, por ejemplo, la publicación de patente de EE.UU. n.º US 2008/0069820). En algunas realizaciones, una de las especificidades de unión es para el VIH y la otra es para cualquier otro antígeno. En algunas realizaciones, los anticuerpos biespecíficos pueden unirse a dos epítopos diferentes del VIH. También pueden usarse anticuerpos biespecíficos para localizar agentes citotóxicos en células infectadas con VIH. Los anticuerpos biespecíficos se pueden preparar como anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpos.

Las técnicas ejemplares para fabricar anticuerpos multispecíficos incluyen la expresión conjunta recombinante de dos pares de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina que tienen diferentes especificidades, genomanipulación de efectos de dirección electrostática para producir moléculas Fc-heterodiméricas de anticuerpos, reticulación de dos o más anticuerpos o fragmentos, uso de cremalleras de leucina para producir anticuerpos biespecíficos, uso de tecnología de "diacuerpo" para fabricar fragmentos de anticuerpos biespecíficos, uso de dímeros de cadena simple Fv (sFv), preparación de anticuerpos triespecíficos y genomanipulación de "botón en ojal" (véase, por ejemplo, Milstein y Cuello, Nature 305: 537 (1983); el documento WO9/089004A1; el documento WO93/08829; Trautnecker et al., EMBO J. 10: 3655 (1991); las patentes de EE.UU. n.º 4.676.980 y 5.731.168; Brennan et al., Science, 229: 81 (1985); Kostelny et al., J. Immunol., 148(5):1547-1553 (1992); Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.,

90:6444-6448 (1993); Gruber et al., J. Immunol., 152:5368 (1994)); y Tutt et al. J. Immunol. 147: 60 (1991)). También se incluyen anticuerpos genomanipulados con tres o más sitios de unión a antígeno funcionales (véase, por ejemplo, el documento US 2006/0025576).

5 VARIANTES

En algunas realizaciones, se contemplan variantes de secuencia de aminoácidos de los anticuerpos que se proporcionan en el presente documento. Una variante normalmente difiere de un polipéptido específicamente desvelado en el presente documento en una o más sustituciones, deleciones, adiciones y/o inserciones. Dichas variantes pueden ser de origen natural o pueden generarse sintéticamente, por ejemplo, mediante la modificación de una o más de las secuencias polipeptídicas anteriores de la invención y la evaluación de una o más actividades biológicas del polipéptido como se describe en el presente documento y/o el uso de cualquiera de una serie de técnicas conocidas. Por ejemplo, puede ser deseable mejorar la afinidad de unión y/u otras propiedades biológicas del anticuerpo. Las variantes de secuencia de aminoácidos de un anticuerpo pueden prepararse mediante la introducción de modificaciones apropiadas en la secuencia de nucleótidos que codifica el anticuerpo, o mediante síntesis de péptidos. Dichas modificaciones incluyen, por ejemplo, deleciones de y/o inserciones en y/o sustituciones de restos dentro de las secuencias de aminoácidos del anticuerpo. Puede efectuarse cualquier combinación de supresión, inserción y sustitución para llegar a la construcción final, a condición de que la construcción final posea las características deseadas, por ejemplo, unión a antígeno.

Variantes de sustitución, inserción y deleción

En algunas realizaciones, se proporcionan variantes de anticuerpos que tienen una o más sustituciones de aminoácidos. Los sitios de interés para la mutagénesis mediante sustitución incluyen las CDR y las FR. Pueden introducirse sustituciones de aminoácidos en un anticuerpo de interés y los productos pueden explorarse para detectar una actividad deseada, por ejemplo, unión a antígeno conservada/mejorada, inmunogenia reducida o CCDA o CDC mejoradas.

Resto original	Sustituciones conservadoras ejemplares
Ala (A)	Val; Leu; Ile
Arg (R)	Lys; Gln; Asn
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg
Asp (D)	Glu; Asn
Cys (C)	Ser; Ala
Gln (Q)	Asn; Glu
Glu (E)	Asp; Gln
Gly (G)	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; Norleucina
Leu (L)	Norleucina; Ile; Val; Met; Ala; Phe
Lys (K)	Arg; Gln; Asn
Met (M)	Leu; Phe; Ile
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr
Pro (P)	Ala
Ser (S)	Thr
Thr (T)	Val; Ser
Trp (W)	Tyr; Phe
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; Norleucina

Los aminoácidos hidrófobos incluyen: Norleucina, Met, Ala, Val, Leu e Ile. Los aminoácidos hidrófilos neutros incluyen: Cys, Ser, Thr, Asn y Gln. Los aminoácidos ácidos incluyen: Asp y Glu. Los aminoácidos básicos incluyen: His, Lys y Arg. Los aminoácidos con restos que influyen en la orientación de la cadena incluyen: Gly y Pro. Los aminoácidos aromáticos incluyen: Trp, Tyr y Phe.

En algunas realizaciones, las sustituciones, inserciones o deleciones pueden ocurrir dentro de una o más CDR, en donde las sustituciones, inserciones o deleciones no reducen sustancialmente la unión del anticuerpo al antígeno. Por ejemplo, las sustituciones conservadoras que no reducen sustancialmente la afinidad de unión pueden realizarse en las CDR. Dichas alteraciones pueden estar fuera de los "puntos críticos" de CDR o SDR. En algunas realizaciones de las secuencias de V_H y V_L variantes, cada CDR está inalterada o no contiene más de una, dos o tres sustituciones de aminoácidos.

Se pueden realizar alteraciones (por ejemplo, sustituciones) en las CDR, por ejemplo, para mejorar la afinidad de anticuerpos. Dichas alteraciones pueden realizarse en codones codificadores de CDR con una alta tasa de mutación durante la maduración somática (véase, por ejemplo, Chowdhury, *Methods Mol. Biol.* 207:179-196 (2008)), y la

variante resultante puede analizarse para determinar la afinidad de unión. La maduración por afinidad (por ejemplo, mediante PCR propensa a errores, combinación de cadenas, aleatorización de CDR o mutagénesis dirigida a oligonucleótidos) se puede usar para mejorar la afinidad de anticuerpos (véase, por ejemplo, Hoogenboom et al. en *Methods in Molecular Biology* 178:1-37 (2001)). Los restos de CDR implicados en la unión a antígeno pueden identificarse específicamente, por ejemplo, utilizando mutagénesis o modelado de exploración de alanina (véase, por ejemplo, Cunningham y Wells Science, 244:1081-1085 (1989)). Las CDR-H3 y CDR-L3 en particular a menudo son dianas. Como alternativa o además, se usa una estructura cristalina de un complejo antígeno-anticuerpo para identificar puntos de contacto entre el anticuerpo y el antígeno. Dichos restos de contacto y restos vecinos pueden usarse como diana o eliminarse como candidatos para sustitución. Las variantes pueden explorarse para determinar si contienen las propiedades deseadas.

Las inserciones y deleciones de secuencias de aminoácidos incluyen fusiones amino- y/o carboxilo-terminales que varían en longitud desde un resto a polipéptidos que contienen cien o más restos, así como inserciones y deleciones intrasecuencia de restos de aminoácidos únicos o múltiples. Los ejemplos de inserciones terminales incluyen un anticuerpo con un resto de metionilo N-terminal. Otras variantes de inserción de la molécula de anticuerpo incluyen la fusión al extremo N o C del anticuerpo a una enzima (por ejemplo, para ADEPT) o un polipéptido que aumenta la semivida en suero del anticuerpo. Los ejemplos de variantes de inserción intrasecuencial de las moléculas de anticuerpo incluyen una inserción de 3 aminoácidos en la cadena ligera. Los ejemplos de deleciones terminales incluyen un anticuerpo con una delección de 7 o menos aminoácidos en un extremo de la cadena ligera.

Variantes de glucosilación

En algunas realizaciones, los anticuerpos se alteran para aumentar o disminuir su glucosilación (por ejemplo, alterando la secuencia de aminoácidos de modo que se crean o eliminan uno o más sitios de glucosilación). Se puede alterar un hidrato de carbono unido a una región Fc de un anticuerpo. Los anticuerpos naturales de células de mamífero comprenden normalmente un oligosacárido biantenarico ramificado unido mediante un enlace N a Asn297 del dominio CH2 de la región Fc (véase, por ejemplo, Wright et al. *TIBTECH* 15:26-32 (1997)). El oligosacárido puede ser varios hidratos de carbono, por ejemplo, manosa, N-acetil glucosamina (GlcNAc), galactosa, ácido siálico, fucosa unida a un GlcNAc en el tallo de la estructura de oligosacárido biantenarico. Se pueden realizar modificaciones del oligosacárido en un anticuerpo, por ejemplo, para crear variantes de anticuerpos con determinadas propiedades mejoradas. Las variantes de glucosilación de anticuerpos pueden tener una función ADCC y/o CDC mejorada.

En algunas realizaciones, se proporcionan variantes de anticuerpos que tienen una estructura de hidrato de carbono que carece de fucosa unida (directa o indirectamente) a una región Fc. Por ejemplo, la cantidad de fucosa en dicho anticuerpo puede ser del 1 % al 80 %, del 1 % al 65 %, del 5 % al 65 % o del 20 % al 40 %. La cantidad de fucosa se determina calculando la cantidad promedio de fucosa dentro de la cadena de azúcar en Asn297, en relación con la suma de todas las glucoestructuras unidas a Asn297 (véase, por ejemplo, el documento WO 08/077546). Asn297 se refiere al resto de asparagina ubicado aproximadamente en la posición 297 en la región Fc (numeración Eu de restos de la región Fc); sin embargo, Asn297 también puede ubicarse aproximadamente ± 3 aminoácidos cadena arriba o cadena abajo de la posición 297, es decir, entre las posiciones 294 y 300, debido a variaciones de secuencia menores en los anticuerpos. Dichas variantes de fucosilación pueden tener una función ADCC mejorada (véase, por ejemplo, la publicación de patente n.º US 2003/0157108; el documento US 2004/0093621; el documento US 2003/0157108; el documento WO00/61739; el documento WO01/29246; el documento US 2003/0115614; el documento US 2002/0164328; el documento 2004/0093621; el documento US 2004/0132140; el documento US 2004/0110704; el documento US 2004/0110282; el documento US 2004/0109865; el documento WO03/085119; el documento WO03/084570; el documento WO05/035586; el documento WO05/035778; el documento WO05/053742; el documento WO02/031140; Okazaki et al. *J. Mol. Biol.* 336:1239-1249 (2004); y Yamane-Ohnuki et al. *Biotech. Bioeng.* 87: 614 (2004)). Las líneas celulares, por ejemplo, las líneas celulares inactivadas y los métodos de su uso pueden usarse para producir anticuerpos defucosilados, por ejemplo, células CHO Lec13 deficientes en fucosilación de proteínas y células CHO inactivadas del gen de alfa-1,6-fucosiltransferasa (FUT8) (véase, por ejemplo, Ripka et al. *Arch. Biochem. Biophys.* 249:533-545 (1986); Yamane- Ohnuki et al. *Biotech. Bioeng.* 87: 614 (2004); Kanda, Y. et al., *Biotechnol. Bioeng.*, 94(4):680-688 (2006); el documento WO03/085107; el documento EP 1176195A1, el documento WO04/056312; el documento WO04/057002; el documento WO03/084570; el documento WO03/085119; los documentos WO03/05691; 4 WO04/024927; y la publicación de patente de EE.UU. n.º US 2003/0157108; el documento US 2003/0115614, el documento US 2004/093621, el documento US 2004/110282, el documento US 2004/110704, y el documento US 2004/132140). También se incluyen otras variantes de glucosilación de anticuerpos (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. n.º 6.602.684; la publicación de patente n.º US 2005/0123546; el documento WO03/011878; el documento WO97/30087; el documento WO98/58964; y el documento WO99/22764).

En consecuencia, los anticuerpos anti-VIH de la presente invención se pueden producir mediante una célula hospedadora con una o más actividades de glucosiltransferasas exógenas y/o endógenas altas. Los genes con actividad glucosiltransferasa incluyen $\beta(1,4)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa III (GnTII), α -manosidasa II (ManII), $\beta(1,4)$ -galactosiltransferasa (GalT), $\beta(1,2)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa I (GnTI) y $\beta(1,2)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa II (GnTII). Las glucotransferasas pueden comprender una fusión que comprende un dominio de localización de Golgi (véase, por ejemplo, Lively et al., *Glycobiology* 318:813-22 (1995); Schachter, *Biochem. Cell Biol.* 64:163-81 (1986); las solicitudes de patente provisional de EE.UU. n.º 60/495.142 y 60/441.307; la

publicación de patente n.º US 2003/0175884 y US 2004/0241817; y el documento WO04/065540). En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-VIH se puede expresar en una célula hospedadora que comprende un gen de glucosiltransferasa interrumpido o desactivado. En consecuencia, en algunas realizaciones, la presente invención se refiere a una célula hospedadora que comprende (a) un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia que codifica un polipéptido que tiene una actividad glucosiltransferasa; y (b) un polinucleótido aislado que codifica un anticuerpo anti-VIH de la presente invención que se une al VIH humano. En una realización particular, el anticuerpo anti-VIH modificado producido por la célula hospedadora tiene una región constante de IgG o un fragmento del mismo que comprende la región Fc. En otra realización particular, el anticuerpo anti-VIH es un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo que comprende una región Fc. Un ácido nucleico aislado es una molécula de ácido nucleico que se ha separado de un componente de su entorno natural. Un ácido nucleico aislado incluye una molécula de ácido nucleico contenida en células que normalmente contienen la molécula de ácido nucleico, pero la molécula de ácido nucleico está presente extracromosómicamente o en una ubicación cromosómica que es diferente de su ubicación cromosómica natural.

Los anticuerpos anti-VIH con glucosilación alterada producida por las células hospedadoras de la invención pueden exhibir una afinidad de unión al receptor Fc aumentada (por ejemplo, una unión a un receptor activador de Fcγ aumentada, tal como el receptor FcγRIIIa) y/o una función efectora aumentada. La función efectora aumentada puede ser un aumento en una o más de los siguientes: citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo aumentada, fagocitosis celular dependiente de anticuerpo aumentada (ADCP), secreción de citocinas aumentada, captación de antígeno mediada por complejo inmune por células presentadoras de antígenos aumentada, citotoxicidad celular mediada por Fc aumentada, unión a células NK aumentada, unión a macrófagos aumentada, unión a células polimorfonucleares aumentada (PMN), unión aumentada a monocitos, reticulación aumentada de anticuerpos unidos a la diana, señalización inductora de la apoptosis directa aumentada, maduración de células dendríticas aumentada y cebado aumentado de linfocitos T. En consecuencia, en un aspecto, la presente invención proporciona glucoformas de un anticuerpo anti-VIH que tiene una función efectora aumentada en comparación con el anticuerpo anti-VIH que no ha sido glucomanipulado. (Véase, por ejemplo, Tang et al., J. Immunol. 179:2815-2823 (2007)).

La presente invención también se refiere a un método para producir un anticuerpo anti-VIH de la presente invención que tiene oligosacáridos modificados, que comprende (a) cultivar una célula hospedadora genomanipulada para expresar al menos un ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene actividad de glucosiltransferasa en condiciones que permiten la producción de un anticuerpo anti-VIH de acuerdo con la presente invención, en donde dicho polipéptido que tiene actividad glucosiltransferasa se expresa en una cantidad suficiente para modificar los oligosacáridos en la región Fc de dicho anticuerpo anti-VIH producido por dicha célula hospedadora; y (b) aislar dicho anticuerpo anti-VIH. En otra realización, hay dos polipéptidos que tienen actividad glucosiltransferasa. Los anticuerpos anti-VIH producidos mediante los métodos de la presente invención pueden tener afinidad de unión al receptor Fc aumentada y/o función efectora aumentada.

En algunas realizaciones, el porcentaje de oligosacáridos unidos a N bisectados en la región Fc del anticuerpo anti-VIH es de al menos aproximadamente un 10 % a aproximadamente un 100 %, específicamente al menos aproximadamente un 50 %, más específicamente, al menos aproximadamente un 60 %, al menos aproximadamente un 70 %, al menos aproximadamente un 80 %, o al menos aproximadamente un 90-95 % de los oligosacáridos totales. En otra realización más, el anticuerpo producido mediante los métodos de la invención tiene una proporción aumentada de oligosacáridos no fucosilados en la región Fc como resultado de la modificación de sus oligosacáridos mediante los métodos de la presente invención. En algunas realizaciones, el porcentaje de oligosacáridos no fucosilados es de al menos aproximadamente un 20 % a aproximadamente un 100 %, específicamente al menos aproximadamente un 50 %, al menos aproximadamente un 60 % a aproximadamente un 70 %, y más específicamente, al menos aproximadamente un 75 %. Los oligosacáridos no fucosilados pueden ser del tipo híbrido o complejo. En otra realización más, el anticuerpo producido mediante los métodos de la invención tiene una proporción aumentada de oligosacáridos bisectados en la región Fc como resultado de la modificación de sus oligosacáridos mediante los métodos de la presente invención. En algunas realizaciones, el porcentaje de oligosacáridos bisectados es de al menos aproximadamente un 20 % a aproximadamente un 100 %, específicamente al menos aproximadamente un 50 %, al menos aproximadamente un 60 % a aproximadamente un 70 %, y más específicamente, al menos aproximadamente un 75 %.

En otra realización, la presente invención se refiere a un anticuerpo anti-VIH genomanipulado para tener función efectora aumentada y/o afinidad de unión al receptor Fc aumentada, producido mediante los métodos de la invención. En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo intacto. En algunas realizaciones, el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo que contiene la región Fc, o una proteína de fusión que incluye una región equivalente a la región Fc de una inmunoglobulina.

En un aspecto, la presente invención proporciona sistemas de expresión de células hospedadoras para la generación de los anticuerpos de la presente invención que tienen patrones de glucosilación modificados. En particular, la presente invención proporciona sistemas de células hospedadoras para la generación de glucoformas de los anticuerpos de la presente invención que tienen un valor terapéutico mejorado. Por lo tanto, la invención proporciona sistemas de expresión de células hospedadoras seleccionados o genomanipulados para expresar un polipéptido que tiene una actividad glucosiltransferasa.

En general, cualquier tipo de línea celular cultivada, incluidas las líneas celulares discutidas anteriormente, se puede usar como antecedente para genomanipular las líneas celulares hospedadoras de la presente invención. En algunas realizaciones, células CHO, células BHK, células NS0, células SP2/0, células YO de mieloma, células P3X63 de mieloma de ratón, células PER, células PER.C6 o células de hibridoma, otras células de mamífero, células de levadura, células de insecto, o células vegetales se usan como la línea celular antecedente para generar las células hospedadoras genomanipuladas de la invención.

Las células hospedadoras que contienen la secuencia codificante de un anticuerpo de la invención y que expresan los productos génicos biológicamente activos pueden identificarse mediante al menos cuatro enfoques generales; (a) hibridación de ADN-ADN o ADN-ARN; (b) la presencia o ausencia de funciones génicas "marcadoras"; (c) evaluación del nivel de transcripción medido mediante la expresión de las respectivas transcripciones de ARNm en la célula hospedadora; y (d) detección del producto génico medido mediante inmunoensayo o mediante su actividad biológica.

Variantes de la región Fc

En algunas realizaciones, pueden introducirse una o más modificaciones de aminoácidos en la región Fc de un anticuerpo proporcionado en el presente documento, generando de este modo una variante de región Fc. Una región Fc en el presente documento es una región C-terminal de una cadena pesada de inmunoglobulina que contiene al menos una porción de la región constante. Una región Fc incluye regiones Fc de secuencia nativa y regiones Fc variantes. La variante de la región Fc puede comprender una secuencia de región Fc humana (por ejemplo, una región Fc de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humana) que comprende una modificación de aminoácidos (por ejemplo, una sustitución) en una o más posiciones de aminoácidos.

En algunas realizaciones, la invención contempla una variante de anticuerpo que posee algunas, pero no todas, las funciones efectoras, lo que lo convierte en un candidato deseable para aplicaciones en las que la semivida del anticuerpo *in vivo* es importante aunque determinadas funciones efectoras (tales como complemento y ADCC) son innecesarias o perjudiciales. Se pueden realizar ensayos de citotoxicidad *in vitro* y/o *in vivo* para confirmar la reducción/agotamiento de las actividades de CDC y/o ADCC. Por ejemplo, se pueden realizar ensayos de unión al receptor Fc (FcR) para garantizar que el anticuerpo carece de unión FcγR (por lo tanto, probablemente carezca de actividad ADCC), pero conserva la capacidad de unión a FcRn. Ejemplos no limitantes de ensayos *in vitro* para determinar la actividad de ADCC de una molécula de interés se describen en las Patentes de EE.UU. n.º 5.500.362 y 5.821.337. Alternativamente, se pueden emplear métodos de ensayos no radiactivos (por ejemplo, ensayos de citotoxicidad no radioactiva ACTI™ y CytoTox 96®). Las células efectoras útiles para dichos ensayos incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC, de sus siglas en inglés) y linfocitos citolíticos naturales (NK, de sus siglas en inglés). Como alternativa o además, la actividad ADCC de la molécula de interés puede evaluarse *in vivo*, por ejemplo, en un modelo animal (véase, por ejemplo, Clynes et al. Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 95:652-656 (1998)). Los ensayos de unión a C1q también se pueden llevar a cabo para confirmar que el anticuerpo es capaz o no de unirse a C1q y, por lo tanto, contiene o carece de actividad de CDC (véase, por ejemplo, los documentos WO06/029879, WO99/51642 y WO05/100402; la patente de EE.UU. n.º 6.194.551; y Idusogie et al. J. Immunol. 164: 4178-4184 (2000)). Para evaluar la activación de complemento, se puede realizar un ensayo de CDC (véase, por ejemplo, Gazzano-Santoro et al., J. Immunol. Methods 202:163 (1996); Cragg, M. S. et al., Blood 101:1045-1052 (2003); y Cragg et al., Blood 103:2738-2743 (2004)). La unión de FcRn y las determinaciones de semivida/eliminación *in vivo* también se pueden realizar utilizando métodos conocidos (véase, por ejemplo, Petkova, S. B. et al., Int'l. Immunol. 18(12):1759-1769 (2006)). Los anticuerpos con función efectora reducida incluyen aquellos con la sustitución de uno o más de los restos de la región Fc 238, 265, 269, 270, 297, 327 y 329; o dos o más de las posiciones de aminoácidos 265, 269, 270, 297 y 327, tal como un mutante Fc con sustitución de los restos 265 y 297 por alanina (véase, por ejemplo, las patentes de EE.UU. n.º 6.737.056 y 7.332.581). También se incluyen variantes de anticuerpos con unión a FcR mejorada o disminuida (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. n.º 6.737.056; el documento WO04/056312, y Shields et al., J. Biol. Chem. 9(2): 6591-6604 (2001)). En algunas realizaciones, una variante de anticuerpo comprende una región Fc con una o más sustituciones de aminoácidos que mejoran la ADCC, por ejemplo, sustituciones en las posiciones 298, 333 y/o 334 de la región Fc.

Los anticuerpos pueden tener semividas aumentadas y una mejor unión al receptor Fc neonatal (FcRn) (véase, por ejemplo, el documento US 2005/0014934). Dichos anticuerpos pueden comprender una región Fc con una o más sustituciones en el mismo que mejoran la unión de la región Fc a FcRn, e incluyen aquellos con sustituciones en uno o más de los restos de la región Fc: 238, 256, 265, 272, 286, 303, 305, 307, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424 o 434 (véase, por ejemplo, la Patente de EE.UU n.º 7.371.826). También se contemplan otros ejemplos de variantes de la región Fc (véase, por ejemplo, Duncan & Winter, Nature 322:738-40 (1988); las patentes de EE.UU. n.º 5.648.260 y 5.624.821; y el documento WO94/29351).

Variantes de anticuerpos genomanipulados con cisteína

En algunas realizaciones, puede ser deseable crear anticuerpos genomanipulados con cisteína, por ejemplo, "thioMab", donde uno o más restos de un anticuerpo están sustituidos con restos de cisteína. En algunas realizaciones, los restos sustituidos se encuentran en sitios accesibles del anticuerpo. Los grupos tiol reactivos se pueden ubicar en

los sitios para la conjugación a otras fracciones, tales como fracciones de fármacos o enlazadores-fracciones de fármaco, para crear un inmunoconjugado. En algunas realizaciones, puede sustituirse uno cualquiera o más de los siguientes restos por cisteína: V205 (numeración de Kabat) de la cadena ligera; A118 (numeración de EU) de la cadena pesada; y S400 (numeración de EU) de la región Fc de la cadena pesada. Los anticuerpos genomanipulados con cisteína pueden generarse como se describe (véase, por ejemplo, patente de EE.UU. n.º 7.521.541).

Derivados de anticuerpos

En algunas realizaciones, un anticuerpo proporcionado en el presente documento puede modificarse adicionalmente para que contenga fracciones no proteínicas adicionales que son conocidas en la técnica y están fácilmente disponibles. Las fracciones adecuadas para la derivatización del anticuerpo incluyen, pero sin limitación, polímeros hidrosolubles. Los ejemplos no limitantes de polímeros hidrosolubles incluyen, pero no se limitan a, polietilenglicol (PEG), copolímeros de etilenglicol/propilenglicol, carboximetilcelulosa, dextrano, alcohol polivinílico, polivinilpirrolidona, poli-1,3-dioxolano, poli-1,3,6-trioxano, copolímero de etileno/anhídrido maleico, poliaminoácidos (homopolímeros o copolímeros aleatorios) y dextrano o poli(n-vinilpirrolidona)polietilenglicol, homopolímeros de polipropilenglicol, copolímeros de óxido de polipropileno/óxido de etileno, polioles polioxiethylados (por ejemplo, glicerol), alcohol polivinílico y mezclas de los mismos. El propionaldehído de polietilenglicol puede tener ventajas en la fabricación debido a su estabilidad en agua.

El polímero puede tener cualquier peso molecular y puede ser ramificado o no ramificado. La cantidad de polímeros unidos al anticuerpo puede variar, y si se unen dos o más polímeros, pueden ser moléculas iguales o diferentes.

En otra realización, se proporcionan conjugados de un anticuerpo y una fracción no proteínica que pueden calentarse selectivamente mediante exposición a la radiación. En algunas realizaciones, la fracción no proteínica es un nanotubo de carbono (véase, por ejemplo, Kam et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102: 11600-11605 (2005)). La radiación puede ser de cualquier longitud de onda, e incluye, pero no se limita a, longitudes de onda que no dañan las células ordinarias, pero que calientan la fracción no proteínica a una temperatura a la que las células proximales a la fracción no proteínica-anticuerpo mueren.

MÉTODOS Y COMPOSICIONES RECOMBINANTES

Los anticuerpos pueden producirse usando métodos y composiciones recombinantes (véase, por ejemplo, la Patente de EE.UU. n.º 4.816.567). En algunas realizaciones, se proporciona un ácido nucleico aislado que codifica un anticuerpo anti-VIH, o fragmento del mismo, descrito en el presente documento. Dicho ácido nucleico puede codificar una secuencia de aminoácidos que comprende la V_L y/o una secuencia de aminoácidos que comprende la V_H del anticuerpo. En una realización adicional, se proporcionan uno o más vectores que comprenden dicho ácido nucleico. Un vector es una molécula de ácido nucleico capaz de propagar otro ácido nucleico al que está unido. El término incluye el vector en forma de una estructura de ácido nucleico autorreplicante, así como el vector incorporado en el genoma de una célula hospedadora en la que se ha introducido. Determinados vectores son capaces de dirigir la expresión de ácidos nucleicos a los que están unidos operativamente. En algunas realizaciones, se proporciona un ácido nucleico y/o vector que codifica un CAR que comprende un dominio de unión procedente de un anticuerpo anti-VIH descrito en el presente documento.

En una realización adicional, se proporciona una célula hospedadora que comprende dicho ácido nucleico. Las células hospedadoras son células en las que se ha introducido ácido nucleico exógeno, incluyendo la descendencia de dichas células. Las células hospedadoras incluyen "transformantes" y "células transformadas", que incluyen a la célula primaria transformada y a la progenie procedente de ésta independientemente del número de pases. La descendencia puede no ser completamente idéntica en contenido de ácido nucleico a una célula progenitora, pero puede contener mutaciones. Se incluye en el presente documento la descendencia mutante que tiene la misma función o actividad biológica explorada o seleccionada en la célula transformada originalmente. En una de dichas realizaciones, una célula hospedadora comprende (por ejemplo, se ha transformado con) un vector que comprende un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos que comprende la V_L del anticuerpo y una secuencia de aminoácidos que comprende la V_H del anticuerpo o un primer vector que comprende un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos que comprende la V_L del anticuerpo y un segundo vector que comprende un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos que comprende la V_H del anticuerpo. En algunas realizaciones, la célula hospedadora comprende un vector que comprende un ácido nucleico que codifica un CAR. En algunas realizaciones, la célula hospedadora es eucariota, por ejemplo, una célula de ovario de hámster chino (CHO, de sus siglas en inglés) o células linfoides (por ejemplo, células Y0, NS0, Sp20). En algunas realizaciones, se proporciona un método para fabricar un anticuerpo anti-VIH, en donde el método comprende cultivar una célula hospedadora que comprende un ácido nucleico que codifica el anticuerpo, según lo dispuesto anteriormente, en condiciones adecuadas para la expresión del anticuerpo y, opcionalmente, recuperar el anticuerpo de la célula hospedadora o del medio de cultivo de la célula hospedadora. En algunas realizaciones, la célula hospedadora es una célula inmunitaria primaria, por ejemplo, un linfocito T, obtenido de un paciente. En algunas realizaciones, el linfocito T es un linfocito T CD4+, un linfocito T CD8+, un linfocito T regulador o una célula NK.

Para la producción recombinante de un anticuerpo anti-VIH, un ácido nucleico aislado que codifica un anticuerpo, por

ejemplo, como se ha descrito anteriormente, se inserta en uno o más vectores para una mayor clonación y/o expresión en una célula hospedadora. Dicho ácido nucleico puede aislarse y secuenciarse fácilmente usando procedimientos convencionales.

Las células hospedadoras adecuadas para la clonación o expresión de vectores que codifican anticuerpos incluyen células procariotas o eucariotas descritas en el presente documento. Por ejemplo, se pueden producir anticuerpos en bacterias, por ejemplo, cuando no se necesita la glucosilación y la función efectora de Fc (véase, por ejemplo, las patentes de EE.UU. n.º 5.648.237, 5.789.199 y 5.840.523; Charlton, "Methods in Molecular Biology", Vol. 248, págs. 245-254 (2003)). Después de la expresión, puede aislarse el anticuerpo a partir de la pasta celular bacteriana en una fracción soluble y puede purificarse adicionalmente.

Además de procariotas, los microbios eucariotas, tales como hongos filamentosos o levaduras, son hospedadores de clonación o expresión adecuados para vectores que codifican anticuerpos (véase, por ejemplo, Gerngross, Nat. Biotech. 22:1409-1414 (2004), y Li et al., Nat. Biotech. 24:210-215 (2006)). Las células hospedadoras adecuadas para la expresión de anticuerpos glucosilados también proceden de organismos multicelulares, incluidos invertebrados y vertebrados. Ejemplos de invertebrados incluyen células vegetales y de insectos (véase, por ejemplo, las patentes de EE.UU. n.º 5.959.177, 6.040.498, 6.420.548, 7.125.978 y 6.417.429). Ejemplos de células de vertebrados incluyen líneas celulares de mamíferos, estirpe CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7); estirpe de riñón embrionario humano (células 293 o 293T como se describen, por ejemplo, en Graham et al., *J. Gen. Virol.* 36:59 (1977)); células de riñón de cría de hámster (BHK); células de sertoli de ratón (células TM4); células de riñón de mono (CV1); células de riñón de mono verde africano (VERO-76); células de carcinoma cervical humano (HELA); células de riñón canino (MDCK); células de hígado de rata búfalo (BRL 3A); células de pulmón humano (W138); células de hígado humano (Hep G2); tumor de mama de ratón (MMT 060562); células TR1; células MCR 5; células FS4; células de ovario de hámster chino (CHO), incluidas las células DHFR-CHO; y estirpes celulares de mieloma, tales como Y0, NS0 y Sp2/0. (Véase, por ejemplo, Yazaki y Wu, "Methods in Molecular Biology", Vol. 248, págs. 255-268 (2003)).

ENSAYOS

Los anticuerpos anti-VIH proporcionados en el presente documento pueden identificarse, seleccionarse o caracterizarse por sus propiedades físicas/químicas y/o actividades biológicas mediante diversos ensayos conocidos.

En un aspecto, un anticuerpo de la invención se prueba para determinar su actividad de unión a antígeno, por ejemplo, mediante ELISA, transferencia de Western, etc. En un aspecto, los ensayos de competencia pueden usarse para identificar un anticuerpo que compite con los anticuerpos anti-VIH descritos en el presente documento para unirse al VIH. En algunas realizaciones, dicho anticuerpo competidor se une al mismo epítipo (por ejemplo, un epítipo lineal o conformacional) que está unido mediante los anticuerpos anti-VIH descritos en el presente documento. Se conocen ejemplos de métodos de mapeo de epítopos (véase, por ejemplo, Morris "Epitope Mapping Protocols", en *Methods in Molecular Biology* vol. 66 (1996)).

En un ensayo de competencia ejemplar, el VIH inmovilizado se incuba en una solución que comprende un primer anticuerpo marcado que se une al VIH y un segundo anticuerpo no marcado que se está probando para determinar su capacidad de competir con el primer anticuerpo para unirse al VIH. El segundo anticuerpo puede estar presente en un sobrenadante de hibridoma. Como control, el VIH inmovilizado se incuba en una solución que comprende el primer anticuerpo marcado pero no el segundo anticuerpo no marcado. Después de la incubación en condiciones permisivas para la unión del primer anticuerpo al VIH, se elimina el exceso de anticuerpo no unido y se mide la cantidad de marcador asociado con el VIH inmovilizado. Si la cantidad de marcador asociado con el VIH inmovilizado se reduce sustancialmente en la muestra de prueba en relación con la muestra de control, entonces eso indica que el segundo anticuerpo está compitiendo con el primer anticuerpo para unirse al VIH (véase, por ejemplo, Harlow y Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual* Cap. 14 (1996)).

En un aspecto, se proporcionan ensayos para identificar anticuerpos anti-VIH de los mismos que tienen actividad biológica. En algunas realizaciones, se proporcionan ensayos para identificar anticuerpos anti-VIH de los mismos que tienen actividad de neutralización para el VIH. También se proporcionan anticuerpos que tienen dicha actividad biológica *in vivo* y/o *in vitro*. En algunas realizaciones, un anticuerpo de la invención se prueba para dicha actividad biológica.

INMUNOCONJUGADOS

La invención también proporciona inmunoconjugados que comprenden un anticuerpo anti-VIH en el presente documento. Un inmunoconjugado es un anticuerpo conjugado con una o más moléculas heterólogas. Por ejemplo, un inmunoconjugado puede comprender un anticuerpo anti-VIH conjugado con uno o más agentes citotóxicos, tales como agentes o fármacos quimioterapéuticos, agentes inhibidores del crecimiento, dominios proteicos, toxinas (por ejemplo, toxinas proteicas, toxinas activas enzimáticamente de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, fragmentos de las mismas), o isótopos radiactivos. En algunas realizaciones, un inmunoconjugado puede comprender un anticuerpo anti-VIH, o fragmento del mismo (por ejemplo, un scFv).

En algunas realizaciones, un inmunoconjugado es un conjugado anticuerpo-fármaco (ADC, de sus siglas en inglés) en el que un anticuerpo se conjuga con uno o más fármacos, que incluyen, pero no se limitan a, un maitansinoide; una auristatina tal como las fracciones de fármaco monometilauristatina DE y DF (MMAE y MMAF); una dolastatina; una caliqueamicina o derivado de la misma; una antraciclina tal como la daunomicina o la doxorubicina; metotrexato; vindesina; un taxano tal como docetaxel, paclitaxel, larotaxel, tesetaxel y ortataxel; un tricoteceno; y CC1065 (véase, por ejemplo, las patentes de EE.UU. n.º 5.208.020, 5.416.064, 5.635.483, 5.780.588, 7.498.298, 5.712.374, 5.714.586, 5.739.116, 5.767.285, 5.770.701, 5.770.710, 5.773.001, 6.630.579 y 5.877.296; el documento EP0425235B1; Hinman et al., *Cancer Res.* 53:3336-3342 (1993); Lode et al., *Cancer Res.* 58:2925-2928 (1998); Kratz et al., *Current Med. Chem.* 13:477-523 (2006); Jeffrey et al., *Bioorganic & Med. Chem. Letters* 16:358-362 (2006); Torgov et al., *Bioconj. Chem.* 16:717-721 (2005); Nagy et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:829-834 (2000); Dubowchik et al., *Bioorg. & Med. Chem. Letters* 12:1529-1532 (2002); y King et al., *J. Med. Chem.* 45:4336-4343 (2002)).

En otra realización, un inmunoconjugado comprende un anticuerpo como se describe en el presente documento conjugado con una toxina enzimáticamente activa o fragmento de la misma, que incluye, pero no se limita a, la cadena A de la difteria, los fragmentos activos de no unión de la toxina de difteria, la cadena A de la exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), la cadena A de ricina, la cadena A de abrina, la cadena A de modeccina, sarcina alfa, las proteínas de *Aleurites fordii*, las proteínas de diantina, las proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII y PAPS), el inhibidor de *Momordica charantia*, curcina, crotina, el inhibidor de *Saponaria officinalis*, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina y los tricotecenos.

En otra realización, un inmunoconjugado comprende un anticuerpo como se describe en el presente documento conjugado con un átomo radiactivo para formar un radioconjugado. Isótopos radiactivos ejemplares disponibles para la producción de radioconjugados incluyen At²¹¹, I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸, Sm¹⁵³, Bi²¹², P³², Pb²¹² e isótopos radioactivos de Lu. Un radioconjugado puede comprender un átomo radiactivo para la detección escintigráfica (por ejemplo, tc99m o 1123, o un marcador giratorio para imágenes de resonancia magnética nuclear (RMN, de sus siglas en inglés), tales como nuevamente, yodo-123, yodo-131, indio-111, flúor-19, carbono-13, nitrógeno-15, oxígeno-17, gadolinio, manganeso o hierro).

Los conjugados de un anticuerpo y un agente citotóxico se pueden hacer usando agentes de copulación de proteínas bifuncionales, tales como N-succinimidil-3-(2-piridilditio) propionato (SPDP), succinimidil-4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato (SMCC), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidioésteres (tales como dimetil adipimidato HCl), ésteres activos (por ejemplo, subcrato de disuccinimidilo), aldehídos (por ejemplo, glutaraldehído), compuestos de bis-azido (por ejemplo, bis(p-azidobenzoil) hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (por ejemplo, bis-(p-diazoniumbenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (tales como tolueno 2,6-diisocianato) y compuestos de flúor biactivos (por ejemplo, 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenceno). Por ejemplo, se puede preparar una inmunotoxina de ricina (véase, por ejemplo, Vitetta et al., *Science* 238:1098 (1987)). El ácido 1-isotiocianatobenzil-3-metildietileno triaminopentaacético (MX-DTPA) marcado con carbono-14 es un agente quelante ejemplar para la conjugación del radionucleótido con el anticuerpo (véase, por ejemplo, el documento WO94/11026). El enlazador puede ser escindible, que facilita la liberación de un fármaco citotóxico en la célula. Los enlazadores escindibles ejemplares incluyen un enlazador ácido-lábil, enlazador sensible a peptidasa, enlazador fotolábil, enlazador dimetil y enlazador que contiene disulfuro (véase, por ejemplo, Chari et al., *Cancer Res.* 52:127-131 (1992); la Patente de EE.UU n.º 5.208.020).

Los inmunoconjugados o ADC en el presente documento contemplan expresamente conjugados preparados con reactivos reticulantes. Los reactivos reticulantes ejemplares incluyen BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, sulfo-EMCS, sulfo-GMBS, sulfo-KMUS, sulfo-MBS, sulfo-SIAB, sulfo-SMCC y sulfo-SMPB, y SVSB (succinimidil-(4-vinilsulfona)benzoato).

MÉTODOS Y COMPOSICIONES PARA DIAGNÓSTICO Y DETECCIÓN

El anticuerpo anti-VIH puede ser útil para detectar la presencia del VIH en una muestra biológica. La detección abarca la detección cuantitativa o cualitativa.

Los anticuerpos y composiciones desvelados en el presente documento se pueden usar para una variedad de propósitos, tales como para detectar una infección por VIH o diagnosticar SIDA en un sujeto. Estos métodos pueden incluir poner en contacto una muestra del sujeto diagnosticado con VIH o SIDA con un anticuerpo descrito en el presente documento, y detectar la unión del anticuerpo a la muestra. Un aumento en la unión del anticuerpo a la muestra en relación con la unión del anticuerpo a una muestra de control confirma que el sujeto tiene una infección por VIH-1 y/o SIDA. En algunas realizaciones, los métodos comprenden además poner en contacto un segundo anticuerpo que se une al VIH con la muestra y detectar la unión del segundo anticuerpo. En algunos ejemplos no limitantes, un aumento en la unión del anticuerpo a la muestra en relación con una muestra de control detecta el VIH en el sujeto. En algunos ejemplos no limitantes, el anticuerpo se une específicamente a la gp120 soluble en la muestra. En algunas realizaciones, los métodos comprenden además poner en contacto un segundo anticuerpo que reconoce específicamente el anticuerpo contra el VIH con la muestra y detectar la unión del segundo anticuerpo.

Se describen métodos de diagnóstico. Los métodos de diagnóstico generalmente implican poner en contacto una

muestra biológica obtenida de un paciente, tal como, por ejemplo, sangre, suero, saliva, orina, esputo, una muestra de hisopo celular o una biopsia de tejido, con un anticuerpo contra el VIH y determinar si el anticuerpo se une preferentemente a la muestra en comparación con una muestra de control o un valor de corte predeterminado, lo que indica la presencia del virus del VIH.

Se describen métodos para detectar la presencia de los anticuerpos contra el VIH de la presente invención en una muestra biológica de un paciente. Los métodos de detección generalmente implican obtener una muestra biológica de un paciente, tal como, por ejemplo, sangre, suero, saliva, orina, esputo, una muestra de hisopo celular, o una biopsia de tejido y aislar anticuerpos contra el VIH o fragmentos de los mismos, o los ácidos nucleicos que codifican un anticuerpo contra el VIH, y analizar la presencia de un anticuerpo contra el VIH en la muestra biológica. Además, la presente invención proporciona métodos para detectar la secuencia de nucleótidos de un anticuerpo contra el VIH en una célula. La secuencia de nucleótidos de un anticuerpo contra el VIH también se puede detectar usando los cebadores desvelados en el presente documento. La presencia del anticuerpo contra el VIH en una muestra biológica de un paciente puede determinarse utilizando técnicas recombinantes conocidas y/o el uso de un espectrómetro de masas.

Se describe un anticuerpo anti-VIH para su uso en un método de diagnóstico o detección que se proporciona. En un aspecto adicional, se proporciona un método para detectar la presencia del VIH en una muestra biológica. El método puede comprender poner en contacto la muestra biológica con un anticuerpo anti-VIH como se describe en el presente documento en condiciones permisivas para la unión del anticuerpo anti-VIH al VIH, y detectar si se forma un complejo entre el anticuerpo anti-VIH y el VIH. Dicho método puede ser un método *in vitro* o *in vivo*. En algunas realizaciones, se usa un anticuerpo anti-VIH para seleccionar sujetos elegibles para la terapia con un anticuerpo anti-VIH, por ejemplo, donde el VIH es un biomarcador para la selección de pacientes.

Los trastornos ejemplares que pueden diagnosticarse usando un anticuerpo de la invención incluyen trastornos caracterizados por infección del VIH, incluido el SIDA.

Se describen anticuerpos anti-VIH marcados que se proporcionan. Los marcadores incluyen, pero no se limitan a, marcadores o fracciones que se detectan directamente (por ejemplo, marcadores fluorescentes, cromóforos, densos en electrones, quimioluminiscentes y radiactivos), así como fracciones detectadas indirectamente, por ejemplo, a través de una reacción enzimática o interacción molecular (por ejemplo, enzimas o ligandos). Los ejemplos de marcadores incluyen radioisótopos (por ejemplo, ^{32}P , ^{14}C , ^{125}I , ^3H y ^{131}I), fluoróforos (por ejemplo, quelatos de tierras raras o fluoresceína y sus derivados, rodamina y sus derivados, dansilo, umbelliferona, luciferinas (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. n.º 4.737.456), luciferina, 2,3-dihidroftalazina diones, peroxidasa de rábano picante (HRP, de sus siglas en inglés), fosfatasa alcalina, β -galactosidasa, glucoamilasa, lisozima, sacárido oxidasas, oxidasas heterocíclicas, acopladas a una enzima que emplea peróxido de hidrógeno para oxidar un precursor de colorante, biotina/avidina, marcadores espín, marcadores de bacteriófagos, radicales libres estables, y similares.

FORMULACIONES FARMACÉUTICAS

También se proporcionan formulaciones farmacéuticas de un anticuerpo anti-VIH como se describe en el presente documento, que se preparan mediante la mezcla de dicho anticuerpo que tiene el grado de pureza deseado con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables opcionales (véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Science 16ª edición, Osol, A. Ed. (1980)), en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Los vehículos farmacéuticamente aceptables generalmente no son tóxicos para los receptores a las dosis y concentraciones empleadas. Los vehículos farmacéuticamente aceptables ejemplares incluyen tampones (por ejemplo, fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos); antioxidantes, (por ejemplo, ácido ascórbico y metionina); conservantes (por ejemplo, cloruro de octadecildimetilbencil amonio); cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio; cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butílico o bencílico; alquil parabenos (por ejemplo, metil o propil parabeno); catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol; polipéptidos de bajo peso molecular (de menos de aproximadamente 10 restos); proteínas, (por ejemplo, albúmina sérica, gelatina o inmunoglobulinas); polímeros hidrófilos (por ejemplo, polivinilpirrolidona); aminoácidos (por ejemplo, glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina); monosacáridos, disacáridos y otros hidratos de carbono (por ejemplo, glucosa, manosa o dextrinas); agentes quelantes (por ejemplo, EDTA); azúcares (por ejemplo, sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol); contra-iones formadores de sal (por ejemplo, sodio); complejos metálicos (por ejemplo, complejos de Zn-proteína); y/o tensioactivos no iónicos (por ejemplo, polietilenglicol (PEG)). Los ejemplos de vehículos farmacéuticamente aceptables en el presente documento incluyen además agentes de dispersión de fármacos intersticiales (por ejemplo, glucoproteínas de hialuronidasa neutras solubles (SHASEGP)) (véase, por ejemplo, la publicación de patente de EE.UU. n.º US 2005/0260186 y US 2006/0104968). En un aspecto, se combina una SHASEGP con una o más glucosaminoglucanasas adicionales, (por ejemplo, condroitinasas).

También se proporcionan formulaciones farmacéuticas que incluyen el anticuerpo anti-VIH, o fragmento del mismo, y/o proteína de fusión y/o, receptor quimérico. Las composiciones y formulaciones farmacéuticas generalmente incluyen uno o más vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables opcionales. En algunas realizaciones, la composición incluye al menos un agente terapéutico adicional.

La expresión "formulación farmacéutica" se refiere a una preparación que se encuentra en una forma que permite que

sea eficaz la actividad biológica de un principio activo contenido en la misma y que no contiene componentes adicionales que sean inaceptablemente tóxicos para un sujeto al que se le administre la formulación.

Un "vehículo farmacéuticamente aceptable" se refiere a un ingrediente en una formulación farmacéutica, distinto del principio activo, que no es tóxico para un sujeto. Un vehículo farmacéuticamente aceptable incluye, pero no se limita a, un tampón, excipiente, estabilizante o conservante.

En algunos aspectos, la elección del vehículo está determinada en parte por la célula particular, la molécula de unión y/o el anticuerpo, y/o por el método de administración. En consecuencia, hay una variedad de formulaciones adecuadas. Por ejemplo, la composición farmacéutica puede contener conservantes. Los conservantes adecuados pueden incluir, por ejemplo, metilparabeno, propilparabeno, benzoato de sodio y cloruro de benzalconio. En algunos aspectos, se usa una mezcla de dos o más conservantes. El conservante o mezclas de los mismos están normalmente presentes en una cantidad de aproximadamente un 0,0001 % a aproximadamente un 2 % en peso de la composición total.

En algunos aspectos se incluyen agentes tamponantes en las composiciones. Los agentes tamponantes adecuados incluyen, por ejemplo, ácido cítrico, citrato de sodio, ácido fosfórico, fosfato de potasio y varios otros ácidos y sales. En algunos aspectos, se usa una mezcla de dos o más agentes tamponantes. Los agentes tamponantes o mezclas de los mismos están normalmente presentes en una cantidad de aproximadamente un 0,001 % a aproximadamente un 4 % en peso de la composición total. Se conocen métodos para preparar composiciones farmacéuticas administrables. Los métodos ejemplares se describen con más detalle en, por ejemplo, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Lippincott Williams & Wilkins; 21ª ed. (1 de mayo de 2005).

Las formulaciones de los anticuerpos pueden incluir formulaciones liofilizadas y soluciones acuosas.

La formulación o composición también puede contener más de un principio activo útil para la indicación, enfermedad o afección particular que se trata con los anticuerpos, o fragmentos de los mismos, o células, preferentemente aquellos con actividades complementarias al anticuerpo, o fragmento del mismo, o célula, donde las actividades respectivas no se afectan negativamente entre sí. En algunas realizaciones, la formulación también puede comprender ingredientes según sea necesario para tratar, mejorar, controlar, reducir la carga vírica o disminuir la gravedad de la enfermedad de una indicación particular (por ejemplo, infección por VIH o SIDA). Dichos principios activos están adecuadamente presentes en combinación en cantidades que son eficaces para el propósito previsto. Por lo tanto, en algunas realizaciones, la composición farmacéutica incluye además otros agentes o fármacos farmacéuticamente activos, tales como agentes antivíricos. En algunas realizaciones, las células o anticuerpos se administran en forma de una sal, por ejemplo, una sal farmacéuticamente aceptable. Las sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables adecuadas incluyen las procedentes de ácidos minerales, tales como ácido clorhídrico, bromhídrico, fosfórico, metafosfórico, nítrico y ácidos sulfúricos y ácidos orgánicos, tales como tartárico, acético, cítrico, málico, láctico, fumárico, benzoico, glicólico, glucónico, succínico y ácidos arilsulfónicos, por ejemplo, ácido *p*-toluenosulfónico.

Las formulaciones de anticuerpos pueden liofilizarse (véase, por ejemplo, la Patente de EE.UU. n.º 6.267.958). Las formulaciones de anticuerpos pueden ser anticuerpos acuosos (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. n.º 6.171.586 y el documento WO06/044908).

Los principios activos pueden quedar atrapados en microcápsulas (por ejemplo, hidroximetilcelulosa o microcápsulas de gelatina y poli(metacrilato de metilo). Los principios activos pueden estar atrapados en microcápsulas en sistemas de administración de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Se pueden preparar preparaciones de liberación sostenida. Ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el anticuerpo, matrices en forma de artículos conformados (por ejemplo, películas o microcápsulas).

La composición farmacéutica, en algunos aspectos, puede emplear sistemas de liberación prolongada, de liberación retardada y de liberación sostenida de manera que la administración de la composición se produzca antes y con el tiempo suficiente para causar la sensibilización del sitio que se vaya a tratar. Están disponibles y son conocidos sistemas de administración de muchos tipos de liberación. Dichos sistemas pueden evitar administraciones repetidas de la composición, aumentando así la comodidad para el sujeto y el médico.

La composición farmacéutica en algunas realizaciones contiene los anticuerpos, o fragmentos de los mismos, y/o células en cantidades eficaces para tratar o prevenir la enfermedad o afección, tal como una cantidad terapéuticamente eficaz o profilácticamente eficaz. La eficacia terapéutica o profiláctica en algunas realizaciones se controla mediante la evaluación periódica de los sujetos tratados. Para administraciones repetidas a lo largo de varios días o un periodo mayor, dependiendo de la afección, se repetirá el tratamiento hasta que se produzca una supresión deseada de los síntomas de enfermedad. Sin embargo, otros regímenes de dosificación pueden ser útiles y pueden determinarse. La dosificación deseada puede administrarse mediante una única administración de bolo de la composición, mediante múltiples administraciones de bolo de la composición, o mediante administración de infusión continua de la composición.

Se describe cómo, en el contexto de células genéticamente modificadas que contienen el anticuerpo o fragmento del mismo, a un sujeto se le administra el intervalo de aproximadamente un millón a aproximadamente 100 mil millones de células, tal como, por ejemplo, 1 millón a aproximadamente 50 mil millones de células (por ejemplo, 5 millones de células, aproximadamente 25 millones de células, aproximadamente 500 millones de células, aproximadamente mil millones de células, aproximadamente 5 mil millones de células, aproximadamente 20 mil millones de células, aproximadamente 30 mil millones de células, aproximadamente 40 mil millones de células, o un intervalo definido por cualquiera de dos valores anteriores), tales como aproximadamente 10 millones a aproximadamente 100 mil millones de células (por ejemplo, aproximadamente 20 millones de células, aproximadamente 30 millones de células, aproximadamente 40 millones de células, aproximadamente 60 millones de células, aproximadamente 70 millones de células, aproximadamente 80 millones de células, aproximadamente 90 millones de células, aproximadamente 10 mil millones de células, aproximadamente 25 mil millones de células, aproximadamente 50 mil millones de células, aproximadamente 75 mil millones de células, aproximadamente 90 mil millones de células, o un intervalo definido por cualquiera de dos valores anteriores), y en algunos casos de aproximadamente 100 millones de células a aproximadamente 50 mil millones de células (por ejemplo, aproximadamente 120 millones de células, aproximadamente 250 millones de células, aproximadamente 350 millones de células, aproximadamente 450 millones de células, aproximadamente 650 millones de células, aproximadamente 800 millones de células, aproximadamente 900 millones de células, aproximadamente 3 mil millones de células, aproximadamente 30 mil millones de células, aproximadamente 45 mil millones de células) o cualquier valor entre estos intervalos, y/o tal cantidad de células por kilogramo de peso corporal del sujeto.

Las composiciones pueden administrarse usando técnicas, formulaciones y/o dispositivos de administración estándar. Se proporcionan formulaciones y dispositivos, tales como jeringas y viales, para el almacenamiento y la administración de las composiciones. La administración de las células puede ser autóloga o heteróloga. Por ejemplo, se pueden obtener células inmunorreactivas o progenitoras de un sujeto y administrarse al mismo sujeto o un sujeto compatible diferente. Las células inmunorreactivas procedentes de sangre periférica o su progenie (por ejemplo, *in vivo*, *ex vivo* o derivado *in vitro*) pueden administrarse mediante inyección localizada, incluida la administración por catéteres, inyección sistémica, inyección localizada, inyección intravenosa o administración parenteral. Cuando se administra una composición terapéutica (por ejemplo, una composición farmacéutica que contiene una célula inmunorreactiva genéticamente modificada), generalmente se formulará en una forma inyectable de dosificación unitaria (solución, suspensión, emulsión).

Las formulaciones incluyen aquellas para administración oral, intravenosa, intraperitoneal, subcutánea, pulmonar, transdérmica, intramuscular, intranasal, bucal, sublingual o supositorios. En algunas realizaciones, las poblaciones celulares se administran parenteralmente. El término "parenteral", tal como se usa en el presente documento, incluye administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, rectal, vaginal e intraperitoneal. En algunas realizaciones, las poblaciones de células se administran a un sujeto usando administración sistémica periférica mediante inyección intravenosa, intraperitoneal o subcutánea.

Las composiciones en algunas realizaciones se proporcionan como preparaciones líquidas estériles, por ejemplo, soluciones acuosas isotónicas, suspensiones, emulsiones, dispersiones o composiciones viscosas, que en algunos aspectos pueden estar tamponadas a un pH seleccionado. Las preparaciones líquidas son normalmente más fáciles de preparar que los geles, otras composiciones viscosas y las composiciones sólidas. Además, las composiciones líquidas son algo más convenientes de administrar, especialmente mediante inyección. Las composiciones viscosas, por otro lado, se pueden formular dentro del intervalo de viscosidad apropiado para proporcionar períodos de contacto más largos con tejidos específicos. Las composiciones líquidas o viscosas pueden comprender vehículos, que pueden ser un disolvente o medio dispersante que contiene, por ejemplo, agua, solución salina, solución salina tamponada con fosfato, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, polietilenglicol líquido) y mezclas adecuadas de los mismos.

Las soluciones inyectables estériles se pueden preparar mediante la incorporación del anticuerpo, o fragmento del mismo, en un disolvente, tal como mezclado con un vehículo, diluyente o excipiente adecuado tal como agua estéril, solución salina fisiológica, glucosa, dextrosa o similares. Las composiciones también se pueden liofilizar. Las composiciones pueden contener sustancias auxiliares tales como agentes humectantes, dispersantes o emulsionantes (por ejemplo, metilcelulosa), agentes tamponadores del pH, aditivos gelificantes o mejoradores de la viscosidad, conservantes, agentes aromatizantes, colorantes y similares, dependiendo de la ruta de administración y preparación deseada. Los textos estándar pueden ser consultados en algunos aspectos para preparar preparaciones adecuadas.

Se pueden añadir varios aditivos que mejoran la estabilidad y la esterilidad de las composiciones, incluidos conservantes antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes y tampones. Puede garantizarse la prevención de la acción de microorganismos mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico y similares. La absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable puede conseguirse mediante el uso de agentes que retrasan la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

Se pueden preparar preparaciones de liberación sostenida. Ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el anticuerpo, cuyas matrices están en forma de artículos con forma, por ejemplo, películas o microcápsulas.

Las formulaciones que se usarán para la administración *in vivo* son generalmente estériles (por ejemplo, mediante filtración a través de membranas de filtración estériles).

5 TERAPIA Y COMPOSICIONES

Cualquiera de los anticuerpos anti-VIH proporcionados en el presente documento puede usarse en terapia. La invención se refiere al tratamiento de un mamífero infectado con una infección por virus (por ejemplo, VIH), que comprende administrar a dicho mamífero una composición farmacéutica que comprende los anticuerpos contra el VIH desvelados en el presente documento. Se proporcionan además anticuerpos para su uso en la reducción de un aumento en el título del virus del VIH, la replicación del virus, la proliferación del virus o una cantidad de una proteína vírica del VIH en un sujeto.

Se describe un anticuerpo anti-VIH para su uso como medicamento. En aspectos adicionales, se proporciona un anticuerpo anti-VIH para su uso en el tratamiento de la infección por VIH. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-VIH neutraliza el VIH. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-VIH es un anticuerpo ampliamente neutralizante. En otras realizaciones, el VIH es VIH-1. En algunas realizaciones, el VIH es VIH-2. En otras realizaciones, el VIH es el grupo M del VIH-1. En algunas realizaciones, el VIH es el grupo N del VIH-1, el grupo O del VIH-1 y/o el grupo P del VIH-1. En otras realizaciones, el VIH es el subtipo A (incluidos A1 y/o A2), B, C, D, E, F (que incluye F1 y/o F2), G, H, I, J, K o cualquier combinación, Subtipo o CRF del mismo. En aspectos adicionales, se proporciona un anticuerpo anti-VIH para su uso en el tratamiento del SIDA. En algunas realizaciones, se proporciona un anticuerpo anti-VIH para su uso en un método de tratamiento. En algunas realizaciones, la invención proporciona un anticuerpo anti-VIH para su uso en un método de tratamiento de un individuo infectado con VIH o que tiene SIDA que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz del anticuerpo anti-VIH. Una cantidad eficaz de un agente, es una cantidad eficaz, en las dosificaciones y durante los periodos de tiempo necesarios, para lograr el resultado terapéutico o profiláctico deseado. En una de dichas realizaciones, el método comprende además administrar al individuo una cantidad eficaz de al menos un agente terapéutico adicional. El individuo puede ser un ser humano.

Se describe el uso de un anticuerpo anti-VIH en la fabricación o preparación de un medicamento. Esto puede ser para el tratamiento de la infección por VIH. Esto puede ser para el tratamiento del SIDA. Se describe el medicamento para su uso en un método de tratamiento de infección por VIH o SIDA que comprende administrar a un individuo que tiene infección por VIH o SIDA una cantidad eficaz del medicamento.

La invención se refiere al tratamiento de la infección por VIH o SIDA. Esto puede comprender administrar a un individuo que tiene dicha infección por VIH o SIDA una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-VIH.

En algunas realizaciones, el VIH de la infección o SIDA expresa gp120 en la superficie de sus virus constituyentes.

Se describe la preparación y administración de una composición de anticuerpos contra el VIH que es adecuada para la administración a un paciente humano o primate no humano con infección por VIH, o en riesgo de infección por VIH, en una cantidad y de acuerdo con un programa suficiente para inducir una respuesta inmunitaria protectora contra el VIH, o la reducción del virus del VIH, en un ser humano.

De acuerdo con otra realización, la presente invención proporciona una vacuna que comprende al menos un anticuerpo de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable. De acuerdo con una realización, la vacuna es una vacuna que comprende al menos un anticuerpo descrito en el presente documento y un vehículo farmacéuticamente aceptable. La vacuna puede incluir una pluralidad de anticuerpos que tienen las características descritas en el presente documento en cualquier combinación y además puede incluir anticuerpos adicionales, tales como otros anticuerpos disponibles que neutralizan al VIH.

Debe entenderse que las composiciones pueden ser uno solo o una combinación de anticuerpos desvelados en el presente documento, que pueden ser iguales o diferentes, para tratar profilácticamente o terapéuticamente la progresión de varios subtipos de infección por VIH después de la vacunación. Dichas combinaciones se pueden seleccionar de acuerdo con la inmunidad deseada. Cuando se administra un anticuerpo a un animal o ser humano, se puede combinar con uno o más vehículos, excipientes o adyuvantes farmacéuticamente aceptables.

Adicionalmente, con respecto a la determinación del nivel eficaz en un paciente para el tratamiento del VIH, en particular, están disponibles modelos animales adecuados y se han implementado ampliamente para evaluar la eficacia *in vivo* contra el VIH de varios protocolos de terapia génica (Sarver et al. (1993b), *supra*). Estos modelos incluyen ratones, monos y gatos. Aunque estos animales no son naturalmente susceptibles a la enfermedad del VIH, los modelos de ratones quiméricos (por ejemplo, SCID, bg/nu/xid, NOD/SCID, SCID-hu, SCID-hu inmunocompetente, BALB/c estirpado de médula ósea) reconstituídos con células mononucleares de sangre periférica (PBMC, de sus siglas en inglés) humanas, ganglios linfáticos, hígado/timo fetal u otros tejidos pueden infectarse con el vector lentivírico o VIH, y emplearse como modelos para la patogénesis del VIH. De manera similar, se puede emplear el modelo de monos/virus de inmunodeficiencia simia (SIV, de sus siglas en inglés), al igual que el modelo de gato/virus de inmunodeficiencia felina (FIV, de sus siglas en inglés). La composición farmacéutica puede contener otros

productos farmacéuticos, junto con un vector de acuerdo con la invención, cuando se usa para tratar terapéuticamente el SIDA. Estos otros productos farmacéuticos se pueden usar de la manera tradicional (es decir, como agentes para tratar la infección por VIH). De acuerdo con otra realización, la presente invención proporciona una composición farmacéutica basada en anticuerpos que comprende una cantidad eficaz de un anticuerpo aislado contra el VIH, o una versión madurada por afinidad, que proporciona una opción de tratamiento profiláctico o terapéutico para reducir la infección del virus del VIH. La composición farmacéutica basada en anticuerpos de la presente invención puede formularse mediante cualquier número de estrategias generalmente conocidas (véase, por ejemplo, McGoff y Scher, 2000, *Solution Formulation of Proteins/Peptides*: In McNally, E. J., ed. *Protein Formulation and Delivery*. Nueva York, NY: Marcel Dekker; págs. 139-158; Akers y Defilippis, 2000, *Peptides and Proteins as Parenteral Solutions*. en: *Pharmaceutical Formulation Development of Peptides and Proteins*. Filadelfia, PA: Talyor y Francis; págs. 145-177; Akers, et al., 2002, *Pharm. Biotechnol.* 14:47-127).

Se describe un método para detectar un anticuerpo contra el VIH que comprende una cadena pesada que comprende una secuencia consenso altamente conservada y una cadena ligera que comprende una secuencia consenso altamente conservada en una muestra biológica, que comprende obtener una muestra biológica que contiene inmunoglobulina de un sujeto mamífero, aislar un anticuerpo contra el VIH de dicha muestra, e identificar las secuencias consenso altamente conservadas de la cadena pesada y la cadena ligera. La muestra biológica puede ser sangre, suero, saliva, orina, esputo, una muestra de hisopo celular o una biopsia de tejido. Las secuencias de aminoácidos pueden determinarse mediante métodos conocidos que incluyen, por ejemplo, PCR y espectrometría de masas.

En un aspecto adicional, la invención proporciona formulaciones farmacéuticas que comprenden cualquiera de los anticuerpos anti-VIH proporcionados en el presente documento (por ejemplo, para su uso en cualquiera de las terapias anteriores). En algunas realizaciones, una formulación farmacéutica comprende cualquiera de los anticuerpos anti-VIH proporcionados en el presente documento y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En otra realización, una formulación farmacéutica comprende cualquiera de los anticuerpos anti-VIH proporcionados en el presente documento y al menos un agente terapéutico adicional.

Los anticuerpos, o fragmentos de los mismos, como se describe en el presente documento, pueden usarse solos o en combinación con otros agentes en una terapia. Por ejemplo, un anticuerpo de la invención puede administrarse conjuntamente con al menos un agente terapéutico adicional. Por ejemplo, los anticuerpos o fragmentos de los mismos pueden usarse solos o en combinación con uno o más de un anticuerpo (por ejemplo, una pluralidad o conjunto de anticuerpos). Por ejemplo, los anticuerpos se pueden usar solos o en combinación con uno o más de otros anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos neutralizantes del VIH), por ejemplo, pero sin limitarse a, VRC01, VRC02, VRC03, VRC-PG-04, VRC-PG-05, b12, (CD4bs), (PGTs, PG9 y PG16). (Véase, *Science* 333(6049): 1633-1637; *Nature* 477(7365):466-470; *Science* 334(6060): 1289-1293; *Science* 326(5950):285-289; *Science* 334(6059): 1097-1103; y *Nature* 480(7377):336-343.)

De acuerdo con otra realización, la presente invención se refiere al tratamiento de un mamífero infectado con una infección vírica, tal como, por ejemplo, VIH, que comprende administrar a dicho mamífero una composición farmacéutica que comprende los anticuerpos contra el VIH desvelados en el presente documento. De acuerdo con una realización, la invención se refiere al tratamiento de un mamífero infectado con VIH que comprende administrar a dicho mamífero una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo de la presente invención, o un fragmento del mismo.

Dichas terapias combinadas indicadas anteriormente abarcan administración combinada (en donde dos o más agentes terapéuticos se incluyen en la misma o en formulaciones separadas) y administración por separado, en cuyo caso, la administración del anticuerpo de la invención puede ocurrir antes, de manera simultánea y/o después de, la administración del agente terapéutico adicional y/o adyuvante.

También se describe la terapia celular adoptiva. Se describe la administración de las células o una composición que contiene las células a un sujeto, tejido o célula, tal como una que tiene, está en riesgo o sospecha de tener la enfermedad, afección o trastorno. En algunas realizaciones, las células, poblaciones y composiciones se administran a un sujeto que tiene la enfermedad o afección particular a tratar, por ejemplo, a través de terapia celular adoptiva, tal como terapia con linfocitos T adoptivos. Las células o composiciones se administran al sujeto, tal como un sujeto que tiene o está en riesgo de la enfermedad o afección. En algunos aspectos, los métodos de este modo tratan, por ejemplo, de mejorar uno o más síntomas de la enfermedad o afección.

Los métodos para la administración de células para la terapia celular adoptiva son conocidos y pueden usarse en conexión con los métodos y composiciones proporcionados. Por ejemplo, se describen métodos de terapia con linfocitos T adoptivos, por ejemplo, en la publicación de solicitud de patente de EE.UU. n.º 2003/0170238 de Gruenberg et al; la patente de EE.UU. n.º 4.690.915 de Rosenberg; Rosenberg (2011) *Nat Rev Clin Oncol.* 8(10):577-85). Véase, por ejemplo, Themeli et al. (2013) *Nat Biotechnol.* 31(10): 928-933; Tsukahara et al. (2013) *Biochem Biophys Res Commun* 438(1): 84-9; Davila et al. (2013) *PLoS ONE* 8(4): e61338.

Se describe cómo la terapia celular, por ejemplo, la terapia celular adoptiva, tal como la terapia adoptiva de linfocitos

T, se lleva a cabo mediante transferencia autóloga, en la que las células se aíslan y/o preparan de otra forma a partir del sujeto que va a recibir la terapia celular, o de una muestra procedente de dicho sujeto. Las células pueden proceder de un sujeto, por ejemplo, un paciente, que necesita un tratamiento y las células, después del aislamiento y el procesamiento, se administran al mismo sujeto.

5 Se describe cómo la terapia celular, por ejemplo, la terapia celular adoptiva, tal como la terapia adoptiva de linfocitos T, se lleva a cabo mediante transferencia alogénica, en el que las células se aíslan y/o preparan de otra forma a partir de un sujeto que no sea un sujeto que va a recibir o que finalmente recibe la terapia celular, por ejemplo, un primer sujeto. Las células pueden administrarse luego a un sujeto diferente, por ejemplo, un segundo sujeto, de la misma especie. El primer y segundo sujeto pueden ser genéticamente idénticos. El primer y segundo sujeto pueden ser genéticamente similares. El segundo sujeto puede expresar la misma clase o supertipo de HLA que el primer sujeto.

15 Se describe cómo el sujeto, a quien se administran las células, poblaciones celulares o composiciones, es un primate, tal como se un ser humano. El primate puede ser un mono o un simio. El sujeto puede ser macho o hembra y puede ser de cualquier edad adecuada, incluidos sujetos menores de siete años, juveniles, adolescentes, adultos y geriátricos. El sujeto puede ser un mamífero no primate, tal como un roedor. En algunos ejemplos, el paciente o sujeto es un modelo animal validado para enfermedad, terapia celular adoptiva y/o para evaluar resultados tóxicos como el síndrome de liberación de citocinas (CRS, de sus siglas en inglés).

20 Un anticuerpo de la invención (y cualquier agente terapéutico adicional) se puede administrar mediante cualquier medio adecuado, incluyendo parenteral, intrapulmonar e intranasal, y, si se desea para un tratamiento local, administración intralesional. Las infusiones parenterales incluyen la administración intramuscular, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal o subcutánea. La dosificación puede ser mediante cualquier ruta adecuada. Por ejemplo, la dosificación puede ser mediante inyecciones (por ejemplo, inyecciones intravenosas o subcutáneas). En el presente documento se contemplan diversos programas de dosificación que incluyen, pero no se limitan a, administraciones únicas o múltiples durante varios puntos de tiempo, administración en bolo e infusión de pulso.

30 Los anticuerpos de la invención se formularían, dosificarían y administrarían de un modo coherente con la buena práctica médica. Los factores a tener en cuenta en este contexto incluyen el trastorno particular que se va a tratar, el mamífero particular que se va a tratar, el estado clínico del paciente individual, la causa del trastorno, el sitio de administración del agente, el método de administración, la pauta de administración y otros factores conocidos para los profesionales sanitarios. El anticuerpo no necesita estar, pero está formulado opcionalmente, con uno o más agentes utilizados actualmente para prevenir o tratar el trastorno en cuestión. La cantidad eficaz de dichos otros agentes depende de la cantidad de anticuerpo presente en la formulación, del tipo de trastorno o tratamiento y de otros factores descritos anteriormente. Estos se usan generalmente en las mismas dosificaciones y con las rutas de administración que se describen en el presente documento, o aproximadamente de un 1 a un 99 % de las dosificaciones descritas en el presente documento, o en cualquier dosificación y mediante cualquier ruta que se determine empírica/clínicamente que sea apropiada.

40 Para la prevención o tratamiento de la enfermedad, la dosificación adecuada de un anticuerpo de la invención (cuando se usa solo o en combinación con otros uno o más agentes terapéuticos adicionales) dependerá del tipo de enfermedad que se va a tratar, del tipo de anticuerpo, la gravedad y evolución de la enfermedad, si el anticuerpo se administra para fines preventivos o terapéuticos, la terapia previa, el historial clínico del paciente y la respuesta al anticuerpo, y el criterio del médico a cargo del tratamiento. El anticuerpo se administra adecuadamente al paciente de una vez o en una serie de tratamientos. Aproximadamente 1 µg/kg a 15 mg/kg (por ejemplo, 0,1 mg/kg-10 mg/kg) de anticuerpo puede ser una dosis candidata inicial para la administración al paciente (por ejemplo, mediante una o más administraciones separadas, o mediante infusión continua). Una dosificación diaria puede variar desde aproximadamente 1 µg/kg a 100 mg/kg o más. Para administraciones repetidas durante varios días o más, el tratamiento generalmente se mantendrá hasta que se produzca la supresión deseada de la infección o los síntomas de la enfermedad. Una dosificación ejemplar del anticuerpo estará en el intervalo de aproximadamente 0,05 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg. Por lo tanto, pueden administrarse al paciente una o más dosis de aproximadamente 0,5 mg/kg, 2,0 mg/kg, 4,0 mg/kg o 10 mg/kg (o cualquier combinación de las mismas). Dichas dosis pueden administrarse de manera intermitente (por ejemplo, cada semana o cada tres semanas). Puede administrarse una dosis de carga inicial superior, seguida de una o más dosis inferiores.

55 Se entiende que cualquiera de las formulaciones o métodos terapéuticos anteriores se puede llevar a cabo usando un inmunoconjugado de la invención en lugar de o además de un anticuerpo anti-VIH.

60 Se describen métodos para reducir un aumento en el título del virus del VIH, la replicación del virus, la proliferación del virus o una cantidad de proteína vírica del VIH. Se describe la administración al sujeto de una cantidad de un anticuerpo contra el VIH eficaz para reducir un aumento en el título del VIH, la replicación del virus o una cantidad de una proteína del VIH de una o más cepas o aislados del VIH en el sujeto.

65 Se describe la reducción de la replicación vírica o la propagación de la infección por VIH a células o tejidos hospedadores adicionales que comprende poner en contacto una célula de mamífero con el anticuerpo, o una porción del mismo, que se une a un epítipo antigénico en gp120.

La inmunización pasiva se puede utilizar para prevenir y tratar enfermedades víricas de manera eficaz y segura. (Véase, por ejemplo, Keller et al., *Clin. Microbiol. Rev.* 13:602-14 (2000); Casadevall, *Nat. Biotechnol.* 20: 114 (2002); Shibata et al, *Nat. Med.* 5:204-10 (1999); e Igarashi et al, *Nat. Med.* 5:211-16 (1999)). La inmunización pasiva que
 5 utiliza anticuerpos monoclonales humanos proporciona una estrategia de tratamiento inmediato para la profilaxis de emergencia y el tratamiento del VIH.

Los sujetos en riesgo de enfermedades o trastornos relacionados con el VIH incluyen pacientes que han entrado en contacto con una persona infectada o que han estado expuestos al VIH de alguna otra manera. La administración de
 10 un agente profiláctico puede ocurrir antes de la manifestación de los síntomas característicos de la enfermedad o trastorno relacionado con el VIH, de modo que una enfermedad o trastorno se prevenga o, alternativamente, se retrase en su progresión.

ARTÍCULOS DE FABRICACIÓN

Se describe un artículo de fabricación que contiene materiales útiles para el tratamiento, prevención y/o diagnóstico de los trastornos descritos anteriormente. El artículo de fabricación comprende un envase y una etiqueta o prospecto sobre o asociado al envase. Los envases adecuados incluyen, por ejemplo, frascos, viales, jeringuillas, bolsas de solución IV, etc. Los recipientes pueden formarse a partir de una diversidad de materiales tales como vidrio o plástico.
 20 El envase contiene una composición que está sola o combinada con otra composición eficaz para tratar, prevenir y/o diagnosticar la afección y puede tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo, el envase puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial que tiene un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica). Al menos un agente activo en la composición es un anticuerpo de la invención. La etiqueta o prospecto indica que la composición se usa para tratar la dolencia de elección. Por otra parte, el artículo de fabricación puede comprender (a) un primer
 25 envase con una composición contenida en este, en donde la composición comprende un anticuerpo de la invención; y (b) un segundo envase con una composición contenida en este, en donde la composición comprende un agente citotóxico o de otro modo terapéutico adicional. El artículo de fabricación en esta realización de la invención puede comprender adicionalmente un prospecto que indica que las composiciones pueden usarse para tratar una afección concreta. Como alternativa o además, el artículo de fabricación puede comprender además un segundo (o tercer)
 30 envase que comprende un tampón farmacéuticamente aceptable, tal como agua bacteriostática para inyección (BWI, de sus siglas en inglés), solución salina tamponada con fosfato, disolución de Ringer y disolución de dextrosa. Puede incluir además otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y de usuario, que incluyen otros tampones, diluyentes, filtros, agujas y jeringas.

Tabla 1 - Secuencias de aminoácidos de cadena pesada

KABAT	FWR1	CDR1	FWR2	CDR2	FWR3	CDR3	FWR4
AbV-1H	QMQLQESGPGLV KPSETLSLTCVVS GGSVS	GNIWS	WIRQSP GKQPE WVG	FVSGEYI EYNPSLK S	RLTISRDTSKNQLS LTLRSVTAADTAM YYCAK	TLRARRIYGV AFGEVVDYH YFDV	WGKG TMVT VSS
AbV-2H	QVQLQESGPGLVK PSETLSVTCVSGE SMN	NYW T	WIRQSP GKGLE WIG	YVSDRA SATYNPS LKS	RVISRDTSKNQLS LKLNSVTADTAV YYCAT	ARRGQRIYGE VAFGEFFYY SMDV	WGKG TAVT VSS
AbV-3H	QLQLQESGPGLVK PPETLSLTCVSGA SIN	DAYW S	WIRQSP GKRPEW VG	YVHSG DTNYP SLKR	RVTFSLDTAKNEVS LKLVALTAADSAV YFCAR	ALHGKRIYGT VALGELFVYF HMDV	WGKG TAVT VSS
AbV-4H	QLQLQESGPGLVK PPETLSLTCVSGA SIN	DAYW S	WIRQSP GKRPEW VG	YVHSG DTNYP SLKR	RVTFSLDT AKNEVS LKLVALTAADSAV YFCAR	ALHGKRIY GT VALGELFVYF YMDV	WGKG TAVT VSS
AbV-5H	QVHLQESGPGLVK PSETLSLTCNVSGT LVR	DNYW S	WIRQPL GKQPE WIG	YVHDSG DTNYP SLKS	RVHLSLDKSKNLV SLRLTGVTAAADSAI YYCAT	TKHGRRYGV VAFKEWFTYF YMDV	WGKG TSVT SS
AbV-6H	QVHLQESGPGLVK PSETLSLTCNVSGT LVR	DNYW S	WIRQPL GKQPE WIG	YVHDSG DTNYP SLKS	RVHLSLDKSKNLV SLRLTGVTAAADSAI YYCAT	TKHGRRYGV VAFKEWFTYF YMDV	WGKG TSVT SS
AbV-7H	QMQLQESGPGLV KPSETLSLTCVSG ASIS	DSYW S	WFRSP GKGLE WIG	YVHKSG DTNYS LKS	RVNLSLDASKNQV SLSLVAATAADSG KYYCAR	TLHGRRYGV AFNEWFTYFY MDV	WGNG TQVT VSS
AbV-8H	QVHLQESGPGLVK PSETLSLTCVSG ASTS	GQYW S	WIRQSP GKGLE WIG	YRSDSG DANYNP SLKS	RVIISLDTSRNQLSL NVTSVTTADTAMY FCAR	AQRGKRIYGV VSLGEYHYH IMDV	WGKG TPVT SS
AbV-9H	QVQLQESGPGLVK PSETLSVTCVSGE SMN	NYW T	WIRQSP GKGLE WIG	YISDRAS ATYNPSL NS	RVISRDTSKNQLS LKLNSVTPADTAV YYCAT	ARRGQRIYGE VSFGEFFYY SMDV	WGKG TAVT VSS

Tabla 2 - Secuencias de aminoácidos de cadena ligera

KABAT	FWR1	CDR1	FWR2	CDR2	FWR3	CDR3	FWR4
AbV-1L	TDSVADVAMS VAPGDTATISC	GEKSNRGAR VQ	WYQQKP GQAPVLI Y	NNQDRP S	GIPERFSASPDAGFG TTATLTISRVEAGDE ADYYC	HIWDSR FPLSW VL	FAGG TKLT VL
AbV-2L	GSVTSFVRPLS VALGETASISC	GRQALGSRA VQ	WYQHRP GQAPVLL IY	NNQDRP S	GIPERFSGTPDINFGT RATLTISGVEAGDEA DYYC	HMWDS RSGFS WS VL	FGGA TRLT VL
AbV-3L	HCTGAVSSFSVS VAPGQTARITC	GEESLGSRSV I	WYQQR GQAPSLII Y	NNDRP S	GIPERFSGSPGSTFGT TATLTISVEAGDEA DYYC	HIWDSR RPTNW V VL	FGEG TTLT VL
AbV-4L	HCTGAVSSFSVS VAPGQTARITC	GEESLGSRSV I	WYQQR GQAPSLII Y	NNDRP S	GIPERFSGSPGSTFGT TATLTISVEAGDEA DYYC	HIWDSR RPTNW V VL	FGEG TTLT VL
AbV-5L	HCTASLASSMS VSPGETAKISC	GKESIGSRV Q	WYQQKP GQPPSLII Y	NNQDRP A	GVPERFSASPDPRPG TTATLTITNVDAEDE ADYYC	HIYDAR GGTNW V VL	FDRG TTLT VL
AbV-6L	HCTGSLASSMS VSPGETAKISC	GKESIGSRV Q	WYQQKP GQPPSLII Y	NNQDRP A	GVPERFSASPDPRPG TT ATLTITNVDAEDE ADYYC	HIYDAR GGTNW V VL	FDRG TTLT VL
AbV-7L	HCTASVTSDISV APGETARISC	GEKSLGSRA VQ	WYQHRA GQAPSLII Y	NNQDRP S	GIPERFSGSPDSAFGT TATLTISVEAGDEA DYYC	HIWDSR VPTKW V VL	FGGG TTLT VL
AbV-9L-a (AbV-2L)	GSVTSFVRPLS VALGETASISC	GRQALGSRA VQ	WYQHRP GQAPVLL IY	NNQDRP S	GIPERFSGTPDINFGT RATLTISGVEAGDEA DYYC	HMWDS RSGFS WS VL	FGGA TRLT VL
AbV-9L-b (10-847)	XXXXSYVRPLS VALGETASISC	GRQALGSRA VQ	WYQHRP GQAPILLI Y	NNQDRP S	GIPERFSGTPDINFGT RATLTISGVEAGDEA DYYC	HMWDS RSGFS WS VL	FGGA TRLT VL

Tabla 3 - Emparejamientos de cadenas pesadas y ligeras

Nombre	SEQ ID NO			
	Región variable		CDR 1-3	
	Cadena pesada (H)	Cadena ligera (L)	Cadena pesada (H)	Cadena ligera (L)
AbV-1	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 17-19	SEQ ID NO: 20-22
AbV-2	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 4	SEQ ID NO: 23-25	SEQ ID NO: 26-28
AbV-3	SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 6	SEQ ID NO: 29-31	SEQ ID NO: 32-34
AbV-4	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 35-37	SEQ ID NO: 38-40
AbV-5	SEQ ID NO: 9	SEQ ID NO: 10	SEQ ID NO: 41-43	SEQ ID NO: 44-46
AbV-6	SEQ ID NO: 11	SEQ ID NO: 12	SEQ ID NO: 47-49	SEQ ID NO: 50-52
AbV-7	SEQ ID NO: 13	SEQ ID NO: 14	SEQ ID NO: 53-55	SEQ ID NO: 56-58
AbV-8	SEQ ID NO: 15	N/D	SEQ ID NO: 59-61	N/D
LAbV-9	SEQ ID NO: 16	SEQ ID NO: 4	SEQ ID NO: 62-64	SEQ ID NO: 26-28
		SEQ ID NO: 65	SEQ ID NO: 62-64	SEQ ID NO: 66-68

Tabla 4 - Secuencias de aminoácidos de cadena pesada excluidas

KABAT	FWR1	CDR1	FWR2	CDR2	FWR3	CDR3	FWR4
GL	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSIS	SYYS	WIRQPPGKLEWIG	YIYSGSTNYNPSLKS	RVTSVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR	TQGGKRIYGVVSFGDYYYYYYM	WGKGTTVTVSS
Consenso	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCSVSGX ₁ ISX ₂ X ₃	DX ₄ YWS	WIRQSPGKLEWIG	YVHDSGDTNYNPSLKS	X ₅ X ₆ SLDTSKNQVSLKLX ₇ X ₈ VTAADSAX ₉ YYCAR	AX ₁₀ HGX ₁₁ RIYGI VAFGEX ₁₂ FTFY	WGKGTTVTVSS
10-1369	QVQLQESGPGLVKPLETSLTCTN VSGAFIA	DHYWS	WIRLPLGKPEWIG	YVHDSGDTNYNPSLKN	RVHSLDDKSTNQVSLKLMVAVTAGDSALYYCAT	TKHGRRIYGVVAFGEWFTFYFM	WGKGTTVTVSS
10-259	QVHLQESGPGLVKPSSETLSLTCTN VSGTLVR	DNYWS	WMRQPLGKQPEWIG	YVHDSGDTNYNPSLKS	RVHSLDDKSNLVS LRLTAVTAADSATYYCAT	TKHGRRIYGVAFNEWFTFYMD	WGKGTTVTVSS
10-303	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCS VSGASIS	DSYWS	WIRQSPGKLEWIG	YVHKSGDTNYNPSLKS	RVNLSLDTSKNQVSLSLVAATAADSGKY YCAR	TLHGRRIYGVAFNEWFTFYMD	WGNGTQVTVSS
10-410	QVQLQESGPGLVKPPETLSLTCS VSGASVN	DAYWS	WIRQSPGKPEWIG	YVHSGDTNYNPSLKR	RVTFSLDTAKNEVSLKLVALTAAADSAYFCAR	ALHGKRIYGVAFNEWFTFYMD	WGKGTTVTVSS
10-1130	QVQLQESGPGLVKPPETLSLTCS VSGASIN	DAYWS	WIRQSPGKPEWIG	YVHSGDTNYNPSLKR	RVTFSLDTAKNEVSLKLVDLTAADSAYFCAR	ALHGKRIYGVAFNEWFTFYMD	WGKGTTVTVSS
10-1121	QVQLQESGPGLVKPPETLSLTCS VSGASIN	DAYWS	WIRQSPGKPEWIG	YVHSGDTNYNPSLKR	RVFSLDTAKNEVSLKLVDLTAADSAYFCAR	ALHGKRIYGVAFNEWFTFYMD	WGKGTTVTVSS
10-1146	QVQLVESGPGLVTPSETLSLTCTVSNGSVS	GRFWS	WIRQSPGRLEWIG	YFSDTDRSEYSPSLRS	RLTSLDASRNQVSLKLSVTAADSATYYCAR	AQGGKRIYGVVSFGDYFYFYMD	WGKGTTVTVSS
10-996	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCS VNGSVS	GRFWS	WIRQSPGRLEWIG	YFSDTEKSNYNPSLRS	RLTSLVDASKNQVSLKLSVTAADSATYYCAR	TQGGKRIYGVVSFGDYFYFYMD	WGKGTTVTVSS
10-1341	QVQLQESGPGLVKPSSETLSVTCS VSGDSMN	NYWT	WIRQSPGKLEWIG	YISDRASATYNPSLNS	RVVISRDTSKNQVSLKLSVTPADTAVYYCAT	ARRGQRIYGVVSFGDYFYFYMD	WGKGTTVTVSS
10-847	QVQLQESGPGLVKPSSETLSVTCS VSGDSMN	NYWT	WIRQSPGKLEWIG	YISDRASATYNPSLNS	RVVISRDTSKNQVSLKLSVTPADTAVYYCAT	ARRGQRIYGVVSFGDYFYFYMD	WGKGTTVTVSS
10-1074	QVQLQESGPGLVKPSSETLSVTCS VSGDSMN	NYWT	WIRQSPGKLEWIG	YISDRASATYNPSLNS	RVVISRDTSKNQVSLKLSVTPADTAVYYCAT	ARRGQRIYGVVSFGDYFYFYMD	WGKGTTVTVSS
10-1074G M	QVQLQESGPGLVKPSSETLSVTCS VSGDSMN	NSYT	WIRQSPGKLEWIG	YISKESATYNPSLNS	RVVISRDTSKNQVSLKLSVTPADTAVYYCAT	ARRGQRIYGVVSFGDYFYFYMD	WGKGTTVTVSS

Tabla 5 - Secuencias de aminoácidos de cadena ligera excluidas

KABAT	FWR1	CDR1	FWR2	CDR2	FWR3	CDR3	FWR4
GL	SYVLTQPPSVSVA PGQTARITC	GGNIGSKS VH	WYQK PGQAPV LVY	DDSDR PS	GIPERFSGNSGN TATLTISRVEAGD EADYYC	QVWD SSSDH PWW	FGG GTK LTVL
Consenso	SX.VRPQPPSLSV APGETARIX ₂ C	GEX ₃ SLGSR AVQ	WYQQR PGQAPS LIY	NNQD RPS	GIPERFSGSPDX4X ₅ FGTTATLTITX ₆ V EAGDEADYYC	HIWD SRX ₇ P TX ₈ W V	FGG GTTL TVL
10-1369	SSMSVSPGETAKI TC	GEKISGSRA VQ	WYQKK PGQPPS LIY	NNQD RPS	GVPERFSASPDIE FGTTATLTITNVE AGDEADYYC	HIYD ARRP TNWW	FDR GTTL TVL
10-259	SSMSVSPGET AKI SC	GKESIGSRA VQ	WYQKK SGQPPS LIY	NNQD RPS	GVPERFSATPDFG AGTTATLTITNVE ADDEADYYC	HIYD ARGG TNWW	FDR GAT LTVL
10-303	SDISVAPGETARIS C	GEKSLGSR AVQ	WYQHR AGQAPS LIY	NNQD RPS	GIPERFSGSPDSPF GTTATLTITSVEA GDEADYYC	HIWD SRVPT KWW	FGG GTTL TVL
10-1121	SFVSVPAGQTARI TC	GEESLGSRS VI	WYQQR PGQAPS LIY	NNHD RPS	GIPERFSGSPGSTF GTTATLTITSVEA GDEADYYC	HIWD SRRPT NWW	FGE GTTL TVL
10-410	SFVSVPAGQTARI TC	GEESLGSRS VI	WYQQR PGQAPS LIY	NNND RPS	GIPERFSGSPGSTF GTTATLTITSVEA GDEADYYC	HIWD SRRPT NWW	FGE GTTL TVL
10-1130	SFVSVPAGQTARI TC	GEESLGSRS VI	WYQQR PGQAPS LIY	NNND RPS	GIPERFSGSPGSTF GTTATLTITSVEA GDEADYYC	HIWD SRRPT NWW	FGE GTTL TVL
10-847	SYVRPLSVALGET ASISC	GRQALGSR AVQ	WYQHR PGQAPI LIY	NNQD RPS	GIPERFSGTPDINF GTRATLTISGVEA GDEADYYC	HMW DSRS GFSW S	FGG ATR LTVL
10-1074	SYVRPLSVALGET ARISC	GRQALGSR AVQ	WYQHR PGQAPI LIY	NNQD RPS	GIPERFSGTPDINF GTRATLTISGVEA GDEADYYC	HMW DSRS GFSW S	FGG ATR LTVL
10-1341	SYVRPLSVALGET ARISC	GRQALGSR AVQ	WYQHR PGQAPI LIY	NNQD RPS	GIPERFSGTPDINF GTRATLTISGVEA GDEADYYC	HMW DSRS GFSW S	FGG ATR LTVL
10-996	SSLPLSVAPGATA KIAC	GEKSFASR AVQ	WYQKK PGQAPV LIY	NNQD RPA	GVSERFSGTPDV GFGSTATLTISRV EAGDEADYYC	HKWD SRSP SWW	FGG GTQ LTVL

(continuación)

KABAT	FWR1	CDR1	FWR2	CDR2	FWR3	CDR3	FWR4
10-1146	SSLPLSLAPGATA KIPC	GEKSRGSR AVQ	WYQQK PGQAPT LIY	NNQD RPA	GVSEYSGNPDV AIGVTATLTISRVEAGDEAEYYC	HYWD SRSPI SWW	FGG WTQ LTVL

LISTADO DE SECUENCIAS

SEQ ID NO: 1-16 - Secuencias de región variable de cadena pesada y ligera:

SEQ ID NO: 1 -

QMQLQESGPGLVKPSETLSLTCVVSGGSVSGNIWSWIRQSPGKGPEWVGFVSGEYIEYNPSLKSRLT
ISRDTSKNQLSLTLRSVTAADTAMYYCAKTLRARRIYGVIAGFEVYDHYHFDVWGKGMTMTVSS

SEQ ID NO: 2 -

TDSVASDVAMSVAPGDTATISCGEKSNGARAVQWYQQKPGQAPVLLIYNNQDRPSGIPERFSASPD
AGFGTTATLTISRVEAGDEADYYCHIWDSRFPLSWVFAGGTKLTVL

SEQ ID NO: 3 -

QVQLQESGPGLVKPSETLSVTCSVSGDSMNYYWTWIRQSPGKGLEWIGYVSDRASATYNPSLKSR
VVISRDTSKNQLSLKLNSVTLADTAVYYCATARRGQRIYGEVAFGEFFYYYSMDVWGKGTAVTVS
S

SEQ ID NO: 4 -

GSVTSFVRPLSVALGETASISCGRQALGSRVQWYQHRPGQAPVLLIYNNQDRPSGIPERFSGTPDIN
FGTRATLTISGVEAGDEADYYCHMWDSRSGFSWSFGGATRLTVL

SEQ ID NO: 5 -

QLQLQESGPGLVKPPETLSLTCVSGASINDAYWSWIRQSPGKRPEWVGYYVHHSGDTNYPNPSLKRR
VTFSLDTAKNEVSLKLVALTAADSAVYFCARALHGKRIYGTVALGELFVYFHMVWGKGTAVTVS
S

SEQ ID NO: 6 -

HCTGAVSSFVSVAPGQTARITCGEESLGSRSVIWYQQRPGQAPSLIYNNNDRPSGIPERFSGSPGSTF
GTTATLTITSVEAGDEADYYCHIWDSRRPTNWWVFEGTTLTVL

SEQ ID NO: 7 -

QLQLQESGPGLVKPPETLSLTCVSGASINDAYWSWIRQSPGKRPEWVGYYVHHSGDTNYPNPSLKRR
VTFSLDTAKNEVSLKLVALTAADSAVYFCARALHGKRIYGTVALGELFVYFYMDVWGKGTAVTVS
S

SEQ ID NO: 8 -

HCTGAVSSFVSVAPGQTARITCGEESLGSRSVIWYQQRPGQAPSLIYNNNDRPSGIPERFSGSPGSTF
GTTATLTITSVEAGDEADYYCHIWDSRRPTNWWVFEGTTLTVL

SEQ ID NO: 9 -

QVHLQESGPGLVKPSETLSLTCNVSGTLVRDNYWSWIRQPLGKQPEWIGYVHDSGDTNYPNPSLKSR
VHLSLDKSKNLVSLRLTGVTAAADSAIYYCATTKHGRRIYGVVAFKEWFTYFYMDVWVGKGTSVTVS
S

SEQ ID NO: 10 -

HCTASLASSMSVSPGETAKISCGKESIGSRAVQWYQQKPGQPPSLIYNNQDRPAGVPERFSASPDFR
PGTTATLTITNVDAEDEADYYCHIIDARGGTNWWFDRGTTLTVL

SEQ ID NO: 11 -

QVHLQESGPGLVKPSETLSLTCNVSGTLVRDNYWSWIRQPLGKQPEWIGYVHDSGDTNYPNPSLKSR
VHLSLDKSKNLVSLRLTGVTAAADSAIYYCATTKHGRRIYGVVAFKEWFTYFYMDVWVGKGTSVTVS
S

SEQ ID NO: 12 -

HCTGSLASSMSVSPGETAKISCGKESIGSRAVQWYQQKPGQPPSLIYNNQDRPAGVPERFSASPDFR
PGTTATLTITNVDAEDEADYYCHIIDARGGTNWWFDRGTTLTVL

SEQ ID NO: 13 -

QMQLQESGPGLVKPSETLSLTCVSGASISDSYWSWFRRSPGKGLEWIGYVHKSGDTNYPNPSLKSRV
NLSLDASKNQVSLSLVAATAADSGKYCARTLHGRIYGVVAFNEWFTYFYMDVWNGTQVTVSS

SEQ ID NO: 14 -

HCTASVTSDISVAPGETARISCGEKSLSRAVQWYQHRAGQAPSLIYNNQDRPSGIPERFSGSPDSA
FGTTATLTITSVEAGDEADYYCHIWDSRVPTKWVFGGGTTLTVL

SEQ ID NO: 15 -

QVHLQESGPGLVKPSETLSLTCVVSFASTSGQYWSWIRQSPGKGLEWIGYRSDSGDANYNPSLKSR
VIISLDTSRNQLSLNVTSTTADTAMYFCARAQRGKRIYGVVSLGEYYHYIMDVWGTGTPVTVSS

SEQ ID NO: 16 -

QVQLQESGPGLVKPSETLSVTCSVSGDSMNYYWTWIRQSPGKGLEWIGYISDRASATYNPSLNSR
VVISRDTSKNQLSLKLSVTPADTAVYYCATARRGQRIYGEVSFGEFFYYYSMDVWVGKGTAVTVSS

SEQ ID NO 17-64 - Secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada y ligera:

- | | |
|----|---|
| 5 | SEQ ID NO: 17 - GNIWS |
| | SEQ ID NO: 18 - FVSGEYIEYNPSLKS |
| | SEQ ID NO: 19 - TLRARRIYGVIAGFEVDYHYFDV |
| | SEQ ID NO: 20 - GEKSNGARAVQ |
| | SEQ ID NO: 21 - NNQDRPS |
| 10 | SEQ ID NO: 22 - HIWDSRFPLSWV |
| | SEQ ID NO: 23 - NYYWT |
| | SEQ ID NO: 24 - YVSDRASATYNPSLKS |

SEQ ID NO: 25 - ARRGQRIYGEVAFGEFFYYYSMDV
 SEQ ID NO: 26 - GRQALGSRAVQ
 SEQ ID NO: 27 - NNQDRPS
 SEQ ID NO: 28 - HMWDSRSGFSWS
 5 SEQ ID NO: 29 - GRQALGSRAVQ
 SEQ ID NO: 30 - NNQDRPS
 SEQ ID NO: 31 - HMWDSRSGFSWS
 SEQ ID NO: 32 - GEESLGSRSVI
 SEQ ID NO: 33 - NNNDRPS
 10 SEQ ID NO: 34 - HIWDSRRPTNWV
 SEQ ID NO: 35 - DAYWS
 SEQ ID NO: 36 - YVHSGDTNYPNPSLKR
 SEQ ID NO: 37 - ALHGKRIYGTVALGELFVYFYMDV
 SEQ ID NO: 38 - GEESLGSRSVI
 15 SEQ ID NO: 39 - NNNDRPS
 SEQ ID NO: 40 - HIWDSRRPTNWV
 SEQ ID NO: 41 - DNYWS
 SEQ ID NO: 42 - YVHDSGDTNYPNPSLKS
 SEQ ID NO: 43 - TKHGRRYGVVAFKEWFTYFYMDV
 20 SEQ ID NO: 44 - GKESIGSRAVQ
 SEQ ID NO: 45 - NNQDRPA
 SEQ ID NO: 46 - HIYDARGGTNWV
 SEQ ID NO: 47 - DNYW
 SEQ ID NO: 48 - YVHDSGDTNYPNPSLKS
 25 SEQ ID NO: 49 - TKHGRRYGVVAFKEWFTYFYMDV
 SEQ ID NO: 50 - GKESIGSRA
 SEQ ID NO: 51 - NNQDRPA
 SEQ ID NO: 52 - HIYDARGGTNWV
 SEQ ID NO: 53 - DSYWS
 30 SEQ ID NO: 54 - YVHKSGDTNYPNPSLKS
 SEQ ID NO: 55 - TLHGRRYGVVAFNEWFTYFYMDV
 SEQ ID NO: 56 - GEKSLGSRAVQ
 SEQ ID NO: 57 - NNQDRPS
 SEQ ID NO: 58 - HIWDSRVPTKWV
 35 SEQ ID NO: 59 - GQYWS
 SEQ ID NO: 60 - YRSDSGDANYNPSLKS
 SEQ ID NO: 61 - AQRGKRIYGVVSLGEYYHYIMDV
 SEQ ID NO: 62 - NYYWT
 SEQ ID NO: 63 - YISDRASATYNPSLNS
 40 SEQ ID NO: 64 - ARRGQRIYGEVSFGEFFYYYSMDV

SEQ ID NO: 65 - Secuencia de región variable de cadena ligera:

SEQ ID NO: 65 -

XXXXSYVRPLSVALGETASISCGRQALGSRAVQWYQHRPGQAPILLIYNNQDRPSGIPERFSGTPDIN
 FGTRATLTISGVEAGDEADYYCHMWDSRSGFSWSFSGGATRLTVL

45

SEQ ID NO 66-68 - Secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera:

SEQ ID NO: 66 - GRQALGSRAVQ
 SEQ ID NO: 67 - NNQDRPS
 50 SEQ ID NO: 68 - HMWDSRSGFSWS

SEQ ID NO 69 y 70 - Secuencias de región variable de línea germinal:

SEQ ID NO: 69 -

QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSYYWSWIRQPPGKGLEWIGYIYYSGSTNYNPSLKSRVT
ISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARTQQGKRIYGVVSFGDYDDYYMDVWGKGTITVTVSS

SEQ ID NO: 70 -

SYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGNNIGSKSVHWYQQKPGQAPVLLVYDDSDRPSGIPERFSGSNSG
NTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDSSSDHPWVFGGGTKLTVL

Ejemplos

5 EJEMPLO 1 - Caracterización de los anticuerpos AbV-1 - 9

Para comprender mejor la respuesta de anticuerpos neutralizantes al VIH-1 y el epítipo dirigido por los anticuerpos AbV1-9, se aislaron miembros de una gran familia clonal que domina la respuesta de memoria IgG específica de gp160 de un paciente infectado con el subtipo A. La secuencia, afinidad de unión, actividad neutralizante y reconocimiento de hidratos de carbono y el bucle V3 se determinaron para los anticuerpos AbV-1 - 9. Se llevaron a cabo ensayos para aislar clones de linfocitos B que codifican AbV-1 - 9. Los clones de AbV-1 - 9 se segregan en dos grupos diferentes que se distinguen por secuencia, afinidad de unión, reconocimiento de hidrato de carbono y actividad neutralizante. El primer grupo exhibe una potencia y amplitud notables a pesar de no unirse de forma detectable a los polisacáridos libres de proteínas.

EJEMPLO 2 - Determinación de los valores de K_d

La K_d se mide mediante un ensayo de unión a antígeno radiomarcado (RIA) realizado con la versión Fab de un anticuerpo de interés y su antígeno como se describe mediante el siguiente ensayo. La afinidad de unión a la solución de Fab por el antígeno se mide equilibrando Fab con una concentración mínima de antígeno marcado con (125 I) en presencia de una serie de titulaciones de antígeno no marcado, capturando después el antígeno unido con una placa recubierta con anticuerpo anti-Fab (véase, por ejemplo, Chen et al., *J. Mol. Biol.* 293:865-881 (1999)). Para establecer las condiciones para el ensayo, se recubren durante la noche placas de múltiples pocillos MICROTITER® (Thermo Scientific) con 5 µg/ml de un anticuerpo anti-Fab capturador (Cappel Labs) en carbonato de sodio 50 mM (pH 9,6) y posteriormente se bloquean con albúmina sérica bovina al 2 % (p/v) en PBS durante dos a cinco horas a temperatura ambiente (aproximadamente 23 °C). En una placa no adsorbente (Nunc n.º 269620), se mezclan antígeno- 125 I 100 pM o 26 pM con diluciones en serie de un Fab de interés (por ejemplo, consistente con la evaluación del anticuerpo anti-VEGF, Fab-12, en Presta et al., *Cancer Res.* 57:4593-4599 (1997)). Después, el Fab de interés se incuba durante la noche; sin embargo, la incubación puede continuar durante un período más largo (por ejemplo, aproximadamente 65 horas) para garantizar que se alcanza el equilibrio. Posteriormente, las mezclas se transfieren a la placa de captura para la incubación a temperatura ambiente (por ejemplo, durante una hora). Después, la solución se retira y la placa se lava ocho veces con polisorbato 20 al 0,1 % (TWEEN-20®) en PBS. Cuando las placas se han secado, se añaden 150 µl/pocillo de centelleante (MICRO-SCINT-20™; Packard) y las placas se cuentan en un contador gamma TOPCOUNT™ (Packard) durante diez minutos. Se eligen las concentraciones de cada Fab que proporcionan menos o igual al 20 % de la unión máxima para su uso en ensayos de unión competitiva.

EJEMPLO 3 - Determinación de los valores de K_d

La K_d se mide usando ensayos de resonancia de plasmón superficial usando un BIACORE®-2000 o un BIACORE®-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, N.J.) a 25 °C con chips de antígeno inmovilizado CM5 a ~10 unidades de respuesta (UR). En resumen, se activan chips biosensores de dextrano carboximetilado (CM5, BIAcore, Inc.) con clorhidrato de N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) y N-hidroxisuccinimida (NHS) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. El antígeno se diluye con acetato de sodio 10 mM, pH 4,8, a 5 µg/ml (~0,2 µM) antes de la inyección a un caudal de 5 µl/min para alcanzar aproximadamente 10 unidades de respuesta (UR) de la proteína acoplada. Después de la inyección del antígeno, se inyecta etanolamina 1 M para bloquear los grupos que no han reaccionado. Para las mediciones de cinética, se inyectan diluciones en serie de Fab (0,78 nM a 500 nM) en PBS con tensioactivo de polisorbato 20 (TWEEN-20™) al 0,05 % (PBST) a 25 °C a un caudal de aproximadamente 25 µl/min. Las tasas de asociación (kon) y las tasas de disociación (koff) se calculan usando un modelo de unión Langmuir simple uno a uno (Programa informático de evaluación BIACORE® versión 3.2) ajustando simultáneamente los sensogramas de asociación y disociación. La constante de equilibrio de disociación (K_d) se calcula como la proporción koff/kon. Véase, por ejemplo, Chen et al., *J. Mol. Biol.* 293:865-881 (1999). Si la tasa de asociación excede 106 M⁻¹ s⁻¹ por el ensayo de resonancia de plasmón superficial anterior, entonces la tasa de asociación puede determinarse usando una técnica de extinción fluorescente que mide el aumento o la disminución de la intensidad de emisión de fluorescencia (excitación = 295 nm; emisión = 340 nm, paso de banda de 16 nm) a 25 °C de un anticuerpo anti-antígeno 20 nM (forma Fab) en PBS, pH 7,2, en presencia de concentraciones crecientes de antígeno medidas en un espectrómetro, tal como un

espectrofotómetro equipado con flujo de parada (Aviv Instruments) o un espectrofotómetro SLM-AMINCO™ serie 8000 (ThermoSpectronic) con una cubeta agitada.

EJEMPLO 4: Secuenciación de donantes de VIH

Siete partes alícuotas de una muestra biológica de un paciente, cada una con aproximadamente 90.000 células, se separaron en fracciones y se analizó la fidelidad de emparejamiento. El análisis resultó en aproximadamente 100.000 pares de cadenas pesadas-ligeras posibles y aproximadamente 37.000 pares de cadenas pesadas-ligeras naturales de alta confianza utilizando los métodos de tecnología AbPair desvelados en el documento PCT/US2014/028925. Se secuenció una alícuota con los métodos de tecnología AbSeq desvelados en los documentos WO2012048341 y WO2012048340.

EJEMPLO 5 - Nuevo descubrimiento bioinformático de bNAb (similitud intradonante)

La similitud de aminoácidos de CDR3 de AbV1-9 se determinó con bNAb conocidos procedentes del paciente 17 (Pt17). Se utilizaron secuencias de pacientes sanos para calibrar el umbral de falsos positivos y desarrollar un límite de similitud o retención de umbral. La relación filogenética de los anticuerpos AbV1-9 se analizó en relación con los bNAb conocidos utilizando la secuencia de aminoácidos completa. Se compararon otras características de anticuerpos seleccionados con las características de otras características de secuencia de bNAb conocidas, que incluyen la familia de la línea germinal, el nivel de mutación, etc. Resultado: se encontraron 7 pares de cadenas pesadas y ligeras de alta confianza y 2 pares de cadenas pesadas con cadenas ligeras inferidas (AbV1-9).

EJEMPLO 6 - Materiales y métodos utilizados en los EJEMPLOS 2-5.

Los anticuerpos contra el VIH se clonan y se producen después de la captura de linfocitos B únicos específicos de gp140. Los anticuerpos glucomanipulados se generan mediante la sustitución de restos en varias posiciones de la cadena pesada. Las propiedades de unión de los anticuerpos anti-gp140 a las proteínas Env del VIH se analizan mediante ensayos ELISA, SPR y micromatrices de polisacáridos. La neutralización se evalúa usando (i) un ensayo basado en luciferasa en células TZM.bl, y (ii) un ensayo basado en PBMC que usa infección con variantes primarias del VIH-1. Las estructuras de AbV1-9 unidas y no unidas al ligando, y fragmentos Fab GL, se resuelven mediante reemplazo molecular a alta resolución.

RT-PCR de linfocitos B individuales y análisis de genes Ig

Se realiza la clasificación de células individuales de linfocitos B gp140+CD19+IgG+ de un paciente. Se realizan PBMC, síntesis de ADNc y amplificaciones por PCR anidadas de genes Ig. Los genes Igk expresados por las variantes clonales de AbV1-9 se amplifican por PCR. Todos los productos de PCR se secuencian y analizan para determinar el uso de genes Ig, los análisis de CDR3 y el número de hipermutaciones somáticas de V_H/V_K. Los alineamientos de secuencias múltiples se realizan utilizando el programa MacVector con la función de análisis ClustalW, y se utilizan para generar dendrogramas mediante el método de unión de vecinos. Alternativamente, los dendrogramas se generan utilizando el método UPGMA.

Los segmentos génicos precursores de la línea germinal (GL, de sus siglas en inglés) de los anticuerpos AbV1-9 se identifican usando IgBLAST e IM-GTdVV-QUEST. Para construir una secuencia ancestral GL representativa, las secuencias IgH e IgL de un anticuerpo que contiene la menor cantidad de hipermutaciones somáticas se alinean con las secuencias GL usando IgBLAST. La secuencia GL IgH se construye reemplazando los segmentos génicos V_H y J_H maduros con sus contrapartes GL y usando la secuencia 10-996 para la región CDRH3 que implica nucleótidos de la región N y el segmento génico D_H. La secuencia GL IgL se ensambla a partir de las secuencias del segmento génico V_L 3-21 *02 y J_L3*02.

Clonación y producción de anticuerpos

Los productos de PCR digeridos purificados se clonaron en vectores que expresan Igγ₁ o Igλ humana. Los vectores que contienen genes IgH e Igλ se secuencian y comparan con las secuencias originales del producto de PCR. Mutagénesis dirigida al sitio (kit de mutagénesis dirigida al sitio QuikChange; Stratagene) se utiliza para producir anticuerpos variantes. Para generar Fab marcados con His, los genes V_H se subclonan en un vector g de expresión 6xHis-IgCγ1 para codificar el dominio IgG1 C_H1 seguido de un marcador 6x-His. Los fragmentos de ADN de IgH que codifican anticuerpos mutantes se obtienen como un minigen sintético (IDT) y se subclonan en vectores que expresan Igγ₁.

Los anticuerpos y los fragmentos Fab se producen mediante transfección transitoria de plásmidos de expresión de IgH e IgL en células HEK 293T de crecimiento exponencial (ATCC, CRL-11268) utilizando el método de preparación de polietilenimina (PEI). Los anticuerpos IgG se purifican por afinidad utilizando perlas de proteína G de sefarosa (GE Healthcare) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los fragmentos Fab se purifican por afinidad usando la resina de cobalto HisPur™ (Thermo scientific) como se describe a continuación.

Proteínas Env del VIH-1

Se introducen mutaciones de alanina en un vector pYU-2 gp120 usando el kit de mutagénesis dirigida al sitio QuikChange (Stratagene) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El mismo procedimiento se utiliza para generar mutantes de doble polisacárido mediante la introducción de mutaciones de alanina individuales en un vector pYU-2 gp120^{mutante}. Las mutaciones dirigidas al sitio se verifican mediante secuenciación de ADN.

Los vectores de expresión que codifican YU-2 gp140, YU-2 gp120, HXB2c gp120^{central}, proteínas HXB2c 2CC centrales y proteínas mutantes YU-2 gp120 se usan para transfectar células HEK 293T. Para producir la proteína YU-2 gp120 con alto contenido de manosa, se añade kifunensina 25 μ M (Enzo Life Sciences) en el momento de la transfección. Los sobrenadantes de cultivo se cosechan y se concentran usando dispositivos de filtración basados en centrifugación que permitieron el intercambio de tampón de las muestras en imidazol 10 mM, fosfato de sodio 50 mM, cloruro de sodio 300 mM; pH 7,4. Las proteínas se purifican mediante cromatografía de afinidad utilizando resina de cobalto HisPur™ (Thermo scientific) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Para las reacciones de desglucosilación, se digieren 50 μ g de YU-2 gp120 producido en células HEK 293T en PBS durante la noche a 37 °C con 200 U de PNGasa F (New England Biolabs) o 10.000 U de Endo H_r (New England Biolabs) en sus respectivos tampones de reacción sin agentes desnaturizantes. Después del intercambio de tampón en PBS usando filtros centrífugos (Amicon® Ultra, Millipore), se examinan g 120s (200 ng) tratados con glucosidasa mediante SDS-PAGE usando un gel NuPAGE al 4-12 % (Invitrogen) seguido de tinción con plata (Kit Pierce Silver Stain, Thermo Scientific).

ELISA

Las placas ELISA de 96 pocillos de alta unión (Costar) se recubren durante la noche con 100 ng/pocillo de gp120 purificada en PBS. Después del lavado, las placas se bloquean durante 2 h con BSA al 2 %, EDTA 1 μ M, Tween-PBS al 0,05 % (tampón de bloqueo) y luego se incuban durante 2 h con IgG a concentraciones de 26,7 nM y 7 diluciones 1:4 consecutivas en PBS. Después del lavado, las placas se desarrollan mediante incubación con anticuerpos anti-IgG humana conjugados con HRP de cabra (Jackson ImmunoResearch) (a 0,8 μ g/ml en tampón de bloqueo) durante 1 h, y mediante la adición de sustrato cromogénico HRP (solución ABTS, Invitrogen). La unión de anticuerpos a los péptidos superpuestos de gp120 seleccionados se prueba usando un método de péptido-ELISA descrito previamente.

Para los ELISA de competición, las placas recubiertas con gp120 se bloquean durante 2 h con tampón de bloqueo y luego se incuban durante 2 h con anticuerpos biotinilados en soluciones diluidas en serie 1:2 de anticuerpos competidores en PBS (intervalo de concentración de IgG de 5,2 a 667 nM). Las placas se desarrollan como se describe anteriormente usando estreptavidina conjugada con HRP (Jackson ImmunoResearch) (a 0,8 μ g/ml en tampón de bloqueo). Todos los experimentos se realizan al menos por duplicado.

Análisis de micromatrices de polisacáridos

Las micromatrices se generan mediante la impresión robótica de sondas de polisacáridos unidas a lípidos (neoglucolípidos) en portaobjetos de vidrio recubiertos de nitrocelulosa a dos niveles (2 y 5 fmol/punto) por duplicado. Los ensayos de unión se realizan con micromatrices que contienen 15 neoglucolípidos procedentes de N-polisacáridos de alto contenido de manosa y tipos complejos. En resumen, los anticuerpos se prueban a 50 μ g/ml y se detecta la unión con anti-IgG humana biotinilada (Vector) seguido de estreptavidina marcada con AlexaFluor 647 (Sondas Moleculares).

Resonancia de plasmón superficial

Los experimentos se realizan usando un Biacore T100 (Biacore, Inc.). En resumen, las proteínas YU-2 gp140 y gp120 están acopladas a amina primaria en chips CM5 (Biacore, Inc.) a una densidad de acoplamiento de 300 UR. Las IgG anti-gp120 y el precursor de la línea germinal (GL) se inyectan sobre las cubetas de lectura a 1 μ M y 10 μ M, respectivamente, a caudales de 35 μ l/min con fases de asociación de 3 min y de disociación de 5 min. La superficie del sensor se regenera mediante una inyección de 30 segundos de glicina-HCl 10 mM, pH 2,5 a un caudal de 50 μ l/min. Las constantes de disociación (k_d (s⁻¹)), asociación (k_a (M⁻¹ s⁻¹)) y de unión (K_D (M) o K_A (M⁻¹)) se calculan a partir de análisis cinéticos después de restar antecedentes usando un modelo de unión 1:1 sin corrección de índice reflexivo (IR) en masa (programa informático de evaluación Biacore T100).

Ensayos de neutralización

La neutralización del virus se evalúa utilizando un ensayo basado en luciferasa en TZM.bl. Los pseudovirus VIH-1 para analizar contienen principalmente virus de nivel 2 y nivel 3. Los pseudovirus con alto contenido de manosa se producen en células de tipo silvestre tratadas con kifunensina 25 μ M (Enzo Life Sciences) o en células HEK 293 S GnT1^{-/-}. El análisis de regresión no lineal se utiliza para calcular las concentraciones a las que se observa la inhibición semimáxima (valores de CI_{50}). Las actividades de neutralización también se evalúan con un ensayo basado en PBMC previamente caracterizado que usa infección con variantes primarias de VIH-1 (n = 95) aisladas de donantes infectados

con el subtipo B con fechas de seroconversión conocidas entre 1985 y 1989 (histórico n = 14) o entre 2003 y 2006 (contemporáneo, n = 21).

La actividad de neutralización para cada anticuerpo se calcula utilizando el programa informático GraphPad Prism como área bajo la curva de mejor ajuste, que se ajusta a la proporción de virus neutralizados sobre valores de CI_{50} que varían de 0,001 a 50 µg/ml. Los valores del área relativa bajo la curva (RAUC, de sus siglas en inglés) se obtienen normalizando todos los valores de AUC mediante el valor más alto.

Análisis estadísticos

Los análisis estadísticos se realizan con el programa informático GraphPad Prism. Las potencias de neutralización en el ensayo TZM-bl contra el panel seleccionado de cepas de virus frente a las afinidades de unión aparentes de los anticuerpos para gp120 y gp140 se analizan usando una prueba de correlación de Spearman. La prueba de Mann Whitney se utiliza para comparar: (i) afinidades por gp120/gp140 de anticuerpos, y (ii) actividades de neutralización contra virus aislados de seroconvertidores históricos y contemporáneos.

Cristalización y determinaciones de estructura

Se expresan los Fab AbV1-9 marcados con 6x-His para cristalización. Los Fab se purifican de los sobrenadantes de las células HEK 293-6E transfectadas transitoriamente por cromatografía de exclusión por tamaño de afinidad secuencial Ni-NTA (Qiagen) y Superdex200 10/300 (GE Healthcare). Para los cristales del Fab PGT121 no unido a ligando, la IgG PGT121 se aísla de los sobrenadantes de las células HEK 293-6E transfectadas transitoriamente por cromatografía de afinidad de Proteína A (Pierce), y los fragmentos Fab se obtienen mediante escisión de papaína de la IgG y purificación adicional utilizando la cromatografía de exclusión por tamaño Superdex200 10/300 (GE Healthcare).

Los Fab purificados se concentran a 8-20 mg/ml en tampón PBS. Los cristales Fab AbV1-9 "unidos al ligando" se preparan a partir de una muestra de proteína (concentración final: 15 mg/ml) que se mezcla con un exceso molar de 3 veces de polisacárido NA2 y se incuba a 20 °C durante 2 horas. Las condiciones de cristalización se seleccionan a 20 °C utilizando un robot de cristalización Mosquito® (laboratorios TTP) en gotas de 400 nL utilizando una proporción de proteína a depósito 1:1. Los cristales de Fab AbV1-9 no unido a ligando se obtienen en PEG 4.000 al 24 %, Tris-HCl 0,1 M pH 8,5, $CuCl_2$ 10 mM y los cristales de Fab AbV1-9 unido a ligando crecen en PEG 10.000 al 17 %, Bis-Tris 0,1 M pH 5,5, CH_3COONH_4 0,1 M. Los cristales de AbV1-9 Fab se obtienen en PEG 3.350 al 25 %, Bis-Tris 0,1 M pH 5,5, NaCl 0,2 M, y los cristales de Fab GL crecen en PEG 3.350 al 20 %, malonato de sodio 0,24 M pH 7,0, $MnCl_2$ 10 mM. Los cristales se crioprotegen sumergiéndolos en aguas madres que contienen glicerol al 20 % o etilenglicol al 20 % y posteriormente se enfrían rápidamente en nitrógeno líquido.

Los datos de difracción se recopilan en la línea de luz 12-2 en un detector de píxeles Pilatus 6M (Dectris). Los datos se catalogan, integran y escalan utilizando XDS. Utilizando los datos obtenidos de los cristales Fab AbV1-9 no unidos a ligando, se usa Phenix para encontrar una solución de reemplazo molecular para un Fab por unidad asimétrica utilizando dos modelos de búsqueda, los dominios C_H-C_L de PGT128 Fab (código PDB 3PV3) y los dominios V_H-V_L de 2F5 (código PDB 3IDJ) después de omitir restos en los bucles CDRH3 y CDRL3. Posteriormente, las estructuras AbV1-9 no ligadas al ligando se usan como un modelo de búsqueda para encontrar soluciones de reemplazo molecular para Fab AbV1-9 unidos al ligando (un Fab por unidad asimétrica) y GL (cuatro Fab por unidad asimétrica).

El perfeccionamiento iterativo (incluidas las restricciones de simetría no cristalográficas para GL) se realiza usando Phenix y ajustando manualmente modelos en mapas de densidad electrónica usando Coot. PyMOL se utiliza para la visualización molecular y para generar figuras de las estructuras Fab. Los cálculos del área de superficie enterrada se realizan con Areaimol (CCP4 Suite) utilizando una sonda de 1,4 Å. Las estructuras Fab se alinean usando el script Super en PyMOL. Los alineamientos Ca por pares se realizan utilizando PD-BeFold.

EJEMPLO 7 - Identificación de nuevas variantes únicas

El predominio y la diversidad de linfocitos B de memoria IgG específicos de gV40 del clonotipo AbV1-9 se aíslan de un donante africano infectado con el subtipo A usando trímeros YU-2 gp140 como cebo. Se identifican los genes de cadena pesada de inmunoglobulina (IgH) y ligera (IgL) correspondientes a familias clonales únicas. De acuerdo con los altos niveles de hipermutación en los genes de IgH, los genes de Ig amplificados están altamente mutados y tienen alteraciones de nucleótidos.

Se expresan nuevas variantes únicas y pueden demostrar la unión a YU-2 gp120 y gp140 mediante ELISA y resonancia de plasmón superficial (SPR). A menos que se indique otra cosa, las proteínas gp120 y gp140 para estos y otros experimentos se expresan en células de mamíferos que pueden unir un N-polisacárido de tipo complejo o alto en manosa a un PNGS.

EJEMPLO 8 - Papel del bucle V3 en el reconocimiento de antígenos

Se examina el papel de V3 en el reconocimiento de antígeno por los anticuerpos AbV1-9. Se realizan ELISA usando proteínas centrales HXB2 gp120 que carecen de bucles VI-V3 (gp120^{central}) o retienen una porción de V3 (núcleo 2CC-central), y usando una proteína mutante YU-2 gp120 que lleva una doble sustitución de alanina en el tallo V3 (gp120^{GD324_5AA}). Los anticuerpos pueden mostrar una reactividad disminuida frente a variantes que carecen del bucle V3 y gp120^{GD3245AA} en comparación con el YU-2 gp120 intacto y pueden sugerir que el reconocimiento mediante AbV1-9 implica determinantes de proteínas en la vecindad del bucle V3. Ninguno de los anticuerpos puede unirse a péptidos superpuestos que abarquen V3, y puede sugerir que los epítomos dirigidos son discontinuos y/o requieren una conformación particular no lograda por péptidos aislados.

Para comparar el reconocimiento global de polisacáridos mediante los anticuerpos AbV1-9, se examina su unión a YU-2 gp120 tratada con PNGasa F, que escinde tanto N-polisacáridos de tipo complejo como de alto contenido en manosa. Debido a que la gp120 no puede ser completamente desglucosilada enzimáticamente a menos que esté desnaturalizada, el tratamiento con PNGasa F da como resultado la desglucosilación parcial de la gp120 plegada de forma natural. No obstante, la reactividad de cada grupo de anticuerpos puede diferir en que la desglucosilación parcial de gp120 mediante PNGasa F puede disminuir la actividad de unión de los anticuerpos AbV1-9. Se llevan a cabo experimentos similares con YU-2 gp120 tratado con Endo H, que escinde N-polisacáridos de alto contenido en manosa, pero no de tipo complejo, y puede afectar la unión de otros anticuerpos más que los anticuerpos AbV1-9.

Una micromatriz de N-polisacáridos puede revelar que varios anticuerpos AbV1-9 muestran una unión detectable a varios N-polisacáridos mono o bi-antennarios de tipo complejo. Los experimentos de mapeo de epítomos se realizan con dos miembros representativos de cada grupo mediante ELISA de competición. Los anticuerpos pueden mostrar competencia cruzada. Para mapear aún más los epítomos dirigidos, se usan anticuerpos anti-gp120 que reconocen la corona del bucle V3, los Cd4b, el sitio de unión del correceptor, una constelación de N-polisacáridos de alto contenido en manosa (2G12), o el bucle V3 y los polisacáridos N unidos en las posiciones 301 y 332. Los anticuerpos de corona anti-V3 pueden inhibir la unión de algunos de estos anticuerpos, pero no de otros.

EJEMPLO 9: Neutralización amplia y potente del VIH

Para evaluar la actividad neutralizante de las variantes de AbV1-9, se prueba su capacidad para inhibir la infección por VIH de las células TZM-bl usando cepas víricas que incluyen R1166.cl, que carece de PNGS en la posición 332 de gp120. Las variantes de AbV1-9 neutralizan los pseudovirus y ninguna neutraliza el control. La actividad neutralizante se correlaciona con la afinidad por el pico del VIH. Una versión representativa de la línea germinal (GL) del clonotipo de anticuerpo PGT 121/10-1074 no puede unirse a g 120/g 140 ni neutralizar ningún virus en el panel, lo que implica que se requiere una mutación somática para la unión y la neutralización. El emparejamiento de cadenas ligeras GL con cadenas pesadas mutadas no rescata la unión o la neutralización, lo que sugiere que ambas cadenas mutadas contribuyen al ensamblaje adecuado del paratopo de anticuerpos.

Los siguientes ensayos se llevan a cabo para comparar las actividades de neutralización de AbV1-9 con un panel extendido de pseudovirus difíciles de neutralizar. Como se esperaba, la mayoría de los virus con cambios de aminoácidos en las posiciones 332 y/o 334 de gp120 (que abarcan los PNGS Asn332-X-Ser334/Thr334) son resistentes a la neutralización. La mutación en este PNGS representa la mayoría de los virus resistentes a la neutralización. Se observan actividades de neutralización comparables para las formas IgG y Fab de AbV1-9, lo que sugiere que la bivalencia no es crítica para su actividad.

Para evaluar el posible papel de los N-polisacáridos de tipo complejo en la envoltura del VIH en la neutralización por AbV1-9, los viriones con alto contenido de manosa se producen de dos maneras diferentes: mediante el ensamblaje de pseudovirus en células tratadas con kifunensina, lo que da como resultado polisacáridos unidos a N Man₉GlcNAc₂, o mediante el ensamblaje en células HEK 293 S GnT1^{-/-}, lo que da como resultado polisacáridos unidos a N Man₅GlcNAc₂. AbV1-9 neutraliza 2 de 3 cepas procedentes de kifunensina de manera equivalente a sus contrapartes producidas en células de tipo silvestre. Dos cepas víricas producidas en células GnT1^{-/-} son tan sensibles a AbV1-9 como sus contrapartes producidas en células de tipo silvestre. De acuerdo con informes anteriores de que los N-polisacáridos de tipo complejo protegen parcialmente el sitio de unión de CD4 de la unión de anticuerpos, los virus producidos en las células GnT1^{-/-} son más sensibles a los anticuerpos de sitio de unión de CD4.

EJEMPLO 10 - VIH-1 de nueva transmisión

La actividad de AbV1-9 contra los virus fundadores transmitidos se prueba evaluando la neutralización en un ensayo basado en células mononucleares de sangre periférica (PBMC) usando virus del subtipo B aislados de una cohorte de individuos que seroconvirtieron entre 1985 y 1989 (histórico, n = 14) o entre 2003 y 2006 (contemporáneo, n = 25). Los AbV1-9 se comparan con bNAb anti-CD4bs y otros bNAb, incluidos VRCO1, PG9/PG16, b12, 2G12, 4E10 y 2F5. Los análisis de agrupamiento de la actividad de neutralización dividieron la segregación en dos grupos; un grupo contiene los neutralizadores del VIH más activos, incluidos los anticuerpos anti-CD4bs y PG9. Los AbV1-9 muestran una potencia de neutralización excepcional en este panel de virus del subtipo B.

EJEMPLO 11 - Estructuras cristalinas de AbV1-9 y GL

Para investigar los determinantes estructurales de las diferencias entre los anticuerpos AbV1-9, se determinan las estructuras cristalinas de los fragmentos Fab de AbV1-9 y un precursor representativo de la línea germinal (GL). La superposición de los dominios variables de cadena pesada y ligera (V_R y V_L) entre los tres Fab muestra la conservación de la estructura de la cadena principal, con diferencias limitadas a pequeños desplazamientos de los bucles CDRH3 y CDR3 de los Fab maduros por afinidad en relación con GL.

Las comparaciones se realizan con la estructura de los anticuerpos que reconocen los polisacáridos unidos Asn332_{gp120} y Asn301_{gp120} y V3 y se resuelve como un complejo con un dominio externo/bucle V3 mini de gp120 expresado en células que no pueden producir proteínas modificadas con N-polisacáridos de tipo complejo.

EJEMPLO 12 - Estructura cristalina del complejo AbV1-9-polisacárido

Las estructuras de AbV1-9 asociadas con un polisacárido biantenal sialilado de tipo complejo se resuelven utilizando cristales obtenidos en condiciones que incluyen NA2.

EJEMPLO 13 - La sustitución de los restos de anticuerpos en contacto con polisacáridos afecta la neutralización

Para evaluar las contribuciones de los restos de contacto de N-polisacáridos de tipo complejo identificados a partir de las estructuras AbV1-9 unidas a ligando, se generan anticuerpos mutantes diseñados para intercambiar los restos de contacto de polisacáridos de tipo complejo. Los anticuerpos glucomanipulados exhiben una afinidad aparente de tipo casi silvestre por YU-2 gp120/gp140, medida mediante SPR, lo que demuestra que las sustituciones no destruyen la unión a una espícula de envoltura procedente de una cepa vírica neutralizada por ambos AbV1-9. A diferencia de AbV1-9 de tipo silvestre, AbV1-9_{GM} no muestra unión a polisacáridos en experimentos de micromatrices. A continuación, se usa un ensayo basado en TZM-bl para comparar la neutralización de los anticuerpos de tipo salvaje y los glucomanipulados. Se prueban las cepas víricas.

EJEMPLO 14 - Transferencia pasiva de AcM neutralizantes anti-VIH-I in vivo

Se administran anticuerpos monoclonales anti-VIH neutralizantes AbV1-9 a macacos de la India y se los expone intrarrectalmente 24 h más tarde con cualquiera de los dos VIHs diferentes. Al combinar los resultados obtenidos de 60 animales expuestos, el título de neutralización protectora en plasma que previene la adquisición del virus en el 50 % de los monos expuestos es aproximadamente 1:100.

Experimentos animales

Los macacos de uso en este estudio son negativos para el alelo MHC de clase I Mamu-A*01. La construcción mediante mutagénesis por PCR de SHIVDH12-V3AD8 trópico R5, con cebadores correspondientes a las mitades en 5' y 3' de SHIVAD8EO se emplea para introducir estas secuencias V3 en el antecedente del clon molecular pSHIVDH12_CL7, usando ADN polimerasa PFX de platino (Invitrogen). Después de la purificación en gel, el producto de PCR se trata con polinucleótido cinasa T4 (GibcoBRL) y se liga con extremos romos, que se usa para transformar células competentes.

Virus

Las reservas de virus se preparan transfectando primero células 293T con los clones moleculares SHIVAD8EO o SHIVDH12-V3AD8 usando Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA). Los sobrenadantes de cultivo se recogen 48 h más tarde y las alícuotas se almacenan a -80 °C hasta su uso. Las PBMC de macaco estimuladas con concanavalina A (2×10^6 células en 500 μ l) se infectan con sobrenadantes celulares transfectados mediante inoculación por centrifugación durante 1 h, se mezclan con el mismo número/volumen de PBMC activadas, y los cultivos se mantienen durante al menos 12 días con reemplazo diario del medio de cultivo. Las muestras del medio de sobrenadante se agrupan alrededor de los tiempos de producción máximos de RT para preparar reservas de virus individuales.

Anticuerpos

Se aíslan y producen once anticuerpos monoclonales (VRCOI, NIH45-46, 45-46G54W, 45-46m2, 3BNC117, 12A12, 1NC9, y 8ANC195, 10-1074, PGT121 y PGT126). DEN3, un anticuerpo monoclonal IgG1 humano específico para el virus del dengue NS1, o IgG humana de control se usan como anticuerpos de control negativo en este estudio. Los anticuerpos monoclonales para seleccionar la transferencia pasiva previa a la exposición se administran por vía intravenosa 24 h antes de la exposición al virus.

Cuantificación de los niveles de ARN vírico en plasma

Los niveles de ARN viral en plasma se determinan mediante PCR de transcripción inversa en tiempo real (sistema de detección de secuencia ABI Prism 7900HT; Applied Biosystems).

Concentraciones de anticuerpos en plasma

Las concentraciones de anticuerpos monoclonales administrados en plasma de mono se determinan mediante un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) utilizando HIV-1JRFL gp120 recombinante (Progenies Pharmaceuticals) o HIVIIB (Advanced Biotechnology Inc.). En resumen, las placas de microtitulación están recubiertas con HIV-1 gp120 (2 µg/ml) y se incuban durante la noche a 4 °C. Las placas se lavan con PBS/Tween-20 al 0,05 % y se bloquean con BSA al 1 % (vol/vol). Después del bloqueo, la dilución en serie de anticuerpos o muestras de plasma se añaden a la placa y se incuban durante 1 hora a temperatura ambiente. La unión se detecta con fragmentos F(ab)₂ de cabra anti-IgG humana acoplados a fosfatasa alcalina (Pierce) y se visualiza con SIGMAFAST OPD (Sigma-Aldrich). La semivida de descomposición de los anticuerpos monoclonales neutralizantes se calcula mediante una fórmula de descomposición exponencial única basada en las concentraciones plasmáticas que comienzan el día 5 o el día 7 después de la administración de anticuerpos.

Ensayos de neutralización

La potencia *in vitro* de cada AcM y la actividad de neutralización presente en las muestras de plasma recogidas de macacos de la India se evalúan mediante dos tipos de ensayos de neutralización; 1) Ensayo de entrada TZM-bl con virus de exposición pseudotipado o un ensayo de replicación de PBMC de 14 días con virus competentes en replicación. Para el ensayo TZM-bl, se incuban muestras de AcM o plasma diluidas en serie con virus pseudotipados, que expresan el gen env procedente de SHIVAD8EO o SHIVDH12_V3AD8 y se preparan mediante transfección conjunta de células 293T con vectores pNLenvl y pCMV que expresan las proteínas de envoltura respectivas. El título de dosis inhibitoria de neutralización al 50 % (CI₅₀) se calcula como la dilución que causa una reducción > del 50 % en las unidades relativas de luminiscencia (URL) en comparación con los niveles en los pocillos de control de virus después de la sustracción de las URL de control celular. El fenotipo de neutralización (niveles) del clon molecular SHIVDH12_V3AD8 se determina mediante el ensayo de células TZM-bl utilizando muestras de plasma de un estudio de cohorte, que exhibe una amplia gama de actividades neutralizantes contra el subtipo B del VIH-1.

Determinaciones de títulos protectores de animales y análisis estadísticos.

Se realiza el cálculo del título neutralizante en plasma frente a cada R5 VIHS, que da como resultado la prevención de la adquisición del virus de un 50 u 80 % de los animales expuestos al virus. La regresión probit se usa para modelar la relación entre los títulos en plasma requeridos para conferir inmunidad esterilizante *in vivo* usando todos los monos inmunizados pasivamente, con valores p de este modelo basados en pruebas de coeficiente de verosimilitud. Los títulos de plasma necesarios para diferentes niveles de protección *in vivo* (33 %, 50 %, 80 %, 90 % y > 95 %) se determinan a partir de las estimaciones del modelo probit y el método de muestreo con reposición se utiliza para construir intervalos de confianza > 90 %.

El protocolo para los experimentos de transferencia pasiva es administrar cantidades decrecientes de AcM neutralizantes por vía intravenosa y exponer a los animales por vía intrarrectal 24 h más tarde. El objetivo es bloquear la adquisición de virus, junto con el conocimiento de que las administraciones repetidas de AcM anti-VIH humanizados a macacos individuales podrían reducir su potencia y/o posiblemente inducir respuestas anafilácticas, eligiéndose una dosis de provocación VIHS de tamaño suficiente para establecer una infección *in vivo* después de una única inoculación.

Como control para el primer experimento de transferencia pasiva, se administra por vía intravenosa un AcM anti-IgG1 del virus dengue NS1 a los animales, que se exponen con SHIVAD8EO 24 horas después. VRCO1 es el primer AcM neutralizante anti-VIH-1 probado para la protección contra la adquisición de virus y se administra a dos macacos a una dosis de 50 mg/kg. Uno (DEGF) de los dos macacos inoculados está completamente protegido de la exposición a SHIVAD8EO. El otro receptor de 50 mg/kg de VRCO1 (DEH3) se infecta, pero la viremia plasmática máxima. Dos macacos adicionales reciben cantidades más bajas (20 mg/kg) de VRCO1 y no están protegidos de la exposición a SHIVAD8EO. La capacidad de los AcM VRCO1 y AbV1-9 para bloquear la adquisición de SHIVDH12-V3AD8 se evalúa de manera similar.

Las muestras de plasma recolectadas en varios momentos de macacos transferidos pasivamente se analizan mediante ELISA VIH-1 gp120 para determinar las concentraciones de AcM neutralizantes. En general, las concentraciones plasmáticas de cada AcM en el momento de la exposición (24 h después de la administración de anticuerpos) se correlacionan con la dosis de anticuerpo administrada.

Los títulos de neutralización se miden en muestras de plasma recogidas 24 h después de la administración de AcM cuando los macacos se exponen con SHIVAD8EO o SHIVDH12-V3AD8. Luego se calculan los títulos de neutralización medidos en plasma necesarios para prevenir la adquisición del virus en el 50 % de los monos expuestos.

EJEMPLO 15 - Administración de AcM neutralizantes a modelos *in vivo* de VIH infectados crónicamente

Las actividades de neutralización de los AcM neutralizantes de acción amplia contra SHIVAD8EO se determinan

inicialmente en el sistema celular TZM-bl contra SHIVAD8EO. Sus capacidades para bloquear la adquisición del virus o para controlar la viremia plasmática en animales infectados crónicamente expuestos con el SHIVAD8EO trópico R5 se evalúan monitoreando las cargas víricas plasmáticas y los ácidos nucleicos víricos asociados a las células; los niveles de subconjuntos de linfocitos T CD4⁺ se miden mediante citometría de flujo. Análisis de SGA de variantes víricas circulantes y la determinación de los niveles de anticuerpos en plasma. La concentración plasmática de NAb se determina midiendo la actividad neutralizante contra las preparaciones de pseudovirus VIH-1 solo susceptibles a 10-1074 o 3BNC117.

EJEMPLO 16 - Preparación de la biblioteca de secuenciación 454

La transcripción inversa se realiza con 10 µl de ARN total y 2 µl de mezcla de cebador RT (50 µM de oligo-dT y 25 µM de hexámero aleatorio). La mezcla se calienta a 95 °C durante 1 min, 65 °C durante 5 min, luego se enfría en hielo durante 1 min. Para cada reacción, se prepara una mezcla con 4 µl de tampón 5x FS, 1 µl de mezcla dNTP 10 mM, 1 µl de DTT 0,1 M, 1 µl de inhibidor de RNasa (Enzymatics) y 1 µl de SuperScript III RT (Invitrogen). Esta mezcla se añade a la reacción y se incuba a 25 °C durante 10 min, 35 °C durante 5 min, 55 °C durante 45 min y 85 °C durante 5 min. El híbrido de ARN/ADN se elimina mediante la adición de 4 µl de RNasa H de E. coli (Enzymatics). Las reacciones de PCR se ensamblan utilizando 13,75 µl de agua, 5 µl de ADNc, 5 µl de tampón 5x HF, 0,5 µl de dNTP 10 mM, 0,25 µl de cada cebador de reserva 100 µM y 0,25 µl de Phusion Hot Start. La reacción se cicla a 98 °C (60s), 24 ciclos de 98 °C (10s), 62 °C (20 s) y 72 °C (20 s), con una extensión final a 72 °C (5 min). Las muestras se purifican en una columna QIAquick y se procesan en un gel E de agarosa al 2 %. Las bandas deseadas se purifican usando el kit de extracción en gel Qiagen MinElute, se eluyen dos veces con 10 µl de tampón EB y se cuantifican en un bioanalizador 2100. Las muestras se envían a SeqWright para la secuenciación 454, que se realiza según las instrucciones del fabricante.

EJEMPLO 17 - Ensayos de producción y neutralización de pseudovirus

Para producir pseudovirus, los plásmidos que codifican Env se cotransfectan con un plásmido genómico de cadena principal deficiente en Env (pSG3ΔEnv) en una relación 1:2 con el reactivo de transfección Eugene 6 (Promega). Los pseudovirus se cosechan 72 horas después de la transfección para su uso en ensayos de neutralización. La actividad neutralizante se evalúa usando una única ronda de ensayo de replicación de pseudovirus y células diana TZM-bl, como se ha descrito previamente.

EJEMPLO 18 - Especímenes humanos

Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) se obtienen del donante 17, un donante infectado con VIH-1 de una cohorte. Todas las muestras humanas se recolectan con consentimiento informado bajo protocolos clínicos aprobados por la junta de revisión institucional correspondiente.

EJEMPLO 19 - Clasificación celular y extracción de ARN

Los viales congelados de 10x10⁶ PBMC se descongelan y se lavan antes de teñir con anti-CD3 (UCHT1) marcado con Pacific Blue, anti-CD 14 (M5E2) marcado con Pacific Blue, anti-CD 19 (HIB19) marcado con FITC, antiCD10 (Hi10a) marcado con PE-Cy5, anti-CD27 (M-T271) marcado con PE y anti-CD21 (B-ly4) marcado con APC, todos de BD Biosciences. Las clasificaciones se realizan en un BD FACSARIA de alta velocidad en el tampón de lisis miRVana (Ambion). Los linfocitos B inmaduros, la memoria similar a un tejido agotado, los linfocitos B maduros activados, los linfocitos B de memoria en reposo y los plasmablastos periféricos de corta duración se tiñen con marcadores³¹ descritos previamente. El ARN total de las células se extrae luego utilizando el kit de extracción de ARN miRVana (Ambion) de acuerdo con las instrucciones del fabricante y se cuantifica en un bioanalizador 2100 (Agilent).

EJEMPLO 20 - Expresión y purificación de anticuerpos y proteínas

Las secuencias de anticuerpos se sintetizan y clonan en vectores de cadena pesada y ligera descritos anteriormente. Los plásmidos se transfectan conjuntamente (proporción 1:1) en células HEK 293T o 293 FreeStyle usando Eugene 6 (Promega) o 293fectin (Invitrogen), respectivamente. Las transfecciones se realizan de acuerdo con el protocolo del fabricante y los sobrenadantes de anticuerpos se cosechan cuatro días después de la transfección. Los anticuerpos producidos en células 293T se cuantifican mediante ELISA y se usan directamente en ensayos de neutralización. Los anticuerpos producidos en células 293 FreeStyle se purifican adicionalmente sobre una columna de proteína A. Las mutaciones se introducen mediante mutagénesis dirigida al sitio utilizando el kit de mutagénesis dirigida al sitio QuikChange (Stratagene). Las proteínas gp120 recombinantes se transfectan en células 293 FreeStyle usando 293fection (Invitrogen) y se purifican con columna de lectina de *Galanthus nivalis* seguida de exclusión por tamaño usando Superdex 300 26/60 (GE Healthcare).

EJEMPLO 21 - Ensayos de unión a la superficie celular

Se añaden cantidades de titulación de AcM a las células 293T transfectadas con Env de VIH-1 y se incuban durante 1 hora a 4 °C en 1x PBS. Después del lavado, las células se fijan con PFA al 2 % (PolySciences) durante 20 minutos

a temperatura ambiente. Las células se lavan y se tiñen luego con una dilución 1:200 de F(ab')₂ de cabra anti-IgG humana (Jackson) conjugada con ficoeritrina durante 1 hora a temperatura ambiente. La unión se analiza mediante citometría de flujo. Las competiciones de unión se realizan titulando cantidades de anticuerpos monoclonales competidores antes de añadir el anticuerpo biotinilado a una concentración requerida para dar Cl₇₀ y luego midiendo la unión con estreptavidina marcada con ficoeritrina (Invitrogen). El programa informático FlowJo se utiliza para la interpretación de datos.

EJEMPLO 22 - Ensayos ELISA

Se realiza la unión mediante ELISA. En resumen, las placas se recubren con Fc de cabra anti-IgG humana (Pierce) o con gp120 y la unión se detecta usando F(ab')₂ de cabra anti-IgG humana conjugado con fosfatasa alcalina (Pierce). Para la unión a gp120 extraída de viriones lisados, las placas se recubren con 5 ng/μl de anticuerpo anti-gp120 D7324 de oveja (reactivos Aalto Bio). Los sobrenadantes de virus se lisan usando una concentración final de NP-40 al 1 % y se incuban en placas recubiertas durante 2 horas a 37 °C. La detección se mide utilizando F(ab')₂ de cabra anti-IgG humana conjugado con fosfatasa alcalina (Pierce). La concentración de anticuerpos se calcula mediante regresión lineal usando una curva de concentración estándar de proteína IgG purificada.

EJEMPLO 23 - Expresión, purificación, cristalización y análisis por difracción de rayos X de Fab de línea germinal de AbV1-9

Los Fab de línea germinal de AbV1-9 se producen en células HEK 293T y se purifican. En resumen, tres días después de la transfección con los genes de cadena pesada y ligera, se cosechan los medios de expresión y se purifica el Fab secretado mediante una matriz de afinidad de anticadena ligera λ humana (CaptureSelect Fab λ; BAC), seguido de cromatografía de intercambio catiónico y cromatografía de exclusión por tamaño. Los cristales de calidad de difracción de rayos X se obtienen en condiciones que contienen acetato de magnesio 0,2 M, PEG 8000 al 20 % p/v, cacodilato de sodio 0,1 M, pH 6,5. Antes de montar y congelar rápidamente los cristales en nitrógeno líquido, las aguas madres se complementan con glicerol al 20 % para crioprotección. Se recopila un conjunto de datos completo. El procesamiento de datos se realiza utilizando XDS. La estructura de la línea germinal PGT121 se resuelve utilizando PHASER en los grupos espaciales P212121 con la estructura Fab PGT123 como modelo de búsqueda. El perfeccionamiento se realiza usando una combinación de PHENIX y COOT.

EJEMPLO 24 - Procesamiento de datos sin procesar: alineamiento de VDJ y definición de clon

Los datos de secuencia sin procesar se procesan utilizando herramientas internas escritas en Python. Las lecturas se dividen en códigos de barras, se filtran por tamaño y se alinean con la base de datos de referencia VDJ de línea germinal de IMGT. La puntuación se mantiene baja para las secuencias que están muy altamente mutadas. La región V se alinea primero, luego se elimina, seguido de J, luego se elimina, seguido de D. Luego se extrae la secuencia CDR3 definida por IMGT de cada lectura. Las secuencias CDR3 se ordenan por abundancia y se agrupan con USEARCH5.1. Finalmente, cada secuencia CDR3 se alinea con las secuencias de anticuerpos diana de AbV1-9 para determinar un valor de divergencia de estos anticuerpos.

EJEMPLO 25 - Identificación y análisis de variantes de anticuerpos

Las gráficas de divergencia-mutación se usan como una herramienta para identificar lecturas que son similares a los anticuerpos conocidos. Los grupos de secuencias de alta identidad y los grupos que están por encima del antecedente se identifican manualmente y se usan como entrada para una inferencia de filogenia con Immunitree. Immunitree implementa un modelo bayesiano de hipermutación somática de clones, que incluye modelos probabilísticos de SHM y error de secuenciación, y realiza la cadena de Markov Monte Carlo sobre la estructura de árbol, tiempos de nacimiento/muerte de los subclones, tasas de error de nacimiento/muerte, mutación y secuenciación, secuencias de consenso de subclones y asignación de lecturas a nodos. La estructura de árbol también se utiliza para cálculos múltiples y para superponer información diferente. La presión de selección que ha experimentado un nodo dado se estima utilizando el algoritmo BASELINE. Realiza una estimación bayesiana de la presión de selección comparando el número observado de mutaciones de reemplazo/silicio en las CDR/FWR de la secuencia consenso del nodo.

EJEMPLO 26 - Recuperación de pares conocidos V_HV_L de baja frecuencia a partir de un controlador élite de VIH

Como una validación adicional de la sensibilidad y precisión del emparejamiento del ensayo, se procesó una muestra en la que ya se conocen públicamente varios emparejamientos V_HV_L nativos raros (< 1 célula en 10.000). Se obtuvieron linfocitos B periféricos de un paciente controlador de élite del VIH cuyos linfocitos B de memoria se han extraído en gran medida en los últimos años por anticuerpos que muestran actividad de neutralización del VIH. Se procesaron 350.000 linfocitos B para generar un total de 38.620 pares de V_HV_L filtrados. De forma interesante, este individuo mostró una mayor proporción de IgG que la muestra sana anterior (Figura 7A) o los repertorios de linfocitos B periféricos sanos típicos. Las secuencias V_H de este conjunto de datos se compararon con todos los anticuerpos ampliamente neutralizantes (bNAb) informados de este individuo, incluido PGT121, y encontraron ocho secuencias V_H cercanas o idénticas, lo que indica que esta familia de bNAb representa menos del 0,03 % de los linfocitos B

circulantes. Crucialmente, todas las cadenas ligeras emparejadas con estas cadenas pesadas eran del linaje de bNAb esperado y similarmente raro, mostrando la misma reordenación Igλ-V3-21/J3 y la inserción de triple codón distintivo como se informó anteriormente, lo que respalda la alta precisión y sensibilidad del método. Además, en un árbol filogenético de todos los pares de V_HV_L similares a PGT121 conocidos y recientemente generados a partir de este individuo (FIG. 7B), los árboles V_H y V_L muestran una topología sorprendentemente similar con secuencias V_H y V_L emparejadas que ocupan posiciones similares a espejos, probablemente reflejando la historia filogenética compartida. Los pares de variantes descubiertos en el presente documento encajan bien con esta regla. De forma interesante, dos anticuerpos PGT122 y PGT123 publicados aparecen como excepciones; no se encontró soporte para estos dos emparejamientos, sino que se encontraron pares similares PGT122V_H:PGT123V_L y PGT123V_H:PGT122V_L, abordando el emparejamiento no verificado en el informe original. El ADN que codifica las regiones V(D)J completas de 8 nuevos pares de V_HV_L similares a PGT se sintetizaron, expresaron los anticuerpos como IgG completa y probaron su capacidad para neutralizar múltiples pseudocepas de VIH (Figura 7C). Los anticuerpos se expresaron bien y todos mostraron una fuerte actividad neutralizante contra el virus, lo que demuestra la utilidad del enfoque en la generación rápida de variantes de anticuerpos funcionales emparejados de forma nativa a partir de una muestra biológica relevante.

EJEMPLO 27 - Muestras humanas

La muestra de sangre para la validación del repertorio saludable se recolectó bajo la aprobación del Proyecto Genoma Humano. Las PBMC para el experimento de VIH bNAb se obtuvieron del donante 17, un donante infectado con VIH-1 de la cohorte G del Protocolo IAVI. Todas las muestras de VIH humanas se recolectaron con consentimiento informado por escrito bajo protocolos clínicos aprobados por el Comité Nacional de Ética de la República de Ruanda, la Junta de Revisión Institucional de la Universidad Emory, el Comité de Ética de Investigación de la Universidad de Zambia, el Comité de Ética de Investigación de Charing Cross, el Comité de Ética y Ciencia de UVRI, el Comité de Ética de Investigación de la Universidad de Nueva Gales del Sur. El Hospital de San Vicente y Servicio de Salud del Área del Este de Sydney, el Comité de Ética e Investigación del Hospital Nacional Kenyatta, el Comité de Ética de Investigación de la Universidad de Ciudad del Cabo, la Junta de Revisión Institucional Internacional, el Comité de Ética de la Universidad Mahidol, la Junta de Revisión Institucional del Instituto de Investigación del Ejército Walter Reed (WRAIR) y el Comité de Costa de Marfil "National d'Ethique des Sciences de la Vie et de la Santé" (CNESVS). El adenocarcinoma de ovario resecado disociado y criopreservado de un solo donante se obtuvo de Conversant Biologics con consentimiento informado por escrito bajo un protocolo aprobado por el IRB.

EJEMPLO 28 - Linfocitos T del receptor antigénico quimérico (CAR) anti-VIH

Los genes para las versiones de fragmentos variables de cadena sencilla (sFv o scFv) anti-VIH de AbV-1-9 se crean mediante la síntesis de secuencias optimizadas por codones para las cadenas pesada y ligera, que están separadas por un enlazador, tal como un enlazador (GGGGS)₃. Para cada anticuerpo anti-VIH, se incluye un gen scFv en un vector que codifica un CAR, tal como uno que codifica un CAR que comprende un dominio de señalización procedente de 4-1BB fusionado con el dominio de señalización CD3 ζ para crear un vector de codificación de CAR anti-VIH, tal como un vector lentivírico. Los linfocitos T primarios CD4⁺ y CD8⁺ se transducen con el vector de codificación de CAR anti-VIH.

Caracterización de linfocitos T que expresan CAR anti-VIH

Los linfocitos T enriquecidos anti-VIH transducidos con CAR se analizan para determinar su capacidad de proliferar en respuesta a las células infectadas con VIH-1. Los linfocitos T anti-VIH transducidos con CAR se marcan con CellTrace Violet y luego se cultivan conjuntamente con células infectadas con VIH-1_{NL4-3} (tales como células Jurkat, SupT1, HEK293T o HeLa). La proliferación de linfocitos T anti-VIH transducidos con CAR se mide mediante citometría de flujo, y se demuestra que aumenta con respecto a los linfocitos T no transducidos.

Los linfocitos T enriquecidos anti-VIH transducidos con CAR se someten a prueba para determinar su capacidad de destruir específicamente a células infectadas por VIH-1. Los linfocitos T anti-VIH transducidos con CAR se analizan en un ensayo de liberación de cromo cuando se cultivan conjuntamente con células diana infectadas con VIH-1. Se mide la lisis específica de las células infectadas con VIH-1, y se muestra que se produce una lisis específica debido a los linfocitos T anti-VIH transducidos con CAR.

Tratamiento con linfocitos T que expresan CAR

Los linfocitos T de un sujeto infectado con VIH se transducen con vectores CAR anti-VIH para expresar CAR anti-VIH. Los linfocitos T anti-VIH transducidos con CAR se administran al sujeto. Las células que expresan el antígeno diana del CAR anti-VIH se destruyen mediante los linfocitos T anti-VIH transducidos con CAR, lo que reduce o elimina la infección por VIH, y/o reduce los síntomas de la misma, en el sujeto.

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que comprende

- 5 (a) una CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 17;
- (b) una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 18;
- (c) una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 19;
- (d) una CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 20;
- (e) una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 21; y
- 10 (f) una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 22.

2. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la reivindicación 1 en donde el anticuerpo o fragmento de anticuerpo comprende

- 15 (a) una secuencia V_H que tiene al menos un 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1; y
- (b) una secuencia V_L que tiene al menos un 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2; preferentemente en donde el anticuerpo o fragmento de anticuerpo comprende
- 20 (a) una secuencia V_H que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1; y
- (b) una secuencia V_L que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2.

3. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde el anticuerpo o fragmento de anticuerpo se une a o es capaz de unirse a un epítipo de N-polisacárido de un VIH con una afinidad de 25 1 nM o menos, tal como se mide usando resonancia de plasmón superficial (SPR).

4. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde el anticuerpo o fragmento de anticuerpo neutraliza o es capaz de neutralizar el VIH, opcionalmente VIH-1, opcionalmente además el grupo M del VIH-1.

5. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde el anticuerpo o fragmento de anticuerpo inhibe la infectividad de dos o más cepas o subtipos de VIH.

6. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde el anticuerpo o fragmento de anticuerpo es un anticuerpo de clase IgG de longitud completa o un fragmento variable de cadena única (scFv).

7. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde el anticuerpo se glucomanipula para modificar los oligosacáridos en la región Fc y en donde el anticuerpo tiene una función efectora de ADCC aumentada en comparación con un anticuerpo no glucomanipulado.

8. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.

9. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde el anticuerpo es un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado o un anticuerpo quimérico.

10. Un ácido nucleico aislado que codifica el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9.

11. Un vector que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 10.

12. Una célula hospedadora que comprende el vector de la reivindicación 11.

13. Un inmunoconjugado que comprende el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9 y un agente terapéutico, opcionalmente un agente antivírico.

14. Una formulación farmacéutica que comprende el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9 y un vehículo farmacéuticamente aceptable y que, opcionalmente, comprende además un agente terapéutico.

15. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-9 o inmunoconjugado de la reivindicación 13 para su uso como medicamento, opcionalmente para neutralizar el VIH o para el tratamiento de la infección por VIH o SIDA.

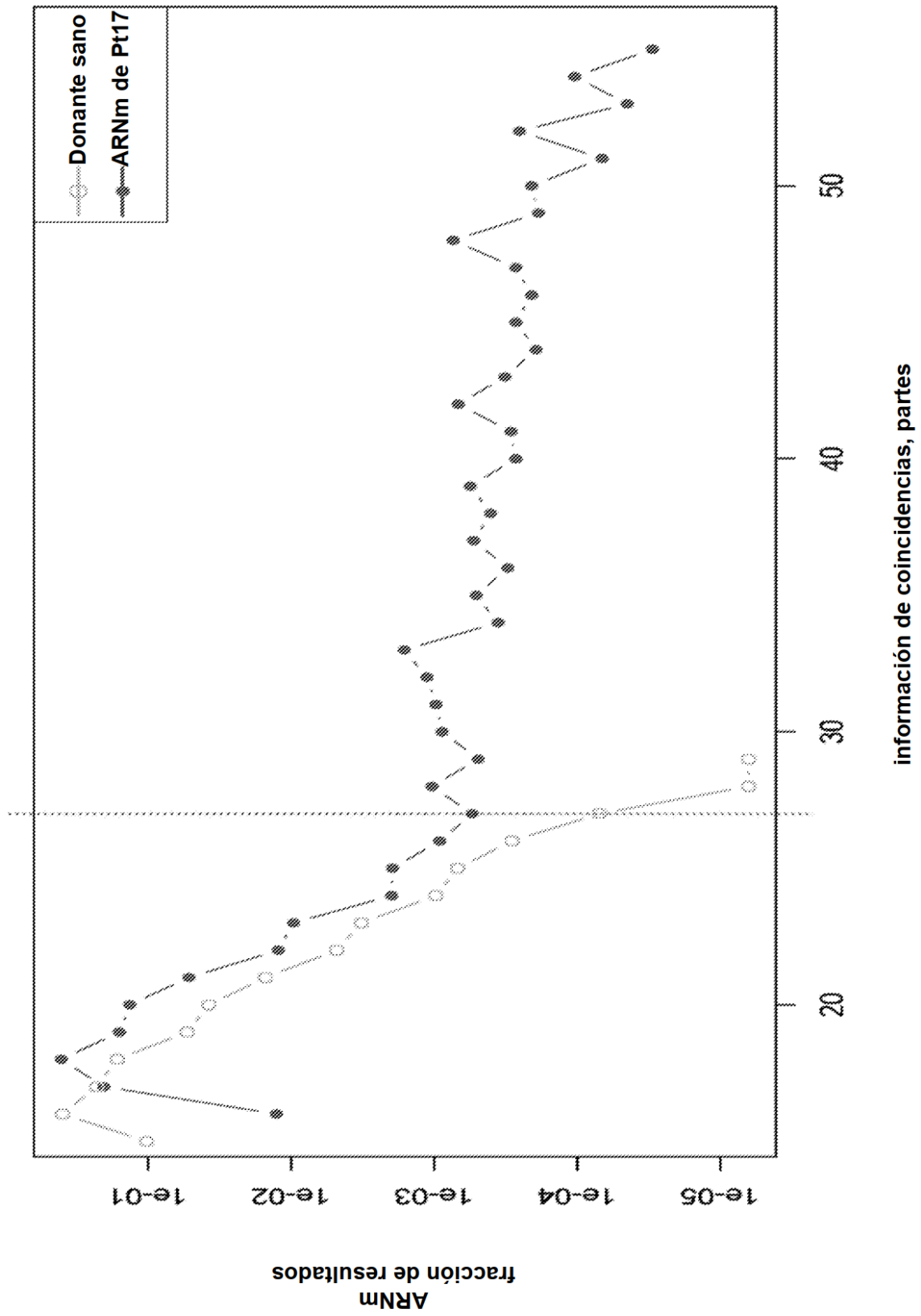


FIG. 1

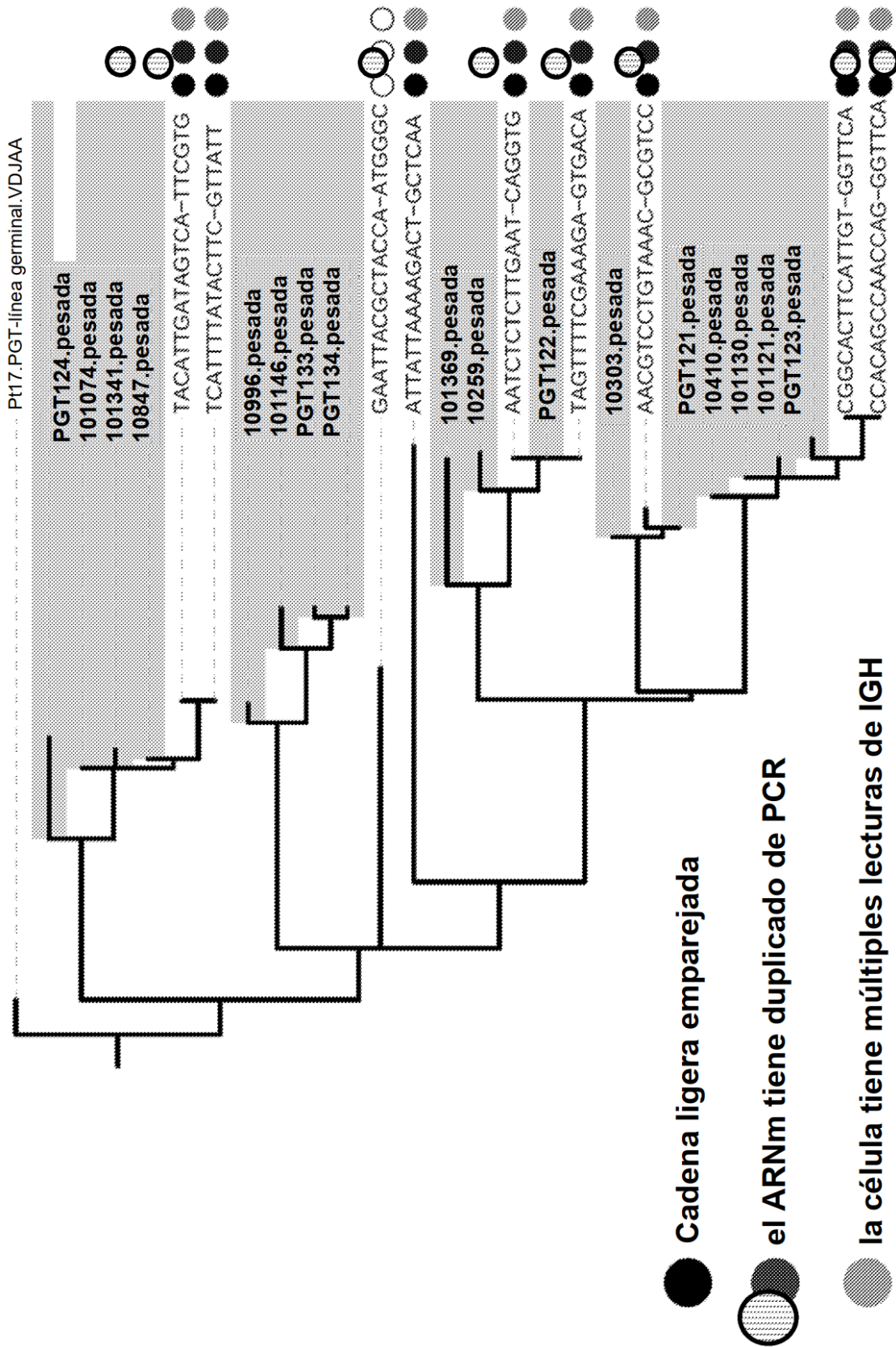


FIG. 2

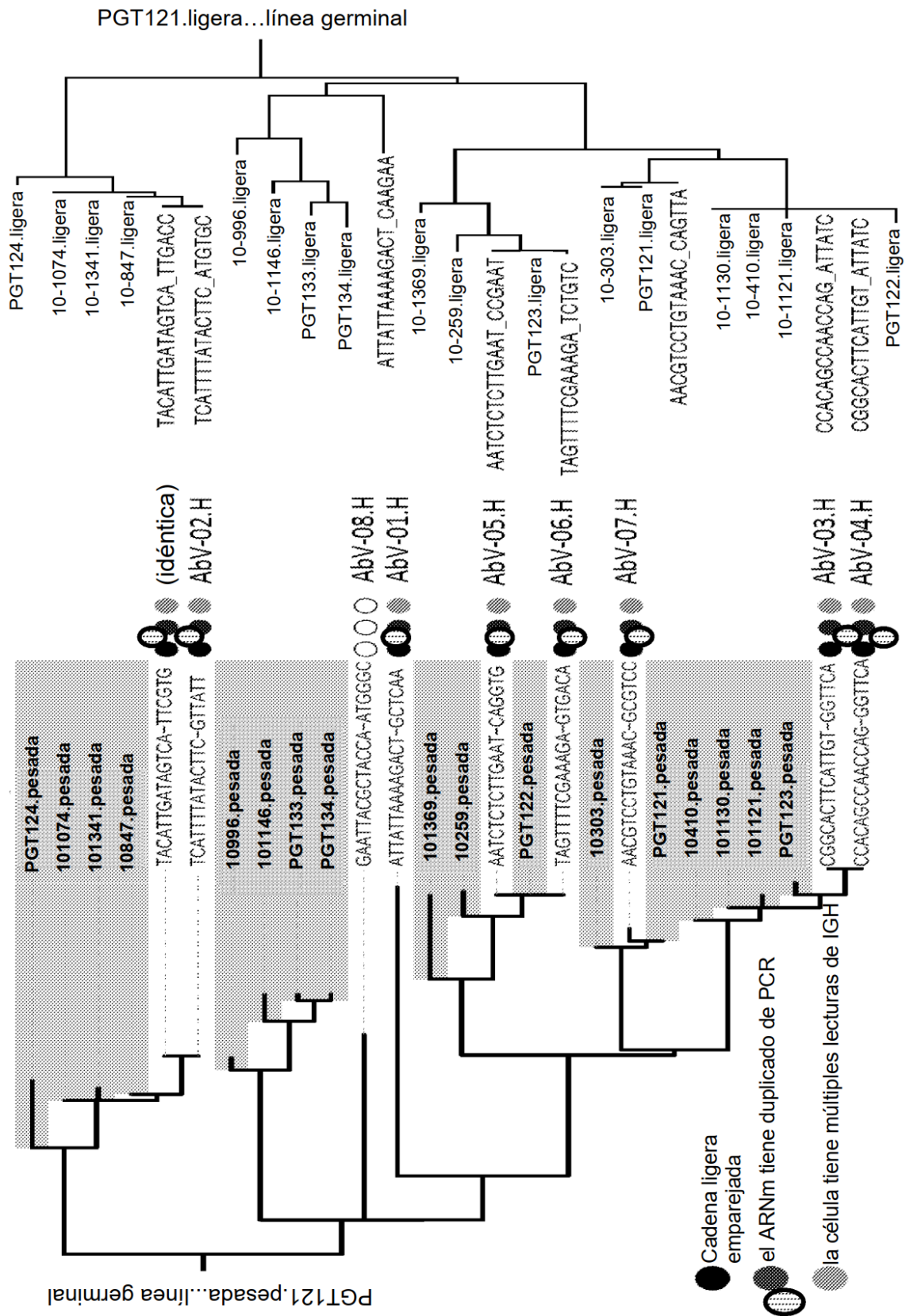


FIG. 3

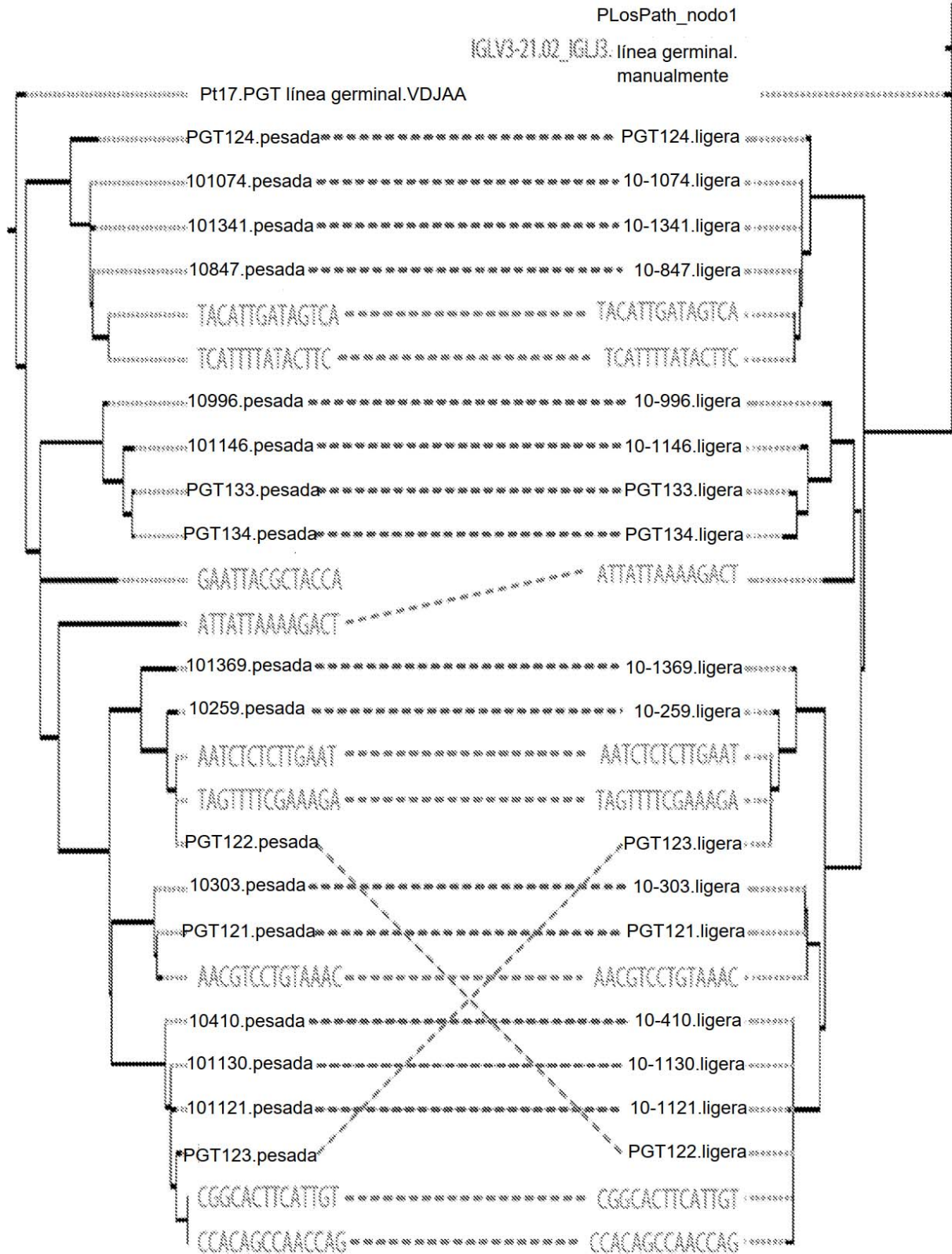


FIG. 4

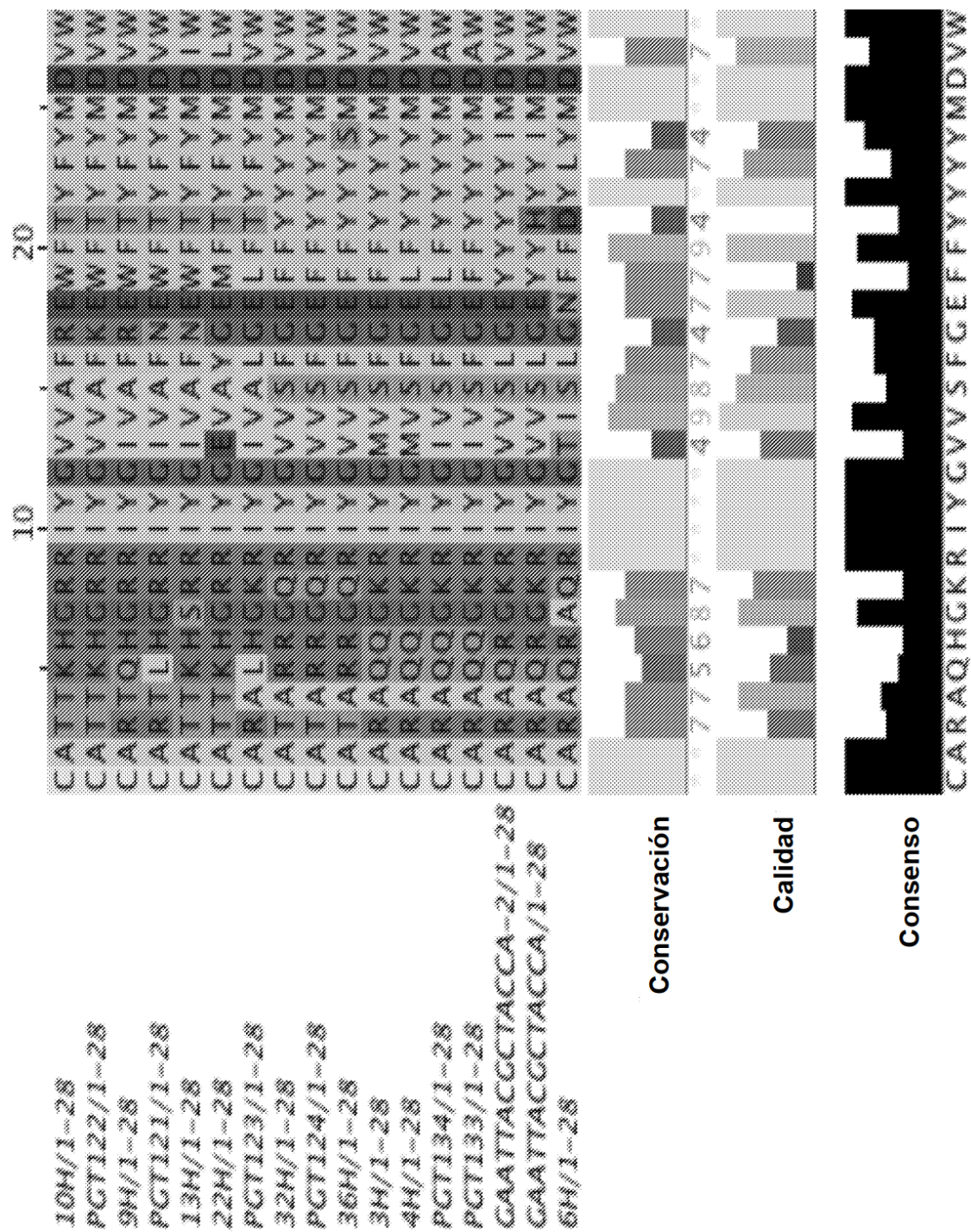


FIG. 5

```

SEQ 69 1 QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSYYWSWIRQPPGKGLEWIGIYYSGSTNYPNPSLKSRVTISVDTSKNQFSL
SEQ 1 1 QMQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGVSNGIWSWIRQSPGKGPPEWGFVSGEY-IEYNPSLKSRLTISRDTSKNQLSL 79
SEQ 3 1 QVQLQESGPGLVKPSSETLSVTCSVSGDSMNYYTWTWIRQSPGKGLEWIGYVSDRASATYNPSLKSRVVISRDTSKNQLSL 80
SEQ 5 1 QLQLQESGPGLVKPPETLSLTCSVSGASINDAYSWIRQSPGKRPEWVGYYHHSGDTNYPNPSLKRRVTFSLDTAKNEVSL 80
SEQ 7 1 QLQLQESGPGLVKPPETLSLTCSVSGASINDAYSWIRQSPGKRPEWVGYYHHSGDTNYPNPSLKRRVTFSLDTAKNEVSL 80
SEQ 9 1 QVHLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGTLVRDNYWSWIRQPLGKQPEWIGYVHDSGDTNYPNPSLKSRVHLSLDSKNLVS 80
SEQ 11 1 QVHLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGTLVRDNYWSWIRQPLGKQPEWIGYVHDSGDTNYPNPSLKSRVHLSLDSKNLVS 80
SEQ 13 1 QMQLQESGPGLVKPSSETLSLTCSVSGASISDSYWSWFRRSPPGKGLEWIGYVHKSGDTNYPNPSLKSRVNLSDASKNQVSL 80
SEQ 15 1 QVHLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGASTSGQYWSWIRQSPGKGLEWIGYRSDSGDANYNPSLKSRVVISLDTSRNQLSL 80
SEQ 16 1 QVQLQESGPGLVKPSSETLSVTCSVSGDSMNYYTWTWIRQSPGKGLEWIGYISDRASATYNPSLNSRVVISRDTSKNQLSL 80

SEQ 69 81 KLSSVTAADTAVYYCARTQQGKRIYGVVSFGDYYYYYMDVWGKGTTVTVSS 132
SEQ 1 80 TLRSVTAADTAMYYCAKTLRARRIYGVIAFGEVYDYHYFDVWGKGTMVTVSS 131
SEQ 3 81 KLNSVTLADTAVYYCATARRGQRIYGEVAFGEFFYYYSMDVWGKGTAVTVSS 132
SEQ 5 81 KLVALTAADSAVYFCARALHGKRIYGTVALGELFVYFHMVDVWGKGTAVTVSS 132
SEQ 7 81 KLVALTAADSAVYFCARALHGKRIYGTVALGELFVYFYMDVWGKGTAVTVSS 132
SEQ 9 81 RLGTVTAADSAIYYCATTKHGRRIYGVVAFKEWFTYFYMDVWGKGTSVTVSS 132
SEQ 11 81 RLGTVTAADSAIYYCATTKHGRRIYGVVAFKEWFTYFYMDVWGKGTSVTVSS 132
SEQ 13 81 SLVAATAADSGKYVCARTLHGRRIYGVAFNEWFTYFYMDVWGNGTQVTVSS 132
SEQ 15 81 NVTSVTTADTAMVFCARAQRGKRIYGVVSLGEYHYHYIMDVWGTGTPVTVSS 132
SEQ 16 81 KLNSVTPADTAVYYCATARRGQRIYGEVSFGEFFYYYSMDVWGKGTAVTVSS 132

```

FIG. 6A

SEQ 70	1	--SYVLTQpps-VSVAPGQTARITCGGNNIGSKSVHWYQQKPGQAPVLVVYDDSDRPSGIPERFSGS---	NSGNTATLTI	74
SEQ 2	1	--TDSVASDV-AMSVAPGDTATISCGEKSNGARAVQYQQKPGQAPVLIYNNQDRPSGIPERFSASPDAGFGTTATLTI		77
SEQ 4	1	---GSVTSFVrPLSVALGETASISGRQALGSRAVQWYQHRPGQAPVLLIYNNQDRPSGIPERFSGTPDINFGTRATLTI		77
SEQ 6	1	HCTGAVSSFV---SVAPGQTARITCGEESLGSRSVIWYQQRPGQAPSLIIYNNDRPSGIPERFSGSPGSTFGTTATLTI		77
SEQ 8	1	HCTGAVSSFV---SVAPGQTARITCGEESLGSRSVIWYQQRPGQAPSLIIYNNDRPSGIPERFSGSPGSTFGTTATLTI		77
SEQ 10	1	HCTASLAS---SMSVSPGETAKISCGKESIGSRAVQWYQQKPGQPPSLIIYNNQDRPAGVPERFSASPDFRPGTTATLTI		77
SEQ 12	1	HCTGSLAS---SMSVSPGETAKISCGKESIGSRAVQWYQQKPGQPPSLIIYNNQDRPAGVPERFSASPDFRPGTTATLTI		77

SEQ 70	75	SRVEAGDEADYYCQVWDSSSDHPWVFGGGTKLTVL	109
SEQ 2	78	SRVEAGDEADYYCHIWDSRFPLSWVFAGGTKLTVL	112
SEQ 4	78	SGVEAGDEADYYCHMWDSRSRGSFSWFGGATRLTVL	112
SEQ 6	78	TSVEAGDEADYYCHIWDSRRPTNWVFEGGTTLTVL	112
SEQ 8	78	TSVEAGDEADYYCHIWDSRRPTNWVFEGGTTLTVL	112
SEQ 10	78	TNVDAAEDEADYYCHIYDARGGTNWVFDRTTTLTVL	112
SEQ 12	78	TNVDAAEDEADYYCHIYDARGGTNWVFDRTTTLTVL	112

FIG. 6B

FIG. 7A

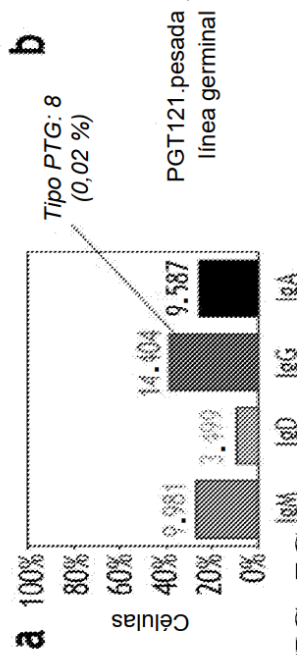


FIG. 7B

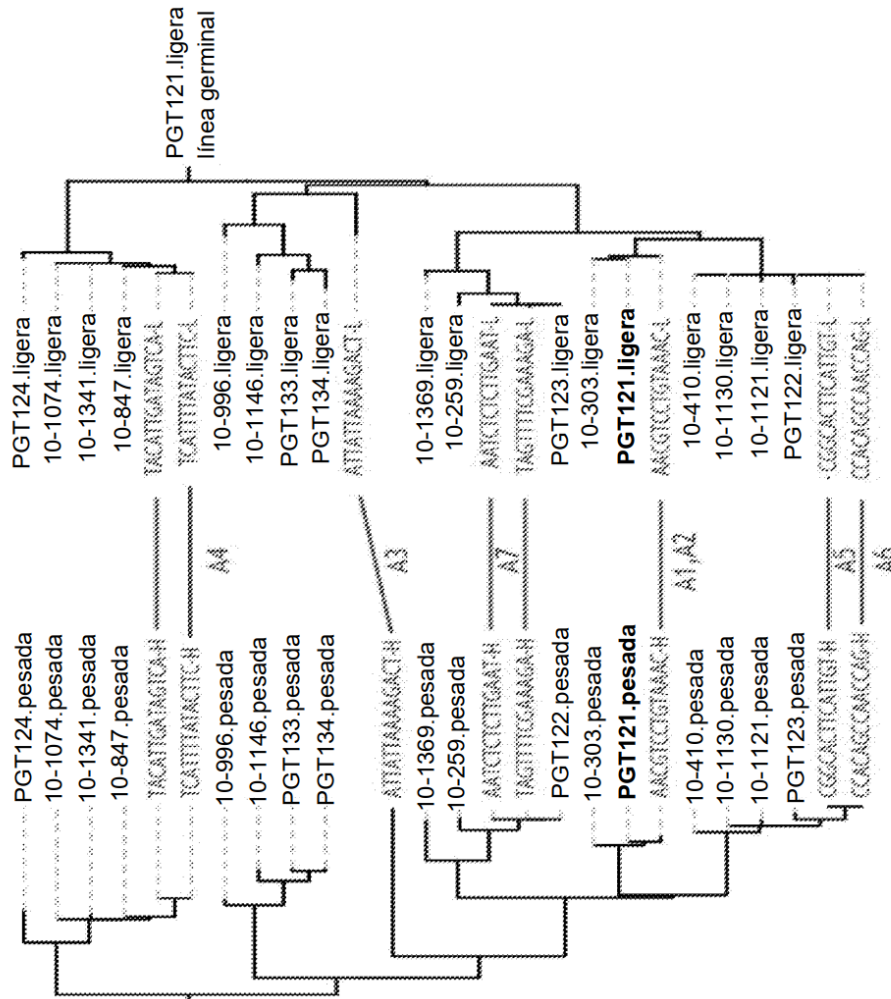


FIG. 7C

C	TS	Cepa de VIH	Anticuerpo							
			PGT121	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7
N332A	BC505	92BR020	0,037	0,019	0,020	0,051	> 10	> 10	0,051	0,006
	92BR020	92BR020	0,001	0,023	0,020	0,047	0,064	> 10	0,015	0,005
	IA VI C22	92BR020	0,001	0,005	0,009	0,015	0,053	0,433	0,014	0,003
	94UG103	92BR020	0,400	0,363	0,255	0,561	> 10	> 10	> 10	0,033
	92TH021	92BR020	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10
	BC505	92BR020	0,052	0,015	0,018	> 10	> 10	> 10	0,019	0,012
	92BR020	92BR020	0,014	0,009	0,018	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10
	IA VI C22	92BR020	0,299	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10
	94UG103	92BR020	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10
	92TH021	92BR020	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10

FIG. 7